

**Entwicklung, Validierung und Anwendung einer Methode
zur Vitamin D-Analytik in Lebensmitteln
mittels LC-MS/MS**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II - Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Diplom-Lebensmittelchemikerin

Nicole Seeburg

geboren am 01. Februar 1985 in Merseburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Marcus Glomb (Halle, Saale)

2. Gutachter: Prof. Dr. Sascha Rohn (Hamburg)

Halle (Saale), 09.07.2014

ABSTRACT

Seeburg

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Analysenmethode zur Bestimmung von Vitamin D und dessen Metaboliten in Lebensmitteln entwickelt.

Die Lebensmittelproben wurden nach Zugabe von isotoopenmarkierten Standards zunächst methanolisch hydrolysiert und mittels kombinierter Festphasenextraktion (Normal- und Reversed-Phase) aufgereinigt und aufkonzentriert. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgt mittels LC-MS/MS im scheduled Multiple Reaction Monitoring-Modus (ESI, positiv).

Die optimierte Methode ermöglichte es Ergosterol, 7-Dehydrocholesterol, Cholecalciferol, Ergocalciferol, 25-Hydroxycholecalciferol, 25-Hydroxyergocalciferol, $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol, $1\alpha,25$ -Dihydroxyergocalciferol sowie (24R)-24,25-Dihydroxycholecalciferol simultan in verschiedenen Lebensmitteln nachzuweisen. Es wurde eine hausinterne Validierung bezüglich des Arbeitsbereichs, analytischer Grenzen, Präzision und Richtigkeit durchgeführt.

Aufgrund der Effizienz und des hohen Probendurchsatzes ist die vorgestellte Methode gut als Screening-Methode im Routinebetrieb einsetzbar. Die Untersuchung von über 650 Lebensmitteln auf ihre Gehalte und Zusammensetzung an Vitamin D ergab, dass Vitamin D₂ und D₃ nur in wenigen Lebensmitteln in nennenswertem Umfang zu finden sind. Die Vorläuferstrukturen Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol treten hingegen recht häufig, insbesondere in fettreichen Produkten auf. Hierbei ist der Gehalt an Ergosterol vermutlich auf die Anwesenheit von Pilzen zurückzuführen. Untersuchte Vertreter der Speisepilze enthielten beträchtliche Mengen des Sterols. Besonders hohe Vitamin D₃-Gehalte wurden in Fisch, insbesondere Hering (essbarer Teil: 30 µg/100 g), *Tilapia*-Filet (20 µg/100 g) und Wildlachs-Filet (11 µg/100 g) ermittelt. Fisch und Fischprodukte stellen damit die bedeutendsten exogenen Vitamin D-Quellen (bis zu 65 %) der deutschen Bevölkerung dar. In geringeren Mengen war Vitamin D₃ in Eigelb (3-4 µg/100 g) und angereicherten Fetten (Margarine: bis zu 7,5 µg/100 g) zu finden. Vitamin D₂ konnte ausschließlich in Speisepilzen, vor allem in Pfifferlingen (20 µg/100 g) bestimmt werden. In Spuren trat es zudem in Weichkäsen auf. Im Bereich Fleisch und Innereien wurden ebenfalls D-Vitamine nachgewiesen. Die Bedeutung von Fleisch für die tägliche Vitamin D-Zufuhr ist auf die hohe Verzehrsmenge zurückzuführen. Dies gilt auch für Milch- und Milcherzeugnisse. Die Relevanz von Vitamin D, das über andere Lebensmittel unter Berücksichtigung der momentanen Ernährungsgewohnheiten der deutschen Bevölkerung aufgenommen wird, ist ernährungsphysiologisch als untergeordnet anzusehen. Basierend auf den vorliegenden Analyseergebnissen wurde eine mittlere Gesamt-Vitamin D-Aufnahme von 2,5 µg/Tag für Männer und 1,9 µg/Tag für Frauen berechnet. Diese Zufuhr liegt deutlich unterhalb der von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfohlenen Menge von 20 µg/Tag. Somit ist die exogene Vitamin D-Aufnahme über die üblichen aus dem Handel stammenden Lebensmittel nicht geeignet, um eine adäquate Versorgung der deutschen Bevölkerung mit Vitamin D sicherzustellen.

ABSTRACT

Seeburg

An analytical method for the determination of vitamin D and its metabolites in food was developed within this work.

Food samples were saponified, purified and concentrated by combined solid-phase extractions (normal- and reversed-phase) after spiking with deuterated internal standards. Identification and quantitation were performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using scheduled multiple reaction monitoring mode (ESI, positive). The optimized method enabled the simultaneous detection of Ergosterol, 7-Dehydrocholesterol, Cholecalciferol, Ergocalciferol, 25-Hydroxycholecalciferol, 25-Hydroxyergocalciferol, 1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol, 1 α ,25-Dihydroxyergocalciferol and (24R)-24,25-Dihydroxycholecalciferol in various food.

An inhouse validation was carried out regarding the working range, analytical limits, precision and accuracy. Due to efficiency and high throughput the presented method is applicable as a screening-method in routine operations.

Analyses of approximately 650 food samples for their content and composition of vitamin D structures verified that vitamin D₂ and D₃ can be found only in very few foods in significant quantities. In contrast, the precursor structures Ergosterol and 7-Dehydrocholesterol were found quite frequently, particularly in products with high fat content. The identification of Ergosterol is probably based on the presence of mushrooms. Selected mushroom samples contained considerable quantities of the sterols. High amounts of vitamin D₃ were found in fish, especially in herring (edible part: 30 μ g/100 g) *tilapia* fillet (20 μ g/100 g) and wild grown salmon fillet (11 μ g/100 g). Thus, fish and fish products represent the main exogen vitamin D sources of the german population with up to 65 %. At lower levels vitamin D₃ was found in egg yolk (3-4 μ g/100 g) and fortified foods like margarine (7.5 μ g/100 g). Vitamin D₂ was identified exclusively in mushrooms with a reference to chanterelles (20 μ g/100 g). Moreover it was verified in trace amounts in soft cheeses.

Vitamin D structures were also found in meat and offal. The significance of meat for the daily intake of vitamin D is based on the high daily portion of consumption. This also applies to milk and milk products. The relevance of vitamin D content of other food is only of negligible importance in regard to the current dietary habits of the german population.

Altogether a mean daily vitamin D intake of 2.5 μ g for men and 1.9 μ g for women was calculated, which is far below the German Nutrition Society (DGE) recommendations of 20 μ g per day. This means that exogen intake by a typical diet is insufficient to ensure an adequate supply of vitamin D for the german population.

Die vorliegende Arbeit ist im Zeitraum von Juli 2010 bis Juli 2013 am Institut für Chemie im Bereich Lebensmittelchemie und Umweltchemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. M. A. Glomb entstanden. Sie war Teil des Verbundprojektes „Vitamin D und kardiovaskuläre Gesundheit -von experimenteller und epidemiologischer Evidenz zu innovativen Lebensmitteln“ (Förder-Nr. 0315668A), welches vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert wurde.

TEILE DIESER ARBEIT WURDEN BEREITS VERÖFFENTLICHT:

Veröffentlichungen

Lietzow, J., Kluge, H., Brandsch, C., Seeburg, N., Hirche, F., Glomb, M., Stangl, G.: Effect of Short-Term UVB Exposure on Vitamin D Concentration of Eggs and Vitamin D Status of Laying Hens; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60; 799-804

Müller-Belecke, A., Harbach, H., Kaufhold, S., Seeburg, N., Glomb, M. (2012): Vitamin D contents in important Northern European freshwater foodfish species – Investigations on the influence of the rearing environment and approaches for elevation. Aqua2012 Prague, 01.-05.09.2012, Abstract Book, S. 759

Tagungsvorträge

Seeburg, N., Glomb M. A.: Etablierung einer optimierten Messmethode zur Vitamin D-Analytik in Lebensmitteln und biologischen Proben, Arbeitstagung des Regionalverbandes Südost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh; Halle (Saale), 24.-25.03.2011

Posterbeiträge

Seeburg, N., Glomb M. A.

Simultane Bestimmung von D-Vitaminen in Lebensmitteln
Statusseminar Ernährung, Berlin, 19.-21.11.2012

Seeburg, N., Glomb M. A.

Simultane Bestimmung von D-Vitaminen in Lebensmitteln und biologischen Proben mittels LC-MS/MS

40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Halle (Saale), 12.-13.09.2011,
(*Abstract in: Lebensmittelchemie 2012, 66 (2), 17-40*)

Seeburg, N., Glomb M. A.

Identifizierung und Quantifizierung von D-Vitaminen in Lebensmitteln und biologischen Proben
Statusseminar Ernährung, Berlin, 16.-18.05.2011

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marcus Glomb, der mir die Möglichkeit gab dieses interessante Thema zu bearbeiten und jederzeit für anregende Diskussionen offen war.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Bei allen Research-Partnern des Verbundprojektes „Vitamin D und kardiovaskuläre Gesundheit – von experimenteller und epidemiologischer Evidenz zu innovativen Lebensmitteln“, insbesondere unserer Projekt-Koordinatorin Frau Prof. Dr. Gabriele Stangl, bedanke ich mich herzlich für die angenehme Zusammenarbeit.

Gedankt werden soll an dieser Stelle auch meinen fleißigen Diplomanden: Nancy Schneider und Julia Seidel, die mir mit großer Ausdauer bei der Bewältigung des Probenpensums eine unverzichtbare Hilfe waren.

Ich danke allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Lebensmittelchemie für die interessante und spannende Zeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Familie und meine Freunde für die stetige Ermutigung, die Unterstützung, die Ablenkung und das nötige „Du schaffst das!“.

Vielen Dank!

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil	2
2.1	Vitamin D – Struktur, Synthese, Funktion, Bedarf.....	2
2.1.1	Struktur	2
2.1.2	Endogene Synthese und Stoffwechsel	3
2.1.3	Physiologische Funktionen.....	5
2.1.4	Bedarf und Versorgung	5
2.2	Vitamin D in Lebensmitteln	6
2.2.1	Fisch	6
2.2.2	Eier	8
2.2.3	Speisepilze.....	10
2.2.4	Fleisch und Milchprodukte.....	11
2.3	Gesetzliche Regelungen.....	13
2.3.1	Anreicherung von Lebensmitteln	13
2.3.2	Anreicherung von Futtermitteln	14
2.4	Vitamin D-Analytik in Lebensmitteln	15
2.4.1	Probenaufreinigung	15
2.4.1.1	Verseifung.....	16
2.4.1.2	Extraktion.....	16
2.4.2	Bindungsassays.....	17
2.4.3	Chromatographische Trennung	17
2.4.3.1	Gaschromatographie	17
2.4.3.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	18
2.4.3.3	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	23
2.5	Matrixeffekte	26
3	Ergebnisse und Diskussion.....	28
3.1	Methodenentwicklung	28
3.1.1	Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Trennmethode.....	28
3.1.2	Optimierung der massenspektrometrischen Detektion	29

3.1.3	Einsatz von Ionisierungshilfsmitteln	32
3.1.4	Chromatographische Spülschritte	32
3.1.5	Säulenrekonstitution mit Tetrahydrofuran.....	33
3.1.6	Derivatisierung	34
3.1.7	Entwicklung und Optimierung der Probenaufarbeitung.....	36
3.1.7.1	Etablierung der Verseifung	36
3.1.7.2	Etablierung der Festphasenextraktion.....	37
3.1.8	Zusammenfassung der optimierten Methode.....	41
3.2	Identifizierung und Bewertung von Matrixeffekten der optimierten Methode.....	42
3.3	Validierung	43
3.3.1	Lagerstabilität	44
3.3.2	Messstabilität.....	45
3.3.3	Selektivität.....	46
3.3.4	Spezifität.....	47
3.3.5	Arbeitsbereich/Linearität	47
3.3.6	Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze/Erfassungsgrenze	48
3.3.7	Präzision	49
3.3.7.1	Wiederholpräzision (RSD _r)	49
3.3.7.2	Laborpräzision (laborinterne Vergleichspräzision, RSD _T)	49
3.3.7.3	Messunsicherheit.....	50
3.3.8	Richtigkeit	51
3.3.8.1	Laborvergleichsuntersuchung	51
3.3.8.2	Richtigkeit über Bestimmung der Wiederfindung	51
3.3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse der Validierung.....	53
3.3.9.1	Identifizierungsmethode	54
3.3.9.2	Biologische Proben.....	55
3.4	Vitamin D in Lebensmitteln	56
3.4.1	Fisch	57
3.4.1.1	Native Fischproben	57
3.4.1.2	Verarbeitete Fischprodukte	58
3.4.1.3	Gehalte an D-Vitaminen in verschiedenen Geweben	60
3.4.1.4	Lachs.....	60

3.4.1.5	Überprüfung einer Korrelation zwischen Vitamin D- und Fett-Gehalt in Lachsproben.....	62
3.4.2	Eier	64
3.4.3	Speisepilze	66
3.4.4	Fleisch und Innereien.....	68
3.4.5	Milchprodukte	70
3.4.5.1	Hart-, Schnitt- und halbfester Schnittkäse	71
3.4.5.2	Weichkäse	72
3.4.5.3	Frischkäse	73
3.4.5.4	Schmelzkäse und -zubereitungen.....	74
3.4.5.5	Rahm-/Sauermilcherzeugnisse und Milchsorten.....	75
3.4.6	Streichfette.....	76
3.4.7	Back-, Teig- und Süßwaren	77
3.4.8	Zusammenfassung der Vitamin D-Zufuhr in Deutschland.....	78
4	Experimenteller Teil.....	80
4.1	Chemikalien und Materialien.....	80
4.1.1	Chemikalien.....	80
4.1.2	Lösungen	81
4.1.3	Geräte.....	82
4.1.4	Sonstige Geräte und Materialien	82
4.1.5	Probenmaterial	83
4.2	Methoden	83
4.2.1	Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS	83
4.2.1.1	Probenvorbereitung.....	83
4.2.1.2	Probenaufarbeitung	83
4.2.2	Quantifizierung	85
4.2.3	Validierung der LC-MS/MS-Methode	86
4.2.4	Identifizierung von Vitamin D mittels Derivatisierung nach Fraktionierung.....	86
5	Zusammenfassung.....	87
6	Literaturverzeichnis.....	91
7	Abbildungsverzeichnis	102

8	Tabellenverzeichnis.....	104
9	Abkürzungsverzeichnis	106
10	Anhang	109
10.1	Validierung	109
10.1.1	Zusammenfassung: Lachs.....	109
10.1.2	Zusammenfassung: Wildlachs	111
10.1.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in verschiedenen Matrices [$\mu\text{g}/100\text{ g}$].....	112
10.2	Identifizierungsmethode	113
10.2.1	HPLC-Parameter	113
10.2.2	MS/MS-Parameter	113
10.2.3	MS/MS-Übergänge der derivatisierten D-Vitamere.....	113
10.3	Bestimmung von Vitamin D in biologischen Proben	115
10.3.1	Durchführung.....	115
10.3.2	HPLC-Parameter	115
10.3.3	MS/MS-Parameter	116
10.3.4	MS/MS-Übergänge der derivatisierten D-Vitamere.....	116
10.3.5	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen in Blutserum	116
11	Lebenslauf	117
12	Eigenständigkeitserklärung	118

1 Einleitung

Vitamin D (Calciferol) gehört zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine und hat einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der Calcium- und Phosphat-Homöostase. Zu den Calciferolen werden verschiedene Verbindungen gezählt, wobei in Lebensmitteln besonders Cholecalciferol (Vitamin D₃) und Ergocalciferol (Vitamin D₂) von Bedeutung sind. Vitamin D₃ kann mit Hilfe von ultraviolettem Licht (UVB) in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol vom Körper selbst gebildet oder mit der Nahrung aufgenommen werden, während Vitamin D₂ ausschließlich über die Nahrung zugeführt wird. Beide Vitamin D-Formen werden im menschlichen Stoffwechsel über Hydroxylierungen zu den verschiedensten aktiven Strukturen metabolisiert.

Obwohl Cholecalciferol endogen synthetisiert wird, besteht unter der Bevölkerung der BRD ein verbreiteter Mangel an dem sogenannten „Sonnenvitamin“. So ergab die nationale Verzehrsstudie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe (Nationalen Verzehrsstudie II, NVS II), dass 82 % der Männer und 91 % der Frauen eine tägliche Vitamin D-Zufuhr von 5 µg (Referenzwert Stand: 2011) unterschreiten [1]. Dieser Wert liegt deutlich unterhalb der aktuellen Verzehrsempfehlung von 20 µg pro Tag für Kinder, Jugendliche, Erwachsene, Schwangere und Stillende bei fehlender endogener Synthese (Säuglinge: 10 µg/d) [2].

Derzeit existieren nur wenige nicht miteinander vergleichbare und teilweise veraltete Daten über die Zusammensetzung und den Gehalt von Vitamin D in Lebensmitteln. Dies ist vor allem auf die anspruchsvolle Analytik zurückzuführen. Während Vitamin D und dessen Metaboliten als Fettbegleitstoffe nur im Spurenbereich vorliegen, treten Störsubstanzen ähnlicher Struktur und Polarität in großen Mengen auf. Zudem decken die Zielanalyten infolge der ein- bis dreifachen Hydroxylierung einen weiten Polaritätsbereich ab, was eine möglichst selektive Abtrennung erschwert. Literaturdaten zu Gehalten in Lebensmitteln fokussieren sich daher meist auf eine Vitamin D-Struktur.

Aufgrund der unterschiedlichen Matrices fehlen in der Vitamin D-Analytik einheitliche Testverfahren zur Reihenuntersuchung von Lebensmitteln. Die amtliche Methode nach § 64 LFGB eignet sich wegen des enormen Aufwandes nicht für den Routinebetrieb [3]. Literaturdaten werden daher oftmals mit nicht miteinander vergleichbaren Nachweismethoden generiert.

Diese Sachverhalte bedingen die Notwendigkeit der Entwicklung einer effizienten, leicht zu handhabenden Analysenmethode zur Bestimmung von D-Vitaminen in Lebensmitteln.

2 Theoretischer Teil

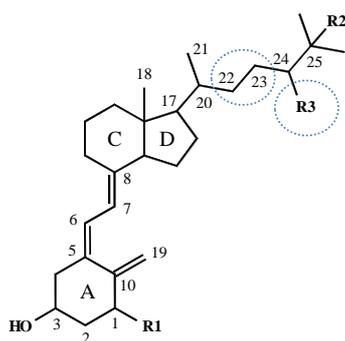
2.1 Vitamin D – Struktur, Synthese, Funktion, Bedarf

Vitamine sind als „...lebensnotwendige organische Verbindungen, die in kleinsten Mengen der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dienen und vom tierischen und/oder menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden können“ definiert [4]. Vitamin D ist folglich kein Vitamin im eigentlichen Sinne, da es über die Haut unter Einfluss von UVB-Strahlung (290-315 nm) endogen gebildet werden kann [5-7].

2.1.1 Struktur

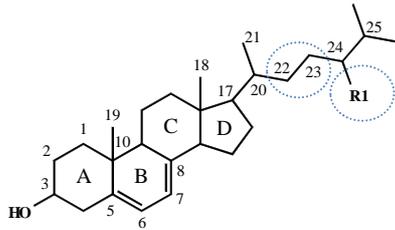
Der Begriff Vitamin D umfasst eine Gruppe fettlöslicher 9,10-Secosteroide, welche einen bedeutenden Einfluss auf die Calcium- und Phosphat-Homöostase ausüben. Insgesamt sind sechs Formen (D₂-D₇) des Vitamins bekannt [8], wobei Cholecalciferol (Vitamin D₃) und Ergocalciferol (Vitamin D₂) die wichtigsten Vertreter in der menschlichen Ernährung darstellen. Vitamin D₂ wird aus der Vorstufe Ergosterol gebildet und kommt vor allem in Pilzen und Hefen vor, während Vitamin D₃ von 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) abstammt und in der Regel im Tierreich auftritt.

Der Unterschied zwischen beiden Verbindungen liegt in der Seitenkette, welche in C17-Position am Sterolgrundgerüst gebunden ist. Im Gegensatz zur Vitamin D₃-Reihe, deren Seitenketten lediglich Einfachbindungen enthalten, besitzen Vitamin D₂-Strukturen eine Doppelbindung an C22-Position, sowie eine Methylgruppe an C24-Position. Insgesamt sind über 40 Metabolite bekannt [9], ausgewählte Vertreter sind in Abbildung 1 und Abbildung 2 aufgelistet und dargestellt.



Metabolit	R1 C1	R2 C25	R3 C24	C22/23
Cholecalciferol	H	H	H	C-C
25-Hydroxycholecalciferol 25(OH)D ₃	H	OH	H	C-C
1,25-Dihydroxycholecalciferol 1,25(OH) ₂ D ₃	OH	OH	H	C-C
(24R)-24,25-Dihydroxycholecalciferol 24,25(OH) ₂ D ₃	H	OH	OH	C-C
Ergocalciferol	H	H	CH ₃	C=C
25-Hydroxyergocalciferol 25(OH)D ₂	H	OH	CH ₃	C=C
1,25-Dihydroxyergocalciferol 1,25(OH) ₂ D ₂	OH	OH	CH ₃	C=C

Abbildung 1: Übersicht über die Struktur der D-Vitamine [10]



Metabolit	R1 C24	C22/23
Ergosterol	CH ₃	C=C
7-Dehydrocholesterol 7-DHC	H	C-C

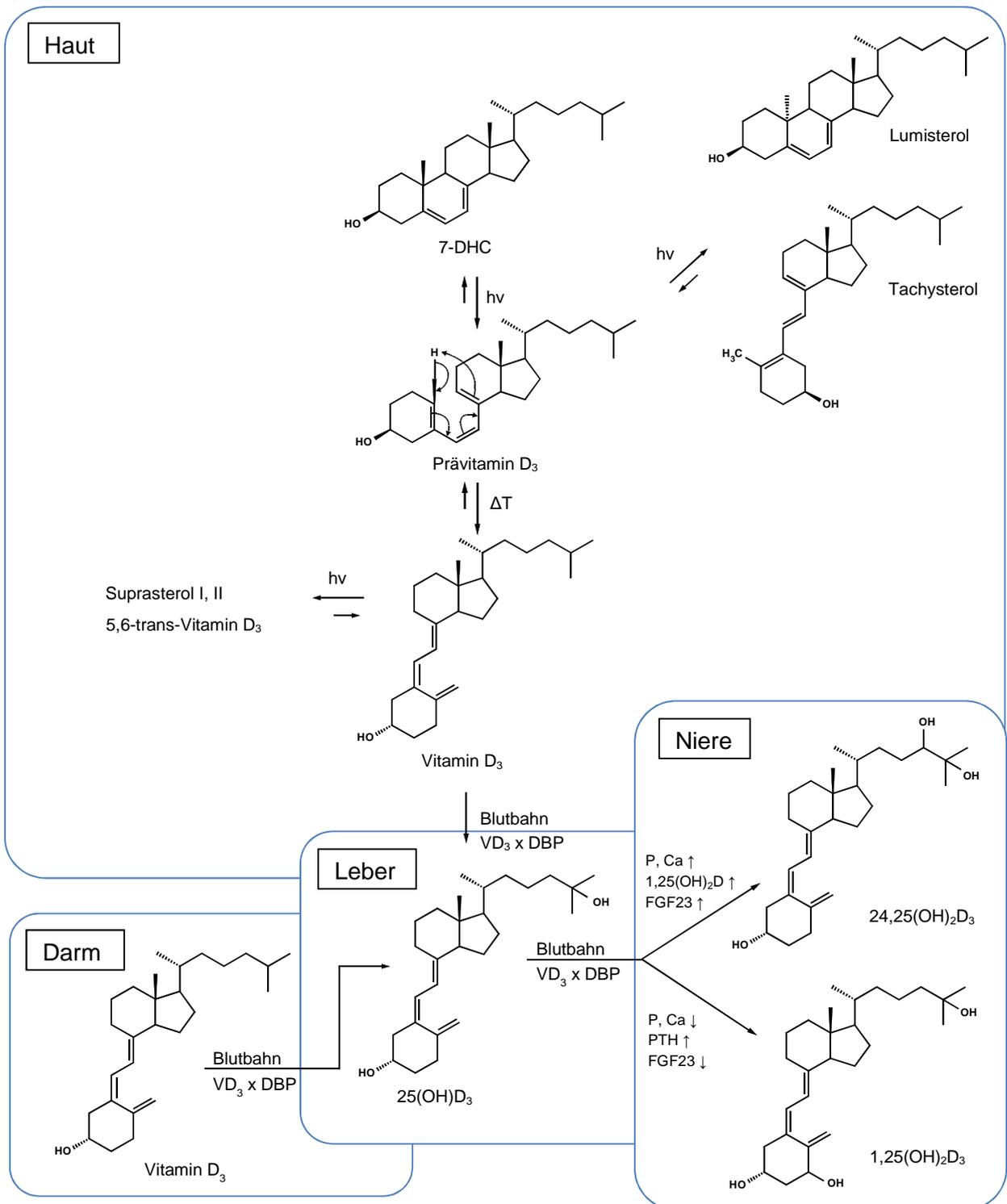
Abbildung 2: Übersicht über die Struktur der Provitamine [10]

2.1.2 Endogene Synthese und Stoffwechsel

Die Vitamin D₃-Synthese (Abbildung 3) findet in allen Hautschichten, hauptsächlich im *Stratum basale* und *Stratum spinosum* der Epidermis, statt [11]. Ausgangsstoff ist 7-Dehydrocholesterol, welches in Darmschleimhaut und Leber im Zuge der Cholesterinbiosynthese gebildet wird. Hochenergetische UV-Strahlung (290-315 nm) führt zu einer Aufspaltung des B-Rings im Sterolgrundgerüst aus der das Prävitamin D₃ hervorgeht. Dieses wird durch eine [1,7]-sigmatrope antarafaciale Wasserstoffumlagerung [12] mit anschließender thermischer Isomerisierung in Vitamin D₃ umgewandelt [13, 14], welches an Vitamin D-bindende Proteine (DBP) gebunden über die Blutbahn in die Zielgewebe (Bsp. Leber) transportiert wird [15]. Sowohl das Prävitamin D₃ als auch das Vitamin D₃ unterliegen einer physiologischen Autoregulation. Prävitamin D₃ wird bei längerer UV-Exposition in die inaktiven Verbindungen Lumisterol und Tachysterol umgewandelt, wobei die Konversion zu Lumisterol eine reversible Reaktion darstellt. Vitamin D₃ kann zu Suprasterol I und II sowie 5,6-Transvitamin D₃ umgewandelt werden. Auf diese Weise wird eine toxische Konzentration von Vitamin D₃ im Körper verhindert [16].

Bei einem regelmäßigen Aufenthalt im Freien können ca. 80 bis 90 % des Vitamin D-Bedarfs über die endogene Synthese abgedeckt werden. Die Aufnahme der restlichen 10 bis 20 % erfolgt über die Nahrung [17]. Exogen zugeführtes Vitamin D (Vitamin D_{2/3}) gelangt im Rahmen der Fettverdauung in den Dünndarm und wird über passive Diffusion in die Enterozyten aufgenommen. Intrazellulär erfolgt dort eine Absorption in Chylomikronen, welche über das Lymphsystem in den peripheren Blutkreislauf transportiert werden [4, 18]. Über DBP gelangt das selbst noch inaktive Vitamin D in die Leber, wo eine 25-Hydroxylierung erfolgt, welche mit Ausnahme eines Produkthemmungsmechanismus kaum einer Regulierung unterliegt. 25-Hydroxycalciferol (25(OH)D) stellt die Speicherform des Vitamin D dar und hat eine Halbwertszeit von ca. 21-30 Tagen (Vitamin D₃: 24 h) [17]. Es wird zur Ermittlung des jeweiligen Vitamin D-Status herangezogen. Über dessen Bewertung existieren verschiedene Angaben [19-21]. Die meisten vertreten die Ansicht, dass eine 25(OH)-Serumkonzentration von < 50 nmol/l (20 ng/ml) einen Vitamin D-Mangel kennzeichnet.

Eine angemessene Vitamin D-Versorgung liegt laut Zittermann (2010) bei einer 25(OH)-Serumkonzentration zwischen ≥ 100 – 250-500 nmol/l (40-200 ng/ml) [20, 22].

Abbildung 3: Vitamin D₃-Synthese und Metabolismus

Gebunden an DBP wird 25(OH)D zur Niere bzw. anderen Geweben transportiert und einer weiteren Hydroxylierung unterzogen. Hierbei entsteht das biologisch aktive 1,25-Dihydroxyvitamin D (Calcitriol, 1,25(OH)₂D). Sowohl die renale als auch die periphere Umwandlung des Vitamin D in seine aktive Form unterliegt einer strengen Regulierung. So wird die Bildung des Calcitriols durch die Anwesenheit des PTH (Parathormon) angeregt, während der fibroblastische Wachstumsfaktor 23 (FGF23) und das Calcitriol selbst zu einer Hemmung führen, indem sie die Bildung von

24-Hydroxylase stimulieren. Diese führt durch die vermehrte Bildung von 24,25(OH)₂D zu einer Deaktivierung von 25(OH)D [21].

24,25(OH)₂D hat eine deutlich geringere biologische Aktivität als Calcitriol [23], soll aber dennoch eigenständige Funktionen besitzen [24]. Über die Ausscheidungswege der D-Vitamine ist wenig bekannt. Oft wird die Galle als Hauptexkretionsweg im Zusammenhang mit der wasserlöslichen Calcitriolinsäure beschrieben [25, 26].

2.1.3 Physiologische Funktionen

1,25-Dihydroxyvitamin D wird über den Blutkreislauf an die entsprechenden Wirkorte (Darm [27, 28], Knochen [29, 30], Plazenta [31], Niere [28, 32], Haut [28, 33]) transportiert und bindet dort an den nukleären bzw. zellmembranständigen Vitamin D-Rezeptor (VDR). Im Zellkern bildet dieser mit dem Retinolsäure-Rezeptor (RXR) einen Komplex, welcher anschließend an bestimmte Stellen der DNA (vitamin D responsive elements (VDRE)) bindet, um die Aktivierung bzw. Hemmung der Transkription bestimmter Gene einzuleiten [21]. Neben dem Einfluss auf die Genexpression hat Calcitriol auch unmittelbare Auswirkungen auf schnelle, nicht-genomische Effekte wie beispielsweise der Signalübertragung zwischen den Zellen [34, 35].

1,25-Dihydroxyvitamin D hat sowohl „klassische“ als auch „nicht-klassische“ Wirkungen. Zu den „klassischen Effekten“ gehören die Stimulation der Absorption von Calcium- und Phosphat im Darm, die Regulation des Knochen-Metabolismus und der negative Einfluss auf die Rückkopplung der PTH-Sekretion. Ein Vitamin D-Mangel kann daher zu Mineralisierungsstörungen im Knochen führen [21]. Symptomatisch zeigt sich dies im Kindesalter (meist ab dem 3. Lebensmonat) in Form der insbesondere Ende des 19. Jahrhunderts weit verbreiteten Rachitis und im Erwachsenenalter als Osteomalazie. Rachitis äußert sich durch eine Erweichung der Knochen, vor allem des Schädels und der Wirbelsäule. Häufig treten Zahndefekte sowie Auftreibungen an der Knochen-Knorpel-Grenze („Rosenkranz“) auf. Unter Osteomalazie ist eine verminderte Knochenverkalkung zu verstehen, welche sich in Knochen- und Muskelschmerzen bis hin zur Deformation der langen Röhrenknochen auswirkt [18, 36, 37]. „Nicht-klassische Effekte“ betreffen die Beeinflussung von Muskelzellen [38], des Herz-Kreislauf- und des Immunsystems [39]. In diesem Zusammenhang wird ein Vitamin D-Mangel als Risikofaktor für bestimmte Arten von Krebs, Autoimmunerkrankungen (Multiple Sklerose, Typ-I-Diabetes) und Bluthochdruck diskutiert [40].

2.1.4 Bedarf und Versorgung

In Süd- und Mitteleuropa kann eine Bestrahlung von Armen und Beinen (ca. 18 % der Körperoberfläche) um die Mittagszeit für 5-30 Minuten ausreichen, um genügend Vitamin D zu synthetisieren [41-43]. Nach Holick *et al.* (2003) entspricht die Exposition des Körpers in Badekleidung mit einer UV-Dosis, die eine gerade sichtbare Rötung hervorruft (minimale Erythemdosis, MED), einer oralen Aufnahme von ca. 250 bis 625 µg Vitamin D [39]. Allerdings ist

die Stärke der Sonneneinstrahlung in Deutschland nur in ca. 6 Monaten des Jahres ausreichend (UV-Index über 3), um eine befriedigende Vitamin D-Bildung zu gewährleisten [22]. Schätzungen zufolge weisen in der BRD in den Wintermonaten ca. 60 % der Erwachsenen (18 bis 79 Jahre) und 80 % der Jugendlichen (11 bis 18 Jahre) Vitamin D-Konzentrationen unter 50 nmol/l auf [41], was einem Vitamin D-Mangel entspricht [19, 22]. Die Vitamin D-Syntheserate ist jedoch nicht nur von der Jahreszeit und dem Breitengrad abhängig, sondern auch vom Ausmaß der Luftverschmutzung, der Bewölkung, der Aufenthaltsdauer im Freien, der Nutzung von Sonnencreme, der Art der Kleidung, sowie individuellen Faktoren (Hautfarbe/-pigmentierung/-erkrankungen, Alter) [21]. Aus diesem Grund ist es notwendig den Vitamin D-Bedarf über die Nahrung zu decken.

Wie bereits erwähnt, empfiehlt die DGE für Kinder, Jugendliche, Erwachsene, Schwangere und Stillende, bei fehlender endogener Synthese, eine tägliche exogene Vitamin D-Zufuhr von 20 µg und für Säuglinge 10 µg [2]. Laut NVS II (2008) werden in Deutschland von Männern durchschnittlich 2,9 µg Vitamin D pro Tag und von Frauen 2,2 µg Vitamin D pro Tag aufgenommen [1]. Auch in Bezug auf die alten Referenzwerte von 2011 (5 µg Vitamin D/Tag für Kinder und Erwachsene), welche die UVB-Exposition der Bevölkerung und die verringerte Syntheseleistung der Haut im höheren Alter berücksichtigten [41], liegen diese Aufnahmemengen deutlich unterhalb der Empfehlung. Der Grund hierfür ist, dass nur wenige natürliche Vitamin D-Quellen existieren, die zur Versorgung beitragen (Siehe 2.2; Seite 6 f.). Darüber hinaus sind diese fast ausschließlich tierischen Ursprungs, weshalb Personengruppen, die eine vegane Ernährungsweise praktizieren, ein deutlich höheres Risiko für einen Vitamin D-Mangel aufweisen. So beschreibt Waldmann (2003), dass Veganer in Deutschland täglich weniger als 1 µg Vitamin D über die Nahrung aufnehmen [44].

2.2 Vitamin D in Lebensmitteln

Vitamin D₃ ist nur in wenigen Lebensmitteln in signifikanten Mengen enthalten. Dazu gehören vor allem fettreiche Seefische, Leber und Eigelb [21]. In wesentlich geringeren Mengen ist es auch in Milch, bzw. Milchprodukten (Butter, Käse) und Fleisch zu finden. Pilze und Hefen produzieren Vitamin D₂ [45], welches eine ähnliche Effektivität in der Aufrechterhaltung des Vitamin D-Status wie Vitamin D₃ aufweist [46]. Der Vitamin D-Gehalt in Lebensmitteln ist von verschiedenen Faktoren wie Ursprungsland, Breitengrad, Jahreszeit, Zubereitungsart und speziell bei tierischen Produkten vom Vitamin D-Status des jeweiligen Tieres abhängig. Selbst innerhalb eines Lebensmittels variieren die Vitaminmengen je nach betrachteten Gewebe [47, 48].

2.2.1 Fisch

Fisch stellt eine sehr gute Quelle für hochwertiges Eiweiß, ungesättigte Fettsäuren, Mineralstoffe (Jod, Selen) und Vitamin D dar. Dieses ist vor allem in fettreichen Fischen zu finden, wobei ein statistischer Zusammenhang zwischen Vitamin D und dem Fettgehalt ausgeschlossen wird [49]. In Tabelle 1 sind die Vitamin D-Gehalte einiger Fische und Fischprodukte aufgelistet.

Tabelle 1: Vitamin D-Gehalte ausgewählter Fische und Fischprodukte

Fisch	D ₃ [µg/100 g]	25(OH)D ₃ [µg/100 g]	7-DHC [µg/100 g]	Literatur
Atlantischer Hering (<i>Clupea harengus membras</i>)	12,1* - 31,9	n. d.	34,9*	[49, 50], *[51]
Kabeljau, Filet (<i>Gadus morhua</i>)	0,5* - 6,9 ± 0,23	n. d.	9,7*	[50], *[51]
Regenbogenforelle, Filet (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	2,9* - 7,8 ± 0,081	0,14	17,2 - 22,9	[50], *[51]
Scholle (<i>Pleuronectes platessa</i>)	0,29	k. A.	322	[51]
<i>Tilapia</i> , Filet	17,9 - 75,3 (MW: 45,3)	0,03 - 0,13 (MW: 0,06)	n. d.	[52]
Weißer Thun, Filet (<i>Thunnus alalunga</i>)	3,1 - 5,9	n. d.	7,2 - 9,8	[53]
Echter Bonito, Filet (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	1,7 - 2,5	n. d.	6,0 - 10,6	[53]
Echter Bonito, Haut (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	45,4	3,8	10,1	[53]
Zander, Filet (<i>Lucioperca</i>)	5,3* - 24,5 ± 0,28	n. d.	10,6*	[50], *[51]
Lachs (Zucht) (<i>Salmo salar</i>)	5,4 - 7,6	k. A.	331 - 467	[51]
Lachs (Wild) (<i>Salmo salar</i>) **	20,3	k. A.	435	[51]
Wildlachs (<i>Oncorhynchus nerka</i>) **	27,2	k. A.	39,4	[51]
Flussbarsch, Filet (<i>Perca fluviatilis</i>) Meerwasser	23,5 - 25,3	n. d.	n.d.	[50]
Flussbarsch, Filet (<i>Perca fluviatilis</i>) Süßwasser	0,3 - 2,3	n. d.	n.d.	
Shrimp	< 0,2	n. d.	k. A.	[50]
Thunfisch in Öl (Konserve)	1,68 ± 0,02	n. d.	k. A.	[50]
Thunfisch (Konserve)	< 2,5 - 8,3	k. A.	k. A.	[54]

** Teile des Lebenszyklus im Süßwasser verbringend

n. d. nicht detektiert

k. A. keine Angabe

Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass der Vitamin D-Gehalt im Fisch starken Schwankungen unterliegt. So weisen wildlebende Fische (Bsp. Lachs) häufig höhere und stärker variierende Konzentrationen an Vitamin D als deren Artgenossen in Zuchtstationen auf [51, 55, 56]. Fische der gleichen Art (Bsp. Flussbarsch, *Perca fluviatilis*) aus unterschiedlichen Fanggebieten (Meer-, Süßwasser), zeigen ebenfalls deutliche Unterschiede. So enthalten Seefische im Vergleich zu denen aus Süßwasser deutlich größere Mengen an Vitamin D.

Um die Ursachen für diese Schwankungen zu ermitteln, wurden Studien durchgeführt die die Zusammenhänge zwischen den Vitamin D-Gehalt in Fischen und den internen (Geschlecht, Alter, Gewicht) bzw. externen Parametern (Jahreszeit, Wasserbeschaffenheit, Vitamin D-Gehalt in Plankton) untersuchten. Dabei konnte keine Korrelation der Cholecalciferolgehalte mit internen Faktoren

festgestellt werden. Lediglich die Vitamin D-Konzentration im Plankton (1,5-10,5 µg D₃/100 g TM [49]) aus den jeweiligen Fanggebieten scheint einen leichten Einfluss auf den Vitamin D-Gehalt in Fischen auszuüben [49, 50].

Über das Vorkommen von D-Vitaminen in Fischen liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Neben der Anreicherung von Vitamin D₃ im Fisch über die Nahrungskette werden auch die photochemische Bildung aus 7-DHC über UVB-Strahlung in der Haut bzw. eine nicht-photochemische, enzymatische Synthese diskutiert. Der photochemische Weg wird hierbei in Frage gestellt, da nicht genügend UVB-Strahlung in den Lebensraum der Fische gelangt um Vitamin D zu erzeugen [57-59]. Die Untersuchung eines lichtunabhängigen Reaktionsweges in Fischleber führte zu dem Ergebnis, dass in Fisch keine signifikante enzymatische Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol in Vitamin D₃ erfolgt [58]. Vitamin D gelangt demnach über die Nahrungskette in die Fische. Die Anreicherung von Vitamin D im Fisch über die externe Aufnahme wurde schon in einigen Publikationen beschrieben [58-61].

Im Jahr 2011 wurde von der deutschen Bevölkerung im Durchschnitt ca. 15,6 kg Fisch pro Kopf verzehrt. In Abbildung 4 sind die fünf bedeutendsten Fische nach ihrer Verzehrsmenge aufgelistet [62].

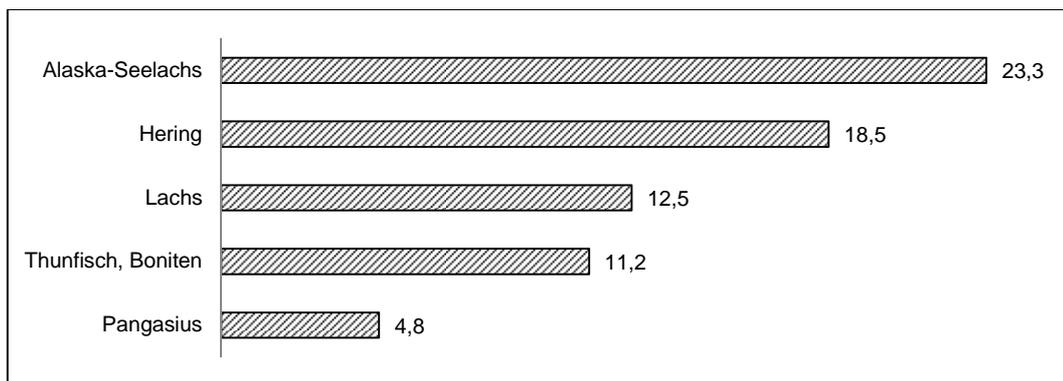


Abbildung 4: Anteil der fünf bedeutendsten Fischarten [%] am Fischverzehr 2011 in der BRD [62]

2.2.2 Eier

Unter „Eier“ werden nach gesetzlichen Bestimmungen Hühnereier in der Schale, die zum Direktverzehr oder zur Verarbeitung durch die Nahrungsmittelindustrie geeignet sind, ausgenommen angeschlagene Eier, bebrütete Eier und gekochte Eier verstanden [VO (EG) Nr. 1234/2007; VO (EG) Nr. 589/2008]. Diese werden gemäß der Eier-Vermarktungsverordnung in Gewichts- und Güteklassen eingestuft. Eier der Güteklasse A müssen mit einem zwölfstelligen Erzeugercode gestempelt werden. Dieser gibt Aufschluss über die Haltungform (erste Ziffer) und die Herkunft der Eier (Tabelle 2).

Tabelle 2: Gewichtsklassen und Haltungsform

Gewichtsklasse			Haltungsform	
Klasse	Größe	Gewicht [g]	Code	Haltung
XL	sehr groß	73 bis >	0	Ökologische Erzeugung
L	groß	63 bis < 73	1	Freilandhaltung
M	mittel	53 bis < 63	2	Bodenhaltung
S	klein	< 53	3	Käfighaltung

Die Hauptbestandteile des flüssigen Hühnervolleis sind 64 % Eiweiß und 36 % Eigelb [63]. Während im Eiweiß nur Spuren von Vitamin D zu finden sind [64], stellt Eigelb eine wichtige Vitamin D-Quelle dar. Aus Tabelle 3 ist zu entnehmen, dass der Vitamin D₃-Gehalt in Eigelb bzw. Eiern starken Schwankungen unterliegt, wenn er nicht von ein und derselben Henne* (Siehe Tabelle 3) stammt [64].

Tabelle 3: Vitamin D₃ und 25-Hydroxycholecalciferol im Ei und Eigelb

D ₃ [µg/100 g]	25(OH)D ₃ [µg/100 g]	Literatur
Eigelb		
1,4 - 15	k. A.	[65]
n. d.	0,98 ± 0,069	[66]
2,5 – 12 (MW: 5,6)	k. A.	[67]
3,9	k. A.	[68]
3,2 - 3,5*	0,86 - 0,96	[64]
Ei (gesamt)		
1,4 ^{2000/2001}	n. d.	[69]
0,73 - 12,1 (MW: 2,0) ²⁰¹⁰	0,43 - 1,32 (MW: 0,65) ²⁰¹⁰	[69]
0,70 - 1,20 (MW: 0,92)	0,16 - 0,55 (MW: 0,36)	[52]

k. A. keine Angabe

n. d. nicht detektiert

Die Gründe für diese Variabilität sind vielfältig. Neben individuellen Faktoren der Hennen (Alter, Rasse), ist auch die Futteranreicherung von Bedeutung. So können die Gehalte an Cholecalciferol und 25-Hydroxycholecalciferol über einen Vitamin D-Zusatz im Futter gesteigert werden [70-72]. Bei einer Anreicherung von 62,4 µg Vitamin D₃ (2.496 IE) pro kg Futter über ein Zeitraum von vier Wochen, sind im Eigelb ca. 3,5 µg Vitamin D₃/100 g und 0,9 µg 25(OH)D₃/100 g zu finden [70, 73]. Wird der Zusatz auf 216 µg/kg (8.640 IE) gesteigert, erhöht sich der Vitamin D₃-Gehalt auf das 7- und der 25-Hydroxycholecalciferol-Gehalt auf das 1,5-fache (Siehe Tabelle 4) [73]. Der Einsatz von Cholecalciferol zur Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes in Eigelb hat sich dabei als effektiver herausgestellt als die Verwendung von Ergocalciferol [71].

Tabelle 4: Zusammenhang zwischen Vitamin D₃ im Futter und im Eigelb [73]

D ₃ (Futter, 4 Wochen) [µg/100 g]	D ₃ [µg/100 g]	25(OH)D ₃ [µg/100 g]
26,6	1,2	0,5
62,4	3,5	0,9
216,0	21,0	1,4

Die Gehalte der D-Vitamine im Eigelb werden weder von der Lagerungsdauer noch durch 10-minütiges Kochen wesentlich beeinflusst. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Fisch, Pilzen und Fleisch gemacht [48, 64, 74]. Insgesamt betragen die Kochverluste zwischen < 10 und 20 % für Vitamin D₃ und 25(OH)D₃.

Im Jahr 2012 wurden in Deutschland pro Person 217 Eier verbraucht. Das entspricht jährlich 13,3 kg Ei pro Kopf [75].

2.2.3 Speisepilze

Pilze stellen eine natürliche Quelle für Vitamin D₂ dar, wobei Wildpilze im Vergleich zu den Zuchtformen, in denen teilweise kein Ergocalciferol nachgewiesen werden konnte, hohe Mengen (Bsp. Pfifferling bis zu 63 µg/100 g) des Vitamins enthalten [47]. Das am häufigsten auftretende Sterol in Pilzen ist Ergosterol, welches 44 - 80 % des Gesamtsterolgehaltes betragen kann [76]. Zuchtpilze weisen höhere Ergosterol-Konzentrationen als Wildpilze auf [47]. Der Gehalt der D-Vitamine in Pilzen variiert von < 0,1 bis 63 µg/100 g für Vitamin D₂ und von 11 bis 192 mg/100 g für Ergosterol. Diese Schwankungen sind auf zahlreiche interne (Pilzart, Farbe) und externe Faktoren (Klima, Standort, Breitengrad) zurückzuführen. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass die Vitamin D₂-Konzentration in Zuchtpilzen zwischen den Jahren variiert [77] und abhängig vom Gewebe ist [47, 78]. In Tabelle 5 sind die Vitamin D-Gehalte einiger Pilze aufgeführt.

Tabelle 5: Vitamin D-Gehalte ausgewählter Pilze

Pilz	D ₂ [µg/100 g]	Ergo [mg/100 g]	Literatur
Zuchtpilze			
Champignon, weiß (<i>Agaricus bosporus</i>)	0,6	44,6	[76]
	0,21	50,36*	[79], *[47]
Champignon, braun (<i>Agaricus bosporus</i>)	0,3	39,5	[76]
Austerpilz (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	0,7	60,7	[76]

Pilz	D ₂ [µg/100 g]	Ergo [mg/100 g]	Literatur
Wildpilze			
Echter Pfifferling (<i>Chantarellus cibarius</i>)	10,7	24,7	[76]
	1,2 - 63	k. A.	[80]
	12,8 ± 0,31	33,7*	[79], *[47]
Trompetenpfifferling (<i>Chantarellus tubaeformis</i>)	21,1	16,8	[76]
	29,8 ± 0,061	k. A.	[79]
Gemeiner Steinpilz (<i>Boletus edulis</i>)	10	192,2	[76]
	2,91 ± 0,076	60,6*	[79], *[47]

k. A. keine Angabe

Der Gehalt an Vitamin D₂ in Pilzen kann durch UV-Exposition deutlich ansteigen [76, 78, 81-84] und ist von der Wellenlänge (UVB > UVC > UVA [76, 81]), Art der Strahlung (kontinuierlich/ gepulst [83]) und dem bestrahlten Gewebe abhängig. So wies die Bestrahlung der Lamellen von Shiitake-Pilzen ein bedeutend höheres Potential (Faktor 4) zur Umwandlung von Ergosterol in Vitamin D₂ auf, als die Bestrahlung des Hutes [78].

Neben Speisepilzen enthalten auch Hefen Ergosterol, welches maximal 10 % der Hefetrockenmasse entsprechen kann [85] und als Ausgangsstoff zur industriellen Erzeugung von Vitamin D₂ mittels UV-Bestrahlung dient [86].

Der am meisten in Deutschland verzehrte Speisepilz ist der Champignon. Im Jahr 2011 wurden von der deutschen Bevölkerung etwa 1,7 kg Frischpilze pro Kopf verzehrt, davon waren ca. 1,5 kg Champignons [87].

2.2.4 Fleisch und Milchprodukte

Fleisch und Milchprodukte enthalten relativ geringe Konzentrationen an Vitamin D, welche in Abhängigkeit von der Jahreszeit gewissen Schwankungen unterliegen [88]. In Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die Gehalte einiger Vertreter dieser Lebensmittelgruppen dargestellt.

Tabelle 6: Vitamin D-Gehalte in Fleisch

Fleisch	D ₃ [µg/100 g]	25(OH)D ₃ [µg/100 g]	D ₂ [µg/100 g]	25(OH)D ₂ [µg/100 g]	Literatur
Schwein					
Filet	0,05* - 0,21*	0,07* - 0,17	< 0,05	< 0,05	[89], *[74]
Filet ^F	0,131 ± 0,0055	0,069 ± 0,0042	< 0,05	n. d.	[88]
Filet ^H	0,086 ± 0,0043	0,052	< 0,05	n. d.	

^F Frühling

^H Herbst

n. d. nicht detektiert

Fleisch	D ₃ [µg/100 g]	25(OH)D ₃ [µg/100 g]	D ₂ [µg/100 g]	25(OH)D ₂ [µg/100 g]	Literatur
Geflügel					
Fleisch	0,12* - 0,31**	0,21* - 0,25	< 0,05*	< 0,05*	**[52], [88], *[89]
Rind					
Ober-/ Unterschale	0,06* - 0,1	0,1* - 0,48	< 0,05*	< 0,05*	[48], *[89]
Fleisch, fett	0,763 ± 0,251	0,401 ± 0,426	k. A.	k. A.	[90]
Fleisch, mager	0,12 ± 0,056	0,269 ± 0,053	k. A.	k. A.	
Lamm					
Kotelett	< 0,05* - 0,09	0,05* - 0,84	< 0,05*	< 0,05*	[48], *[89]
Fleisch, fett	0,884 ± 0,344	< 0,2	k. A.	k. A.	[90]
Fleisch, mager	0,098 ± 0,031	0,203 ± 0,059	k. A.	k. A.	
Innereien					
Leber (Schwein) ^F	0,312 ± 0,0053	0,48 ± 0,042	< 0,05	n. d.	[88]
Leber (Schwein) ^H	0,48 ± 0,03	0,39 ± 0,089	< 0,05	n. d.	
Leber (Rind)	< 0,05 - 0,86*	0,34 - 0,77*	< 0,05	0,09	[88], *[91]
Niere (Rind)	0,74 ± 0,19	2,33 ± 0,47	k. A.	k. A.	[91]

^F Frühlung ^H Herbst k. A. keine Angabe n. d. nicht detektiert

Tabelle 7: Vitamin D-Gehalte in Milch und Milchprodukten

Milch/ Milchprodukt	Fett [%]	D ₃ [µg/100 g]	25(OH)D ₃ [µg/100 g]	D ₂ [µg/100 g]	25(OH)D ₂ [µg/100 g]	Literatur
Milch	1,5	0,0046 ± 0,0015	0,0042 ± 0,0003	k. A.	k. A.	[92]
	3,5	0,0092 ± 0,003	0,0075 ± 0,0013	k. A.	k. A.	[92]
	4	< 0,02	< 0,02	< 0,02	n. d.	[88]
Kaffeesahne	13	0,044 ± 0,019	0,027 ± 0,006	k. A.	k. A.	[92]
Schlagsahne	36	0,07	0,09	0,01	n. d.	[88]
Butter	80 - 81	0,18 ± 0,023	0,05 - 0,1*	0,05 - 0,06*	0,06*	[88], *[92]
	k. A.	0,7	k. A.	k. A.	k. A.	[68]
Edamer ^F	24	0,058 ± 0,0019	< 0,05	< 0,05	n. d.	[88]
Edamer ^H		0,153 ± 0,0093	0,1 ± 0,027	< 0,05	n. d.	

^F Frühlung ^H Herbst k. A. keine Angabe n. d. nicht detektiert

Der Vitamin D₃-Gehalt im Fleisch reicht von < 0,05 bis 0,9 µg/100 g und bei Milch bzw. Milchprodukten von < 0,02 bis 0,2 µg/100 g. 25(OH)D₃ ist in Fleisch mit 0,05 bis 0,84 µg/100 g und in Milch bzw. Milchprodukten mit < 0,02 bis 0,1 µg/100 g vertreten. Untersuchungen zeigten, dass Vitamin D₃ in fettreicheren Lebensmitteln in höheren Konzentrationen zu finden ist als in fettärmeren [52, 88, 90].

Obwohl Fleisch- und Milchprodukte im Vergleich zu bspw. Fisch oder Eigelb deutlich weniger Vitamin D₃ enthalten, werden diese jedoch in großen Mengen von der Deutschen Bevölkerung verzehrt, sodass sich daraus ein nicht unwesentlicher Beitrag zur Vitamin D-Versorgung ergibt.

Im Jahr 2011 wurden in der BRD ca. 89,2 kg Fleisch bzw. -erzeugnisse und 85,4 kg Frischmilcherzeugnisse, 23,0 kg Käse, 5,6 kg Sahneerzeugnisse und 2,6 kg Kondensmilcherzeugnisse pro Kopf verbraucht [93]. In Abbildung 5 und Abbildung 6 sind die Lebensmittelgruppen nach ihrer Verzehrsmenge aufgeschlüsselt dargestellt.

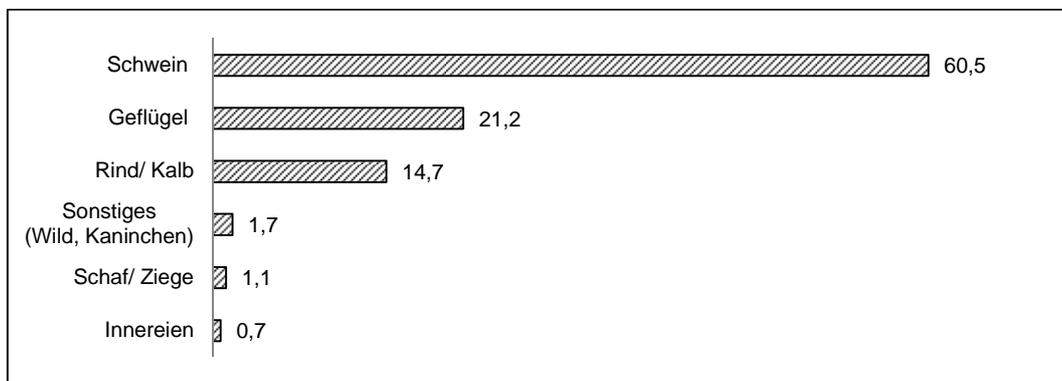


Abbildung 5: Anteil der Fleischarten [%] am Fleischverzehr 2011 in der BRD [93]

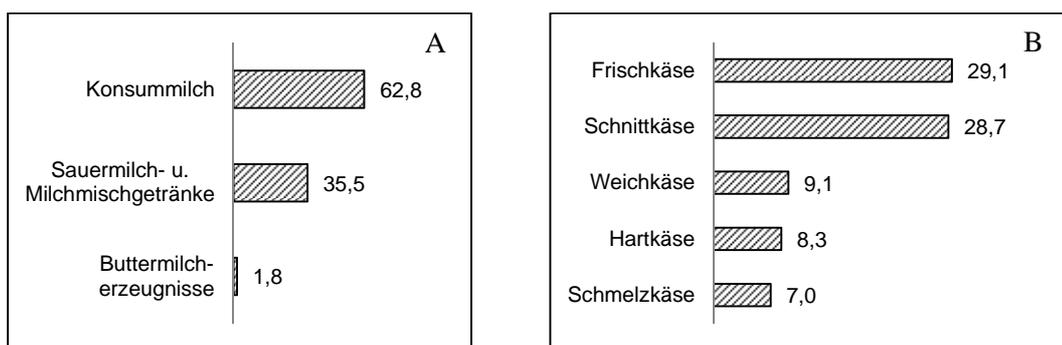


Abbildung 6: A: Anteil Milcherzeugnisse [%] am Verzehr von Frischmilcherzeugnissen 2011 in der BRD [94]; B: Anteil der Käsesorten [%] am Käseverzehr 2011 in der BRD [95]

2.3 Gesetzliche Regelungen

2.3.1 Anreicherung von Lebensmitteln

Aufgrund der Vitamin D-Mangelversorgung, erfolgt in manchen Ländern eine Vitaminisierung bestimmter Lebensmittel mit Vitamin D₃ bzw. Vitamin D₂. Häufig werden Milch und Milchprodukte (Käse, Joghurt), Cerealien, Margarine und/oder Butter, Orangensaft sowie Kindernahrung angereichert

[96, 97]. In der BRD werden nur wenige Lebensmittel, vor allem Margarine, mit Vitamin D versetzt. Der Vitamin D-Zusatz ist über die VO (EG) 1925/2006 geregelt. Gemäß Artikel 17 Abs. 3 der VO (EG) 1925/2006 können Mitgliedsstaaten bestehende nationale Bestimmungen über Höchst- und Mindestgehalte von Vitaminen und Mineralstoffen weiterhin anwenden, bis die entsprechenden Gemeinschaftsmaßnahmen oder andere spezifische Gemeinschaftsbestimmungen erlassen worden sind. Folglich ist gemäß § 1 b Absatz 1 Nr. 2 Buchstabe a - c der VitaminV der Zusatz von Vitamin D in Form von Ergosterol, Cholecalciferol und Cholecalciferol-Cholesterin für Margarine- und Mischfetterzeugnisse bis zu insgesamt 25 µg auf ein Kilogramm (berechnet als Calciferol) möglich. Weiterhin dürfen „Lebensmittel, die zu Verwendung als Mahlzeit oder anstelle einer Mahlzeit bestimmt sind“ (§ 6 (3) NKV) mit bis zu insgesamt 1,6 µg pro Mahlzeit angereichert werden. Im Einzelfall können Vitamin D-Zusätze über Ausnahmegenehmigungen nach § 68 LFGB und Allgemeinverfügungen nach § 54 LFGB geregelt sein. So dürfen Streichfette und Halbfettmargarinen in der BRD laut der Bekanntmachungen vom 11.11.2004 D Nr. 2004-041-00 bzw. vom 16.05.2013 (BVL 13/01/16) Gehalte bis zu 7,5 µg/100 g aufweisen. Mit den Bekanntmachungen vom 16.05.2013 (BVL 13/01/017 und BVL 13/01/012) können in die BRD auch Frühstückscerealien mit einem Gehalt von maximal 3 µg Vitamin D pro 100 g verbracht bzw. in den Verkehr gebracht werden. Aufgrund der Instabilität der D-Vitamine ist eine Überdosierung um bis zu 50 % des gekennzeichneten Gehaltes möglich [98].

2.3.2 Anreicherung von Futtermitteln

Vitamin D₂ und D₃ zählen zu den Futtermittelzusatzstoffen (E 670 bzw. E 671), die vor dem 15. Juli 2003 gemäß RL 70/524/ EWG zugelassen wurden und laut § 16 Futtermittelverordnung (FutMV) in Verbindung mit dem Gemeinschaftsregister der Futtermittelzusatzstoffe nach VO (EG) Nr. 1831/2003 geregelt werden. Die entsprechend zulässigen Höchstmengen werden nach Richtlinie 70/524/EWG vorgeschrieben. Als nach dem 15. Juli 2003 zugelassener Futtermittelzusatzstoff wird der Einsatz von 25-Hydroxycholecalciferol (3a670a) über Artikel 1 der VO (EG) Nr. 887/2009, gestützt auf die VO (EG) Nr. 1831/2003, festgelegt und ist bis 16. Oktober 2019 zugelassen. In Tabelle 8 sind die zulässigen Höchstmengen, welche dem Futter der einzelnen Tierarten zugesetzt werden dürfen, zusammengefasst.

Tabelle 8: Höchstmengen an Vitamin D in Futtermitteln

Tierart	D ₃ [mg/kg]	D ₂ [mg/kg]	25(OH)D ₃ [mg/kg]	D ₃ + 25(OH)D ₃ [mg/kg]
Ferkel, Kalb	0,25*	0,25*	-	-
Rind, Schaf, Einhufer	0,1	0,1	-	-
Schwein	0,05	0,05	0,05	≤ 0,05
Masthühner/-truthühner	0,125	-	0,1	≤ 0,125
Sonstiges Geflügel	0,075	-	0,08	≤ 0,08
Fische	0,075	-	-	-

*nur in Milchaustauschfuttermitteln

Futtermittel für Rinder, Schafe und Schweine können sowohl mit Vitamin D₂ als auch mit Vitamin D₃ angereichert werden, wobei der gleichzeitige Einsatz beider Verbindungen unzulässig ist. Der Zusatz von 25-Hydroxycholecalciferol ist im begrenzten Umfang erlaubt. Dieser Metabolit, der laut Ovesen *et al.* (2003) je nach verwendeten Testsystem eine 1,5- bis 5-fach höhere Aktivität als die unhydroxylierte Verbindung besitzt [99], darf in Kombination mit Vitamin D₃ eingesetzt werden. Hierbei sind für die jeweiligen Tierarten Summenparameter zu beachten.

2.4 Vitamin D-Analytik in Lebensmitteln

Es wurden bereits zahlreiche Analysenverfahren zur Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln publiziert. Diese lassen sich in Bio- und Bindungsassays sowie physikalisch-chemische Methoden unterteilen. Bei den Bioassays handelt es sich um traditionelle Verfahren unter Anwendung von Tierversuchen. Als offizielle Methode wurde insbesondere der „Line-Test“ lange Zeit zur Vitamin D-Bestimmung in Lebensmitteln eingesetzt. Hierbei wird das Versuchstier zunächst mit einer speziellen Rachitis-auslösenden Diät behandelt und anschließend die kurative Wirkung Vitamin D-haltiger Nahrung auf die Epiphysenlinie untersucht. Generell sind biologische Methoden sehr kostenintensiv und zeitaufwendig [100]. Bindungsassays basieren auf spezifischen Substrat-Rezeptor-Wechselwirkungen. Anhand des Rezeptors (R) werden drei Gruppen unterschieden: (Radio)-Rezeptorassay (R: Zellrezeptor), kompetitiver Proteinbindungsassay (R: natürliches Protein) und (Radio)-Immunoassay (R: Antikörper). Bindungsassays sind relativ einfach in der Handhabung und erfordern wenig gerätetechnischen Aufwand, neigen jedoch zu Kreuzreaktivitäten und geben häufig nur Summenparameter wieder [101]. Zu den in der Vitamin D-Analytik in Lebensmitteln angewendeten physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden zählen die Spektrophotometrie, Kolorimetrie (Bsp. Antimontrichlorid-Methode [102]), Dünnschichtchromatographie (DC), Gaschromatographie (GC) und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). In den letzten Jahren hat sich vor allem der Bereich der Flüssigchromatographie weiterentwickelt. Die Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie gewinnt in der Vitamin D-Analytik zunehmend an Bedeutung.

2.4.1 Probenaufreinigung

Bei Lebensmitteln handelt es sich um komplexe Matrices, folglich ist vor der chromatographischen Analyse eine sorgfältige und selektive Probenaufreinigung durchzuführen. Dies gilt vor allem in Hinblick auf die geringen Konzentrationen der fettlöslichen D-Vitamine und den zahlreichen endogenen Begleitstoffen, die mit den Zielanalyten interferieren können.

Die Probenaufreinigung umfasst die Freisetzung der D-Vitamine aus der Matrix, das Entfernen von Störsubstanzen und die Anreicherung der Zielanalyten. Die gebräuchlichsten Methoden sind die warme oder kalte Verseifung, die Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-Liquid Extraction, LLE) und die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE). Der Verseifungsschritt ist nicht immer Bestandteil der Probenaufarbeitung. Abernethy *et al.* (2012) veröffentlichten eine Routine-Methode

zur Bestimmung von Vitamin D₃ in angereicherter Säuglingsnahrung, Milch und Milchpulver, die ohne Verseifung durchgeführt wird [103]. Die Probenaufreinigung umfasst lediglich das Lösen der Probe in MeOH-H₂O sowie LLE mit Isooctan (IO).

In Tabelle 10 und Tabelle 11 (Seite 19 f. und Seite 24 f.) sind einige Verfahren zur Lebensmittelaufarbeitung aus der Literatur zusammengefasst. Einzelne Schritte wie Filtration, Zentrifugation oder Evaporation wurden nicht mit aufgeführt.

2.4.1.1 Verseifung

Unter Verseifung wird die basische Esterhydrolyse von Triglyceriden verstanden. Fette werden dabei in Glycerin und die jeweiligen Alkalisalze der Fettsäuren gespalten [104].

Das fettlösliche Vitamin D liegt in Lebensmitteln nicht nur frei, sondern auch als Ester an Fettsäuren gebunden vor [105]. Deshalb reicht eine einfache Extraktion nicht aus, um in Lebensmitteln alle D-Vitamine vollständig zu bestimmen. Durch die alkalische Hydrolyse werden die Esterbindungen der Fette sowie der Probenmatrix gespalten und die Zielanalyten freigesetzt. Darüber hinaus lässt sich die Kapazität der anschließenden Extraktion erhöhen, indem ein Großteil der neutralen Lipide entfernt wird.

Aufgrund der Oxidationsanfälligkeit und Instabilität gegenüber hohen Temperaturen wird Vitamin D oftmals in Abwesenheit von Sauerstoff (Stickstoff-Atmosphäre) unter Zusatz von Antioxidantien (Ascorbinsäure, Pyrogallol, Butylhydroxytoluol (BHT)) kalt hydrolysiert. Der Zusatz von Ethanol soll die Verseifungslösung stabilisieren und das Ausfällen von Seife verhindern.

2.4.1.2 Extraktion

Um die freigesetzten D-Vitamine vom unverseiften Anteil abzutrennen, wird im Anschluss der alkalischen Hydrolyse eine Extraktion durchgeführt. Sie dient vor allem der Beseitigung wasserlöslicher Komponenten (Proteine, Zucker, Ballaststoffe, Farbstoffe, Seife). Es werden die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die Festphasenextraktion unterschieden.

Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Bei der LLE wird die unterschiedliche Löslichkeit des Analyten an der Phasengrenze zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln (wässrig/organisch) ausgenutzt [106]. Der Vorteil dieser Extraktionsmethode liegt in der thermisch schonenden und selektiven Trennung kleinster Analytmengen. Dieses Verfahren ist jedoch schlecht automatisierbar und sehr zeit- bzw. kostenintensiv aufgrund der matrixbezogenen Auswahl und des hohen Verbrauchs an reinen Lösungsmitteln.

Festphasenextraktion (SPE)

Die SPE ist ein physikalischer Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase (Sorbens) stattfindet [106]. Sie stellt eine kostengünstige Alternative zur LLE dar. Zu den Vorteilen dieser Extraktionsmethode gehören geringe Anschaffungskosten, einfache Handhabung, relative kurze

Prozesszeiten, Automatisierbarkeit und der geringe Lösungsmittelverbrauch. Nachteile dieses Verfahrens zeigten sich vor allem in den Anfängen der SPE (Volumenschwankungen/geringe Kapazität des Festphasenmaterials, pH-Wert-Instabilität). Durch Entwicklung neuer Sorbens-Materialien konnten diese jedoch behoben werden.

2.4.2 Bindungsassays

Bindungsassays finden in der Vitamin D-Analytik von Lebensmitteln nur selten Anwendung (Fleisch, Milch) [48, 91, 107-109]. Purchas *et al.* (2007) verwendete ein kommerziell erhältliches Radioimmunoassay (RIA)-Kit (Biosource), entwickelt für Blut, Plasma oder Serum, um 25-Hydroxycholecalciferol in Fleisch zu bestimmen [48]. Bei der RIA konkurriert das Antigen aus der Probe mit dem in konstanter Konzentration vorhandenen radioaktiv markierten Liganden um die vorhandenen Bindungsstellen des Antikörpers [106]. Die zu messende Radioaktivität ist umso kleiner, je höher die Antigen-Konzentration der Probe ist. Das von Purchas *et al.* verwendete Assay zeigte nur geringe Kreuzreaktivitäten mit 25-Hydroxyergocalciferol (0,6 %), allerdings große Querempfindlichkeiten mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol (84 %). Zu den Nachteilen der RIA zählen neben den stattfindenden Kreuzreaktivitäten, geringe Haltbarkeit, gesundheitliche Gefahren und Entsorgungsschwierigkeiten, die sich aus dem Umgang mit radioaktivem Material ergeben. Darüber hinaus ist dieses Verfahren abhängig von der Probenaufarbeitung und der variierenden Antikörperspezifität, sodass Literaturangaben schlecht vergleichbar sind.

2.4.3 Chromatographische Trennung

Chromatographische Trennmethode stellen hochspezifische Verfahren dar, um Zielanalyten in geringsten Spurenkonzentrationen nachzuweisen.

2.4.3.1 Gaschromatographie

D-Vitamine sind aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit und fehlenden Temperaturstabilität [101] weniger für die gaschromatographische Analyse geeignet. Zur Bestimmung müssen die D-Vitamine zunächst in flüchtige Trimethylsilylether (TMSE) überführt werden. Die Detektion erfolgt in den meisten Fällen mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Zur Identifizierung werden häufig massenspektrometrische Kopplungen (GC-MS) eingesetzt [110, 111].

Bei hohen Temperaturen (≥ 125 °C) wandeln sich die Vitamine (derivatisiert und underivatisiert) zu Pyro- und Isopyro-Isomeren um, wodurch im Chromatogramm zwei Signale mit der gleichen Masse entstehen und die Sensitivität im SIM-Modus verringert wird [101]. Dennoch führte die Entwicklung der Gaschromatographie zu neuen Ansätzen in der Vitamin D-Analytik. Insbesondere bei der Strukturaufklärung gilt die GC-MS gegenwärtig als „Goldstandard“ [112].

Im Bereich der Lebensmittelanalytik können die Vorläuferstrukturen der D-Vitamine zuverlässig mit GC-MS-Methoden identifiziert und quantifiziert werden (Tabelle 9) [47].

Tabelle 9: GC-Methoden zur Quantifizierung von D-Vitaminen in Lebensmitteln

Analyt [ISTD]	Matrix	Probenaufarbeitung	Detektor	Säule/ -material	Literatur
Ergosterol [Cholesterol]	Pilze	Verseifung: 85 °C (30 min), alkalisch, EtOH LLE: Cyclohex Derivatisierung	FID MS	RTX-5w/ Integra fused silica capillary column (0,1 µm, 60m x 0,32 mm, Restek Corp.)	Mattila 2002 [47]
Ergosterol [Cholesterol]	Pilze	Verseifung: 85 °C (30 min), alkalisch, EtOH LLE: Cyclohex Derivatisierung	FID MS	DB-5MS (0,5 µm, 30 m x 0,25 mm, J & W Scientific)	Teichmann 2007 [76]
Ergosterol [³ H]-D3]	Pilze	Verseifung: 75 °C (30 min), alkalisch, EtOH LLE: EE-PE-H ₂ O-EtOH Derivatisierung	FID MS	RTX-5MS (0,1 µm, 30 m x 0,25 mm, Restek)	Phillips 2011 [113]

2.4.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Viele der in der aktuellen Literatur beschriebenen Methoden zur Vitamin D-Bestimmung in Lebensmitteln basieren auf HPLC mit UV-Detektion (265 nm, 280 nm). Die Spezifität des Verfahrens ist durch spektrale Matrixinterferenzen limitiert. Selbst reine Lösungsmittel absorbieren im kurzwelligen Bereich (200-210 nm), dennoch sind HPLC-UV-Methoden bis heute wissenschaftlicher Standard [3]. In Tabelle 10 sind einige HPLC-Methoden aus der Literatur für verschiedene Lebensmittel ab 1984 aufgeführt. Weitere Quantifizierungsmethoden für Milchprodukte von 1977 bis 2004 sind in einem Review von Perales *et al.* (2005) zusammengefasst [114].

Sowohl Normal-(NP) als auch Umkehr-Phasen (Reversed-Phase, RP) werden zur Quantifizierung von D-Vitaminen in Lebensmitteln eingesetzt. Dabei wird der eigentlichen Messung mit RP-Phasen-HPLC häufig eine NP-Phasen-HPLC vorangeschaltet [115]. Die HPLC-Technik dient folglich nicht nur als analytische (A), sondern im Rahmen der Probenaufarbeitung auch als (semi-)präparative Methode (SP). Ein Meilenstein bei der Entwicklung der HPLC-Methoden war die Einführung interner Standards, da sowohl Vitamin D₂ als auch Vitamin D₃ einer reversiblen thermischen Isomerisierung zu ihren entsprechenden Prävitaminen unterliegen [116-118].

Neben der UV-Detektion werden auch elektrochemische Detektoren (ECD) zur Vitamin D-Bestimmung in Lebensmitteln eingesetzt [51, 119]. Allerdings gehört diese Kombination eher zu den Ausnahmen.

Tabelle 10: HPLC-Methoden zur Quantifizierung von D-Vitaminen in Lebensmitteln

Vitamin D-Analyt [ISTD]	Matrix	Probenaufarbeitung	Detektor	Säule/ -material/ mobile Phase	Leistung	Literatur
D ₃ , 25(OH)D ₃ , [ESTD]	Fischleberöle Fisch Fischprodukte*, Eier*, Milchprodukte*, Lebensmittel (angereichert)*, Multivitaminpräparate* Futtermittel*	Verseifung: T, alkalisch, EtOH 1. LLE: Benzol evtl. 2. SPE (SEP-PAK Silica, Waters): MeOH-Hex- TCM	UV λ = 254 nm	1. SP (D ₃ , 25D ₃): Nucleosil 5C18 (300 x 7,5 mm, Nagel & Co.): MeOH-ACN 2. A (D ₃): Zorbax SIL (250 x 4,6 mm, DiPont Co.): Hex-IPA 2. SP (25D ₃): Nucleosil 5 C18 (300 x 7,5 mm, Nagel & Co.): MeOH-ACN 3. A (25D ₃): Zorbax SIL (250 x 4,6 mm, DiPont Co.): Hex-IPA	BG: 20 I.U./100 g (0,5 µg/100 g)	Takeuchi 1984 [120] Takeuchi 1986 [53] *Takeuchi 1984 [68]
D ₃ , 25(OH)D ₃ , 7-DHC [ESTD]	Fischleber	Verseifung: T, alkalisch, EtOH 1. LLE: Benzol	UV λ = 254 nm	1. SP (D ₃ , 25D ₃): Nucleosil 5 C18 (300 x 7,5 mm, Nagel & Co.): MeOH-ACN 2. A (D ₃ , 7-DHC): Zorbax SIL (250 x 4,6 mm , DiPont Co.): Hex-IPA 2. SP (25D ₃): Nucleosil 5 C18 (300 x 7,5 mm, Nagel & Co.): MeOH-ACN 3. A (25D ₃): Zorbax SIL (250 x 4,6 mm, DiPont Co.): Hex-IPA	BG: 20 I.U./100 g (0,5 µg/100 g)	Takeuchi 1987 [55]
D ₃ [D ₂] 25(OH)D ₃ * [25(OH)D ₂ *] } ***	Eigelb Eier, Hühnerfleisch***	Verseifung: RT (ovn), alkalisch, EtOH 1. LLE: EE:PE (1:1) 2. SPE (Mega Bond Elut Silica [2 g, Varian]): Hex-IPA	DAD λ = 264 nm	1. SP: µ-Porasil (10 µm, 300 x 3,9 mm, Waters): Hex-IPA-THF (98:1:1) 2. A: Vydac 201 TP 54 (5 µm, 250 x 4,6 mm, Separations Group): MeOH-H ₂ O	BG: 0,4 µg/100 g	Mattila 1992 [65] *Mattila 1993 [66] **Mattila 1999 [73] ***Mattila 2011 [121]
D ₃ , D ₂ 25(OH)D ₃ [ESTD] (nicht simultan)	Fleisch, Fett	Verseifung: T (30 min), alkalisch, EtOH 1.LLE: Hex-DCM (85:15) 2. SPE (Aluminiumoxid): Hex- IPA	DAD λ = 254 nm	1. SP (D ₃): Apex silica (3 µm, 150 x 4,5 mm, Jones Chromatography): Hex-Cyclohexan-IPA 2. A (D ₃): Resolve 8C18 (5 µm): MeOH 1. SP (25D ₃): Resolve 8C18 (5 µm): MeOH 2. A (25D ₃): Apex silica (3 µm, 150 x 4,5 mm, Jones Chromatography): Hep-IPA	NWG (D ₃): 0,2-1,0 µg/100 g	Thompson 1993 [122]
D ₃ [D ₂]	Milch	Verseifung: RT (ovn), alkalisch, EtOH 1.LLE: Hex-EE (9:1) 2. SPE (Sep-Pak silica, Waters): Hex-EA	DAD λ = 265 nm	1. SP: Resolve silica Rad-Pak (5 µm) + Guard-Pak: Hex- IPA 2. A: Resolve C18 Rad-Pak (5 µm) + Guard-Pak: MeOH-THF-H ₂ O	NWG: 2 ng absolut auf Säule (Inj.-Vol. 100 µl)	Kurmann 1994 [123]
D ₂ , 25(OH)D ₂ [D ₃ ; 25(OH)D ₃] (nicht simultan)	Pilze	Verseifung: RT (ovn), alkalisch, EtOH 1. LLE: EE:PE (1:1)	UV λ = 264 nm	1. SP (D ₂ , 25D ₂): µ-Porasil (10 µm, 300 x 3,9 mm, Waters) + Vorsäule: Hex-IPA 2. A (D ₂):Vydac 201 TP 54, (5 µm, 250 x 4,6 mm, Separations Group) + Vorsäule: MeOH-H ₂ O 2. SP (25D ₂): Vydac 201 TP 54, (5 µm, 250 x 4,6 mm, Separations Group) + Vorsäule:	NWG (D ₂): 1,5 ng/Injektion (70 µl) NWG (D ₃): 0,5 ng/Injektion (70 µl) NWG (25D ₂): 0,5 ng/Injektion (70 µl) NWG (25D ₃): 0,7 ng/Injektion (70 µl)	Mattila 1994 [79]

D_3 , 25(OH) D_3 , 7-DHC [[1,2(n) ³ H]- D_3 , 25OH[23,24(n) ³ H]- D_3]	Fisch	Verseifung: 80 °C (45 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: Benzol 2. SPE (Sephadex LH-20 (1,5 x 116 cm): MeOH-Hex-TCM	UV $\lambda = 265 \text{ nm}$	MeOH-H ₂ O 3. A (25D ₂): μ -Porasil (10 μm , 300 x 3,9 mm, Waters) + Vorsäule: Hex-IPA 1. SP (D_3 , 25(OH) D_3 , 7-DHC): Zorbax-ODS (5 μm , 150 x 4,6 mm): MeOH-ACN 2. SP (25(OH) D_3): Zorbax-ODS (5 μm , 150 x 4,6 mm): MeOH-ACN 2/3. A (D_3 , 25(OH) D_3 , 7-DHC): Zorbax-SIL (5 μm , 150 x 4,6 mm): Hex-IPA	-	Rao Sunita 1995 [61]
D_3 , 25(OH) D_3 ¹ [D_2 , 25(OH) D_2] (nicht simultan)	Fisch, Fischgerichte	Verseifung: RT (ovn), alkalisch, EtOH 1. LLE: EE:PE (1:1) 2. SPE (Mega Bond Elut Silica [2 g, Varian]): Hex-IPA	DAD/ UV ¹ $\lambda = 264 \text{ nm}$	SP: μ -Porasil, (10 μm , 300 x 3,9 mm, Waters) + Vorsäule:Hex-IPA A (D_3 / 25(OH) D_3): Vydac 201 TP 54, (5 μm , 250 x 4,6 mm, Separations Group) + Vorsäule: MeOH-H ₂ O	BG (D_3): 0,2 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ BG(25D ₃): 0,1 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$	Mattila 1995 [50]
$D_{2/3}$, 25(OH) $D_{2/3}$ [D_2 , 25(OH) D_2] (nicht simultan)	Milchprodukte, Fleisch (roh), Leber	Verseifung: 40-60 °C, alkalisch, EtOH 1. LLE: EE:PE (1:1)	UV $\lambda = 264 \text{ nm}$	1. SP ($D_{2/3}$, 25D _{2/3}): μ -Porasil (10 μm , 300 x 3,9 mm, Waters) + Vorsäule: Hex-IPA 2. SP ($D_{2/3}$, 25D _{2/3}): Vydac 201 TP 54 (5 μm , 250 x 4,6 mm, The Separations Group) + Vorsäule: MeOH-H ₂ O 3. A ($D_{2/3}$): Zorbax ODS + Vydac 201 T 54: MeOH-H ₂ O 3. A (25D _{2/3}): Spherisorb S5NH ₂ (5 μm , 250 x 4,6 mm) + μ -Porasil: Hex-IPA	BG: 0,02 - 0,05 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$	Mattila 1995 [88]
$D_{2/3}$ *; Ergosterol, 7-DHC [ESTD]	Milch	1. Ultraschallbad: EtOH 2. LLE: Hex 3. LLE: MeOH-H ₂ O	UV $\lambda = 264 \text{ nm}^*$ $\lambda = 280 \text{ nm}$	μLC : A: Hypersil C18 BDS (3 μm , 150 x 0,3 mm, LC Packings): MeOH-H ₂ O-THF	(Injektion: 5 μl): NWG (D_2): 2 ng/ml NWG (D_3): 0,2 ng/ml NWG (Ergo): 1 ng/ml NWG (7-DHC): 0,4 ng/ml	Gomis 2000 [124]
$D_{2/3}$ [ESTD]	Multivitaminpräparate	1. Entfernung v. Umhüllungen/ Kapseln 2. Lösen/ Rühren: MeOH	UV $\lambda = 260 \text{ nm}$	A: Nucleosil 100-5 C18 (75 x 2 mm, Macherey-Nagel): ACN-H ₂ O	-	Kozhanova 2000 [125]
D_3 , 25(OH) D_3 [³ H- D_3 , ³ H-25(OH) D_3]	Fleisch, Leber, Niere (Rind)	Homogenisator: Phosphat-Puffer-MeOH LLE (D_3): Hex LLE (25D ₃): TCM-MeOH SPE (D_3 , 25D ₃) (Varian LRC Silica, 500 mg, Varian): Hex-IPA	UV $\lambda = 254 \text{ nm}$	1. SP (D_3): Dupont Zorbax Sil (250 x 4,6 mm, Mac-Mod Analytical): Hex-IPA 2. A (D_3 , 25D ₃): Alltech Econosphere ODS (150 x 4,6 mm, Alltech Assoc.): MeOH-H ₂ O 1. A (25D ₃): Zorbax NH ₂ (250 x 4,6 mm, Mac-Mod Analytical): Hex-DCM-IPA	-	Montgomery 2000 [91]
D_3 [ESTD]	Multivitaminpräparate	1. Probe lösen 2. SPE: C18 AR (30 mg, SPEC, ANSYS Diagnostics): TCM	UV $\lambda = 285 \text{ nm}$	A: Nova-Pack C18 (4 μm , 150 x 3,9 mm, Waters): ACN-MeOH	NWG : 0,05 mg/l	Moreno 2000 [126]

D _{2/3} [D _{2/3}]	Lebensmittel, die entweder D ₂ oder D ₃ enthalten	Verseifung: 70-100 °C (20 - 45 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: mit EE, DCM, PE (40-60°C), Hex, EA oder Mischungen davon 2. SPE: mit Silicagel, Aluminiumoxid, C18	UV/ DAD λ = 264 - 265 nm	1. SP: Bsp. NP-HPLC: Hex-IPA, Hex-IPA-THF, IO-BuOH, Hep-IPA 2. A: Bsp. RP-HPLC: MeOH, MeOH-H ₂ O, ACN-MeOH, ACN-MeOH-TCM	-	DIN EN 12821 (§ 64 LFGB 00.00_61) 2000 [3]
D ₃ [D ₂]	a) Milch b) Fischprodukte	Verseifung: 100 °C (20 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: Hex:EA (4:1)	UV λ = 265 nm	1. SP (b): μ-Porasil (10 μm, 300 x 3,9 mm, Waters) + Vorsäule: Hex-THF-IPA 2. SP (D _{2/3} , 25D _{2/3}): Vydac TP 54 (5 μm, 250 x 4,6 mm, The Separations Group) + Vorsäule: MeOH-H ₂ O		Saloväänänen 2000
D ₃ , 25(OH)D ₃ [D ₂ , ESTD]	Fleisch	Verseifung: 75 °C (45 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: EE:PE (1:1) 2. SPE: Silica (2g, Isolute): Hep-IPA	UV-DAD λ = 265 nm	1. SP: 2 kombinierte Säulen: Luna, Si60 (5 μm, 150 x 4,6 mm, Phenomenex) + Spherclone, amino (5 μm, 150 x 4,6 mm, Phenomenex) Hep- IPA 2. A (D ₃): 2 kombinierte VYDAC 201 TP54 (5 μm, 150 x 4,6 mm, The Separations Group): MeOH-ACN 2. A (25D ₃): 2 kombinierte Luna, C18(2) (5 μm, 150 x 4,6 mm und 5 μm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex) MeOH-H ₂ O	BG (D ₃): 0,03 μg/100 g BG (25D ₃): 0,05 μg/100 g	Jakobsen 2004 [117] Clausen 2003 [74]
D ₃ [D ₂]	a) Milch*, fl. Säuglingsnahrung* b) Säuglingsnahrung c) Öl Margarine*, Fischöl *(angereichert)	Verseifung: 95°C (30 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: Hep	UV λ = 265 nm	1. SP: Nucleosil 50-5 (5 μm, 250 x 4,6 mm) + Vorsäule: IPA-MTBE-Cyclohex-Hep 2. A: Vydac 201 TP 54 (5 μm, 250 x 4,6 mm) + Vorsäule: MeOH-ACN	-	Staffas 2003 [127]
D ₂ , Ergosterol [D ₃]	Pilze	Verseifung: 80 °C (1 h), alkalisch, EtOH 1. LLE: n-Pentan	UV λ = 282 nm	A: Maxsil 5 C18 (250 x 4,6 mm, Phenomenex): ACN-MeOH	-	Jasinghe 2005 [78]
D ₃ , 7-DHC [D ₂ , Ergosterol]	Fisch	Verseifung: RT (ovn), alkalisch, EtOH 1. SPE: Chem Elut CE 1020 (20 ml, Varian): Hex	ECD	1. SP: LiChrosorb Si 60 (5 μm, 250 x 4 mm) + Vorsäule: IPA-Hex 2. A: Discovery C18 (5 μm, 250 x 4,6 mm, Supelco) + Vorsäule: MeOH-HClO ₄ -NaClO ₄	BG: 5 ng/ml	Ostermeyer 2005 [51]
D ₃ [D ₂]	Säuglingsnahrung, Milch (angereichert)	Verseifung: RT (ovn), alkalisch, EtOH 1. LLE: Hex	ECD	A: Waters XTerra™ RP18 (5 μm, 250 x 4,6 mm): MeOH-H ₂ O-AcOH:Naac (1:1)	BG: 0,156 μg/100 g	Perales 2005 [119]
D ₃ [D ₂]	Fleisch (Rind, Lamm)	Verseifung: 20 °C (ovn), alkalisch, EtOH 1. LLE: PE:EE (1:1)	UV λ = 265 nm	1. SP (D ₃): Luna Silica (5 μm, 150 x 4,6 mm): Hep- IPA 2. A (D ₃): Lunar C18 (5 μm, 150 x 4,6 mm): MeOH-ACN	NWG: 0,02 μg/100 g	Purchas 2007 [48]
D ₃ , 25(OH)D ₃ [D ₂ , 25(OH)D ₂]	Fleisch, Leber (Schwein) Rindermilch*, Butter*	Verseifung: 75 °C (45 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: EE:PE (1:1)	UV-DAD λ = 265 nm	1. SP: 2 kombinierte Säulen: Luna, Si60 (5 μm, 150 x 4,6 mm, Phenomenex) + Spherclone, amino (5 μm, 150 x 4,6 mm, Phenomenex) Hep-IPA	BG (DAD): 4 - 10 ng/100 g	Jakobsen 2007 [128] *Jakobsen 2009 [92]

		2. SPE: Silica (2g, Isolute): Hep-IPA		2. SP (Leber, Milch, Butter): Luna Cyano (3 µm, 150 x 4,6 mm, Phenomenex): IPA-Hep 3. A (D ₃): 2 kombinierte VYDAC201TP54 (5 µm, 150 x 4,6 mm, The Separations Group): MeOH-ACN 3. A (25D ₃): 2 kombinierte Luna, C18(2) (5 µm, 150 x 4,6 mm und 5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex) MeOH-H ₂ O		
D ₃ [D ₂]	Milch*, Orangensaft*, Cerealien*, Käse* (verarbeitet), Lachs (Dose) *angereichert	Verseifung: 75 °C (30 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: EE-PE-H ₂ O-EtOH	DAD λ = 265 nm Zusatz: LC-MS	1. SP: Intersil® (5 µm, 250 x 4,6 mm, GL Sciences): IPA-MTBE-Cyclohex-Hep 2. A: Intersil® ODS-2 (5 µm, 250 x 4,6 mm): MeOH-ACN	-	Phillips 2008 [129] (nach FCMDL)
D ₂ [[³ H]-D ₃]	Pilze	Verseifung: 60 °C (1 h), alkalisch, MeOH 1. LLE: Hex-EA 2. SPE (0,5 g, 10-40 µm Silica, Varian): DCM: IPA	UV λ = 265 nm	1. SP: Zorbax SIL (5 µm, 250 x 9 mm, Agilent Technologies): Hex-DCM- EtOH (IPA:MeOH (2:1)) 2. SP: Zorbax NH ₂ (5 µm, 250 x 0,45 mm, Agilent Technologies): Hex-EtOH 2. A: Vydac ODS (201TP54, Chrom Tech, Inc.): ACN-DCM	NWG: 0,1 µg/100 g	Phillips 2011 [113]
D ₃ [D ₂]	Fleisch (Schwein, Rind, Huhn), Eier, Fisch, Fertiggerichte	Verseifung: RT (ovn), alkalisch, EtOH 1. LLE: EE:PE (1:4) 2. SPE (Varian Bondelut Silica SPE [1000 mg]): IPA-Cyclohex-DCM-Hex	UV-DAD λ = 265 nm	1. SP (D ₃): 2 kombinierte Supelcosil LC-Si (5 µm, 150 x 4,6 mm, Supelco) 2. A (D ₃): Lichrospher RP-18 (5 µm, 250 x 3 mm): MeOH-H ₂ O	NWG: 0,04 µg/100 g	Bilodeau 2011 [52]
D ₃ [ESTD]	Säuglingsnahrung (angereichert)	Verseifung: 90 °C (30 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: Hex	UV λ = 254 nm	Column-switching HPLC system: 1. SP: Capcell-pak MF C8 (5 µm, 150 x 4,6 mm): MeOH-EtOH-H ₂ O 2. Focus: Capcell-pak UG120V C18 (5 µm, 35 x 2,0 mm): MeOH-EtOH 3. A: Capcell-pak UG120V C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm): MeOH-EtOH	BG: 0,495 µg/100 g	Ko 2012 [130]
D ₃ [ESTD]	a) Obst (Aprikose)*, Gemüse (Avokado)*, b) Säfte, c) Multivitaminpräparate	a) Mixer: MeOH b) Carrez I u. II SPE: RP 18 Bakerbond (500 mg, 3ml): MeOH-H ₂ O-TCM c) Lösen in MeOH	DAD λ = 275 nm	A: TSKGel ODS-100V (5 µm, 150 x 4,6 mm, Tosoh Bioscience): MeOH-H ₂ O (+ TFA)	BG: 15,84 µg/ml	Plonka 2012 [131]

2.4.3.3 Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Die Analytik von D-Vitaminen erfolgt zunehmend mit gekoppelten Trenn- und Detektionssystemen, wie der LC-MS/MS. Die Vorteile der LC-MS/MS-Methoden sind deren hohe Sensitivität, Spezifität, die Möglichkeit simultane Bestimmungen durchzuführen und die kurze Analysenzeit. Eine intensive Probenvorbereitung ist jedoch Voraussetzung für eine gute Chromatographie. Mit der Probenaufarbeitung werden Interferenzen minimiert und abgetrennt, die anderenfalls Matrixeffekte wie Ionensuppressionen hervorrufen können (Siehe 2.5; Seite 26 f.).

Mit der Massenspektrometrie ist es möglich das gesamte Spektrum der bekannten D-Vitamine zu untersuchen. In der Literatur existieren bereits zahlreiche LC-MS/MS-Methoden zur Bestimmung der D-Vitamine in biologischen Flüssigkeiten (Blut, Plasma, Serum) [132]. Entwicklungen massenspektrometrischer Applikationen im Bereich „Lebensmittel“ werden erst seit kurzem beschrieben. In Tabelle 11 (Seite 24) sind einige Verfahren zur Vitamin D-Analytik in Lebensmitteln dargestellt. Es werden vor allem „schonende“ Ionisierungstechniken unter Atmosphärendruck (API) eingesetzt. Dabei kommen Elektronenspray-Ionisation (ESI) und chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) zur Anwendung.

Vitamin D zeigt aufgrund fehlender reaktiver funktioneller Gruppen und protonenanziehender Heteroatome (Stickstoff, Sauerstoff) nur eine geringe Ionisierungseffizienz. Folglich ist die Derivatisierung mit Coochson-Reagenzien, wie z.B. 4-Phenyl-1,2,4-triazolinon-3,5-dion (PTAD) [133, 134], 4-[4-(6-Methoxy-2-benzoxazolyl)phenyl]-1,2,4-triazolinon-3,5-dion (MBOTAD) [135], 4-(4-Nitrophenyl)-1,2,4-triazolinon-3,5-dione (NPTAD) [136] und 4-[2-(6,7-Dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalyl)ethyl]-1,2,4-triazolinon-3,5-dione (DMEQTAD) [137], ein wichtiger Aspekt in der LC-MS/MS-Analytik. Während der Derivatisierung (Diels-Alder-Reaktion) greift das Dienophil sowohl von der α - als auch von der β -Seite an der C10-C19:C5-C6 *s-cis*-dien-Bindung des Vitamins an, infolgedessen sich stabile Diels-Alder-Addukte (6*S*- und 6*R*-Isomer) bilden [133, 134, 138]. Durch das Einbringen polarer Gruppen und die Erhöhung der Molekülmasse, die zu einer Verringerung der koeluerenden Matrix führt, steigt die Sensitivität der Methode um das 100- bis 1000-fache [138].

In der Vitamin D-Analytik mit LC-MS/MS werden häufig Additive verwendet, um die Ionisierung der Zielstrukturen in der Gasphase zu erleichtern. Zu den gängigsten Ionisierungshilfsmitteln gehören organische Säuren wie Ameisen- und Essigsäure sowie deren Ammoniumsalze. Higashi *et al.* (2008) verwendete Methylamin um eine einheitliche Ionenbildung und höhere Sensitivität zu erreichen [134].

Tabelle 11: LC-MS-Methoden zur Quantifizierung von D-Vitaminen in Lebensmitteln

Analyt (ISTD)	Matrix	Probenaufarbeitung	Instrument/ Ionisation	Säule/ mobile Phase/ Zusätze	Leistung	Literatur
D ₃ [D ₂]	Milch, Orangensaft, Cerealien, Käse (verarbeitet), Lachs (Dose)	Verseifung: 75 °C (30 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: EE-PE-H ₂ O-EtOH	a) TSQ 7000 (Finnigan MAT, jetzt: Thermo Fisher Scientific Corp.) b) LCQ Deca XP (Thermo electron Corp., jetzt: Thermo Fisher Scientific Corp.) APCI (+)	Intersil® ODS-2 (5 µm, 250 x 4,6 mm): MeOH-ACN	-	Phillips 2008 [129] (nach USDA Food Composition and Methods Development Laboratory FCMDL)
D _{2/3} [² H ₃ -D ₃]	a) Säuglingsnahrung, Käse, Cerealien, Multivitaminpräparate b) Futtermittel	Verseifung: RT (ovn), alkalisch, EtOH 1. LLE: Hex (+ BHT)	MDS Sciex API 4000 QTRAP APCI (+)	YMC (3 µm; 150 x 2,0 mm); Waters) a) ACN-MeOH (+ 0,1 % AcOH) b) H ₂ O-ACN (+ 0,1 % AcOH)	BG: 0,045 µg/100 g	Huang 2009 [139]
25(OH)D ₃ [² H ₆ -25(OH)D ₃]	Schwein (Niere, Leber, Muskel, Milz, Fett ¹ , Haut ²)	<u>Keine</u> Verseifung! Zerreiben mit MeOH ¹ 1. Zerreiben mit MeOH 2. SPE (Chromabond SPE, C18ec [500 mg], Machery & Nagel): MeOH-H ₂ O ² 1. enzymatische Hydrolyse mit Collagenase (> 1200 CDU/ mg, Sigma) 2. SPE ((Chromabond SPE, C18ec [500 mg], Machery & Nagel): MeOH-H ₂ O	Agilent 1100 LC/MSD APCI (+)	Switch-system: analyt. column: Aquasil C18 (3 µm, 100 x 3 mm) trapping column: Aquasil C18 (5 µm, 10 x 3 mm) MeOH-H ₂ O (+ 0,05 % HCOOH)	NWG: 0,1 - 0,5 µg/100 g	Höller 2010 [140]
D ₃ , 25(OH)D ₃ [² H ₃ -D ₃ ; ² H ₃ -25(OH)D ₃]	Kuhmilch, Säuglingsnahrung (angereichert/ nicht angereichert)	Verseifung: T (30 min), alkalisch, EtOH 1. LLE: Hex (+ BHT) 2. SPE (nicht angereicherte Produkte/ 25(OH)D ₃ : Silica SPE [500 mg]): Hex-EA	a) Thermo Electron LTQ APCI (+) b) Waters Micromass Quattro ESI (+)	Polaris C18-A (5 µm, 150 x 2,1 mm, Varian): a) MeOH-H ₂ O b) MeOH-H ₂ O (+ 5 mM NH ₄ HCO ₂)	a) BG (D ₃): 0,01 µg/100 ml a) BG (25D ₃): 0,01 µg/100 ml b) BG (D ₃): 0,02 µg/100 ml	Trenerry 2011 [141]
25(OH)D ₃ [25(OH)D ₂]	Fleisch (Schwein, Rind, Huhn), Eier, Fisch, Fertiggerichte	Verseifung: RT (ovn), alkalisch, EtOH 1. LLE: EE:PE (1:4) 2. SPE (Varian Bondelut Silica SPE [1000 mg]):	a) Micromass Quattro II b) Waters Quattro Premier XE	Lichrospher RP-18 (5 µm, 250 x 3 mm): MeOH-H ₂ O (+ 0,2 % AcOH)	NWG: 0,04 µg/100 g	Bilodeau 2011 [52]

		IPA-Cyclohex-DCM-Hex 3. SP (25D ₃): 2 kombinierte Waters Spherisorb NH ₂ (5 µm, 150 x 4,6 mm, Waters)	APCI (+)			
D ₃ [² H ₃ -D ₃]	Säuglingsnahrung, Milch, Milchpulver (angereichert)	<u>Keine</u> Verseifung ! LLE: IO-ACN Derivatisierung: PTAD	ABSciex 3200 QTRAP ESI (+)	Kinetex core-shell RP C18 (2,6 µm; 50 x 2,1 mm, Phenomenex): MeOH-H ₂ O (+ 0,2 % NH ₄ HCO ₂)	BG: 0,117 µg/100 g	Abernethy 2012 [103]
D ₃ , D ₂ [² H ₃ -D ₃]	Milch	Verseifung: 25 °C (ovn), alkalisch, EtOH 1. LLE: Hex (+ BHT) 1. SPE (Chromabond XTR [50 ml]): PE (+ BHT) 2. Dekantieren: Hep	4000 Qtrap (AB Sciex APCI (+)	A: 2 kombinierte Säulen: Supelcosil C18 (5 µm, 50 x 4,6 mm, Supelco-Sigma-Aldrich) + Alltima C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm, Grace- Alltech): MeOH-IPA-Hex	BG (D ₂): 2,7 µg/l BG (D ₃): 3,36 µg/l	Gentili 2013 [142]
D _{2/3} , 25(OH)D _{2/3} [[² H ₃ -D ₃ ; ² H ₃ -25(OH)D ₃]]	Fleisch	Verseifung: 25 °C (ovn), alkalisch, EtOH 1. SPE (Chromabond XTR [50 ml]): PE (+ BHT) 2. Dekantieren: Hep	Agilent (Varian) 500 MS IT APCI (+)	Prevail® Silica LC (5 µm, 250 x 4,6 mm, Alltech): IPA-Hep	BG: 0,05 µg/100 g	Strobel 2013 [89] Liu 2013 [90]

2.5 Matrixeffekte

Die LC-MS/MS-Technik stellt aufgrund der Tandem-MS-Möglichkeit gegenüber konventionellen HPLC-UV/DAD-Instrumenten eine sehr selektive Messmethode dar. Jedoch sind Matrixeffekte, die in den Probenextrakten von komplexen Matrices in großen Mengen vorkommen, bei der MS/MS-Detektion im Gegensatz zur UV/DAD-Detektion für den Analytiker nicht direkt sichtbar. Diese Interferenzen können die Analyse stark beeinflussen, indem sie den Transport der Zielanalyten und die Bildung von Ionen in die bzw. der Gasphase stören [143]. Dies führt zu Signalerhöhungen (*Ion enhancement*) bzw. -unterdrückungen (*Ion suppression*), welche sich auf die Leistungsfähigkeit der Methode auswirken (Richtigkeit, Linearität, Wiederholbarkeit, Präzision, Nachweisgrenze usw.) [144].

Ursache von Matrixeffekten

Hauptquellen für Matrixeffekte sind endogene Substanzen (organische/anorganische Moleküle), die aus der Probe selbst stammen und exogene Stoffe, die während der Probenaufbereitung in die Messlösung gelangen (Lösungsmittel, Festphasenmaterial). Bei den endogenen Substanzen kann es sich um ionische Strukturen (anorganische Elektrolyte, Salze), hoch polare Komponenten (Phenole, Pigmente) und verschiedene organische Substanzen wie Kohlenhydrate, Amine, Harnstoff, Lipide, Peptide, analoge Komponenten oder strukturähnliche Metabolite handeln. Infolge natürlicher Konzentrationsschwankungen sind diese Strukturen nicht vorher zu bestimmen. Exogene Substanzen umfassen zum Beispiel Kunststoffe, Polymere, Phthalate, Waschmittelrückstände, Ionenpaarreagenzien und Puffer. Ionensuppression entsteht wenn diese Stoffe in hoher Konzentration in der Messlösung vorkommen und im gleichen Zeitfenster wie die Zielanalyten von der Säule eluieren [145].

Mechanismus der Ionensuppression

Zur Ionensuppression wurden bereits verschiedene Mechanismen in der wässrigen aber auch in der Gasphase beschrieben. Beispielsweise können nicht oder kaum flüchtige Substanzen die Effizienz der Tröpfchenbildung bzw. Tröpfchenverdampfung verändern und somit die Anzahl an Ionen die den Detektor erreichen, beeinflussen. Darüber hinaus hat auch das gemeinsame Ausfällen mit Makromolekülen eine Bedeutung. Bei einem weiteren postulierten Mechanismus konkurrieren die Störkomponenten mit den Zielanalyten um die maximale Ionisationseffizienz. In der Gasphase können die Zielanalyten mit hochaktiven Substanzen Deprotonierungsreaktionen eingehen und infolgedessen neutralisiert werden. Die Stabilität der gebildeten Ionen ist demnach ebenfalls von Bedeutung [144, 145].

Identifizierung von Matrixeffekten

Um potentielle Matrixeffekte zu identifizieren, können die Zielanalyten nachträglich in die fertigen Blind-Probenextrakte dotiert (*Post-Extraction Addition*) und die resultierenden Signalintensitäten mit

denen eines Standardmixes gleicher Endkonzentration in reinem Lösungsmittel verglichen werden. Eine weitere Möglichkeit Matrixeffekte zu bewerten, stellt der Infundierversuch mittels T-Stück (*Post-Column-Infusion*) dar. Hierbei wird ein Standardmix in reinem Lösungsmittel permanent zwischen HPLC und MS infundiert, während eine Blindprobe injiziert wird. Der Einbruch der Basislinie deutet auf eine Unterdrückung der Ionisierung des Analyten aufgrund endogener Substanzen hin [143-146].

Maßnahmen zur Verringerung/Kompensation von Matrixeffekten

Um Matrixeffekte zu minimieren bzw. zu kompensieren, stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. In Tabelle 12 sind einige Maßnahmen aufgeführt [144].

Tabelle 12: Eliminierung bzw. Reduzierung von Matrixeffekten [144]

Maßnahmen	Hinweis
Verringerung des Injektionsvolumen/Probenverdünnung	<ul style="list-style-type: none"> ○ Empfindlichkeit des Gerätes muss hoch genug sein, um Zielanalyten zu erfassen
Optimierung/Intensivierung der Probenaufreinigung	<ul style="list-style-type: none"> ○ arbeits- und zeitintensiv ○ Matrixeffekte können zusätzlich verursacht werden
Optimierung der chromatographischen/ massenspektrometrischen Parameter (Flussrate erniedrigen, Flow-splitting)	<ul style="list-style-type: none"> ○ teilweise höhere Messzeiten ○ Quellen-Design anderer Hersteller können weniger empfänglich für Matrixeffekte sein
Verwendung eines geeigneten ISTDs (Kompensation der Signalveränderungen)	<ul style="list-style-type: none"> ○ strukturell analoger STD und Analyt können unterschiedlich von der Matrix beeinflusst werden → Verwendung deuterierte STDs (kostenintensiv, Matrixeinfluss nicht unbedingt eliminiert/ kompensiert)
Standardaddition	<ul style="list-style-type: none"> ○ arbeits- und zeitintensiv
Alternative Ionisierungsquelle	<ul style="list-style-type: none"> ○ Empfindlichkeit muss hoch genug sein um Zielanalyten erfassen zu können ○ Matrixeffekte treten auch bei alternativen Ionisierungstechniken auf

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Methodenentwicklung

Zur Identifizierung und Quantifizierung der D-Vitamine in Lebensmitteln musste ein geeignetes Analysenverfahren entwickelt werden. Die Herausforderung der Vitamin D-Analytik besteht zum einen in der anspruchsvollen Matrix Fett, in der die Zielstrukturen im Spurenbereich vorliegen und zum anderen in strukturähnlichen Begleitstoffen (z.B. Cholesterin), welche die Bestimmung beeinflussen. Diese Interferenzen müssen durch sorgfältige Probenvorbereitung und instrumentelle Maßnahmen beseitigt bzw. kompensiert werden. Die zu entwickelnde Methode sollte routinetauglich sein, daher stand die Probenvorbereitung, unter Berücksichtigung der Nachweisempfindlichkeit und der Analysenzeit, im Vordergrund der Methodenentwicklung.

Derzeit existieren verschiedene Untersuchungsmethoden um den Gehalt an D-Vitaminen in Lebensmitteln zu bestimmen (Siehe 2.4; Seite 15 f.). In der Regel wird eine alkalische Hydrolyse, gefolgt von einer Extraktion und anschließender Identifizierung bzw. Quantifizierung mittels HPLC und UV/VIS- bzw. MS/MS-Detektion eingesetzt.

Vor diesem Hintergrund wurden folgende Ansätze bei der Entwicklung der Methode zugrunde gelegt:

1. Methanolische Verseifung
2. Aufreinigung/Anreicherung mittels Festphasen-Extraktion (SPE)
3. Identifizierung/Quantifizierung mittels LC-MS/MS

D-Vitamine sind empfindlich gegenüber Licht, Hitze und Sauerstoff, deshalb müssen die einzelnen Verfahrensschritte während der Probenaufarbeitung genauestens aufeinander abgestimmt werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden daher unterschiedliche Hydrolyse- sowie Extraktionsbedingungen getestet. Die Optimierung der Analysenzeit erfolgte durch die Wahl geeigneter Messmethoden und effizienter Messbedingungen.

3.1.1 Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Trennmethode

Eine gute chromatographische Trennung ist von Bedeutung, da sie ein wichtiges Identifizierungskriterium darstellt. In Hinblick auf die zu entwickelnde LC-MS/MS-Methode ist eine angemessene Empfindlichkeit gegeben, wenn dem Massenspektrometer für jede Massenspur eine ausreichend lange Messzeit zur Verfügung steht. Dies lässt sich nur dann erreichen, wenn die einzelnen D-Vitamine und möglichst auch die Probenmatrix zeitlich versetzt von der Säule eluieren.

Die Entwicklung der chromatographischen Trennmethode erfolgte mittels kommerziell erhältlicher Standards zunächst an einer HPLC mit UV/VIS Detektion ($\lambda = 265 \text{ nm}$). Um eine schnelle und einfache Analytik zu etablieren, wurden unterschiedliche Trennparameter wie der Einfluss des

Laufmittelsystems (Fließmittelzusammensetzung, Fließmitteladditive, isokratisch/Gradientenelution; Flussrate) und der Säule (Säulendurchmesser, Säulentemperatur) untersucht.

Als Laufmittel diente Methanol bzw. Wasser versetzt mit jeweils 0,1 % Ameisensäure. Später wurde auch der Einsatz von Acetonitril als mobile Phase getestet. Dieses Laufmittelsystem konnte jedoch nicht auf die bestehende Methode angewendet werden, da im resultierenden LC-MS/MS-Chromatogramm, im Gegensatz zum Methanol-System, nicht alle Standards nachweisbar waren. Vermutlich führt der unpolare Charakter von Acetonitril im ESI-Modus zu einer Verringerung der Ladungsträger und somit zu einer schlechteren Ionisation der Zielanalyten.

D-Vitamere weisen ein breites Polaritätsspektrum im mittel- bis unpolaren Bereich auf ($\log K_{ow}$ -Werte: 7,6 - 10,6 [147, 148]), deshalb fanden die Trennungen an Umkehrphasen (RP-Phasen; Knauer Vertex Column Eurospher-100 C18; 250 x 4,6 mm mit integrierter Vorsäule; Knauer Eurospher II 100-3 C18 H; 100 x 2 mm mit integrierter Vorsäule) statt, welche für polare und unpolare Analyten gleichermaßen geeignet sind. Die Dimension der Säule, speziell der Innendurchmesser, wurde letztendlich so gewählt, dass der Eluentenstrom vollständig (*split-less*) dem Massenspektrometer zugeführt werden konnte, um eine maximale Nachweisempfindlichkeit zu erreichen. Darüber hinaus führte der Einsatz der kürzeren Säule zu einer Verringerung der Messzeit von 95 min auf 24 min. Zusätzlich wurde eine Methode zum Spülen der Säule erarbeitet, um die Empfindlichkeit der Messmethode zu verbessern (Siehe 3.1.4; Seite 32 f.). In Tabelle 13 sind die optimierten LC-Parameter zusammengefasst. Da die Zielstrukturen nur in sehr geringen Gehalten im Lebensmittel zu erwarten sind, wurde die optimierte HPLC-Methode anschließend auf die Flüssigchromatographie gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS/MS) übertragen.

Tabelle 13: Optimierte LC-Parameter

Parameter	Bedingung
Messmethode	
Trennsäule	Knauer Eurospher II 100-3 C18 H 100 x 2 mm + Vorsäule
Laufmittel	A: H ₂ O + 0,1 % Ameisensäure B: MeOH + 0,1 % Ameisensäure
Fluss	0,3 ml/min
Temperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µl
Gradient	40/60 $\xrightarrow{2'}$ 5/95 $\xrightarrow{2'}$ 0/100 (15') $\xrightarrow{0,75'}$ 40/60 (4,25')
Dauer	24 min
Spülmethode	
Injektionsvolumen	100 µl Methanol
Gradient	40/60 $\xrightarrow{0,5'}$ 0/100 (6') $\xrightarrow{0,5'}$ 40/60 (5')
Dauer	12 min

3.1.2 Optimierung der massenspektrometrischen Detektion

Die massenspektrometrische Detektion der einzelnen Analyten erfolgte im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus (ESI, positiv). Zur Ermittlung und Optimierung substanzspezifischer

Massenübergänge sowie den dazugehörigen Geräteparametern wurden für die einzelnen D-Vitamerestandardlösungen mit einem Substanzgehalt von ca. 5-10 mg/l Methanol hergestellt. Diese Lösungen wurden mittels Spritzenpumpe (5 µl/min) kontinuierlich nach der Trennsäule der Ionenquelle (ESI) zugeführt. Mit diesem Verfahren konnten die bestmöglichen Bedingungen für die Fragmentierung der D-Vitamerestandardlösungen bestimmt werden. Es wurden für jede Zielsubstanz drei intensitätsstarke Masse zu Ladungs-Übergänge, zwei Qualifier und ein Quantifier, sowie die optimalen Bedingungen ermittelt. In Tabelle 14 und Tabelle 15 sind die Fragmente, deren Retentionszeiten und die entsprechenden Gasparameter aufgelistet.

Tabelle 14: MS/MS-Übergänge der D-Vitamerestandardlösungen

Analyt	Mutterion	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Rt [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
(24R)-24,25(OH) ₂ D ₃	[M+H] ⁺	417,5	399,4	6,8	40	12	13
	[M+H] ⁺	417,5*	381,4*	6,8	40	15	9
	[M+H] ⁺	417,5	121,2	6,8	40	12	10
1,25(OH) ₂ D ₃	[M-18+H] ⁺	399,4*	381,4*	7,1	40	15	9
	[M-18+H] ⁺	399,4	363,3	7,1	40	16	12
	[M-18+H] ⁺	399,4	133,1	7,1	40	31	9
1,25(OH) ₂ D ₂	[M-18+H] ⁺	411,4	259,2	7,3	35	15	6
	[M-18+H] ⁺	411,4	151,1	7,3	35	20	11
	[M-18+H] ⁺	411,4*	133,1*	7,3	35	31	9
25(OH)D ₃	[M+H] ⁺	401,2*	383,3*	8	35	15	12
	[M+H] ⁺	401,2	365,3	8	35	18	10
	[M+H] ⁺	401,2	105,2	8	35	63	6
25(OH)D ₂	[M+H] ⁺	413,3*	395,4*	8,2	30	12	12
	[M+H] ⁺	413,3	355,4	8,2	30	12,5	11
	[M+H] ⁺	413,3	337,5	8,2	30	13	10
D ₂	[M+H] ⁺	397,4	379,4	12,4	30	15	12
	[M+H] ⁺	397,4	271,4	12,4	30	17	6,5
	[M+H] ⁺	397,4*	69,2*	12,4	30	46	6,5
D ₃	[M+H] ⁺	385,5	367,5	12,6	30	15	12
	[M+H] ⁺	385,5*	259,4*	12,6	30	20	6
	[M+H] ⁺	385,5	159,2	12,6	30	33,5	13
Ergosterol	[M-18+H] ⁺	379,4	159,2	13,4	35	55	10
	[M-18+H] ⁺	379,4	125,2	13,4	35	18	9
	[M-18+H] ⁺	379,4*	69,2*	13,4	35	43	12
7-DHC	[M+H] ⁺	385,3	367,5	13,7	60	14	10
	[M-18+H] ⁺	367,3	159,2	13,7	35	27	12
	[M-18+H] ⁺	367,3*	145,1*	13,7	35	24	12

*Quantifier

Tabelle 15: MS/MS-Übergänge der deuterierten D-Vitamine

Analyt	Mutterion	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Rt [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
1,25(OH) ₂ D ₃ -d ₃	[M-18+H] ⁺	402,4*	384,4*	7,1	40	15	10
	[M-18+H] ⁺	402,4	366,4	7,1	40	16	12
	[M-18+H] ⁺	402,4	136,2	7,1	40	31	9
25(OH)D ₃ -d ₃	[M+H] ⁺	404,2*	386,4*	8	35	17	12
	[M+H] ⁺	404,2	368,4	8	35	18	10
	[M+H] ⁺	404,2	357,4	8	35	19,5	20
D ₂ -d ₃	[M+H] ⁺	400,7	382,4	12,4	30	15	12
	[M+H] ⁺	400,7	271,5	12,4	30	17	6,5
	[M+H] ⁺	400,7*	69,2*	12,4	30	46	6,5
D ₃ -d ₃	[M+H] ⁺	388,5	370,5	12,6	30	17	11
	[M+H] ⁺	388,5*	259,3*	12,6	30	20	6
	[M+H] ⁺	388,5	162,2	12,6	30	33,5	13
7-DHC-d ₇	[M+H] ⁺	392,6	374,3	13,7	60	14	10
	[M-18+H] ⁺	374,4	159,3	13,7	35	27	12
	[M-18+H] ⁺	374,4*	145,2*	13,7	35	24	12

*Quantifizier

Anhand verschiedener Matrices konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Massenübergänge die geringste Störung durch Signale anderer Substanzen aufwiesen. Abschließend wurden die nicht-substanzspezifischen MS-Parameter durch Fließinjektionsanalyse (FIA) mittels eines Mischstandards für die maximale Ionenausbeute optimiert. Die Geräteeinstellungen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Optimierte massenspektrometrische Parameter

Parameter	Bedingung
Curtain Gas	30 psi
Temperature	550 °C
Gas 1 (Auxiliary Gas)	45 psi
Gas 2 (Nebulizer Gas)	60 psi
Collision Gas	medium
Ion Spray Voltage	5.500 V
Detection	sMRM-Mode

3.1.3 Einsatz von Ionisierungshilfsmitteln

Es zeigte sich, dass D-Vitamere zur Adduktbildung mit in der Lösung vorhandenen Ionen neigen, so dass eine Vielzahl von Molekülkationen (Addukte mit Ammonium-, Natrium-, Kaliumionen ect.) auftrat. Zur Optimierung der Ionisierung wurden dem Laufmittel daher Gemische verschiedener Modifier (Salze [Ammoniumformiat, Natriumacetat, Lithiumacetat], Basen [Methylamin]) gleicher Stoffmengenkonzentrationen zugesetzt, um eine einheitliche Ionenbildung und folglich höhere Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit zu fördern.

Die Zugabe von Ammoniumformiat bzw. Methylamin hatte keinen merklichen Einfluss auf die selektive Adduktbildung. Mittels Natriumacetat konnte zwar ein dominantes Natrium-Addukt erzeugt werden, jedoch führte dessen Einsatz insgesamt zu einer Intensitätsverschlechterung. Dies konnte auch bei Lithiumacetat beobachtet werden.

Allein der Zusatz von Ameisensäure führte zu einem Intensitätsgewinn. Auf eine weitere Zugabe von Additiven wurde daher verzichtet.

3.1.4 Chromatographische Spülschritte

Nach Abschluss der Optimierung wurde die Stabilität des Messsystems überprüft, indem eine aufgearbeitete Lachsprobe mehrfach in das LC-MS/MS-System injiziert und die Peakflächen des Quantifierions bestimmt wurde. In Tabelle 17 sind die Variationskoeffizienten ausgewählter Analyten für eine Serie von neun bzw. sechs Injektionen mit der Konzentration von 0,2 mg/l dargestellt. Abbildung 7 zeigt die entsprechenden Peakflächen als Funktion der aufeinanderfolgenden Injektionen.

Tabelle 17: Variationskoeffizienten aus den Peakflächen der Quantifier nacheinander folgender Messungen ohne und mit Spülschritt

Analyt	RSD [%]		
	ohne Spülschritt		mit Spülschritt
	9 Messungen	6 Messungen (ersten 3 unberücksichtigt)	6 Messungen
(24R)-24,25(OH) ₂ D ₃	50,3	7,0	3,5
25(OH)D ₃ d ₃	24,7	2,6	2,2
D ₃ d ₃	7,3	3,3	2,6
D ₂ d ₃	6,7	3,6	1,3
D ₃	7,0	2,1	1,0
7-DHC	5,0	2,4	1,3

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass der Variationskoeffizient der meisten Analyten erst durch das Ausklammern der ersten drei Injektionen kleiner als 5 % und damit als gut zu bewerten ist. Die Peakflächen der ersten drei Messungen waren immer, unabhängig von der Matrix, signifikant höher als die der folgenden. Frisch angesetzte Standard-Lösungen, die im Anschluss an die Messungen injiziert wurden, zeigten dieses Phänomen nicht. Eine Matrixabhängigkeit sowie eine Instabilität der Messlösungen kommen daher nicht in Betracht. Aufgrund des angewendeten Quantifizierungsverfahrens (Siehe 4.2.2, Seite 85; deuterierter ISTD), können Überbewertungen der tatsächlichen Analyt-Konzentration jedoch ausgeschlossen werden.

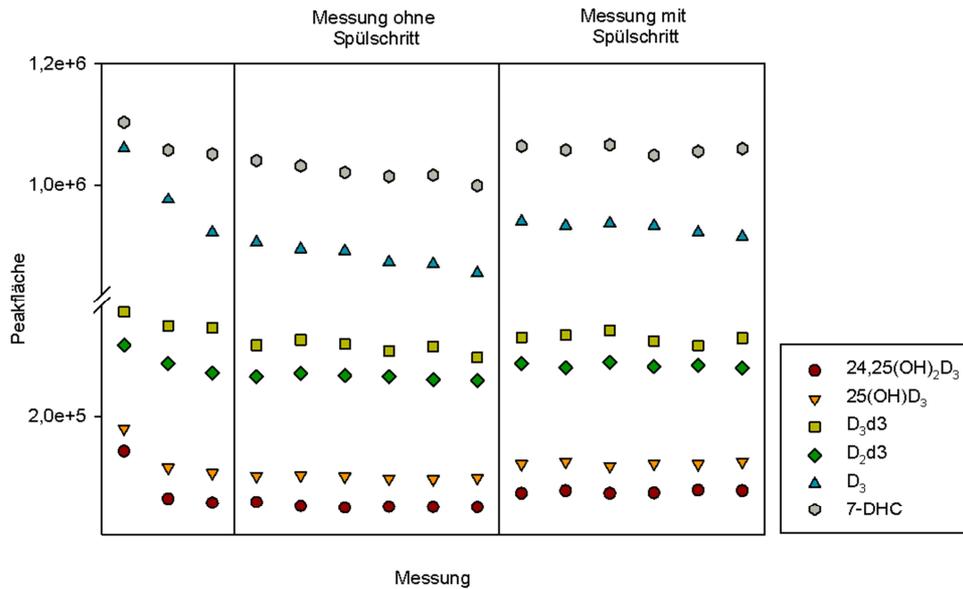


Abbildung 7: Peakflächen ausgewählter D-Vitamerer nacheinander folgender Messungen ohne und mit Spülschritt

Abbildung 7 zeigt, dass der Einsatz der Zwischenspülmethode bei allen D-Vitameren zu einer höheren Messempfindlichkeit führte. Darüber hinaus konnte die Messpräzision weiter verbessert werden. Aufgrund dessen wurde nach jeder Messung ein Spülschritt durchlaufen. In Tabelle 13 (Seite 29) sind die entsprechenden HPLC-Bedingungen zusammengefasst.

3.1.5 Säulenrekonstitution mit Tetrahydrofuran

Im Verlauf der Routinemessungen wurde festgestellt, dass die eingesetzte Trennsäule nur eine geringe Haltbarkeit aufwies. Nach Messung von ca. 250 Lebensmittelproben zeigten die Chromatogramme trotz Zwischenspülschritt (Siehe 3.1.4) extreme Peakverbreiterungen, was die Quantifizierung, angesichts der geringen Vitamin D-Gehalte in den Proben, unmöglich machte. Da eine intensive Probenaufreinigung (inklusive der Probenvorbereitung, siehe Zusammenfassung 3.1.8; Seite 41) nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde versucht, die Lebensdauer der Säule über das chromatographische System zu verlängern.

Die D-Vitamerer werden mit 100 % Methanol von der stationären Phase eluiert. Durch den Zusatz von Tetrahydrofuran wurde die Elutionswirkung des Laufmittels erhöht, um mögliche Störkomponenten von der Säule zu spülen. Dies hatte jedoch Auswirkungen auf die chromatographische Trennung. Insbesondere die unpolaren Strukturen wurden stärker auf der Säule zurückgehalten, was zu einer Peakverbreiterung führte. Eine optimale Trennung der einzelnen Analyten voneinander war nicht mehr gegeben. Da diese aber eine Grundlage für die Empfindlichkeit der LC-MS/MS-Methode darstellt, wurde im Weiteren auf eine Modifizierung des Laufmittels verzichtet.

Sowohl der Austausch der Vorsäule als auch die Regenerierung der verschmutzten Trennsäule brachten nur eine kurzfristige Verbesserung, so dass etwa alle 250 Proben eine neue Trennsäule eingesetzt werden musste.

3.1.6 Derivatisierung

Aus der Literatur ist bekannt, dass D-Vitamine aufgrund ihres Dien-Systems gut mit dienophilen Strukturen, wie 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion, unter Bildung von Pyridazin-Derivaten, reagieren [134, 135, 137, 138, 149]. In Abbildung 8 ist die Derivatisierung von Vitamin D₃ dargestellt. Die Diels-Alder-Derivatisierung führt zu einer verbesserten Ionisierbarkeit der Zielstrukturen, was einen empfindlichen Nachweis der D-Vitamine auch im Spurenbereich möglich macht. Es werden Intensitätsgewinne von Faktor 100-1000 beschrieben [134, 138].

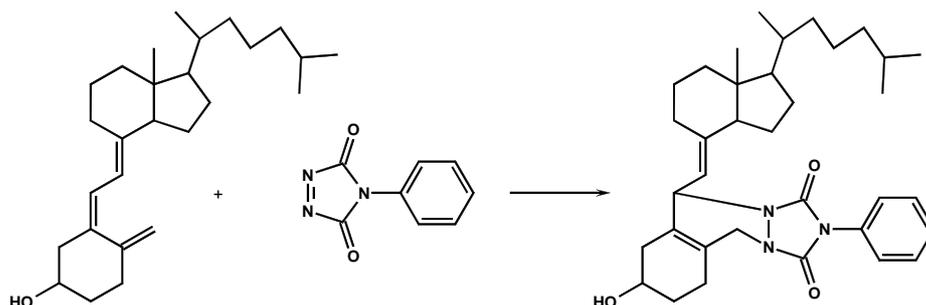


Abbildung 8: Derivatisierung von Cholecalciferol (Vitamin D₃)

Durch den Vergleich der Intensitäten eines nativen und derivatisierten Mischstandards (Durchführung der Derivatisierung, 4.2.4, Seite 86) gleicher Konzentration (0,2 mg/l) konnte die aus der Literatur beschriebene Intensitätserhöhung für die meisten D-Vitamine bestätigt werden. Der maximal ermittelte Intensitätsgewinn lag allerdings bei einem Faktor von 20 (Tabelle 18).

Tabelle 18: Vergleich der Intensitäten eines nativen und derivatisierten Mischstandards (0,2 mg/l)

Analyt	Derivatisiert [cps]	Nativ [cps]	Faktor
D ₃	1,49E+05	1,93E+04	8
D ₂	1,43E+05	9,95E+03	14
(24R)-24,25(OH) ₂ D ₃	1,55E+05	6,00E+04	3
25(OH)D ₃	5,10E+05	2,22E+05	2
25(OH)D ₂	7,55E+04	8,14E+04	1
1 α ,25(OH) ₂ D ₃	1,36E+05	7,13E+03	19
1 α ,25(OH) ₂ D ₂	4,69E+04	8,04E+03	6
Ergosterol	1,27E+05	9,27E+04	1
7-DHC	2,66E+05	2,28E+04	12

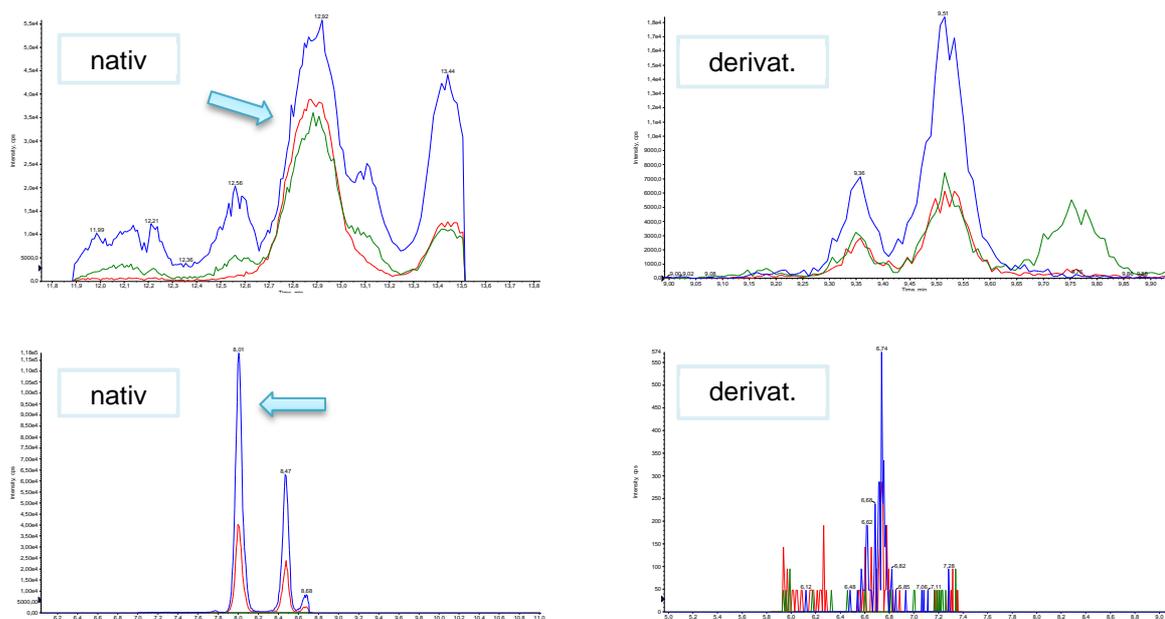
Der Vergleich der Intensitäten ein und derselben aufgearbeiteten Lachs- bzw. Eigelbprobe im nativen und derivatisierten Zustand zeigte ein anderes Verhalten (Tabelle 19).

Tabelle 19: Vergleich der Intensitäten ausgewählter D-Vitamer einer aufgearbeiteten Lachs- bzw. Eigelbprobe im nativen und derivatisierten Zustand

Analyt	Lachs			Eigelb		
	Derivatisiert [cps]	Nativ [cps]	Faktor	Derivatisiert [cps]	Nativ [cps]	Faktor
7-DHC	9,87E+05	4,60E+05	2,15	3,21E+04	1,52E+04	2,11
D ₃	3,50E+04	5,60E+04	0,62	3,83E+04	3,50E+04	1,09
D ₃ d3	1,28E+03	1,57E+05	0,01	1,76E+04	2,00E+04	0,88
25(OH)D ₃ d3	9,88E+02	3,61E+04	0,03	6,37E+02	4,80E+04	0,01
1 α ,25(OH) ₂ D ₃ d3	9,87E+05	4,60E+05	2,15	6,00E+01	6,54E+03	0,01

Offenbar verursachten nicht abgetrennte Begleitstoffe in der Matrix während der Derivatisierung Interferenzen, die sich wiederum diskriminierend auf die Derivatisierung der einzelnen Analyten auswirkten. Eine Intensitätserhöhung konnte ausschließlich in den Vorläuferstrukturen 7-Dehydrocholesterol und Ergosterol festgestellt werden. Die Signale von Vitamin D₃ bzw. dem entsprechend deuterierten Standard im nativen bzw. derivatisierten Zustand zeigten in etwa die gleichen Dimensionen, während die Pyridazin-Derivate der mehrfach-hydroxylierten D-Vitamer nur etwa 1-3 % der Intensität der nativen Strukturen aufwiesen. Eine Erhöhung des Anteils bzw. der Konzentration des Derivatisierungsmittels brachte keine Verbesserung der Signale. Dies wurde auch von Aronov *et al.* (2008) beobachtet [138]. Lediglich durch das Fraktionieren der nativen Messung mit anschließender Derivatisierung der einzelnen Fraktionen konnte einer Diskriminierung der hydroxylierten Strukturen in den Proben entgegengesteuert werden.

In Abbildung 9 sind beispielhaft die LC-MS/MS-Chromatogramme von Vitamin D₃ (oben) und 25-Hydroxycholecalciferol (unten) von ein und derselben Lachsprobe im nativen und derivatisierten Zustand dargestellt.

Abbildung 9: Vitamin D₃ (oben) und 25-Hydroxycholecalciferol (unten) einer Lachsprobe

Die aus der Derivatisierung hervorgehenden typischen Isomere sind beim derivatisierten Vitamin D₃ (obere Abbildung, rechts) deutlich zu erkennen. Für jede Substanz ergeben sich zwei Signale, die unmittelbar zusammenhängen. Die Isomere von 25-Hydroxycholecalciferol (untere Abbildung, rechts) wurden mit der vorliegenden Methode nicht vollständig voneinander getrennt, so dass lediglich ein Signal im Chromatogramm zu sehen ist. Anhand der Abbildungen wird deutlich, dass das Signal-Rausch-Verhältnis des derivatisierten Vitamin D₃ deutlich größer ist, als das der nativen Struktur. Dennoch wurde aufgrund der Diskriminierung einzelner Strukturen während der direkten Derivatisierung aus der Probelösung sowie dem Arbeitsaufwand des Fraktionierens und dem geringen Empfindlichkeitsgewinn, im Weiteren auf den Derivatisierungsschritt verzichtet.

3.1.7 Entwicklung und Optimierung der Probenaufarbeitung

Die Entwicklung der Probenaufarbeitung basierte auf vorangegangenen Arbeiten von Hartmann (2007) und dem Prüfverfahren 21-0054-01 des Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt (Hausmethode) [150, 151].

3.1.7.1 Etablierung der Verseifung

Die Hydrolyse der Lebensmittelproben war unumgänglich, da die finale Methode insbesondere für fettreiche Matrices angewendet werden sollte. In Abbildung 10 ist die Verseifung nach dem Prüfverfahren 21-0054-01 dargestellt. Diese diente als Grundlage für die Entwicklung und Optimierung des Hydrolyseschrittes. Natriumascorbat wurde als Antioxidationsmittel zugegeben. Der Zusatz von Natriumsulfid diente dem Ausschluss katalytischer Effekte von Metallspuren. Natriumheptansulfonsäure (HSS) fand als Ionenpaarreagenz Anwendung.

1-10 g	Probe	} in 500 ml Zweihals-Erlenmeyerkolben
30 ml	Wasser	
ISTD	(ca. 1 mg/l in Messlösung)	
1 g	Natriumascorbat	
2 ml	4 % -ige Natriumsulfid-Lösung	
25 ml	methan. Kaliumhydroxid-Lösung	
100 ml	Methanol	
<ul style="list-style-type: none"> • 85 °C, ½-1 h (Fettanteil >25 %) unter Rückfluss, N₂-Strom, Lichtschutz • 20 ml Methanol durch Kühler geben, Abkühlen auf Raumtemperatur • Zugabe 20-25 ml 1 M Zitronensäure (pH der Probelösung = 9) • Zugabe 5 ml methanolische 0,3 M Natriumheptansulfonsäure • Probenansatz in 250 ml Messkolben überführen und auffüllen 		

Abbildung 10: Verseifung nach Prüfverfahren 21-0054-01

Es wurden verschiedene Parameter (Art der Verseifung [kalt/heiß], Temperatur, Zeit, pH-Wert ect.) variiert und gegebenenfalls verändert. Um den vorgesehenen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten, erfolgte die Verseifung in hitzestabilen Laborglasflaschen im Trockenschrank je nach Fettgehalt der Matrix für 3 bis 5 h bei 70 °C über Nacht. Die Chemikalien wurden als Gesamtlösung (Lösung 1 und 2) zum Probenansatz gegeben. Durch den Einsatz eines zitronensäurehaltigen Ammoniumchlorid-Puffers konnte von der zeitaufwendigen pH-Wert-Einstellung abgesehen werden. Auf die Zugabe des Ionenpaarreagenzes wurde im Weiteren verzichtet (Siehe 3.1.7.2.2; Seite 39 f.).

In 3.1.8 (Seite 41) ist die optimierte Gesamtmethode dargestellt.

3.1.7.2 Etablierung der Festphasenextraktion

Aufgrund der zu erwartenden niedrigen Konzentrationen der D-Vitamer in Lebensmitteln ist neben der Verseifung ein Aufreinigungs- und Anreicherungsschritt notwendig. Dieser sollte durch eine kombinierte Festphasenextraktion (SPE), beginnend mit einer Reversed-Phase-(RP)-SPE und anschließender Normal-Phase-(NP)-SPE, umgesetzt werden. Die Festphasenextraktion wurde hinsichtlich des Säulenmaterials, der Konditionierungs-, Wasch- und Elutionsbedingungen (Lösungsmittel, Volumen, pH-Wert) optimiert.

3.1.7.2.1 Wahl des Festphasenmaterials

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) stellt eine schnelle und effiziente Methode zur Probenvorbereitung dar. Mittels SPE sollten vor allem störende Begleitstoffe abgetrennt und die D-Vitamer aufkonzentriert werden. Die Schwierigkeit hierbei bestand vor allem in der Wahl des Säulenmaterials, da die Zielanalyten ein relativ breites Polaritätsspektrum zeigen.

RP-Phase

Insgesamt wurden fünf verschiedene Reversed-Phase-SPE-Kartuschen (Tabelle 20) miteinander verglichen. Unter den Säulen befanden sich drei aus Polymerharz und zwei auf oberflächenmodifizierter Kieselgelbasis.

Tabelle 20: Übersicht eingesetzter Festphasenmaterialien

Phase	Hersteller	Material	Polarität
RP-Phasen			
Strata-X	Phenomenex	Polystyrol-Divinylbenzol-Polymer (modifiziert)	unpolar-mittelpolar
Strata-SDB-L	Phenomenex	Styrene-Divinylbenzol-Polymer	unpolar, aromatische WW
Strata C18-E	Phenomenex	Silica (modifiziert)	unpolar
Discovery Select HLB	Supelco	Styrene Polymer (modifiziert)	polar-unpolar
Discovery DSC-18Lt	Supelco	Silica (modifiziert, 11 % C)	mittelpolar
NP-Phasen			
Strata-SI-1 Silica	Phenomenex	Silica (unmodifiziert)	polar
Discovery DSC-Si	Supelco	Silica (unmodifiziert)	polar

Für den Vergleich wurde eine aufdotierte Lachsprobe alkalisch hydrolysiert (Siehe 3.1.8; Seite 41) und auf die entsprechend ihrer Empfehlung vorbereiteten Säulen gegeben. Die Elution erfolgte mittels 6 ml Isopropanol. In Abbildung 11 sind die relativen Peakflächen ausgewählter Vertreter der einzelnen Substanzgruppen dargestellt. Die höchste Peakfläche der jeweiligen D-Vitamere wurde als Bezugspunkt verwendet.

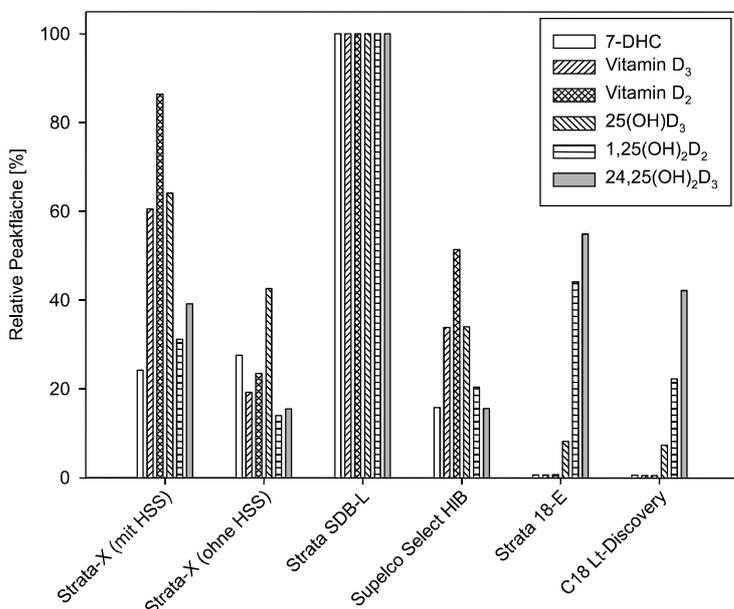


Abbildung 11: Vergleich der Festphasenmaterialien

Die Kartuschen basierend auf oberflächenmodifizierten Kieselgel (5-6) zeigten sich hierbei als weniger geeignet als die auf Polymerharzbasis (1-4). Insbesondere bei den unpolaren Strukturen wie 7-Dehydrocholesterol und Vitamin D_{2/3} wiesen die Kieselgelsäulen deutliche Schwächen auf. Mit der SDB-L-Säule von Phenomenex wurden im Vergleich zu den anderen Kartuschen die besten Ergebnisse erzielt, folglich wurde diese im Weiteren verwendet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Einsatz von Ionenpaarreagenzien wie Natriumpentasulfonat [152] oder Natriumheptan-1-Sulfonsäure (HSS) die Spezifität der D-Vitameren-Trennung und damit die Wiederfindung steigert. Dies konnte für die meisten Analyten, mit Ausnahme von 7-Dehydrocholesterol und Ergosterol unter Verwendung der Strata-X-Kartusche bestätigt werden (Siehe Abbildung 11). Da es sich jedoch sowohl bei den D-Vitameren als auch bei dem Sorbens der SDBL-Kartusche um nicht-ionische Strukturen handelt, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf den Einsatz eines Ionenpaarreagenzes verzichtet.

NP-Phase

Insgesamt wurden zwei verschiedene Normal-Phase-SPE-Kartuschen (Tabelle 20; Seite 37) miteinander verglichen. Für den Vergleich wurde eine aufdotierte Eigelbprobe nach 3.1.8 alkalisch hydrolysiert und auf die entsprechend ihrer Empfehlung vorbereiteten Säulen gegeben. Die Elution erfolgte mit 3 ml eines Gemisches aus Isopropanol und Hexan [35:65; v/v]. Bei der Auswertung der

Ergebnisse zeigten die NP-Säulen keinen signifikanten Unterschied zueinander, so dass letzten Endes aus Kostengründen die Strata-SI-1 Silica von Phenomenex Anwendung fand.

3.1.7.2.2 Optimierung der Festphasenextraktion

RP-Phase

Die Wechselwirkung zwischen Analyt und Festphasenmaterial ist von verschiedenen Faktoren, wie Lösungsmittel und pH-Wert, abhängig. Da die SPE im Anschluss an die Verseifung stattfinden sollte, lag die Probe zunächst in einem stark basischen, wässrigen Milieu vor. Laut Hersteller ist das Festphasenmaterial der SDB-L-Kartusche in einem pH-Bereich von 1-14 stabil. Eine Überprüfung der Festphasenextraktion mit Proben verschiedenen pH-Wertes ergab keinen Einfluss auf die Wiederfindung, jedoch zeigten sich Unterschiede in der Handhabung der Proben. So bildete sich bei einem pH-Wert von über 11 bisweilen ein wolkenförmiger Niederschlag der die Faltenfilter verstopfte. Aufgrund dessen und in Hinblick auf eine Standardisierung des pH-Wertes wurde dieser vor der Aufgabe auf 10 eingestellt. Dies erfolgte aus Gründen der Zeitersparnis mit Hilfe eines zitronensäurehaltigen Ammoniumchlorid-Puffers (Lösung II) und einer 1 M Zitronensäurelösung (Zusammensetzung Siehe 4.1.2; Seite 82).

Die Durchführung der Festphasenextraktion verlief zunächst nach dem Prüfverfahren 21-0054-01 des Landesamts für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt (Abbildung 12).

Säule:	Strata-X 33 u (N-Vinylpyrrolidon Polymer) (200 mg/3 ml)
Konditionieren:	6 ml Methanol 6 ml Wasser (pH = 9)
Probenaufgabe:	50 ml verseifte Probenlösung
Elution:	4 x 3 ml Chloroform

Abbildung 12: Festphasenextraktion nach Prüfverfahren 21-0054-01

Da die zukünftige Methode die Verwendung eines nichtflüchtigen Puffers vorsah, mussten die entsprechenden Salze vor der LC-MS/MS-Messung aus der Probe entfernt werden. Dies geschah mit Einführung verschiedener Waschschriffe. So konnte wasserlösliche Matrix erfolgreich ohne Verluste der D-Vitamere mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser [10:90; v/v] entfernt werden. Um möglichst viele Störkomponenten von den Zielanalyten zu trennen, wurde zusätzlich ein Waschschriff mit einem höheren Anteil der organischen Phase durchgeführt. Bei einer Zusammensetzung von Methanol/Wasser [70:30; v/v] verblieben die D-Vitamere am Festphasenmaterial.

Aufgrund gesundheitlicher Aspekte und dem vorgesehenen Einsatz der Methode in der Routineanalytik, wurde auf Chloroform als Elutionsmittel verzichtet und stattdessen ein Gemisch aus Isopropanol/Ethylacetat [70:30; v/v] (Empfehlung des Herstellers) verwendet. Eine Übersicht über die aus den Untersuchungen hervorgehende RP-SPE-Methode ist in Kapitel 3.1.8 (Seite 41) dargestellt.

NP-Phase

Die NP-Festphasenextraktion wurde zunächst in Anlehnung an Jäpelt (2011) [153] inklusive einiger Modifizierungen mittels eines Mischstandards (0,2 mg/l) durchgeführt (Abbildung 13). Die Elution der Zielanalyten erfolgte schrittweise mit ansteigender Konzentration Isopropanol. Die Fraktionen wurden einzeln aufgefangen und vermessen.

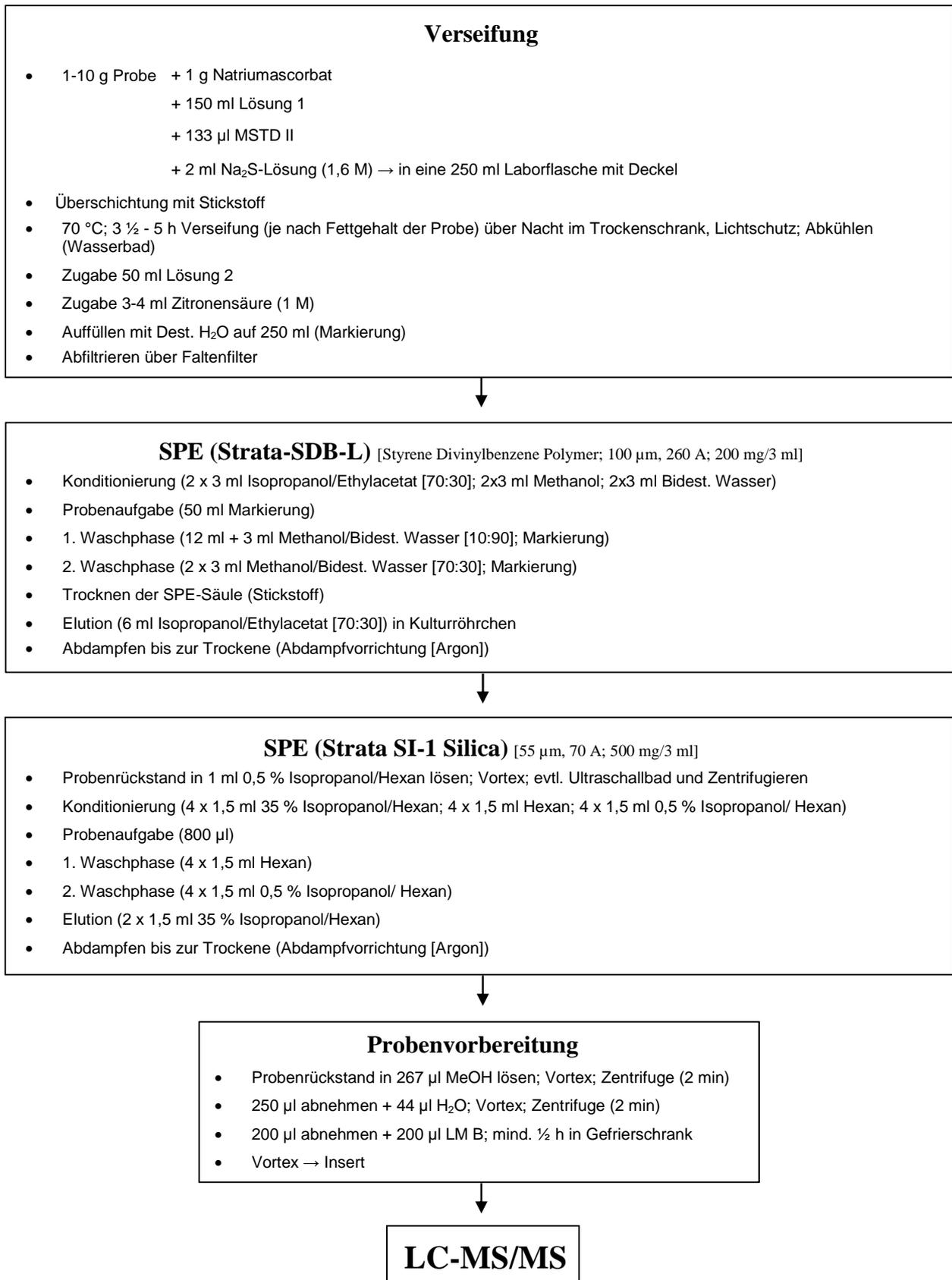
Konditionieren:	3 ml n-Hexan 2 x 3 ml 0,5 % Isopropanol/n-Hexan
Probenaufgabe:	1 ml Probenlösung in 1 % Isopropanol/n-Hexan
Elution:	3 ml Isopropanol/n-Hexan (0; 0,5; 1; 2; 5, 6, 10, 20, 25, 30, 50, 75, 100)

Abbildung 13: NP-Festphasenextraktion

Es zeigte sich, dass die Elutionskraft einer 1 %-igen Isopropanol-Lösung bereits ausreichte um die Wechselwirkung zwischen Analyt und stationärer Phase aufzuheben. Bei einem Verhältnis von 25:75 Isopropanol/n-Hexan waren alle D-Vitamine vollständig von der Säule eluiert. Um mögliche Matrixeffekte zu berücksichtigen, wurde anschließend eine aufgearbeitete Lachsprobe über die NP-Kartusche gegeben. Aus den Untersuchungen konnte entnommen werden, dass 25 % Isopropanol/n-Hexan nicht ausreichten um die Analyten vollständig von der Säule zu entfernen. Als Konsequenz wurden die Probenaufgabe und die Elutionslösung verändert. Eine Übersicht über die optimierte NP-SPE-Methode ist in Kapitel 3.1.8 (Seite 41) zu finden.

3.1.8 Zusammenfassung der optimierten Methode

Die Zusammensetzungen der eingesetzten Lösungen und Misch-Standards sind in 4.1.2 (Seite 81 f.) aufgeführt.



3.2 Identifizierung und Bewertung von Matrixeffekten der optimierten Methode

Nach Methodenentwicklung und -optimierung wurde die gesamte Probenaufarbeitung einschließlich Messung mit einem Standardmix bzw. verschiedenen aufdotierten Lebensmittelproben durchgeführt. Für den Standardmix wurden zufriedenstellende Signale erhalten, die eine gute Wiederfindung implizierten. Im Gegensatz dazu zeigten die Lebensmittelproben deutlich geringere Intensitäten sowie teilweise falsch negative Ergebnisse. Um mögliche Ionensuppressionseffekte zu identifizieren bzw. deren Ausmaß zu bestimmen, wurden die Lebensmittelproben erneut aufgearbeitet und direkt vor der LC-MS/MS-Messung in vier äquidistanten Konzentrationsstufen mit Standardlösung angereichert. Die ermittelten Intensitäten der Quantifier wurden gegen die aufdotierten Konzentrationen aufgetragen und die Steigung der Kalibrierfunktionen (Matrix-Kalibrierung) ermittelt. Zeitgleich wurde eine Standard-Kalibrierung mit den zugesetzten Konzentrationsniveaus vermessen.

Durch Vergleich der Steigung der Standard- mit der Matrix-Kalibrierung, kann der Matrixeffekt als prozentuale Abweichung von der Standardkalibration berechnet werden. Hierbei handelt es sich allerdings um Schätzungen, da die y-Achsenabschnitte und damit die Ausgangskonzentrationen der D-Vitamine in den Proben unberücksichtigt bleiben. In Tabelle 21 ist das Ausmaß der Matrixeffekte für die Quantifier der D-Vitamine in verschiedenen Matrices dargestellt.

Tabelle 21: Matrixeffekte der optimierten Analysenmethode

Analyt	Lachs	Wildlachs	Fleisch	Leber	Käse	Butter	Eigelb
D ₃	+++	+++	--	--	+	+++	--
D ₂	+++	+++	--	--	-	+++	--
(24R)- 24,25(OH) ₂ D ₃	---	---	---	---	---	-	--
25(OH)D ₃	--	--	---	--	--	+	--
25(OH)D ₂	--	--	---	--	--	++	--
1 α ,25(OH) ₂ D ₃	---	---	---	--	---	+	--
1 α ,25(OH) ₂ D ₂	---	---	---	---	---	-	--
Ergosterol	+++	+++	--	--	-	+++	--
7-DHC	+++	+++	--	--	--	++	--

Ausprägung Suppressionseffekt: - (gering), -- (stark), --- (sehr stark)

Ausprägung Promotionseffekt: + (gering), ++ (stark), +++ (sehr stark)

Aus der Tabelle 21 ist zu entnehmen, dass die Ionisierung der Analyten in der Ionenquelle des LC-MS/MS starken Matrixeinflüssen unterlag. Hierbei fanden sowohl Suppressions- als auch Promotionseffekte statt. Insbesondere die mehrfach hydroxylierten D-Vitamine zeigten deutliche Signalunterdrückungen, während die unpolare Strukturen (Vitamin D_{2/3}, Ergosterol, 7-Dehydrocholesterol) teilweise extrem verstärkte Signale aufwiesen. Die signalsuppressiven Effekte stehen möglicherweise mit den Fettsäure- und Cholesterolgehalten der Lebensmittel im Zusammenhang. Untersuchungen der Lebensmittel Eigelb und Lachs mittels GC nach Silylierung mit BSA-TMCS (N, O-Bis(trimethylsilyl)acetamid-Trimethylchlorsilan) zeigten, dass in der Messlösung

vor allem langkettige Fettsäuren (Stearin-, Palmitin, Eicosapentaen-, Docosahexaensäure) und Cholesterol enthalten waren.

Um die Matrixeffekte und Aufarbeitungsverluste zu kompensieren, wurden deuterierte Standards (Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂), 25-Hydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃)) zur Quantifizierung eingesetzt. Sie stellen die wichtigsten Vertreter der zu untersuchenden Substanzgruppen, mit Ausnahme der Provitamine, dar. Laut Literatur müssen diese jedoch nicht zwingend das physikalisch-chemische Verhalten ihrer analogen Partner repräsentieren [144]. In Anbetracht der kaum vorhandenen strukturellen Unterschiede (D₂-Gruppe: Doppelbindung in C22-Position, Methylgruppe am C24 in der Seitenkette) und der Ergebnisse der Validierung sind diese Effekte jedoch minimal. Die ermittelten Daten von Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol sind als halbquantitativ zu bewerten (Siehe 3.3.8.2; Seite 51).

Weitere Maßnahmen zur Verringerung der Matrixeffekte wurden aufgrund der bereits vollständig durchgeführten Optimierung der Methode nicht getroffen.

3.3 Validierung

„Validierung ist die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt sind“ [154]. Die Validierung eines Analysenverfahrens umfasst demnach den Vorgang der Festlegung von Leistungsanforderungen für eine beabsichtigte Anwendung und den Nachweis, dass diese vom Verfahren erfüllt werden. Die Leistungsfähigkeit eines Verfahrens lässt sich durch verschiedene Parameter wie zum Beispiel Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision beschreiben.

Folgende Anforderungen werden an das entwickelte Analysenverfahren gestellt:

Die vorliegende Methode soll als Screening-Methode der Identifizierung und Quantifizierung von ausgewählten D-Vitaminen in verschiedenen Lebensmittelmatrices dienen. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise Vitamin D₃-Gehalte von 0,01 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Milch) [92] bis 77 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Silberlachs) [55] und Vitamin D₂-Gehalte von 0,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Champignon, braun) [76] bis 63 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Echter Pfifferling) [80] zu erwarten. Die Nachweisgrenzen müssen daher niedrig genug sein, um Vitamin D-Konzentrationen im Spurenbereich nachweisen zu können. Gleichzeitig sind Gehalte an 7-Dehydrocholesterol von 7,2 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Weißer Thun) [53] bis 467 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Zuchtlachs) [51] und Ergosterol von 16,8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Echter Pfifferling) [76] bis 192,2 $\text{mg}/100\text{ g}$ (Gemeiner Steinpilz) [76] zu berücksichtigen. Der Arbeitsbereich soll mit Ausnahme für die Provitamine im unteren $\mu\text{g}/\text{l}$ -Bereich liegen und zusätzlich einen linearen Verlauf zeigen, da für die Quantifizierung eine Grundkalibrierung 1. Grades vorgesehen ist. Darüber hinaus sollte die Messunsicherheit in einem angemessenen Bereich liegen. Hierbei sollen lediglich die zufälligen Messabweichungen berücksichtigt werden.

Basierend auf Horwitz (1982) soll die relative Standardabweichung für den Bereich von 1 bis 100 µg/100 g unter Wiederholbedingungen maximal 11 bis 21 % und unter Vergleichsbedingungen (hier: laborintern) maximal 16 bis 31 % betragen [155]. Zur eindeutigen Identifizierung der Zielstrukturen muss die Methode eine ausreichend hohe Selektivität und Spezifität aufweisen. Die mittlere Wiederfindungsrate soll zwischen 70 und 120 % liegen.

Die Validierung (hausintern) des entwickelten Analysenverfahrens erfolgte anhand ausgewählter repräsentativer Proben mittels deuterierter Standards (Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂), 25-Hydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), 7-Dehydrocholesterol-d₇ (25,26,26,26,27,27,27-d₇)). Es wurden die Selektivität, Spezifität, der Arbeitsbereich, die Linearität, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie die Präzision (Wiederhol- und Laborpräzision, Messunsicherheit) für die einzelnen Analyten in verschiedenen repräsentativen Matrices (Wildlachs, Zuchtlachs) bestimmt. Die Überprüfung der Richtigkeit des Verfahrens erfolgte durch die Teilnahme an einem zertifizierten Ringversuch (RVEP 13347 Milchpulver Vitamin D) des Deutschen Referenzbüros für Lebensmittel-Ringversuche und Referenzmaterialien (DRRR). In diesem Rahmen wurde jedoch lediglich die Bestimmung von Vitamin D₃ in einem Bereich von $7,79 \pm 0,33$ µg/100 g und $11,59 \pm 0,74$ µg/100 g in Milchpulver durchgeführt. Um die Richtigkeit auch für die restlichen D-Vitamine zu bestätigen, wurde die Validierungsmatrix vor der Aufarbeitung mit den verschiedenen Zielanalyten aufdotiert und die Richtigkeit über die Wiederfindungsrate bestimmt. Darüber hinaus erfolgte die Überprüfung der Stabilität der D-Vitamine in methanolischer Lösung bei verschiedenen Lagerungsbedingungen (Kühlschrank, Gefrierschrank).

Nachfolgend sind die einzelnen Validierungsparameter exemplarisch für die Matrix „Fischfilet“ (Zuchtlachs) aufgeführt. Im Anhang 10.1.2 befinden sich die Ergebnisse der Validierung „Wildlachs“. Die Zusammensetzungen der verwendeten Mischstandardlösungen sind in 0 zu finden. Einige Validierungsparameter der Provitamine 7-Dehydrocholesterol und Ergosterol wurden sowohl mit 7-Dehydrocholesterol-d₇ (25,26,26,26,27,27,27-d₇) als auch mit Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃) (7-DHC (d₃) bzw. Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂) (Ergosterol (d₃)) als interne Standards berechnet.

3.3.1 Lagerstabilität

Während der Entwicklung, Validierung und Anwendung der Methode wurden verwendete Standardlösungen (Misch-STD I) teilweise für längere Zeit im Gefrierschrank gelagert, weshalb die Haltbarkeit der D-Vitamine in methanolischer Lösung mittels Kalibrierreihen unterschiedlichen Alters überprüft wurde. Eine Kalibrierreihe mit fünf Konzentrationsstufen wurde im Kühlschrank bei 6 °C bzw. im Gefrierschrank bei -18 °C gelagert, zu verschiedenen Zeiten eine definierte Menge entnommen, unter Argon abgedampft und eingefroren. Nach Abschluss des Lagerversuchs wurden alle Kalibrierstufen mit internen Standard (Misch-STD II) versetzt, gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Nach Bestimmung der Regressionsgeraden erfolgte unter Annahme eines willkürlich

gewählten Peakflächenverhältnisses (PFV), das in etwa der Mitte der Kalibrierung entsprach, die Berechnung des Gehaltes einer fiktiven Probe. Die entsprechenden Ergebnisse für den Versuch „Kühlschrank“ sind in Tabelle 22 dargestellt. Die relative Standardabweichung der Substanzen lag zwischen 5 % und 9 % und somit innerhalb des Bereichs der Präzisionsdaten (Messunsicherheit).

Tabelle 22: Lagerstabilität der D-Vitamerie im Kühlschrank (6 °C)

Analyt	0 d [µg/100 g]	2 d [µg/100 g]	7 d [µg/100 g]	14 d [µg/100 g]	27 d [µg/100 g]	MW [µg/100 g]	SD [µg/100 g]	RSD [%]
D ₃	21,9	18,8	20,3	22,9	21,5	21,1	1,6	7,4
D ₂	22,3	21,7	20,4	25,3	24,2	22,8	2,0	8,6
(24 <i>R</i>)-24,25(OH) ₂ D ₃	22,4	22,5	18,7	23,0	22,4	21,8	1,8	8,1
25(OH)D ₃	19,9	19,9	22,0	22,2	20,5	20,9	1,1	5,4
25(OH)D ₂	22,6	20,7	19,6	22,2	19,9	21,0	1,4	6,5
1α,25(OH) ₂ D ₃	24,1	24,6	20,3	24,6	21,6	23,0	2,0	8,5
1α,25(OH) ₂ D ₂	20,0	20,2	20,1	22,5	19,6	20,5	1,1	5,6
Ergosterol (d3)	22,5	20,7	20,3	24,7	22,3	22,1	1,8	8,0
7-DHC (d3)	22,0	21,9	23,7	25,2	22,6	23,1	1,4	5,9

(d3): als ISTD Vitamin D₃-d3 (6, 19, 19-D₃) für 7-DHC bzw. Vitamin D₂-d3 (6, 19, 19-D₂) für Ergosterol verwendet

Es konnte kein Hinweis auf Abbau der Analyten innerhalb der 1-monatigen Lagerung im Kühlschrank festgestellt werden. Demnach ist eine Lagerung der Standardlösungen für 27 Tage bei 6 °C im Kühlschrank möglich. Routinemäßig wurden die Lösungen jedoch im Gefrierschrank bei -18 °C aufbewahrt bzw. bei Nichtgebrauch unter Argon-Strom abgedampft und anschließend eingefroren.

3.3.2 Messstabilität

Um die Messstabilität des Analysenverfahrens zu überprüfen, wurde im Verlauf der Messung in regelmäßigen Abständen (alle sechs Messungen) ein Mischstandard (I) mit einer Konzentration von 0,2 mg/l injiziert. In Abbildung 14 sind die gemessenen Peakflächen des Quantifiers der Zielanalyten für fünf Injektionen aufgeführt, wobei die erste Messung außer Acht gelassen wurde. Der Grund hierfür ist in Kapitel 3.1.4 (Seite 32 f.) erläutert.

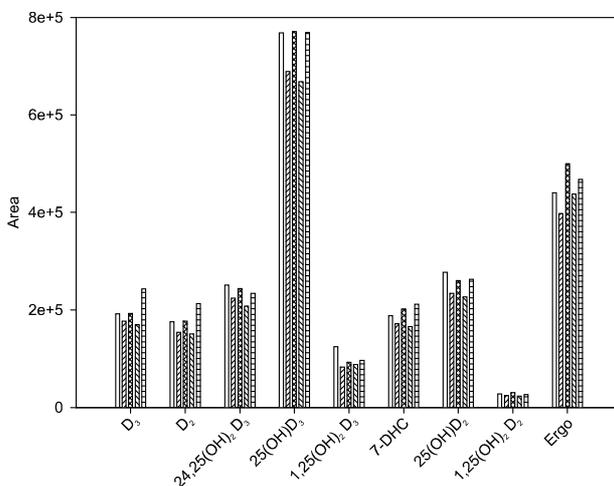


Abbildung 14: Messstabilität des Analysenverfahrens

Es zeigt sich, dass die ermittelten Daten normalverteilt sind und kein Trend der Messwerte vorliegt. Dies konnte in anderen Messungen bestätigt werden. Die Stabilität der Messung des Analyseverfahrens ist somit als gegeben anzusehen.

3.3.3 Selektivität

„Die Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren...“ [154]. In Abbildung 15 ist das LC-MS/MS-Chromatogramm eines Mischstandards (I, II) mit einer Konzentration von 0,2 mg/l dargestellt. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 16 das LC-MS/MS-Chromatogramm einer aufgearbeiteten Lachsprobe.

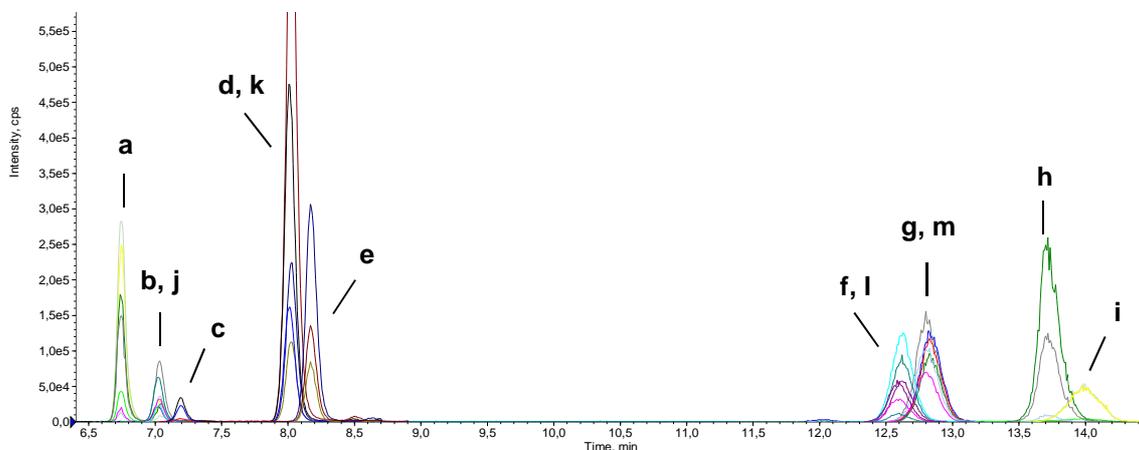


Abbildung 15: LC-MS/MS-Chromatogramm eines Mischstandards **a** (24*R*)-24,25-(OH)₂D₃; **b** 1α,25(OH)₂D₃; **c** 1α,25(OH)₂D₂; **d** 25(OH)D₃; **e** 25(OH)D₂; **f** D₂; **g** D₃; **h** Ergosterol; **i** 7-DHC; **j** 1α,25(OH)₂D₃d₃; **k** 25(OH)D₃d₃; **l** D₂d₃; **m** D₃d₃

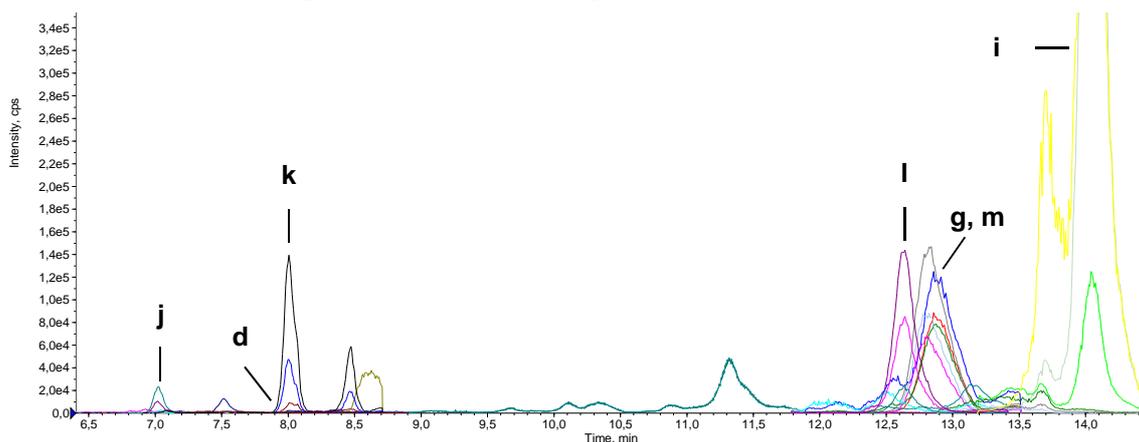


Abbildung 16: LC-MS/MS-Chromatogramm einer aufgearbeiteten Lachsprobe **d** 25(OH)D₃; **g** D₃; **i** 7-DHC; **j** 1α,25(OH)₂D₃d₃; **k** 25(OH)D₃d₃; **l** D₂d₃; **m** D₃d₃

Es wurden alle D-Vitamer und deuterierten Strukturen anhand ihrer Masse-Ladungsverhältnisse sowie ihrer Retentionszeiten ausgewertet. Zwischen den Zielanalyten traten bei einem Substanzpaar Überlappungen von Massenübergängen auf. 24,25(OH)₂D₃ und 1,25(OH)₂D₃ besitzen den gleichen Massenübergang, sind aber aufgrund der verschiedenen Retentionszeiten ausreichend voneinander

unterscheidbar (Siehe Abbildung 15 **a** und **b**). Einige Substanzgruppen ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_2/\text{D}_3$; $25(\text{OH})\text{D}_2/\text{D}_3$; Vitamin D_2/D_3 ; 7-DHC/Ergo) konnten mittels der Messmethode nicht vollständig voneinander getrennt werden. Dessen ungeachtet sind die jeweiligen D-Vitamine eindeutig voneinander unterscheidbar und zeigen keine Querempfindlichkeiten.

Bei der Messung der deuterierten Analyten wurden keine Signale der nicht-deuterierten Substanzen und umgekehrt detektiert. Dies gilt auch innerhalb der jeweiligen Gruppen.

Die Selektivität des Analysenverfahrens ist durch die Messung mehrerer Massenübergänge je Analyt und der ausreichenden chromatographischen Trennung als gegeben anzusehen. Störungen bei der Identifizierung der D-Vitamine untereinander können ausgeschlossen werden.

3.3.4 Spezifität

„Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, eine Substanz [...] ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren...“ [154]. Die Spezifität der Methode resultiert aus der Basislinientrennung der Vitamin D-Signale von den anderen Signalen im Chromatogramm sowie den ermittelten eindeutigen Massenspuren. Sie kann aufgrund der Erfahrungen bei der Untersuchung von Proben verschiedener Matrices (Fisch, Milchprodukte [Butter, Käse], Fleisch/Innereien, Pilze), als gegeben angesehen werden (Bsp. Lachs Abbildung 16).

3.3.5 Arbeitsbereich/Linearität

„Der Arbeitsbereich ist der Konzentrationsbereich, für den die ermittelte Kalibrierfunktion Gültigkeit besitzt“ [154]. Der Arbeitsbereich (Tabelle 23) der vorliegenden Methode entspricht dem Kalibrierbereich. Die unterste Grenze leitet sich aus der Bestimmungsgrenze (Tabelle 24, Seite 48) des jeweiligen Analyten ab.

Die Linearität beschreibt die Fähigkeit der Methode innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereichs Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind [154]. Zur Bestimmung wurde das entsprechende Probenmaterial mit acht Konzentrationsstufen Mischstandard I aufdotiert (drei Wiederholbestimmungen), aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS vermessen. Mit Hilfe des Anpassungstests nach Mandel erfolgte die rechnerische Überprüfung der Linearität der Kalibrierungen.

Tabelle 23: Arbeitsbereich und Linearität „Zuchtlachsfilet“

Analyt	Arbeitsbereich [µg/l]	Arbeitsbereich [µg/100 g]	Korrelations- koeffizient r	F-Test nach Mandel
D ₃	25,5 - 933,0	1,0 - 36,6	0,9998	linear
D ₂	73,9 - 933,0	2,9 - 36,6	0,9993	linear
(24R)-24,25(OH) ₂ D ₃	76,4 - 594,0	3,0 - 23,3	0,9998	linear
25(OH)D ₃	17,8 - 933,0	0,7 - 36,6	0,9993	linear
25(OH)D ₂	48,4 - 933,0	1,9 - 36,6	0,9998	linear
1α,25(OH) ₂ D ₃	418 - 765	16,4 - 30,0	0,9999	linear
1α,25(OH) ₂ D ₂	543 - 933	21,3 - 36,6	0,9983	linear

Analyt	Arbeitsbereich [µg/l]	Arbeitsbereich [µg/100 g]	Korrelations- koeffizient r	F-Test nach Mandel
Ergosterol	530 - 1.940	20 - 80	0,9983	linear
7-DHC	170 - 1.960	10 - 60	0,9864	quadratisch*
Ergosterol (d3)	480 - 1.940	20 - 80	0,9983	linear
7-DHC (d3)	220 - 1.610	10 - 60	0,9864	quadratisch*

*aber: lineare Regression vertretbar

(d3): als ISTD Vitamin D₃-d3 (6, 19, 19-D₃) für 7-DHC bzw. Vitamin D₂-d3 (6, 19, 19-D₂) für Ergosterol verwendet

Die Linearität (Tabelle 23) ist für die D-Vitamine im gesamten Arbeitsbereich gewährleistet. Dabei zeigten sich keine Unterschiede innerhalb der Massenübergänge der einzelnen Analyten.

3.3.6 Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze/Erfassungsgrenze

Die Nachweisgrenze (NWG) eines Verfahrens stellt die kleinste nachweisbare Menge dar, während unter Bestimmungsgrenze (BG) die kleinste quantifizierbare Menge verstanden wird. Die Mindestmenge, die mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann, wird als Erfassungsgrenze (EG) bezeichnet [154].

Die analytischen Grenzen der Methode wurden über das Signal-Rausch-Verhältnis aus 12 unabhängig aufgearbeiteten Proben (6 x Probe + Analyt; 6 x Blindwert) ermittelt. Nach Kromidas ist die Nachweisgrenze als drei-fache, die Erfassungsgrenze als sechs-fache und die Bestimmungsgrenze als zehn-fache Rauschhöhe zur Retentionszeit der Verbindung definiert [154].

Tabelle 24: Kenndaten der Kalibrierung „Zuchtlachsfilet“

Analyt	NWG [µg/100 g]	EG [µg/100 g]	BG [µg/100 g]
D ₃	0,3	0,6	1,0
D ₂	0,9	1,7	2,9
(24R)-24,25(OH) ₂ D ₃	0,9	1,8	3,0
25(OH)D ₃	0,2	0,4	0,7
25(OH)D ₂	0,6	1,1	1,9
1α,25(OH) ₂ D ₃	4,9	9,8	16,4
1α,25(OH) ₂ D ₂	6,4	12,8	21,3
Ergosterol	6,2	12,4	20,7
7-DHC	2,0	4,0	6,6
Ergosterol (d3)	6	11	19
7-DHC (d3)	3	5	9

(d3): als ISTD Vitamin D₃-d3 (6, 19, 19-D₃) für 7-DHC bzw. Vitamin D₂-d3 (6, 19, 19-D₂) für Ergosterol verwendet

Die ermittelten Nachweisgrenzen sind nicht geeignet um kleinste Vitamin D-Mengen in Lebensmitteln zu erfassen. Dies gilt insbesondere für die hydroxylierten Strukturen. Gehalte an Vitamin D₃ in Fisch (Bsp. Kabeljau 0,5-6,9 µg/100 g [50], [51]), Eigelb (1,4-15 µg/100 g [65]), Wildpilzen (Bsp.

Pfifferling 1,2-63 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ [80]) sowie angereicherten Produkten können jedoch ohne Schwierigkeiten nachgewiesen werden (Siehe 2.2; Seite 6 f.).

3.3.7 Präzision

Die Präzision ist das Maß für die zufällige Streuung der Ergebnisse eines Analysenverfahrens [154].

3.3.7.1 Wiederholpräzision (RSD_r)

Unter Wiederholpräzision wird die Präzision verstanden, die unter gleichen Bedingungen in kurzen Zeitabständen ermittelt wurde (dasselbe Verfahren, dieselbe Probe, dasselbe Labor, derselbe Bearbeiter, dieselbe Geräteausrüstung). Die hieraus hervorgehenden Ergebnisse müssen unabhängig voneinander sein [154]. Die Wiederholpräzision wurde an drei Tagen aus fünf bis sechs unabhängig aufgearbeiteten Proben in zwei verschiedenen Konzentrationen innerhalb einer Serie unter Wiederholbedingungen bestimmt (Tabelle 25).

3.3.7.2 Laborpräzision (laborinterne Vergleichspräzision, RSD_T)

Die Laborpräzision beschreibt die Präzision von Ermittlungsergebnissen derselben Probe innerhalb eines Labors, die unter gleichen Bedingungen bei bewusster Änderung eines Parameters ermittelt wird [154]. Im Rahmen der Arbeit wurde die tagesverschiedene Laborpräzision der D-Vitamine in Lachsfilets aus fünf bis sechs unabhängig aufgearbeiteten Proben in zwei verschiedenen Konzentrationen an drei Tagen untersucht.

Tabelle 25: Wiederhol- und Laborpräzision „Zuchtlachsfilet“

Analyt	RSD _r	RSD _T	RSD _r	RSD _T
	[%]	[%]	[%]	[%]
	6,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$		23,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$	
D ₃	3,2	4,3	7,6	8,8
D ₂	4,5	9,0	7,2	13,3
(24R)-24,25(OH) ₂ D ₃	14,1	25,9	9,9	13,7
25(OH)D ₃	4,9	6,8	3,8	7,5
25(OH)D ₂	8,6	16,1	10,1	20,1
1 α ,25(OH) ₂ D ₃	-	-	13,0	23,0
1 α ,25(OH) ₂ D ₂	-	-	16,1	20,5
	14,0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$		48,9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$	
Ergosterol	-	-	5,7	11
7-DHC	4,7	9,5	3,2	5,3
Ergosterol (d3)	-	-	11	47
7-DHC (d3)	10	28	15	35

(d3): als ISTD Vitamin D₃-d3 (6, 19, 19-D₃) für 7-DHC bzw. Vitamin D₂-d3 (6, 19, 19-D₂) für Ergosterol verwendet

Laut Horwitz (1982) ist die Akzeptanz der relativen Standardabweichung abhängig vom Anteil des Analyten in % in der Probe. Bei einem Anteil von 1-100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (0,01-1 ppm) beträgt die maximal akzeptierte Streuung unter Wiederholbedingungen 21-11 % und unter Vergleichsbedingungen

31-16 % [155]. Für die D-Vitamer wurden gute bis befriedigende Präzisionsdaten sowohl innerhalb (Wiederholpräzision, RSD_r) als auch zwischen den Serien (Laborpräzision, RSD_T) ermittelt. Dies zeigt, dass das Verfahren für die untersuchten D-Vitamer geeignet ist.

Die starken Schwankungen von über 20 % zwischen den Serien bei den mehrfach-hydroxylierten Metaboliten und den Vorläuferstrukturen Ergosterol (d3) und 7-Dehydrocholesterol (d3) geben einen Hinweis auf eine geringere Reproduzierbarkeit für diese Strukturen. Deren Quantifizierung ist daher mit einer größeren Unsicherheit verbunden.

3.3.7.3 Messunsicherheit

Jeder Messwert ist mit einer Messunsicherheit behaftet. Es werden zufällige (messtechnisch zugänglich) und systematische (unbekannte Abweichungen, durch Abschätzung zugänglich) Unsicherheitsquellen unterschieden. Im Rahmen der Validierung sollen lediglich die zufälligen Messabweichungen mittels empirisch statistischer Verfahren abgeschätzt werden [154].

Zur Ermittlung wurden fünf bis sechs unabhängig aufgearbeitete Proben in zwei verschiedenen Konzentrationen innerhalb einer Serie an einem Tag analysiert. In Tabelle 26 sind die Messunsicherheiten für die einzelnen Analyten dargestellt. Sie liegen in einem akzeptablen Bereich.

Tabelle 26: Verfahrenskoeffizient und Messunsicherheit „Zuchtlachsfilet“

Analyt	MW	SD	RSD	Messunsicherheit	MW	SD	RSD	Messunsicherheit
	[$\mu\text{g}/100\text{ g}$]	[$\mu\text{g}/100\text{ g}$]	[%]	(P=95 %) [$\mu\text{g}/100\text{ g}$]	[$\mu\text{g}/100\text{ g}$]	[$\mu\text{g}/100\text{ g}$]	[%]	(P=95 %) [$\mu\text{g}/100\text{ g}$]
	6,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$				23,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$			
D ₃	10,4	0,3	3,0	0,3	27,9	1,9	7,0	2,0
D ₂	6,8	0,3	3,8	0,3	24,3	1,6	6,6	1,7
(24R)- 24,25(OH) ₂ D ₃	6,8	0,9	13,3	1,0	26,7	2,4	9,2	2,6
25(OH)D ₃	7,3	0,4	4,8	0,4	24,9	0,8	3,3	1,0
25(OH)D ₂	7,8	0,6	8,3	0,8	24,5	2,0	8,5	2,1
1 α ,25(OH) ₂ D ₃	-	-	-	-	24,2	0,8	12,8	3,3
1 α ,25(OH) ₂ D ₂	-	-	-	-	27,4	4,4	14,0	4,6
	14,0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$				48,9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$			
Ergosterol	-	-	-	-	52,2	2,8	5,3	3,5
7-DHC	348,9	17,9	5,1	22,3	395,1	11,4	2,9	14,2
Ergosterol (d3)	-	-	-	-	74	7	11	9
7-DHC (d3)	258	22	9	35	271	37	14	46

(d3): als ISTD Vitamin D₃-d3 (6, 19, 19-D₃) für 7-DHC bzw. Vitamin D₂-d3 (6, 19, 19-D₂) für Ergosterol verwendet

3.3.8 Richtigkeit

3.3.8.1 Laborvergleichsuntersuchung

Im Rahmen der Validierung wurde die entwickelte Methode durch die Teilnahme an einem DRRR-Ringversuch auf ihre Eignung zur Vitamin D₃-Bestimmung in Milchpulver (REVP 13348) überprüft. Die Teilnahme konnte mit großem Erfolg abgeschlossen werden.

Insgesamt waren zwei Proben (RM-MPV 9/10) auf ihren Vitamin D-Gehalt zu untersuchen, wobei die Wahl des Analysenverfahrens den Teilnehmern freigestellt wurde. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand von drei verschiedenen Modellen (sensible Statistik mit/ohne Ausreißereliminierung [Grubbs, ISO 5725], robuste Statistik [Huber-Schätzer, Q - Methode]). Über den χ^2 -Anpassungstest wurde die Qualität der einzelnen statistischen Verfahren überprüft und das sinnvollste zur Auswertung herangezogen. Für den vorliegenden Ringversuch hatte sich die sensible Statistik ohne Ausreißereliminierung qualifiziert. Die Laborleistung wurde über z' - Score ermittelt, welcher sich ausschließlich auf die Werte der Teilnehmer des Ringversuchs bezog. Zur Berechnung des Besten Schätzwertes m_{best} wurden nur die Ergebnisse der Teilnehmer verwendet, die mit der Referenzanalytik (LC) bestimmt worden sind. Folgende Gleichung lag der z' - score -Auswertung zugrunde:

$$z' - score = \frac{m - m_{best}}{\sqrt{s_{best}^2 + s_M^2}}$$

m = Labormittelwert (Teilnehmer)
 m_{best} = Bester Schätzwert für den wahren Wert
 s_{best} = Standardabweichung des Besten Schätzwertes
 s_M = Standardabweichung d. Homogenitätstest d. Materials

Ein Ergebnis mit $|z'| < 2$ wurde als zufriedenstellende Laborleistung bewertet und der Ringversuch galt als bestanden. Die Ergebnisse des Ringversuchs sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Ergebnisse des Ringversuchs REVP 13348

Probe	Einzelwert 1	Einzelwert 2	Mittelwert m [$\mu\text{g}/100 \text{ g}$]	Mittelwert m_{best} [$\mu\text{g}/100 \text{ g}$]	Standardabweichung s_{best} [$\mu\text{g}/100 \text{ g}$]	z' -score	Labore
1	12,5	11,8	11,8	11,59	$\pm 0,80$	0,26	8
2	8,10	7,40	7,75	7,79	$\pm 0,52$	-0,07	8

Die Ergebnisse des Ringversuchs zeigen, dass die vorgestellte Methode ein leistungsfähiges Instrument zur Bestimmung von Vitamin D₃ in Milchpulver darstellt.

3.3.8.2 Richtigkeit über Bestimmung der Wiederfindung

Zur Bestimmung der Richtigkeit eines Verfahrens kann die Wiederfindung herangezogen werden. Sie beschreibt das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe [154]. Die Ermittlung erfolgte aus fünf bis sechs unabhängig aufgearbeiteten Proben in zwei verschiedenen Konzentrationen zum Lachsfilet. Um den natürlichen Gehalt an D-Vitameren (Cholecalciferol, Ergosterol, 7-Dehydrocholesterol) zu berücksichtigen, wurden zusätzlich Blindwerte vermessen. In Tabelle 28 sind die Ergebnisse der Wiederfindungen

dargestellt. Es zeigte sich, dass die Wiederfindung konzentrationsunabhängig ist. Sie liegt für die meisten Analyten zwischen 90 und 120 % und damit für die Spurenanalytik in einem akzeptablen Bereich. Die großen Abweichungen bei 7-Dehydrocholesterol sind auf die hohen Gehalte in der Validierungsmatrix zurückzuführen (vgl. Anhang 10.1.2 Wildlachs; Seite 111).

Tabelle 28: Wiederfindungsraten „Zuchtlachsfilet“

Analyt	6,6 µg/100 g			23,3 µg/100 g		
	WF [%]	SD [%]	RSD [%]	WF [%]	SD [%]	RSD [%]
D ₃	102	5	5	106	9	9
D ₂	105	10	10	100	6	6
(24 <i>R</i>)-24,25(OH) ₂ D ₃	90	9	10	110	10	9
25(OH)D ₃	104	7	7	103	2	2
25(OH)D ₂	105	11	10	102	5	5
1α,25(OH) ₂ D ₃	-	-	-	103	11	10
1α,25(OH) ₂ D ₂	-	-	-	116	16	14
	14,0 µg/100 g			48,9 µg/100 g		
Ergosterol	-	-	-	103	7	7
7-DHC	107	50	46	120	41	33
Ergosterol (d3)	-	-	-	109	24	22
7-DHC (d3)	185	68	37	160	85	55

(d3): als ISTD Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃) für 7-DHC bzw. Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂) für Ergosterol verwendet

Aus Tabelle 28 ist weiterhin zu entnehmen, dass die deuterierten Standards ihre entsprechende Substanzgruppe gut repräsentieren (Siehe 4.2.2; Seite 85). Die Wiederfindungsraten der Vitamin D₃-Gruppe stimmen mit den Werten der Vitamin D₂-Gruppe gut überein. Jedoch ist auch zu sehen, dass Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃) und Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂) als interner Standard nicht für die Vorläuferstrukturen 7-Dehydrocholesterol und Ergosterol geeignet sind. Daten, die auf dieser Grundlage berechnet werden, sind als halbquantitativ zu bewerten. In Abbildung 17 sind die ermittelten Wiederfindungsraten von Zuchtlachs- und Wildlachsfiletproben nebeneinander aufgeführt. Obwohl es sich hierbei um verschiedene Matrices handelte, der Zuchtlachs beispielsweise viel fettreicher als der Wildlachs (Siehe 3.4.1.5; Seite 62 f.) war, sind die Wiederfindungen vergleichbar.

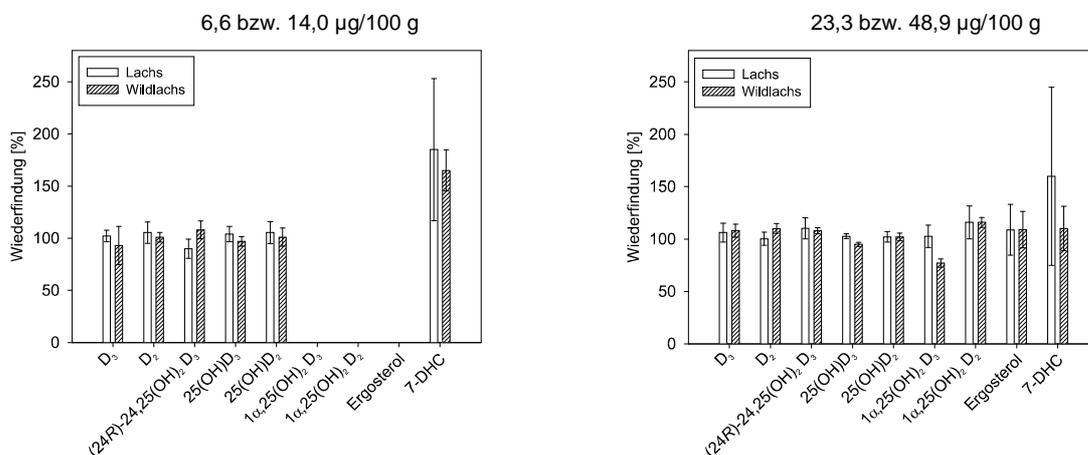


Abbildung 17: Wiederfindung des Analysenverfahrens am Beispiel Wild- und Zuchtlachsfilet

3.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Validierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine leistungsfähige Screening-Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von D-Vitaminen in verschiedenen Lebensmitteln (Lachs, Wildlachs) mittels LC-MS/MS entwickelt. Die zu Beginn der Validierung festgelegten Leistungsanforderungen an das Analysenverfahren wurden für die meisten Analyten weitestgehend erfüllt. Die Linearität ist für alle D-Vitamine im gesamten Arbeitsbereich (25,2 bis 1.940 µg/l) gewährleistet. Die Selektivität und Spezifität der Methode werden als gegeben angesehen. Die ermittelten Wiederfindungen lagen für den Großteil der Analyten, mit Ausnahme von 7-Dehydrocholesterol (d3) (160 bis 185 %) in einem akzeptablen Bereich von 90 bis 120 %, wobei die großen Abweichungen bei 7-Dehydrocholesterol (d3) unter anderem auf die hohen Ursprungsgehalte in der Validierungsmatrix zurückzuführen sind. Die relative Wiederholpräzision schwankte zwischen 3,2 und 16,1 % für Zuchtlachs- und zwischen 2,6 und 14 % für Wildlachsfilet, während die laborinterne Vergleichspräzision für Zuchtlachs Werte von 4,3 bis 47 % und für Wildlachsfilet 2,7 bis 44 % annahm. Die starken Schwankungen von über 20 % zwischen den Serien bei den mehrfach-hydroxylierten Metaboliten und den Vorläuferstrukturen Ergosterol (d3) und 7-Dehydrocholesterol (d3) geben einen Hinweis auf eine geringere Reproduzierbarkeit für diese Strukturen, weshalb deren Quantifizierung mit einer größeren Unsicherheit verbunden ist. Das zeigten auch die ermittelten Messunsicherheiten, welche dennoch in einem akzeptablen Bereich lagen. Anhand der Wiederfindungsergebnisse wird deutlich, dass Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃) und Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂) nicht zur vollständigen Kompensation der Aufarbeitungsverluste und matrixbedingten Abweichungen für 7-Dehydrocholesterol und Ergosterol geeignet sind. Folglich können für Daten, die auf dieser Grundlage berechnet worden sind, nur halbquantitative Aussagen gemacht werden.

Die Nachweisgrenzen, berechnet aus der dreifachen Rauschhöhe, ergaben für Zuchtlachsfilet je nach Analyt 0,2 bis 6,4 µg/100 g und für Wildlachsfilet 0,4 bis 8,7 µg/100 g. Als Bestimmungsgrenzen, basierend auf der zehnfachen Rauschhöhe, wurden für das fettreichere Zuchtlachsfilet Werte zwischen 1,0 und 21,3 µg/100 g und für Wildlachsfilet 1,2 und 28,9 µg/100 g ermittelt. Diese Ergebnisse liegen oberhalb der Zielvorgaben und damit über den bisher publizierten analytischen Grenzen verschiedener Methoden (2.4.3), welche sich jedoch nur auf ein bis zwei Vitamin D-Strukturen fokussieren.

Bei der vorliegenden Methode handelt es sich um eine Screening-Methode, mit der in kürzester Zeit eine Vielzahl an unterschiedlichen Lebensmitteln (24 Proben/d) auf neun Vitamin D-Strukturen untersucht werden kann. Aus der Literatur bekannte Analysenverfahren sind mit erheblichem Mehraufwand verbunden. So werden oftmals vor der eigentlichen analytischen Bestimmung der D-Vitamine (semi-)präparative HPLC-Schritte durchgeführt (Siehe 2.4.3.2; Seite 18 f.). Vergleichbare Methoden untersuchen deutlich weniger Strukturen bei der Hälfte des Probenvolumens [151].

Das breite Spektrum an Zielanalyten in Kombination mit einem hohen Probendurchsatz geht mit einer Verringerung der Empfindlichkeit der Gesamtmethode einher. Um die nötige Empfindlichkeit für

einzelne D-Vitamerie im Bereich unterhalb der Nachweisgrenzen zu gewährleisten, muss eine zusätzliche Identifizierungsmethode eingesetzt werden.

Die Praxistauglichkeit der entwickelten Methode wurde durch die Untersuchung von über 1.500 Lebensmitteln belegt. Bei über 900 Proben handelte es sich um verschiedene Gewebe (Fleisch, Haut, Intestinalfett, Leber) von Aal, Forelle, Karpfen und Zander, die im Zuge des Verbundprojektes aufgearbeitet und vermessen wurden. Die Ergebnisse sind nicht Bestandteil dieser Arbeit und werden an anderer Stelle veröffentlicht.

3.3.9.1 Identifizierungsmethode

Die Identifizierungsmethode enthielt zwei zusätzliche Aufarbeitungsschritte: Fraktionierung der Zielanalyten mittels analytischer HPLC (DAD) und Derivatisierung der einzelnen Fraktionen mit PTAD. Anschließend erfolgte die Messung am LC-MS/MS (Siehe 4.2.4; Seite 86). In Abbildung 18 sind die Chromatogramme von Vitamin D₂ und dem entsprechend deuterierten Standard einer aufgearbeiteten Hefeprobe ohne (links) und mit (rechts) Identifizierungsmethode dargestellt. Beim derivatisierten Vitamin D₂ (Aufarbeitung mit Identifizierungsmethode) wurde lediglich das größte Isomer zum Vergleich herangezogen.

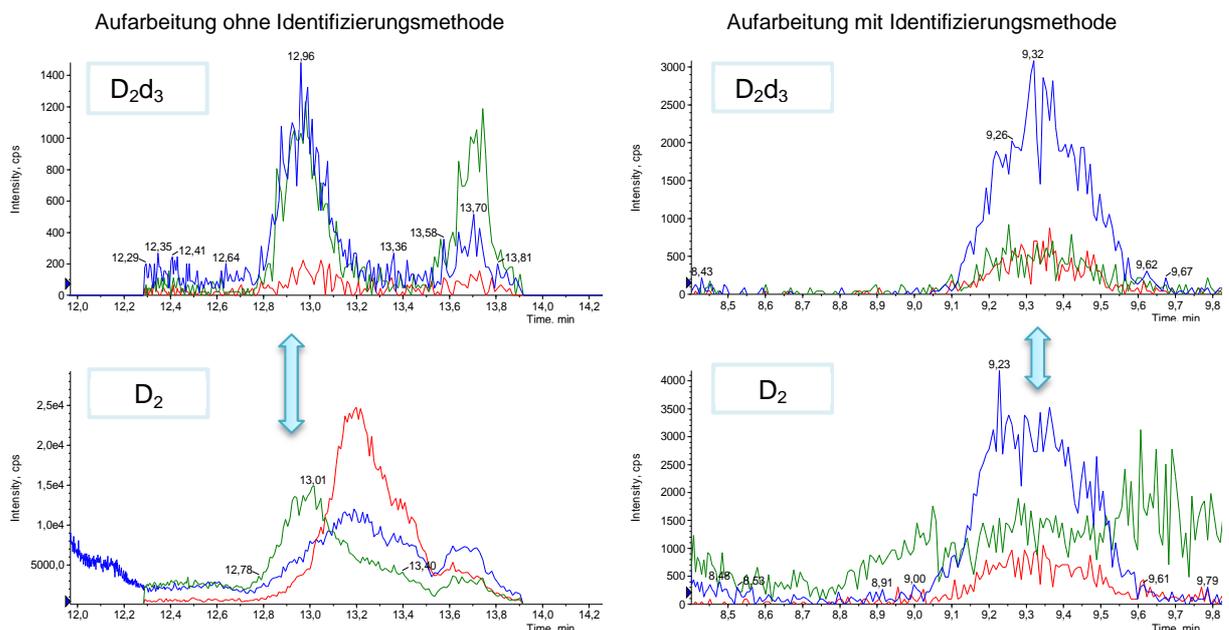


Abbildung 18: Vitamin D₂ und deuterierter Standard einer Hefeprobe ohne (links) und mit (rechts) Identifizierungsmethode

Aus den Abbildungen ist zu erkennen, dass ein Großteil der Störsubstanzen durch die Identifizierungsmethode abgetrennt wurde und die anschließende Derivatisierung das Signal-Rausch-Verhältnis des Vitamin D₂ deutlich verbessert hat. Der Fraktionierungsschritt war hierbei von entscheidender Bedeutung, da er die Derivatisierung der einzelnen D-Vitamerie in der Probe ermöglichte (Siehe 3.1.6; Seite 34 f.). Aufgrund des damit verbundenen Arbeitsaufwandes ist die Identifizierungsmethode jedoch nicht für Routinemessungen geeignet.

3.3.9.2 Biologische Proben

Während der Methodenentwicklung zur Identifizierung und Quantifizierung von Vitamin D in Lebensmitteln wurden auch Versuche zum Einsatz des Verfahrens in biologischen Matrices durchgeführt. Im Gegensatz zu Lebensmitteln wurden biologische Proben nicht verseift, sondern einer Proteinfällung unterzogen. Nach Abtrennung der Proteine erfolgte eine Festphasenextraktion (Reversed-Phase) und eine Derivatisierung mit PTAD, woraus sich ein empfindlicher Nachweis der D-Vitamine im Spurenbereich ergab. Die aufgearbeiteten Proben wurden mit einer modifizierten LC-MS/MS-Methode vermessen. Die Aufarbeitung und die einzelnen Messparameter sind detailliert in Anhang 10.3 (Seite 115 f.) aufgeführt. In Abbildung 19 und Abbildung 20 sind die Chromatogramme eines derivatisierten Mischstandards und einer aufgearbeiteten Blutserum-Probe dargestellt.

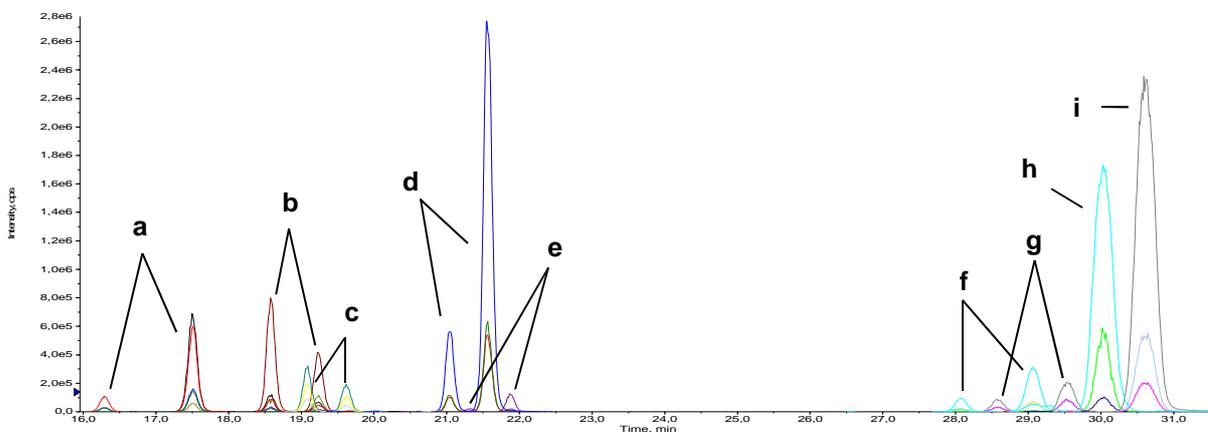


Abbildung 19: LC-MS/MS-Chromatogramm eines derivatisierten Mischstandards

a (24*R*)-24,25-(OH)₂D₃_PTAD; **b** 1*α*,25(OH)₂D₃_PTAD; **c** 1*α*,25(OH)₂D₂_PTAD;
d 25(OH)D₃_PTAD; **e** 25(OH)D₂_PTAD; **f** D₂_PTAD; **g** D₃_PTAD; **h** Ergosterol_PTAD;
i 7-DHC_PTAD

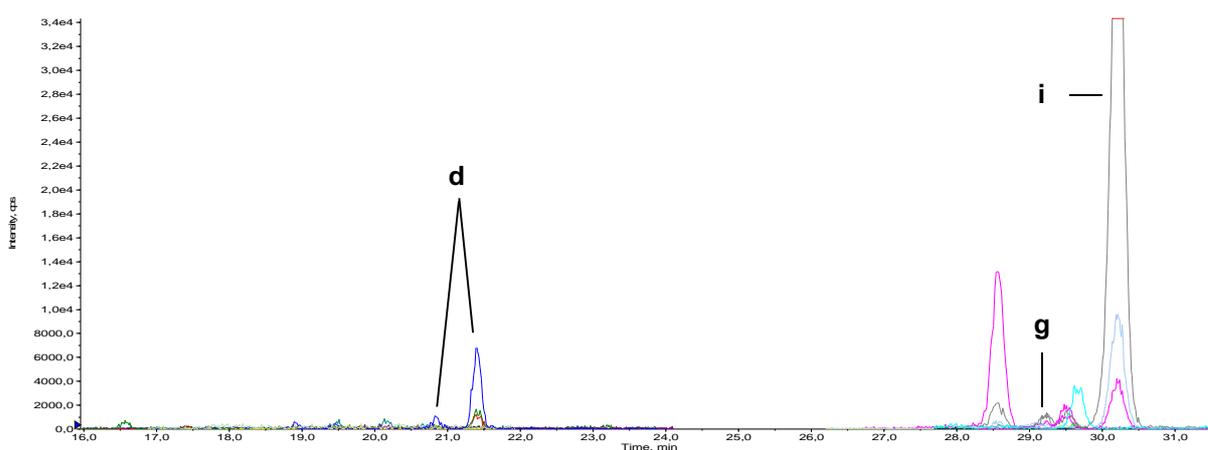


Abbildung 20: LC-MS/MS-Chromatogramm einer derivatisierten Blutserumprobe

d 25(OH)D₃_PTAD; **g** D₃_PTAD; **i** 7-DHC_PTAD

Im Blutserum konnten 25(OH)D₃, Vitamin D₃ und 7-Dehydrocholesterol analysiert werden. Die Nachweisgrenzen, berechnet aus der dreifachen Rauschhöhe, ergaben je nach Analyt 0,4 bis 25 ng/ml bzw. 0,04 bis 2,7 µg/100 g (Siehe Anhang 10.3.5; Seite 116) und liegen deutlich unterhalb den

ermittelten analytischen Grenzen der Methode zur Lebensmittelbestimmung. Dennoch sind sie nicht ausreichend um beispielsweise $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Blutserum (0,018 ng/ml) zu erfassen (NWG: 1,1 ng/ml), so dass an dieser Stelle weiterer Optimierungsbedarf besteht (Siehe Anhang 10.3.5; Seite 116). Im Vergleich mit den zurzeit auf dem Markt existierenden kommerziell erhältlichen Reagenzienkits (Bsp. Chromsystem, München, Deutschland) ist die vorgestellte Methode zur Vitamin D-Bestimmung in biologischen Proben aufgrund des Arbeitsaufwandes und des geringen Probendurchsatzes (ca. 12 Proben/d) nicht für eine Routinemessung geeignet.

3.4 Vitamin D in Lebensmitteln

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 650 Lebensmittel mit der optimierten Methode auf ihren Gehalt an Vitamin D untersucht. Die Auswahl der zu analysierenden Proben erfolgte anhand der Ergebnisse der Nationalen Verzehrsstudie II (NVS II) [1], welche die aktuellsten Daten zum Lebensmittelverzehr und zum Ernährungsverhalten der deutschen Bevölkerung beinhalten, im Zusammenhang mit den aus der Literatur bekannten Vitamin D-Gehalten. In Tabelle 29 ist der mittlere Beitrag einzelner Lebensmittelgruppen zur täglichen Zufuhr von Vitamin D bei Männern und Frauen zusammengefasst [156]. Gerichte aus Fleisch sind in dieser Tabelle nicht mit aufgeführt, liefern laut NVS II aber ebenfalls einen Beitrag zur Vitamin D-Versorgung [1].

Tabelle 29: Beitrag einzelner Lebensmittelgruppen zur Vitamin D-Zufuhr [156]

Lebensmittel	Männer [µg/Tag]	Frauen [µg/Tag]
Fisch, Fischerzeugnisse, Krusten- und Schalentiere (Salz- und Süßwasserfische, Garnelen, Muscheln, Schnecken, verarbeitete Produkte wie Kaviar, Fischkonserven)	1,4	0,8
Milch- und Milcherzeugnisse (inkl. Joghurt, (saure) Sahne, Schmand, Buttermilch, Kefir, Molke, Käse, Quark)	0,4	0,3
Eier (inkl. zubereitete Eier [Rührei, Spiegelei, gekochtes Ei, Eier in Speisen; <u>nicht</u> : Eier in Backwaren, Suppen, Soßen])	0,3	0,3
Tierische Fette (inkl. Butter)	0,2	0,1
Pflanzliche Fette (Margarine)	0,3	0,2
Gemüse (inkl. Pilzen, Hülsenfrüchten, Tiefkühlgemüse und Gemüseerzeugnissen)	0,1	0,1
Backwaren (Kuchen, Torten, Gebäck, Pikante Backwaren [gefüllte Blätterteigtaschen, Käsestangen], Knabberartikel [Salzgebäck, Erdnussflips, Pizzakracker, Tortilla Chips])	0,3	0,3
Getreide (Getreide, Mehle, Reis, verarbeitete Produkte [Cerealien, Teigwaren, Popcorn])	0,1	0,1
Süßwaren (Süßigkeiten, Speiseeis, Cremes, Süßspeisen, Getränkepulver- und Granulate)	0,1	0,1

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Vitamin D-Untersuchungen für die einzelnen Lebensmittelgruppen vorgestellt. In den Tabellen sind jeweils der niedrigste, höchste und mittlere Gehalt aufgeführt. Die angegebenen Daten der Provitamine Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol sind

als halbquantitativ zu bewerten. Die in Klammern angegebenen Zahlen verweisen auf die Anzahl der Proben, in denen der entsprechende Analyt nachgewiesen bzw. quantifiziert wurde. D-Vitamine, die in keinem der untersuchten Lebensmittel innerhalb der Gruppen nachgewiesen werden konnten, blieben in den Tabellen unberücksichtigt.

3.4.1 Fisch

Fisch und Fischprodukte stellen laut NVS II (2008) die Hauptquelle für exogen zugeführtes Vitamin D dar (vgl. Tabelle 29). Aus diesem Grund wurden verschiedene Fische bzw. Krustentiere (Seelachs, Hering, Lachs [Zucht-/Wildlachs], Thunfisch, Pangasius, Kabeljau, Scholle, *Tilapia*, Garnelen) sowie eine Auswahl an Fischprodukten (Heringskonserven und Marinaden, Thunfischkonserven) auf ihren Vitamin D-Gehalt untersucht.

3.4.1.1 Native Fischproben

Insgesamt wurden 178 unverarbeitete Fischfilets und Krustentiere aufgearbeitet und vermessen (frisch/tiefgefroren). Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 aufgeführt. Abbildung 21 gibt die Verteilung von Vitamin D₃ (●), die entsprechenden Mittelwerte (■) sowie die Standardabweichungen in den einzelnen Fischen bzw. Krustentieren wieder.

Tabelle 30: Gehalte an D-Vitaminen in unverarbeiteten Fischen und Krustentieren

Fischfilet	n	D ₃ [µg/100 g]			25(OH)D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Alaska-Seelachs	20		n. n.			n. n.		16	61	30 (20)		n. n.	
Hering	7	7,0	13,3	9 (5)		n. n.		10	130	50 (5)		n. n.	
Zuchtlachs (<i>Salmo salar</i>)	40	2,2	9,5	5 (40)	< 0,7 (30)	1,0	0,8 (9)	80	330	180 (40)		n. n.	
Wildlachs	52	4,0	42,8	11 (52)	< 1,2 (4)	-	-	< 6 (3)	90	40 (49)		n. n.	
Thunfisch	9	< 1 (1)	10,3	6 (7)		n. n.		< 9 (2)	20	15 (2)		n. n.	
Pangasius	11		n. n.			n. n.		< 9 (2)	-	-		n. n.	
Kabeljau	10	< 1 (2)	2,4	2,4 (1)		n. n.		10	60	20 (8)		n. n.	
Scholle	8	< 1 (1)	8,0	4 (6)		n. n.		50	550	200 (8)	< 6 (2)	-	-
<i>Tilapia</i>	10	13,3	40,0	20 (10)	< 0,7 (1)	-	-	20	120	60 (10)	< 6 (7)	< 20 (2)	-
Garnelen	11		n. n.			n. n.		40	80	60 (11)	< 20 (7)	30	25 (4)

n. n. nicht nachweisbar BG (D₃): 1 µg/100 g; BG (25D₃): 0,7 µg/100 g; BG (7-DHC): 9 µg/100 g; NWG (Ergo): 6 µg/100 g; BG (Ergo): 20 µg/100 g; BG (25D₃, Wildlachs): 1,2 µg/100 g; BG (7-DHC, Wildlachs): 6 µg/100 g

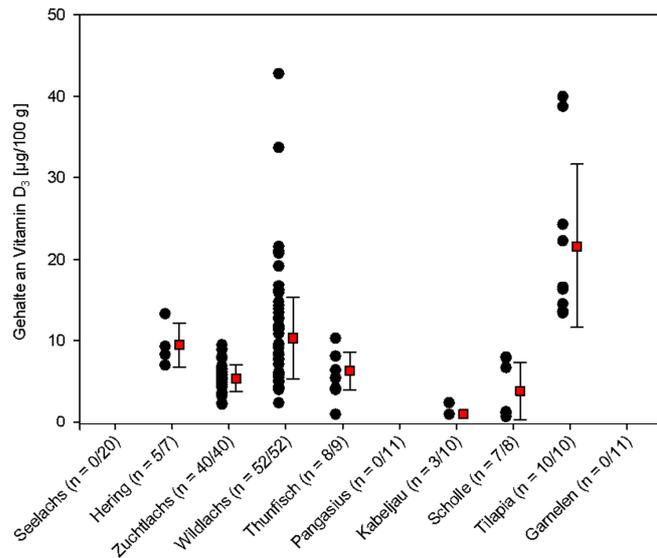


Abbildung 21: Gehalte an Vitamin D₃ in unverarbeiteten Fischen und Krustentieren

Cholecalciferol konnte in Hering, Lachs, Thunfisch, Kabeljau, Scholle und *Tilapia* bestimmt werden. Die mittleren Gehalte schwankten zwischen 2,4 und 20 µg/100 g. Die höchsten Vitamin D₃-Mengen wurden in Wildlachs (42,8 µg/100 g) und *Tilapia* (40,0 µg/100 g) ermittelt.

25-Hydroxycholecalciferol wurde in einer *Tilapia*-Probe und einigen Lachsfischen nachgewiesen, wobei der Metabolit häufiger in Zuchtlachs- als in Wildlachsfilets vorkam.

7-Dehydrocholesterol konnte in fast allen Fischarten und den Krustentieren in unterschiedlichen Mengen (< 6-550 µg/100 g) bestimmt werden, während Ergosterol ausschließlich in Scholle, *Tilapia* und Garnelen (roh, geschält) zu finden war. In Scholle und *Tilapia* lagen die Ergosterol-Gehalte teilweise unterhalb der Nachweisgrenze, so dass sie mit der Identifizierungsmethode bestätigt werden mussten. Das häufige Auftreten des Provitamin D₂ in den Garnelen (11/11) und dem *Tilapia* (9/10) lässt darauf schließen, dass es natürlicherweise in diesen Organismen vorkommt und nicht produktionsbedingt verursacht wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen weitestgehend mit den Referenzwerten aus der Literatur überein (Siehe 2.2.1; Seite 6 f.). Bei den Literaturwerten für Hering ist zu berücksichtigen, dass diese sich auf den essbaren Teil (Filet und Haut) des Fisches beziehen. Die im Hering (Filet und Haut) ermittelten Vitamin D-Gehalte sind in Tabelle 31 aufgeführt.

3.4.1.2 Verarbeitete Fischprodukte

Als häufig im Handel zu findende verarbeitete Fischprodukte, wurden fünf Herings- und sechs Thunfischkonserven sowie neun marinierte bzw. gesalzene Heringe (Bismarckhering, Rollmops; Matjes) untersucht.

In Tabelle 31 sind die ermittelten Vitamin D-Gehalte zusammengefasst. Abbildung 22 stellt die Verteilung von Vitamin D₃ (●), die entsprechenden Mittelwerte (■) sowie die Standardabweichungen in den einzelnen Fisch und Fischprodukten dar.

Tabelle 31: Gehalte an D-Vitaminen in verarbeiteten und unverarbeiteten Fischprodukten

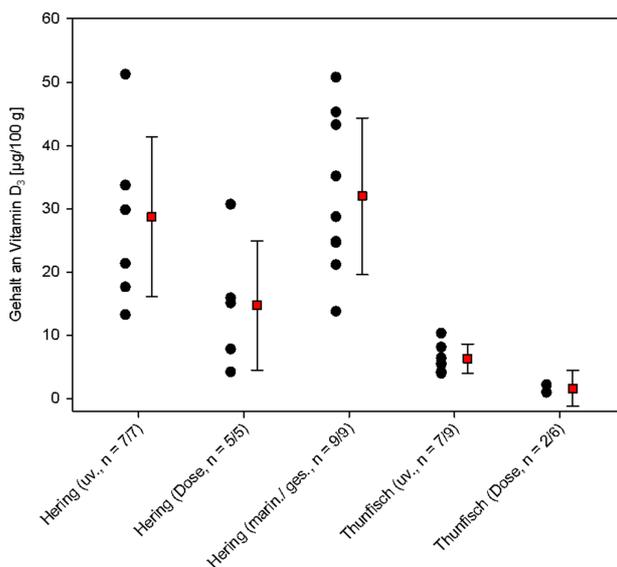
Fisch	n	D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW

Hering, Fisch*										
unverarbeitet	7	13,2	51,3	30 (7)	11	200	70 (7)		n. n.	
Konserve	5	4,2	30,7	15 (5)	50	170	110 (5)		n. n.	
Marinade/ gesalzen	9	13,7	50,8	30 (9)	16	210	110 (9)		n. n.	

Thunfisch, Filet										
unverarbeitet	9	< 1 (1)	10,3	6 (7)	< 9 (3)	20	20 (1)		n. n.	
Konserve	6	1	2,2	1,6 (2)	22	29	25 (3)	25	38	32 (2)

*bezieht sich auf essbaren Teil (Filet und Haut)
BG (D₃): 1 µg/100 g; BG (7-DHC): 9 µg/100 g

n. n. nicht nachweisbar

Abbildung 22: Gehalte an Vitamin D₃ in verarbeiteten und unverarbeiteten (uv.) Hering bzw. Thunfisch

Der Vergleich der nativen Heringsproben mit den Konserven zeigt, dass die unverarbeiteten Heringe (Haut und Filet) im Mittel höhere Gehalte an Cholecalciferol (30 µg/100 g) aufwiesen als die konservierten Produkte (15 µg/100 g). Im Gegensatz dazu stimmte der Vitamin D₃-Gehalt in marinierten Heringsproben mit dem der nativen Fische überein. Dies ist darauf zurückzuführen, dass marinierte bzw. gesalzene Heringe (Rollmops, Matjes) im Unterschied zu den Konserven, für die Haltbarmachung nicht erhitzt werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den nativen und konservierten Thunfischfilets. Die unverarbeiteten Fische wiesen einen drei-fach höheren Cholecalciferol-Gehalt (6 µg/100 g) auf als die konservierten (2 µg/100 g). Von diesen zur Haltbarmachung erhitzten Produkten war in lediglich zwei von sechs untersuchten Filets Vitamin D₃ zu finden. Die ermittelten Werte stimmen mit denen aus der Literatur (Thunfischkonserve: 1,68 µg/100 g [50]) überein.

7-Dehydrocholesterol konnte sowohl in nativen als auch in verarbeiteten Herings- bzw. Thunfischproben nachgewiesen werden. Hierbei enthielten die verarbeiteten Produkte im Mittel höhere Gehalte als die nativen. Möglicherweise tragen weitere Zutaten im verarbeiteten Produkt zum Gesamt-7-Dehydrocholesterolgehalt bei.

Ergosterol konnte in zwei der sechs untersuchten Thunfischkonserven nachgewiesen werden. Bei einer handelte es sich um „Thunfisch in Sonnenblumenöl“ bei der anderen um „Thunfisch naturale“. Da in den unverarbeiteten Thunfisch kein Ergosterol gefunden wurde, ist anzunehmen, dass der Gehalt entweder über andere Zutaten in die Konserven gelangte oder auf Hefen und Schimmelpilze (Bestandteil der Membran) zurückzuführen ist. Gegen den Fremdeintrag durch andere Bestandteile spricht, dass im „Thunfisch naturale“ außer Wasser und Salz keine weiteren Zutaten verwendet wurden und gegen den Eintrag durch Mikroorganismen, dass Konserven weitestgehend durch spezielle Konservierungsmethoden vor mikrobiellen Verderb geschützt sind. Aufgrund der Datenlage ist der Ursprung des Ergosterolgehaltes in den Proben nicht feststellbar.

3.4.1.3 Gehalte an D-Vitaminen in verschiedenen Geweben

Bei getrennter Betrachtung von Heringshaut und -filet (Tabelle 32) in verarbeiteten und unverarbeiteten Produkten ist zu erkennen, dass in der Haut unabhängig von der Verarbeitung im Mittel höhere Gehalte an Vitamin D₃ zu finden waren als in den Filetproben. Die Haut unverarbeiteter Heringe (40 µg/100 g) zeigte dabei gegenüber den marinierten bzw. gesalzen Proben (30 µg/100 g) leicht erhöhte Gehalte auf. Diese Differenz ist nicht signifikant.

Tabelle 32: Gehalte an D-Vitaminen in verschiedenen Geweben verarbeiteter und unverarbeiteter Fischproben

Fisch	n	D ₃ [µg/100 g]			25(OH)D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Hering, Filet													
unverarbeitet	7	7,0	13,3	9 (5)	n. n.			10	130	50 (5)	n. n.		
Marinade/ gesalzen	9	4,4	16,7	12 (9)	n. n.			10	120	60 (7)	< 6 (4)	-	-
Hering, Haut													
unverarbeitet	6	17,7	61,3	40 (6)	n. n.			22	32	27 (5)	< 20 (1)	-	-
Marinade/ gesalzen	9	13,8	50,1	30 (9)	n. n.			20	190	80 (8)	< 6 (4)	< 20 (1)	-

n. n. nicht nachweisbar

NWG (Ergo): 6 µg/100 g; BG (Ergo): 20 µg/100 g

3.4.1.4 Lachs

Lachs kann sowohl aus Aquakultur (Zuchtlachs) als auch aus natürlichen Quellen (Wildlachs) stammen. Es wurden insgesamt 40 Zuchtlachs- (*Salmo salar*) konventioneller sowie biologischer Haltung und 52 Wildlachsfiletsproben (*Oncorhynchus keta*, *Oncorhynchus gorboscha*, *Oncorhynchus*

nerka, *Oncorhynchus ssp.*) aus dem Handel aufgearbeitet und vermessen. Die bei der Untersuchung ermittelten Gehalte an D-Vitameren sind in Tabelle 33 wiedergegeben.

Tabelle 33: Gehalte an D-Vitameren in Zucht- und Wildlachsen

Fischfilet	n	D ₃ [µg/100 g]			25(OH)D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Zuchtlachs	40	2,2	9,5	5 (40)	< 0,7 (33)	1,0	0,9 (6)	80	330	180 (40)
<i>Salmo salar</i>	36	2,2	9,5	6 (36)	< 0,7 (31)	1,0	0,9 (4)	80	330	190 (36)
<i>Salmo salar</i> (Bio)	4	3,6	5,8	5 (4)	< 0,7 (2)	0,8	0,8 (2)	100	230	160 (4)
Wildlachs	52	4,0	42,8	11 (52)	< 1,2 (4)	-	-	< 6 (3)	90	40 (49)
<i>Oncorhynchus keta</i>	15	7,7	42,8	18 (15)		n. n.		< 6 (3)	50	30 (12)
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	31	4,0	16,8	8 (31)		n. n.		10	90	40 (31)
<i>Oncorhynchus nerka</i>	4	13,9	16,2	15 (4)	< 1,2 (4)	-	-	20	20	21 (4)
<i>Oncorhynchus ssp.</i>	2	8,2	9,6	8,9 (2)		n. n.		40	60	50 (2)

n. n. nicht nachweisbar BG (25D₃, Lachs): 0,7 µg/100 g; BG (25D₃, Wildlachs): 1,2 µg/100 g;
BG (7-DHC, Wildlachs): 6 µg/100 g

Cholecalciferol konnte in allen untersuchten Lachsproben nachgewiesen werden. Die Spannweite reichte im Mittel von 2,2 bis 9,5 µg/100 g in Zucht- und von 4,0 bis 42,8 µg/100 g in Wildlachs. Wildlachsfilets (11 µg/100 g) enthielten im Mittel höhere Gehalte an Vitamin D₃ als Zuchtlachsfilets (5 µg/100 g). Besonders hohe Vitamin D₃-Mengen wurden hierbei in *Oncorhynchus keta* (42,8 µg/100 g) ermittelt. Innerhalb der Zuchtlachse war kein Unterschied im Vitamin D₃-Gehalt zwischen Fischen aus konventioneller (6 µg/100 g) und biologischer (5 µg/100 g) Haltung zu erfassen, wobei die geringe Probenanzahl der „Bio“-Lachse (4) zu berücksichtigen ist.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Vitamin D₃ über das Futter in die Fische gelangt und eine Anreicherung über die Nahrungskette erfolgt (Siehe 2.2.1; Seite 6 f.) [58-61]. Lachsfische sind Raubfische und stehen am Ende der Nahrungskette. Sie ernähren sich von Kleinfischen, wie beispielsweise Hering (Vitamin D₃: 30 µg/100 g; 7-DHC: 70 µg/100 g), Krebstieren und Garnelen. Kommerziell erhältliches Fischfutter darf mit maximal 75 µg Vitamin D₃ pro kg angereichert werden (Siehe 2.3.2; Seite 14). Anhand der Daten wird deutlich, dass Wildlachse eine höhere Zufuhr an Vitamin D über die Nahrung erreichen können, was die ermittelten Vitamin D₃-Gehalte erklärt.

25-Hydroxycholecalciferol konnte in fast allen Zuchtlachsproben (39/40) nachgewiesen werden, während es in Wildlachsen ausschließlich in der Gattung *Oncorhynchus nerka* vorkam. Hierbei ist die geringe Probenzahl (4) zu berücksichtigen.

7-Dehydrocholesterol trat in allen Lachsfischen auf. Als unpolarer Metabolit wird das Provitamin in unpolaren Matrices, wie Fett, stärker angereichert als im polaren Muskelgewebe, folglich ist es verstärkt in den fettreichen Zuchtlachsen zu finden. Der mittlere Gehalt im Zuchtlachs- (180 µg/100 g) lag etwa 4-fach höher als bei Wildlachsfilet (40 µg/100 g).

Untersuchungen von Futtermittelproben für Zuchtfische ergaben 100 bis 500 µg 7-DHC und 1.300 bis 2.700 µg Ergosterol pro 100 g Futter. Die 7-DHC-Mengen lassen sich daher, unter Berücksichtigung der Gehalte im Hering, auch auf die unterschiedliche Futtermittelzusammensetzung zurückführen. Im Gegensatz zum Provitamin D₃ konnte Ergosterol jedoch in keiner Lachsprobe nachgewiesen werden. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit der geringeren Bioverfügbarkeit von Vitamin D₂ in Fisch [49].

Neben den Einflüssen über das Futter sind weitere Faktoren wie der Lebensraum und art- bzw. stoffwechselspezifische Ursachen von Bedeutung. So zeigten die Untersuchungen von Ostermeyer *et al.* (2006), dass Lachsfische der Gattung *Salmo salar* (Lebensraum: Atlantik) unabhängig von ihren Lebensbedingungen (Farm- und Wildlachs) ähnliche Gehalte an 7-Dehydrocholesterol enthielten. Diese waren im Vergleich zu verschiedenen *Oncorhynchus*-Arten (Lebensraum: Pazifik) etwa zehnfach höher [51] (Siehe 2.2.1; Seite 7; Tabelle 1).

3.4.1.5 Überprüfung einer Korrelation zwischen Vitamin D- und Fett-Gehalt in Lachsproben

Mattila *et al.* veröffentlichten 1997 eine Studie, in der unter anderem ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vitamin D₃- und Fettgehalt in Fischen untersucht wurde. Die Probenauswahl umfasste Flussbarsch (*Perca fluviatilis*), Atlantischer Hering (*Clupea harengus membras*) und Kleine Maräne (*Coregonus albula*) aus verschiedenen Gewässern. Es konnte in dieser Studie keine Korrelation zwischen dem Fett- und Vitamin D₃-Gehalt festgestellt werden [49].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 40 Proben der Zuchtlachsgattung *Salmo salar*, neun Proben der Wildlachsgattung *Oncorhynchus keta* und 27 Proben der Wildlachsgattung *Oncorhynchus gorbuscha* auf ihren Fett- und Vitamin D-Gehalt untersucht. In Tabelle 34 sind die Ergebnisse der Bestimmungen zusammengefasst.

Anhand der Daten wird ersichtlich, dass die Fettgehalte der Zuchtlachsproben (*Salmo salar*) mit durchschnittlich 14 % deutlich höher lagen als die der Wildlachsproben (*Oncorhynchus*-Arten), welche im Schnitt einen Fettgehalt von 2 % aufwiesen. Die Fettgehalte der Zuchtlachsproben erstreckten sich über einen Bereich von 5 bis 25 %, während die Fettgehalte der Wildlachsproben zwischen 0,3 und 5,2 % lagen. Zwischen den Bereichen, in denen sich die Fettgehalte der einzelnen Gattungen befinden, bestanden nur marginale Unterschiede.

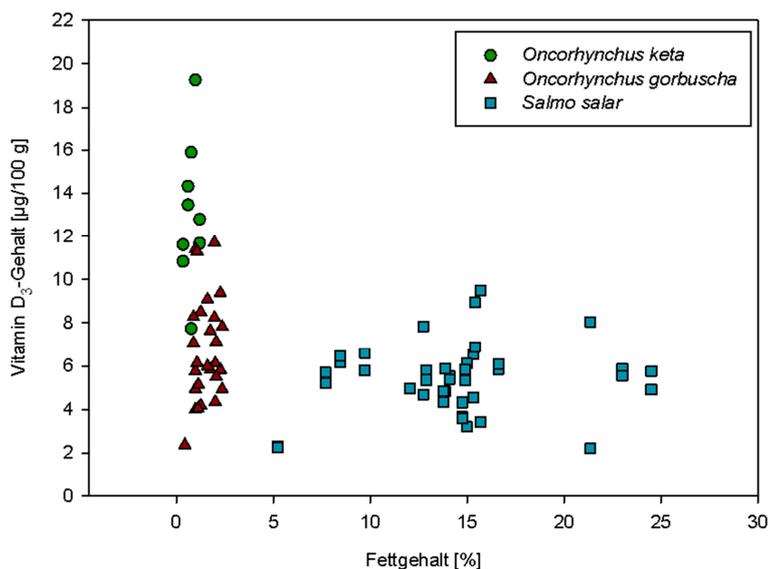
Tabelle 34: Vitamin D- und Fettgehalt in Zucht- und Wildlachsfischfilets

Fisch	n	D ₃ [%]			7-DHC [%]			Fett [%]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Zuchtlachs,* gesamt	40	2	10	5 ± 1	80	330	180 ± 20	5	25	14 ± 2
Wildlachs,** gesamt	42	2	19	9 ± 1	10	90	40 ± 10	0,3	5,2	2 ± 0
<i>Oncorhynchus keta</i>	9	8	19	13 ± 3	10	50	20 ± 10	0,3	1,2	0,8 ± 0,2
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	27	2	12	7 ± 1	10	90	40 ± 10	0,4	2,4	1,5 ± 0,2

* alle *Salmo salar*, unabhängig der Haltungsbedingungen

** alle *Oncorhynchus* (*O. keta*, *O. gorbuscha*, *O. nerka*, *O. ssp.*)

Um die Beziehung zwischen Vitamin D- und Fettgehalt zu veranschaulichen, wurden die beiden Größen in einem Diagramm (Abbildung 23) für die einzelnen Gattungen gegeneinander aufgetragen.

Abbildung 23: Zusammenhang zwischen Vitamin D₃- und Fettgehalt in Lachsfischen

Aus dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die Zuchtlachsproben eine hohe Varianz im Fett- bei geringen Schwankungen des Vitamin D₃-Gehaltes aufweisen. Die Datenpunkte der Wildlachs-gattungen liegen dagegen in engeren Gruppierungen zueinander.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vitamin D₃- und Fettgehalt in Lachsfischfilets kann nach Anwendung des t-Tests zur Prüfung des Korrelationskoeffizienten ($P = 95\%$) ausgeschlossen werden. Dies gilt sowohl für Zucht- bzw. Wildlachsfilets allgemein als auch für Filets innerhalb der Wildlachsarten *Oncorhynchus keta* und *Oncorhynchus gorbuscha*.

Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen von Mattila *et al.* (1997), dass kein genereller Zusammenhang zwischen dem Vitamin D- und dem Fettgehalt in Fischen besteht [49]. Auch innerhalb der Lachse ist eine solche Korrelation nicht zu finden.

Die Betrachtung der 7-Dehydrocholesterolgehalte in Verbindung mit den Fettgehalten der untersuchten Zuchtlachsfilets *Salmo salar* lässt einen Zusammenhang zwischen den beiden Größen vermuten. Aufgrund der halbquantitativen Bestimmung des Provitamins kann dieser jedoch nicht eindeutig bestätigt werden.

3.4.2 Eier

Eigelb stellt eine wichtige natürliche Vitamin D-Ressource dar. Insgesamt wurden 58 Eigelbproben untersucht. Deren Auswahl bezog sich auf verschiedene Haltungsarten (Freiland-, Boden-, private Freilandhaltung) zu verschiedenen Zeitpunkten (Februar/März 2013; Juli/September 2011). In Tabelle 35 und Tabelle 36 sind die gemittelten Ergebnisse dargestellt. Abbildung 24 zeigt die Verteilung von Vitamin D₃ (●), die entsprechenden Mittelwerte (■) sowie die Standardabweichungen in den einzelnen Eigelbproben.

Tabelle 35: Gehalte an D-Vitaminen in Eigelb aus den Monaten Februar und März 2013

Eigelb	n	D ₃ [µg/100 g]			25(OH)D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Bodenhaltung	10	2,9	5,5	4 (3)	n. q. (10)			10	30	14 (10)
Freilandhaltung	10	2,4	5,7	3 (7)	n. q. (10)			10	70	20 (10)
Freilandhaltung, privat I*	10	2,1	5,5	3 (8)	n. q. (10)			10	80	30 (10)
Freilandhaltung, privat II*	10	1,5	4,0	2,4 (6)	n. q. (10)			20	60	30 (10)

*verschiedene Halter

n.q. nicht quantifizierbar

Vitamin D₃ konnte unabhängig von den Haltungsbedingungen der Hühner in 24 der insgesamt 40 Eigelbproben aus dem Zeitraum Februar und März nachgewiesen werden. Hierbei enthielten Eigelbe aus privater Haltung (3 µg/100 g bzw. 2,4 µg/100 g) ähnliche Vitamin D₃-Gehalte wie die aus kommerziellen Quellen (3 µg/100 g bzw. 4 µg/100 g). Auch bei den industriell produzierten Eiern zeigten die Cholecalciferolgehalte zwischen den in Freiland- bzw. Bodenhaltung gewonnenen Eigelbproben keine signifikanten Differenzen.

Es existieren jedoch Unterschiede in der Anzahl an Proben, in denen Vitamin D₃ nachgewiesen werden konnte. So wurde in Eiern aus Freilandhaltung mit sieben von zehn Proben deutlich öfter Vitamin D₃ ermittelt als in Eiern aus Bodenhaltung (3/10).

Wie bereits in Kapitel 2.2.2 (Seite 9 f.) näher erläutert, hat das Futter der Hühner einen bedeutenden Einfluss auf den Vitamin D-Gehalt im Eigelb [70-72]. Gesetzlich ist eine Anreicherung von bis zu 75 µg Vitamin D₃ pro kg Futter möglich (2.3.2, Seite 14). Laut Literatur kann bei einem Zusatz von 62,5 µg Vitamin D₃ pro kg Futter über einen Zeitraum von vier Wochen ein Cholecalciferol-Gehalt im Eigelb von 3,5 µg/100 g erreicht werden [73]. Diese Gehalte stimmen mit den ermittelten Werten für Eier aus konventioneller Haltung überein.

Verschiedene Untersuchungen haben bereits eine saisonale Vitamin D-Abhängigkeit in Fleisch- und Milchprodukten nachgewiesen [88, 123]. Es ist somit denkbar, dass der Vitamin D₃-Gehalt in Eigelb von der UV-Bestrahlung der Hühner beeinflusst wird. In Tabelle 36 sind die gemittelten Ergebnisse der Vitamin D-Untersuchungen in Eigelb für den Zeitraum Juli und September 2011 dargestellt.

Tabelle 36: Gehalte an D-Vitaminen in Eigelbproben aus den Monaten Juli und September 2011

Eigelb	n	D ₃ [µg/100 g]			25(OH)D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]		
		min.	max.	MW (n)	min.	max.	MW (n)	min.	max.	MW (n)
Bodenhaltung	10	2,1	5,1	3 (10)	0,8	1,5	1,1 (10)	300	600	400 (10)
Freilandhaltung, privat	8	12,9	24,2	19 (8)	1,5	2,4	2,1 (8)	400	800	600 (8)

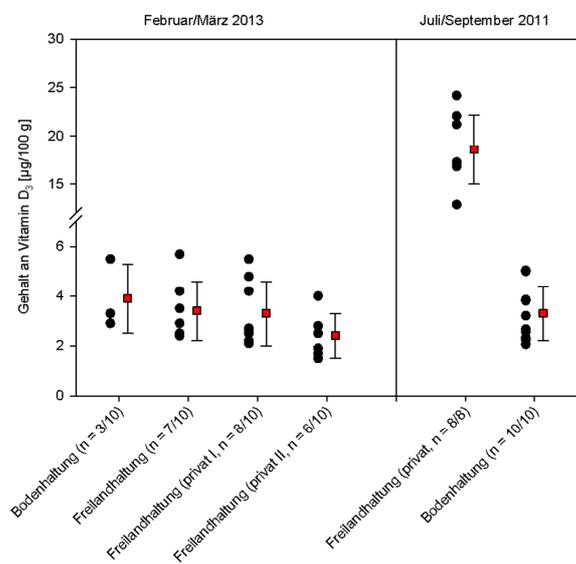


Abbildung 24: Gehalte an Vitamin D₃ in Hühnereigelben aus verschiedenen Haltungsbedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten (Februar/März 2013; Juli/September 2011)

Während zwischen den untersuchten Eigelben aus Freiland- bzw. Bodenhaltung aus dem Zeitraum Februar bis März kein Unterschied im Vitamin D₃-Gehalt nachzuweisen war, zeigten die Eigelbe aus Freilandhaltung von Juli bis September deutlich höhere Werte als die aus Bodenhaltung. Dies könnte im Zusammenhang mit der UVB-Strahlung stehen, die in den Sommermonaten intensiv genug ist um Vitamin D₃ zu synthetisieren.

25-Hydroxycholecalciferol konnte in den Eigelbproben aus dem Zeitraum Februar bis März 2013 identifiziert, jedoch mit der angewandten Methode aufgrund von Matrixeinflüssen nicht integriert bzw. quantifiziert werden. Die 25(OH)D₃-Gehalte der Eigelbproben aus den Monaten Juli bis September 2011 stimmen mit den Daten aus der Literatur nur teilweise überein (0,98 µg/100 g [66]). So wurden für die Eigelbproben aus Freilandhaltung doppelt so hohe Werte ermittelt. Aufgrund der Datenlage (fehlende Angaben über Futtermittelzusammensetzung) ist es nicht möglich, eine Erklärung dafür zu finden.

7-Dehydrocholesterol konnte in allen Eigelbproben bestimmt werden, wobei die Werte aus den Sommermonaten ca. 20-fach höher lagen als im Winter. Derzeit sind keine Literaturangaben über den 7-DHC-Gehalt in Eigelb verfügbar.

3.4.3 Speisepilze

Pilze stellen eine natürliche Quelle für Vitamin D₂ dar. Insgesamt wurden 22 Speisepilz- und 12 Hefepilzproben (Bäckerhefe [*Saccharomyces cerevisiae*]) aus dem Handel untersucht. Unter den Speisepilzen befanden sich Kräuterseitlinge (*Pleurotus eryngii*), Steinpilze (*Boletus edulis*) Champignons (*Agaricus bisporus*), Austernpilze (*Pleurotus ostreatus*) und Pfifferlinge (*Cantharellus cibarius*). Soweit es möglich war, wurden Hut und Stiel getrennt analysiert und über das Massenverhältnis der durchschnittliche Vitamin D-Gehalt im Gesamtpilz bestimmt. In Tabelle 37 sind die ermittelten Gehalte zusammengefasst. Abbildung 25 zeigt die Verteilung von Vitamin D₂ (●), die entsprechenden Mittelwerte (■) sowie die Standardabweichungen in den einzelnen Pilzen.

Tabelle 37: Gehalte an D-Vitaminen in kommerziell erhältlichen Speisepilzen und Hefen

Pilz	n	D ₂ [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW
Brauner Kräuterseitling, gesamt	4	1,6	26,4	10 (4)	3.590	4.390	5.000 (4)
Hut	4	3,1	12,8	6 (4)	2.620	6.800	4.000 (4)
Stiel	5	< 2,9 (3)	18,4	12 (2)	1.530	5.980	3.000 (5)
Steinpilz, gesamt	3	10,7	20,0	14 (3)	6.120	7.160	6.500 (3)
Hut	3	7,2	15	11 (3)	4.210	4.550	4.000 (3)
Stiel	3	4,7	8,3	7 (3)	1.020	4.100	3.000 (3)
Champignon, gesamt	4	< 2,9 (4)	-	-	2.410	8.180	6.000 (4)
Hut	4	< 2,9 (4)	-	-	1.050	3.600	2.000 (4)
Stiel	4	< 2,9 (4)	-	-	450	2.770	2.000 (4)
Austernpilz, gesamt	6	< 2,9 (2)	10	6 (3)	2.360	7.040	3.000 (6)
Pfifferling, gesamt	5	8	62,7	20 (5)	960	4.710	2.000 (5)
Trockenbackhefe	10	n. q.			3.460	9.190	6.000 (10)
Bäckerhefe	2	n. q.			2.610	3.060	2.800 (2)

n. q. nicht quantifizierbar

BG (D₂): 2,9 µg/100 g

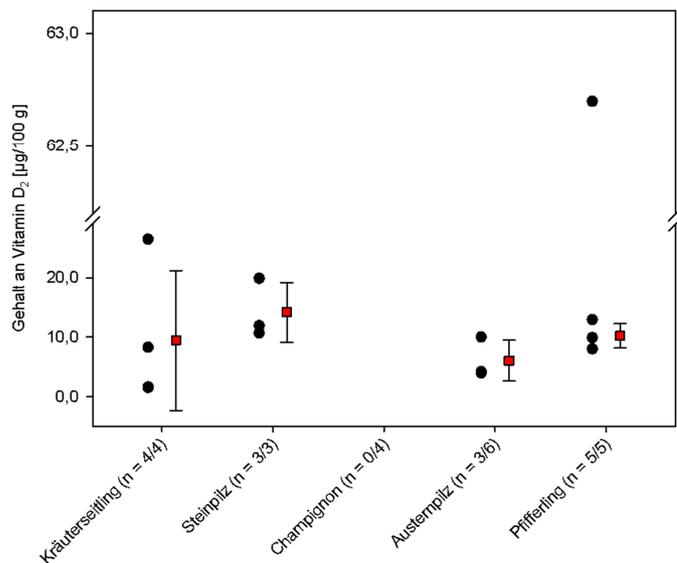


Abbildung 25: Gehalte an Vitamin D₂ in Pilzen

Ergocalciferol konnte in allen Speisepilzen, mit Ausnahme einer Austernpilzprobe nachgewiesen und teilweise quantifiziert werden. Die Gehalte variierten im Mittel zwischen $< 2,9$ und $20 \mu\text{g}/100 \text{ g}$. Besonders hohe Vitamin D₂-Mengen wurden in einer Pfifferlingprobe ermittelt ($62,7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$). Die geringsten Gehalte an Vitamin D₂ (unterhalb der BG) wiesen Zuchtchampignons (*Agaricus bisporus*) auf. Als am häufigsten auftretende Sterol in Pilzen konnte Ergosterol in allen Speisepilzproben in hohen Mengen analysiert werden.

Die ermittelten Daten für Vitamin D₂ entsprechen weitestgehend den Referenzwerten aus der Literatur (2.2.3; Seite 10). Ausnahmen bildeten einige Austern- und Steinpilzproben, für die höhere Werte bestimmt wurden. Für die Braunen Kräuterseitlinge (*Pleurotus eryngii*), die der Gattung *Pleurotus* angehören, konnten keine Vergleichsdaten gefunden werden.

Bei den Ergosterol-Gehalten traten erhebliche Diskrepanzen auf. Während in der Literatur zweistellige Werte im $\text{mg}/100 \text{ g}$ -Bereich analysiert wurden, lagen die Gehalte im Rahmen der vorliegenden Studie etwa zehnfach niedriger. Obwohl es sich bei den ermittelten Werten nur um halbquantitative Ergebnisse handelt, müssen damit die Daten aus der Literatur kritisch betrachtet werden.

Bei Untersuchungen des Sterol- und Vitamin D₂-Gehalts von Speisepilzen beobachtete Mattila *et al.* (2002), dass sich die D-Vitamerie innerhalb des Pilzkörpers (Hut, Stiel) recht unterschiedlich verteilen, wobei die Differenz beim Provitamin weniger stark ausgeprägt ist [47]. In der vorliegenden Studie wurden von einigen Pilzen (Kräuterseitling, Steinpilz, Champignon) Hut und Stiel getrennt voneinander untersucht. Anhand der Ergebnisse können jedoch keine eindeutigen Aussagen darüber getroffen werden, in welchem Teil des Pilzkörpers die größten Vitamin D-Mengen auftreten. Laut Mattila *et al.* (2002) enthalten die Hüte ($10 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) von wild gewachsenen Steinpilzen, aufgrund der Exposition zum Sonnenlicht, höhere Vitamin D₂-Gehalte als der Stiel ($2,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$). Dies konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden, wobei der Unterschied jedoch als nicht signifikant einzuschätzen ist. Bei den Kräuterseitlingen wiesen sowohl der Stiel als auch der Hut

ähnlich große Gehalte auf. Die ermittelten Daten der Zuchtchampignons liegen unterhalb der Bestimmungsgrenze und sind daher nicht für eine solche Auswertung geeignet.

Neben Speisepilzen wurden auch Hefepilze (*Saccharomyces cerevisiae*) untersucht. Wie aus Tabelle 37 ersichtlich, konnte in allen Bäckerhefen Ergosterol ermittelt werden. Wie zu erwarten, zeigte sich dabei eine Differenz zwischen den gefriergetrockneten und den frischen Hefeproben. Werden die Ergosterolgehalte der frischen Hefeproben auf deren Trockenmasse (27 g/100 g [67]) bezogen, ergeben sich 10.370 µg Ergosterol pro 100 g. Dieser gegenüber der getrockneten Hefe deutlich erhöhte Wert lässt sich mit der erhöhten Stoffwechselaktivität frischer Hefe begründen.

In sechs der insgesamt 12 Proben konnten im Chromatogramm dem Vitamin D₂ entsprechende Signale beobachtet werden, welche mittels der Identifizierungsmethode bestätigt wurden.

3.4.4 Fleisch und Innereien

Gemäß Art. 2 Nr. 3 der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 in Verbindung mit Anhang 1 Nr. 1 dieser Verordnung werden unter dem Begriff „Fleisch“ alle genießbaren Teile einschließlich Blut von Rind, Schwein, Schaf, Ziege, Geflügel, Hasentieren sowie Wild zusammengefasst. Die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches definieren „Fleisch“ entsprechend des EU- Hygienerechts. Diese Definition beinhaltet nicht nur die Skelettmuskulatur mitsamt dem wesensgemäß darin eingebetteten oder damit verbundenen Gewebe (Fett- und Bindegewebe) sondern auch Innereien.

Insgesamt wurden 112 Aufarbeitungen in der Kategorie Fleisch und Innereien durchgeführt. Die Auswahl umfasste neben 56 Muskelfleischproben (Schwein, Rind, Kalb, Lamm, Geflügel [Pute, Hähnchen]) 38 Proben verschiedener Organe (Rinder-, Kalbs-, Kaninchen-, Puten-, Hähnchen-, Schweineleber/-niere). Soweit es möglich war, wurden Fleisch und Fett bzw. Fleisch und Haut getrennt analysiert. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 38 und Tabelle 39 zusammengefasst.

Tabelle 38: Gehalte an D-Vitaminen in Fleisch

Fleisch	n	D ₃ [µg/100 g]			25(OH)D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Schwein	18	< 1,4 (3)	< 4,8 (1)	-	n. n.			< 30 (4)	170	100 (2)	< 6 (1)	30	15 (5)
Hähnchen, Fleisch	9		n. n.		n. n.			< 30 (4)	-	-	< 6 (2)	-	-
Hähnchen, Haut	9	< 1,4 (2)	< 4,8 (2)	-	n. n.			100	420	200 (9)	20	80 1.060 ¹	100 (9)
Pute	5	< 1,4 (1)	-	-	n. n.			n. n.			n. n.		
Rind, Fleisch	11	< 4,8 (2)	-	-	< 1,5 (1)	< 5,1 (1)	-	< 30 (1)	-	-	10	30	20 (3)
Rind, Fett	2		n. n.		n. n.			< 30 (1)	-	-	10	10	10 (2)
Kalb, Fleisch	5	< 4,8 (1)	-	-	n. n.			n. n.			30	70	50 (4)
Kalb, Fett	1	< 1,4 (1)	-	-	< 5,1 (1)	-	-	< 30 (1)	-	-	-	-	1.100 (1)

Fleisch	n	D ₃ [µg/100 g]			25(OH)D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Lamm, Fleisch	8	< 1,4 (1)	-	-	n. n.			< 30 (2)	-	-	-	-	9 (1)
Lamm, Fett	6	< 1,4 (2)	-	-	n. n.			< 30 (1)	70	50 (4)	20	30	20 (3)

n. n. nicht nachweisbar † auffälliger Wert NWG (D₃): 1,4 µg/100 g; BG (D₃): 4,8 µg/100 g;
 NWG (25D₃): 1,5 µg/100 g; BG (25D₃): 5,1 µg/100 g; BG (7-DHC): 30 µg/100 g; BG (Ergo): 6 µg/100 g

Vitamin D₃ konnte in sechs und 25-Hydroxycholecalciferol in zwei von 74 Fleischproben nachgewiesen werden. In 11 Chromatogrammen wurden Signale als Vitamin D₃ bzw. 25-Hydroxycholecalciferol identifiziert, wobei die ermittelten Gehalte jedoch unterhalb der Nachweisgrenzen lagen. Deren Abgleich (NWG: Vitamin D₃: 1,4 µg/100 g; 25(OH)D₃: 1,5 µg/100 g) mit den Literaturdaten ergab, dass die Leistungsparameter deutlich höher als die Referenzwerte lagen (vgl. 2.2.4; Seite 11; Tabelle 6).

7-Dehydrocholesterol und Ergosterol wurden wesentlich häufiger, vorwiegend in fettreichem Gewebe, ermittelt. Dies fiel vor allem bei den Hähnchenproben auf, bei denen eine getrennte Untersuchung von Haut und Fleisch erfolgte. Wie aus Tabelle 38 ersichtlich, konnten im Hähnchenfleisch ähnliche Gehalte an D-Vitaminen wie in den anderen Fleischarten nachgewiesen werden, während in den dazugehörigen Hautproben hohe Gehalte an 7-DHC (200 µg/100 g) und Ergosterol (100 µg/100 g) quantifiziert wurden. Der Grund hierfür liegt im hohen Fettanteil der Haut gegenüber dem Fleisch. Die unpolaren Sterole reichern sich daher verstärkt im unpolaren Hautgewebe an. Insbesondere bei Geflügel beschränkt sich die Fettverteilung auf die Hautunterschicht und dem Bauchraum, während das Fett im roten Muskelfleisch weitgehend gleich verteilt ist. Da Ergosterol ein wichtiger Membranbestandteil von Hefen und Schimmelpilzen ist, kann der hohe Gehalt der Haut, welche die nach außen abgrenzende Gewebsschicht darstellt, auch durch den erhöhten Kontakt zu Mikroorganismen gegenüber dem darunter liegenden Fleisch erklärt werden.

Vitamin D gelangt entweder über das Futter oder durch Eigensynthese mittels UV-Strahlung in das Fleisch von Schlachttieren. Unter den 11 analysierten Rindfleischproben, befanden sich zwei als „Bio“ deklarierte Produkte. Beide enthielten 7-Dehydrocholesterol. In einer dieser Proben konnte Cholecalciferol und 25-Hydroxycholecalciferol nachgewiesen werden.

Die spezifischen Vorschriften für die ökologische/biologische Produktion (Herkunft, Unterbringung, Haltung, Futtermittel, Krankheitsvorsorge und tierärztliche Behandlung) sowie die Kennzeichnung sind in der VO (EG) 899/2008 geregelt. Diese sieht eine „artgerechte“ Tierhaltung vor, welche eine u. a. den Luft- und Lichtbedürfnissen angepasste Unterbringung der Tiere vorsieht. Es ist somit denkbar, dass die in der „Bio“-Probe ermittelten Vitamin D-Gehalte auf die gegenüber konventionell produzierten Fleischproben höher standardisierten Haltungsbedingungen zurückzuführen sind.

Innereien

Organe wie Leber und Niere sind für den Vitamin D-Metabolismus in Säugetieren zwingend erforderlich. Aufgrund dessen wurden diese, sofern sie als Lebensmittel von Bedeutung waren, untersucht. Die Auswahl umfasste 35 Leberproben von verschiedenen Tieren (Pute, Hähnchen, Kaninchen, Rind, Kalb, Schwein) sowie drei Nierenproben vom Schwein. Die gemittelten Ergebnisse sind in Tabelle 39 zu finden.

Tabelle 39: Gehalte an D-Vitaminen in Innereien

Fleisch	n	D ₃ [µg/100 g]			25(OH)D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Schwein, Leber	14	< 2,2 (8)	-	-	< 1,1 (1)	-	-	< 31 (1)	-	-
Schwein, Niere	3	< 2,2 (1)	-	-		n. n.			n. n.	
Hähnchen, Leber	7	< 7,4 (1)	-	-	< 3,7 (3)	-	-		n. n.	
Pute, Leber	3	< 2,2 (1)	< 7,4 (1)	-	< 3,7 (1)	-	-		n. n.	
Rind, Leber	4	< 2,2 (1)	-	-		n. n.			n. n.	
Kalb, Leber	2	< 2,2 (1)	-	-		n. n.		< 31 (1)	-	
Kaninchen, Leber	5		n. n.		< 1,1 (3)	-	-	< 31 (1)	-	-

n. n. nicht nachgewiesen NWG (D₃): 2,2 µg/100 g; BG (D₃): 7,4 µg/100 g; NWG (25D₃): 1,1 µg/100 g;
BG (25D₃): 3,7 µg/100 g; BG (7-DHC): 31 µg/100 g

Cholecalciferol konnte in zwei und 25-Hydroxycholecalciferol in vier Proben Puten- bzw. Hähnchenleber nachgewiesen werden. In 16 Chromatogrammen wurden Signale als Vitamin D₃ bzw. 25(OH)D₃ identifiziert, deren Integration führte jedoch zu Gehalten unterhalb der Nachweisgrenzen (Vitamin D₃: 2,2 µg/100 g; 25(OH)D₃: 1,1 µg/100 g). Ein Abgleich der analytischen Grenzen mit den Literaturdaten ergab, dass diese, wie im Muskelfleisch, deutlich höher als die Referenzwerte lagen (vgl. 2.2.4; Seite 11; Tabelle 6).

Exogen zugeführtes Vitamin D wird über den Darm zur Leber transportiert, daher existiert möglicherweise ein Zusammenhang zwischen den im Futtermittel zulässigen und den in den Leberproben ermittelten Vitamin D-Gehalten. Das Futter von Masthühnern kann im Vergleich zu anderen Tierarten wesentlich höhere Mengen an Vitamin D (Vitamin D₃: 0,125 µg/100 g, 25(OH)D₃: 0,1 µg/100 g; Summe: 0,125 µg/100 g) enthalten (Siehe 2.3.2; Seite 14; Tabelle 8). Demzufolge ist anzunehmen, dass die nachgewiesenen D-Vitamine in Geflügelleber auf deren Futter zurückzuführen sind.

3.4.5 Milchprodukte

Insgesamt wurden 109 Milch und Milchprodukte aufgearbeitet und vermessen. Die Auswahl an Milchprodukten umfasste verschiedene Käsesorten und Käseerzeugnisse, Butter-, Rahm- und Sauermilchprodukte, sowie verschiedene Milchsorten. Eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 40: Gehalte an D-Vitaminen in Milchprodukten

Milchprodukt	n	D ₃ [µg/100 g]			D ₂ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Hartkäse	6	n. n.	n. n.		n. n.	n. n.		60	280	140 (6)	30	32	30 (3)
Schnittkäse	18	n. n.	n. n.		n. n.	n. n.		70	140	110 (17)	20	40	30 (2)
Weichkäse	20	< 0,9 (3)	-	-	< 1,4 (2)	< 4,5 (2)	-	< 30 (7)	110	60 (15)	670	2.270	1.000 (20)
Frischkäse/ -zubereitung	17	-	< 2,7 (1 [*])	-	n. n.	n. n.		< 30 (3)	90	60 (13)	< 11 (3)	25 410 ¹	20 (2)
Schmelzkäse/ -zubereitung	15	n. n.	n. n.		n. n.	n. n.		60	230	110 (15)	< 11 (7)	420 3.403 ¹	200 (7)
Rahm-/ Sauermilch- erzeugnisse & Kondensmilch	29	n. n.	n. n.		n. n.	n. n.		< 30 (2)	150	80 (27)	< 11 (17)	-	-
Milch	4	n. n.	n. n.		n. n.	n. n.		< 30 (3)	-	37 (1)	n. n.	n. n.	n. n.

* angereichertes Produkt: Zusatz von 1,25 µg Cholecalciferol pro 100 g auffälliger Wert n. n. nicht nachgewiesen
 NWG (D₃): 0,9 µg/100 g; BG (D₃): 2,9 µg/100 g; NWG (D₂): 1,4 µg/100 g, BG (7-DHC): 30 µg/100 g; BG (Ergo): 11 µg/100 g

Cholecalciferol konnte in einem und Ergocalciferol in zwei Milcherzeugnissen nachgewiesen werden. In weiteren fünf Chromatogrammen wurden Signale als Vitamin D₃ bzw. Vitamin D₂ identifiziert, deren Integration führte jedoch zu Gehalten unterhalb der Nachweisgrenze (NWG (D₃): 0,9 µg/100 g, NWG (D₂): 1,4 µg/100 g). Bei dem Vitamin D₃ enthaltenden Produkt handelte es sich um eine angereicherte Frischkäsezubereitung. Vitamin D₂ konnte ausschließlich in Weichkäsesorten nachgewiesen werden. Die Provitamine 7-DHC und Ergosterol wurden wesentlich häufiger identifiziert und quantifiziert. Nachfolgend wird auf die einzelnen Milchprodukte näher eingegangen.

3.4.5.1 Hart-, Schnitt- und halbfester Schnittkäse

Gemäß § 6 Absatz 1 der KäseV kann Käse je nach Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse in Gruppen eingeteilt werden. Insgesamt wurden sechs Hartkäse, 15 Schnittkäse und drei halbfeste Schnittkäse (Butterkäse) untersucht. In Tabelle 41 sind die ermittelten Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 41: Gehalte an D-Vitaminen in Hart-, Schnitt- und halbfesten Schnittkäsen

Käse	n	7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW
Hartkäse							
Emmentaler	4	60	170	100 (4)	30	30	30 (2)
Grana Padano	1	-	-	160 (1)	n. n.	n. n.	
Comté	1	-	-	180 (1)	-	-	32 (1)
Schnittkäse							
Gouda	5	70	150	110 (5)	n. n.	n. n.	
Edamer	5	80	130	120 (5)	n. n.	n. n.	

n. n. nicht nachgewiesen

Käse	n	7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW
Schnittkäse							
Tilsiter	2	70	90	80 (2)	n. n.		
Leerdamer	2	80	130	100 (2)	-	-	15 (1)
Maasdamer	1	-	-	140 (1)	n. n.		
Butterkäse	3	80	130	110 (3)	n. n.		

n. n. nicht nachgewiesen

7-DHC wurde in allen Schnitt- bzw. Hartkäseproben in ähnlichen Gehalten quantifiziert. Als Bestandteil des „tierischen“ Stoffwechsels gelangt das Provitamin D₃ über die Milch in den Käse. Es konnten keine Vergleichswerte aus der Literatur gefunden werden.

Ergosterol trat lediglich in vier von 22 Proben auf. Dessen Gehalt ist vermutlich auf die Aktivität von Hefen und Schimmelpilzen zurückzuführen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Käse Vitamin D₃ und 25(OH)D₃ enthält (Siehe 2.2.4; Seite 12; Tabelle 7). Die Referenzwerte liegen allerdings deutlich unter den Nachweisgrenzen der angewandten Methode (NWG (D₃): 0,9 µg/100 g; NWG (25OHD₃): 0,5 µg/100 g).

3.4.5.2 Weichkäse

Insgesamt wurden neun Weißschimmelkäse (u. a. Camembert, Brie), acht Blauschimmelkäse sowie drei Weichkäse, die sowohl Blau- als auch Weißschimmel enthielten, untersucht. Soweit es möglich war, wurden Kern und Rinde getrennt analysiert und über das Massenverhältnis der durchschnittliche Gehalt im Gesamtprodukt bestimmt. Die für die verschiedenen Weichkäsesorten ermittelten Werte sind in Tabelle 42 zusammengefasst.

Tabelle 42: Gehalte an D-Vitaminen in Weichkäse

Weichkäse	n	D ₂ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Weißschimmel, gesamt	9	< 4,5 (1)	-	-	< 30 (1)	110	70 (9)	690	1.020	900 (9)
Kern	7	n. n.			70	140	110 (7)	30	320	100 (7)
Rinde	9	n. n.			< 30 (6)	40	31 (3)	1.230	1.860	1.600 (9)
Blauschimmel, gesamt	8	< 1,4 (1)	< 4,5 (1)	-	< 30 (5)	50	40 (3)	670	2.270	1.100 (8)
Weiß- und Blauschimmel, gesamt	3	< 1,4 (1)	-	-	< 30 (1)	40	30 (2)	1.000	1.170	1.090 (3)
Kern	3	n. n.			30	40	32 (3)	470	1.080	800 (3)
Rinde	2	n. n.			< 30 (1)	32	32 (1)	1020	1.340	1.200 (2)

n. n. nicht nachgewiesen

NWG (D₂): 1,4 µg/100 g, BG (D₂): 4,5 µg/100 g, BG (7-DHC): 30 µg/100 g

Ergosterol wurde in allen Weichkäseschichten in hohen Mengen ermittelt. Dies war insofern zu erwarten, da Weichkäse während der Herstellung gezielt mit Edelschimmel (Bsp. *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*), welcher die Vitamin D₂-Vorstufe synthetisiert, versetzt wird. Die Käserinden enthielten, aufgrund des höheren Anteils an Edelschimmel, wesentlich größere Mengen an Ergosterol (1.200 bis 1.600 µg/100 g) als die Kerne (100 bis 800 µg/100 g). Die Umwandlung des Ergosterols zum Vitamin D₂ konnte nur in zwei der insgesamt 20 untersuchten Weichkäseproben nachgewiesen werden. Dies ist auf die fehlende photochemische Umsetzung während der Reifung und Lagerung (Lichtausschluss, niedrige Temperaturen) des Käses zurückzuführen.

Neben Ergosterol konnten in allen untersuchten Weichkäseproben 7-Dehydrocholesterol nachgewiesen werden. Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass bei Weißschimmelkäse, der augenscheinlich nur auf seiner Oberfläche Edelschimmel enthält, der Gehalt an 7-DHC sich in Kern und Rinde signifikant unterscheidet. Im Kern war die Vitamin D₃-Vorstufe in ähnlichen Mengen (110 µg/100 g) zu finden wie in Schnitt- bzw. Hartkäse (110 bis 130 µg/100 g), während die von Schimmel bewachsenen äußeren Schichten deutlich weniger 7-DHC (31 µg/100 g) aufwiesen. Ähnliche Gehalte des Provitamin D₃ wurden auch in den von Nutzpilzen besiedelten Bereichen anderer Weichkäsesorten (Blauschimmelkäse [gesamt]; Weichkäse mit Weiß- und Blauschimmel [Rinde, Kern]) analysiert (< 30 bis 40 µg/100 g).

3.4.5.3 Frischkäse

Insgesamt wurden vier Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen, acht Speisequarksorten (Fettgehalt 20-40 % i. Tr.) und eine Milchquarkmahlzeit untersucht. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 43 aufgeführt.

Tabelle 43: Gehalte an D-Vitaminen in Frischkäse und -zubereitungen

Frischkäse	n	D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Frischkäse	4	n. n.			<30	100	50 (3)	n. n.		
Frischkäsezubereitung	4	< 2,7 (1*)	-	-	< 30 (3)	37	37 (1)	-	-	16 (1)
Speisequark	8	n. n.			40	90	60 (8)	< 11 (3)	25	25 (1)
Milchquarkmahlzeit	1	n. n.			-	-	70 (1)	-	-	410 (1)

* angereichertes Produkt: Zusatz von 1,25 µg Cholecalciferol pro 100 g
BG (D₃): 2,7 µg/100 g; BG (7-DHC): 30 µg/100 g; BG (Ergo): 11 µg/100 g

n. n. nicht nachgewiesen

Laut § 7 Absatz 1 in Verbindung mit Anlage 1 der KäseV handelt es sich bei Speisequark um eine Standardsorte der Gruppe Frischkäse. 7-Dehydrocholesterol konnte in allen Frischkäsen (einschließlich Speisequark) und deren Zubereitungen in ähnlichen Gehalten quantifiziert werden. Diese betragen in etwa die Hälfte von Schnitt- bzw. Hartkäse (70 bis 180 µg/100 g), was den Trockenmasseverhältnissen berechnet aus § 6 Absatz 1 der KäseV (Quark/Frischkäse: < 27 %; Schnitt-/Hartkäse: 37 bis 44 %) entspricht. In sechs von 17 untersuchten Proben wurde Ergosterol nachgewiesen und damit 1,6-fach häufiger als in den untersuchten Schnitt- bzw. Hartkäsen (5/22). Der

Grund hierfür liegt im hohen Wassergehalt (> 73 %) von Frischkäse, der infolge dessen kontaminationsanfälliger, insbesondere gegenüber Hefen und Schimmelpilzen, ist.

Der Ergosterolgehalt einer Probe war besonders hoch (410 µg/100 g). Hierbei handelte es sich um eine Milchquarkmahlzeit, welche laut Deklaration neben Milchprodukten (Quark, Sahne) auch pflanzliche Zutaten (modifizierte Stärke, Kakao, Johannisbrotkernmehl) enthielt. Es ist anzunehmen, dass diese einen Beitrag zum Gesamt-Ergosterolgehalt leisten.

Neben den Provitaminen konnte in einer angereicherten Frischkäsezubereitung Vitamin D₃ nachgewiesen werden. Der berechnete Cholecalciferol-Gehalt lag mit 1,9 µg/100 g unterhalb der Bestimmungsgrenze (2,7 µg/100 g) und ist somit als nicht gesichert zu bewerten. Die Erhöhung gegenüber dem deklarierten Wert (1,25 µg/100 g) lässt sich damit erklären, dass bei instabilen Vitaminen eine Anreicherung um zusätzlich 50 % gegenüber der Deklaration erlaubt ist, um den angegebenen Vitamin D-Gehalt bis zum Erreichen des Mindesthaltbarkeitsdatums zu gewährleisten [98].

3.4.5.4 Schmelzkäse und -zubereitungen

Insgesamt wurden vier Schmelzkäse, zehn Schmelzkäsezubereitungen (eine mit Champignon) sowie ein Brotaufstrich untersucht. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 44 dargestellt.

Tabelle 44: Gehalte an D-Vitaminen in Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen

Erzeugnis	n	7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW
Schmelzkäse	4	80	230	120 (4)	30	330	100 (4)
Schmelzkäsezubereitung	8	60	220	100 (8)	< 11 (6)	420	300 (2)
Schmelzkäsezubereitung, Kräuter	1	-	-	90 (1)	-	-	30 (1)
Schmelzkäsezubereitung, Champignon	1	-	-	100 (1)	-	-	3.400 (1)
Brotaufstrich	1	-	-	80 (1)	< 11 (1)	-	-

BG (Ergo): 11 µg/100 g

7-Dehydrocholesterol und Ergosterol konnten in allen Schmelzkäse und -zubereitungen nachgewiesen werden. Schmelzkäse sind laut § 1 Absatz 4 Nr. 1 KäseV „Erzeugnisse, die [...] aus Käse, auch unter Zusatz anderer Milcherzeugnisse, [...], hergestellt sind.“ Davon zu differenzieren sind Schmelzkäsezubereitungen, welche „Erzeugnisse, die unter Zusatz anderer Milcherzeugnisse oder beigegebener Lebensmittel aus Käse, aus Schmelzkäse oder aus Käse und Schmelzkäse [...] hergestellt sind“ (§ 1 (4) Nr. 3 KäseV), darstellen. Diese Produktkategorie kann daher aus mehreren Zutaten bestehen und verschiedene Zusammensetzungen aufweisen. Hierbei fallen zwei Proben bezüglich ihrer vergleichsweise hohen Ergosterolgehalte auf (300 µg/100 g). Der Abgleich mit den Zutatenlisten der entsprechenden Produkte ergab, dass diese pflanzliche Bestandteile (Stärke, Paprikaextrakt) enthielten, welche möglicherweise einen Beitrag zum Gesamt-Ergosterolgehalt leisten.

Dagegen spricht zunächst, dass eine mit Kräutern versetzte Schmelzkäsezubereitung keinen erhöhten Ergosterolgehalt aufwies. Allerdings dürfen Kräuter im Gegensatz zu anderen verwendeten pflanzlichen Zutaten mittels Bestrahlung entkeimt werden (§ 1 (1) LMBestV).

In einer Schmelzkäsezubereitung mit Champignon wurde ein sehr hoher Gehalt an Ergosterol ermittelt (3.400 µg/100 g), welcher jedoch im Bereich der in Champignons ermittelten Werte lag (2.400 bis 8.200 µg/100 g).

3.4.5.5 Rahm-/Sauermilcherzeugnisse und Milchsorten

Insgesamt wurden 19 Rahm- und sechs Sauermilcherzeugnisse sowie acht Milchsorten untersucht. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 45 aufgeführt.

Tabelle 45: Gehalte an D-Vitaminen in Rahm- und Sauermilcherzeugnissen

Erzeugnis	n	7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW
Rahmerzeugnisse							
Crème Fraîche/ Double/ Saure Sahne	7	70	190	120 (7)	< 11 (4)	-	-
Kaffeesahne	4	40	60	50 (4)	< 11 (4)	-	-
Schlagsahne	8	60	140	100 (8)	< 11 (5)	-	-
Sauermilcherzeugnisse							
Joghurt	6	30	50	40 (6)	n. n.		
Milchsorten							
Milch	4	< 30 (3)	40	40 (1)	n. n.		
Kondensmilch	4	50	100	70 (4)	< 11 (4)	-	-

n. n. nicht nachgewiesen

NWG (7-DHC): 30 µg/100 g; BG (Ergo): 11 µg/100 g

7-Dehydrocholesterol konnte in allen und Ergosterol in 17 von 33 Proben nachgewiesen werden. Die geringsten Gehalte an 7-DHC wurden in Milch (Fettgehalt: 3,5-3,8 %) und Joghurt (Fettgehalt: 3,5-10 %) ermittelt. Kaffeesahne (Fettgehalt: 10-15 %) und Kondensmilch (Fettgehalt: 7,5-15 %) wiesen geringere 7-DHC-Mengen auf, als die fettreichere Schlagsahne (Fettgehalt: 30 %). Diese Ergebnisse bestätigen, dass unpolare Sterole vor allem in unpolarem Milieu vorkommen.

In der Literatur angegebene Referenzwerte für Vitamin D₃ und 25-Hydroxycholecalciferol (Siehe 2.2.4; Seite 12; Tabelle 7) liegen deutlich unterhalb der Nachweisgrenzen der angewandten Methode (NWG (D₃): 0,9 µg/100 g; NWG (25OHD₃): 0,5 µg/100 g).

3.4.6 Streichfette

Insgesamt wurden 27 Streichfette untersucht. Darunter waren 17 tierischen und neun pflanzlichen Ursprungs. Bei einer Probe handelte es sich um ein gemischtes Produkt. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 46 zusammengestellt.

Tabelle 46: Gehalte an D-Vitaminen in Streichfetten

Fett	n	D ₃ [µg/100 g]			7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW	min.	max.	MW
Butter	14	n. n.			130	390	270 (15)	< 20 (7)	35	26 (4)
Butterschmalz	1	n. n.			-	-	100 (1)		n. n.	
Mischstreichfett	3	n. n.			100	250	200 (3)	-	-	163 (1)
Margarine (ohne Zusatz)	3	n. n.					n. n.	190	470	300 (3)
Margarine (mit 2,5 µg/100 g*)	1	-	-	4,2 (1)			n. n.	-	-	400 (1)
Margarine (mit 7,5 µg/100 g*)	5	7,1	9,5	8,5 (5)			n. n.	44	460	300 (5)

*laut Deklaration

n. n. nicht nachgewiesen

BG (Ergo): 20 µg/100 g

7-Dehydrocholesterol wurde in allen tierischen und Ergosterol in allen pflanzlichen Streichfetten mit jeweils ähnlichen Gehalten quantifiziert. In Butter (Fettgehalt: ca. 82 %) konnte neben dem höchsten 7-DHC-Gehalt (270 µg/100 g) als einziges tierisches Produkt auch Ergosterol ermittelt werden. Es liegen keine Vergleichsdaten aus der Literatur für die Provitamine in Butter vor.

Das untersuchte Butterschmalz (Butterreinfett) zeigte trotz des gegenüber Butter erhöhten Fettgehaltes (100 %) einen geringeren 7-DHC-Wert (100 µg/100 g). Es ist anzunehmen, dass dieses im Rahmen der Herstellung zusammen mit anderen Komponenten (Eiweiße) abgetrennt wurde. Bei Milchstreichfetten handelt es sich um Erzeugnisse aus pflanzlichen und/ oder tierischen Fetten. Laut Artikel 115 der VO (EG) 1234/2007 in Verbindung mit Abschnitt I Nr. 2 des Anhangs XV dieser Verordnung und Teil C Nr. 4 der Anlage zu XV darf der Milchfettanteil bei Mischfetten zwischen 10 und 80 % des Gesamtfettes betragen. Der gemittelte 7-DHC-Gehalt lag bei 200 µg/100 g und damit im erwarteten Bereich. Bei einem Produkt handelte es sich um Milchstreichfett mit Rapsöl. In diesem wurde unter anderem Ergosterol bestimmt.

In der Kategorie „pflanzliche Fette“ wurden ausschließlich Margarineproben untersucht. Diese Produktklasse wird häufig mit Vitamin D angereichert. Wie Tabelle 46 zu entnehmen, sind fünf der neun untersuchten Margarineproben mit Vitamin D₃ versetzt. Die ermittelten Cholecalciferolgehalte liegen fast ausschließlich über den deklarierten Vitamin D-Gehalten. In der Bekanntmachung vom 11.11.2004 „Streichfetten mit Zusatz von Vitamin D. Zu Nr. 2004-041-00“ ist festgelegt, dass der Gehalt an Vitamin D 7,5 µg/100 g des Erzeugnisses nicht überschreiten darf. Unter Berücksichtigung der gestatteten Anreicherung von maximal 50 % des angegebenen Wertes als Ausgleich von

Lagerungsverlusten [98], weist nur noch das mit 2,5 µg/100 g deklarierte Produkt einen leicht erhöhten Vitamin D₃-Gehalt (4 µg/100 g) auf.

3.4.7 Back-, Teig- und Süßwaren

Laut der Nationalen Verzehrsstudie II (2008) werden Back- und Süßwaren als Vitamin D-liefernde Lebensmittelgruppen angesehen [1]. Der Kategorie „Backwaren“ wurden im Rahmen der Studie sowohl Back- (Kuchen, Kekse) als auch Getreideerzeugnisse (z.B. Teigwaren) zugeordnet. Es ist anzunehmen, dass diese Produkte aufgrund ihrer Zutaten, wie Sahne (Torten), Käse (Käsestangen), Wurstwaren (gefüllte Blätterteigtaschen) oder Ei (Kuchen, Gebäck ect.) als Vitamin D-Lieferanten gelten. In den meisten dieser untersuchten Bestandteile konnte, mit Ausnahme von Eigelb, kein Vitamin D nachgewiesen werden. Folglich wurden hauptsächlich Lebensmittel mit einem hohen Eianteil in die Probenauswahl „Backwaren“ aufgenommen.

Insgesamt wurden vier Backwaren (Eierplätzchen), sieben Teigwaren (Eiernudeln, -spätzle), zwei Süßwaren (Pudding) und zwei Mehlproben auf ihren Vitamin D-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 zusammengefasst.

Tabelle 47: Gehalte an D-Vitaminen in Back-, Teig-, Süßwaren und Eierlikör

Produkt	n	7-DHC [µg/100 g]			Ergo [µg/100 g]		
		min.	max.	MW	min.	max.	MW
Backwaren	4	30	60	40 (4)	< 20 (3)	30	30 (4)
Teigwaren	7	50	60	50 (5)	< 20 (2)	40	30 (4)
Süßwaren	2	60	70	60 (2)	-	-	50 (1)
Mehl	2		n. n.				n. n.

n. n. nicht nachgewiesen

BG (Ergo): 20 µg/100 g

Cholecalciferol konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Der Grund hierfür liegt im geringen Vollei-Anteil der Produkte (20 %, bestehend aus ca. 30 % Eigelb [4 µg D₃/100 g; vgl. 3.4.2]). Derart geringe Gehalte (0,2 µg/100 g) lassen sich mit der vorliegenden Methode (BG (D₃): 1,0 µg/100 g) nicht quantifizieren.

7-Dehydrocholesterol wurde in allen Back-, Süß- und zum Teil auch in Teigwaren (5/7) mit ähnlichen Gehalten bestimmt. Ergosterol konnte in neun von 15 Proben quantifiziert werden. Das von Hefen und Pilzen synthetisierte Provitamin könnte, wie bereits erwähnt, über die pflanzlichen Inhaltsstoffe oder produktionsbedingt eingebracht worden sein. Untersuchte Mehlproben enthielten keine D-Vitamine.

3.4.8 Zusammenfassung der Vitamin D-Zufuhr in Deutschland

Die Nationale Verzehrsstudie II beinhaltet aktuelle und repräsentative Daten zum Lebensmittelverzehr und zum Ernährungsverhalten der deutschen Bevölkerung. Deren Berechnungsgrundlage stellt der Bundeslebensmittelschlüssel (BLS) dar, welcher national zusammengestellte Nährwertangaben über verschiedenste Lebensmittel unter Berücksichtigung von wissenschaftlicher Literatur und internationalen Nährstoffdatenbanken beinhaltet [1, 156]. In Abbildung 26 sind die Hauptquellen für Vitamin D in Deutschland laut NVS II (2008) und der im Rahmen der Arbeit ermittelten Daten (Projektdaten) gegenübergestellt.

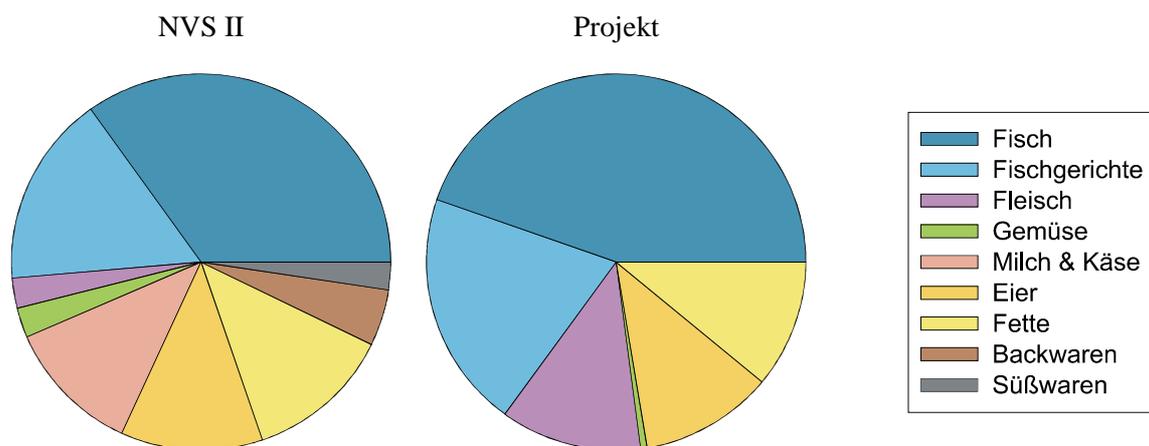


Abbildung 26: Hauptquellen für Vitamin D in Deutschland [%]

Die Abbildung zeigt, dass Fisch bzw. Fischgerichte, gefolgt von Fetten und Eiern, entsprechend der NVS II- bzw. der Projektdaten, die Hauptlieferanten für Vitamin D darstellen. Hierbei stammen gemäß der Projektdaten 65 % des Vitamin D aus Fisch- und Fischgerichten, während es laut NVS II ca. 52 % sind. Der Anteil von Eiern und Fetten an der Vitamin D Zufuhr liegt bei beiden Datensätzen im gleichen Bereich (ca. 11-12 %). Die Kategorie „Fett“ enthält sowohl die pflanzlichen als auch die tierischen Fette. Bei der Berechnung der Projektdaten wurden die angereicherten Margarine-Proben mit 50 % berücksichtigt.

Fleisch hat entsprechend der Projektdaten einen deutlich höheren Einfluss auf die Vitamin D-Gesamtversorgung als in der NVS II (ca. 2 %) angegeben. Obwohl in den untersuchten Fleischproben und Innereien nur sehr geringe Vitamin D-Mengen nachgewiesen werden konnten, tragen diese aufgrund der hohen Verzehrsmenge wesentlich zur Versorgung bei (ca. 12 %). 2011 wurden 89,2 kg Fleisch pro Kopf in Deutschland verzehrt [93]. Bei Fisch waren es hingegen nur 15,8 kg [62].

Den Projektdaten zufolge haben Milch- bzw. Milchprodukte, Back- und Süßwaren praktisch keine Bedeutung für die tägliche Vitamin D-Zufuhr. Bei der Berechnung des Milch- und Milchprodukte-Anteils blieben angereicherte Lebensmittel (Frischkäsezubereitung; vgl. 3.4.5.3; Seite 73; Tabelle 43) unberücksichtigt, so dass ungeachtet des hohen Verzehrs an Milch (2011: 53,6 kg/Kopf), Milcherzeugnissen (2011: 85,4 kg/Kopf) und Käse (2011: 23,0 kg/Kopf) mit den vorliegenden Daten keine Beteiligung am Gesamt-Vitamin D-Verzehr berechnet werden konnte [93-95]. Unter

Verwendung der aus der Literatur bekannten Werte ergibt sich für die Lebensmittelklasse Milch und Käse ein Anteil von ca. 25 %, was in etwa der doppelten Menge der von der NVS II angegebenen Daten entspricht. Der Einfluss von Gemüse an der Vitamin D-Gesamtzufuhr ist laut der Projektdaten deutlich geringer als von der NVS II angenommen. Bei der Berechnung wurden ausschließlich die ermittelten Gehalte der untersuchten Champignons verwendet, obwohl diese die geringsten Vitamin D₂-Gehalte aufwiesen (vgl. Kapitel 3.4.3; Seite 66). Grund hierfür war, dass Champignons den Hauptanteil der verzehrten Speisepilze in der deutschen Bevölkerung darstellen (2011: 1,7 kg Pilz/Kopf, davon 1,5 kg Champignon [87]).

Laut den Projektdaten beträgt die mittlere Vitamin D-Zufuhr bei Männern 2,5 µg/Tag und bei Frauen 1,9 µg/Tag. Dieses Resultat deckt sich weitestgehend mit den Ergebnissen der NVS II-Studie (2008), welche für Männer eine Zufuhr von 2,9 µg/Tag und für Frauen von 2,2 µg/Tag angibt (Median).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Vitamin D₂ und D₃ in nennenswerten Mengen nur in wenigen Lebensmitteln vorkommen. Die Vorläuferstrukturen sind hingegen recht häufig, insbesondere in fettreichen Produkten, zu finden. Hierbei ist der Gehalt an Ergosterol auf die Anwesenheit von Pilzen zurückzuführen. Fisch bzw. Fischgerichte stellen die Hauptvitamin D-Quellen dar (bis zu 65 %; Projektdaten). Weitere wichtige Vitamin D-Lieferanten sind Eier und Fette, wobei der Fettanteil bei der Vitamin D-Versorgung sich aus angereicherten Produkten ergibt. In Fleisch und Milch bzw. deren Erzeugnissen sind relativ geringe Mengen an Vitamin D enthalten. Deren Bedeutung für die tägliche Vitamin D-Zufuhr ist auf die hohe Verzehrsmenge zurückzuführen. Die Relevanz von Vitamin D-Mengen, die über andere Lebensmittel unter Berücksichtigung der momentanen Ernährungsgewohnheiten der deutschen Bevölkerung aufgenommen werden, ist ernährungsphysiologisch als untergeordnet anzusehen. Insgesamt beträgt die mittlere Vitamin D-Aufnahme bei Männern 2,5 µg/Tag und bei Frauen 1,9 µg/Tag. Diese Zufuhr liegt deutlich unterhalb der von der DGE empfohlenen Menge von 20 µg/Tag (bei fehlender endogener Synthese) [2]. Generell ist die Vitamin D-Versorgung über die Ernährung mit den üblichen aus dem Handel stammenden Lebensmitteln nicht geeignet, um eine adäquate Versorgung der deutschen Bevölkerung mit Vitamin D sicherzustellen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Chemikalien und Materialien

4.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Hersteller	CAS-Nr.
Ameisensäure	99 %	Roth	64-18-6
Ammoniak	ca. 25 %	Grüssing GmbH	1336-21-6
Ammoniumchlorid	99 %	VEB Jenapharm	12125-02-9
Citronensäure	99 %	Grüssing GmbH	77-92-9
Ethanol	≥ 99.9%	Roth	65-17-5
Ethylacetat	99,9 %	Sigma Aldrich	141-78-6
Hexan	≥ 95 %	VWR	110-54-3
Isopropanol	99.9% (HPLC)	Fluka	67-63-0
Kaliumhydroxid	85 %	Grüssing GmbH	1310-58-3
Methanol	≥ 99.9% (HPLC)	Sigma Aldrich	67-56-1
Natriumascorbat	≥ 99 %	Grüssing GmbH	134-03-2
n-Hexan	≥ 99 %	Roth	110-54-3
Natriumsulfid (Nonahydrat)	≥ 98 %	Sigma Aldrich	1313-84-4
4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD)	97 %	Sigma Aldrich	4233-33-4

Standard	Reinheit	Hersteller	CAS-Nr.
7-Dehydrocholesterol	≥ 98 %	Sigma Aldrich	434-16-2
7-Dehydrocholesterol- (25,26,26,26,27,27,27-d ₇)	98 %	Sigma Aldrich	388622-58-0
Ergosterol	≥ 95 %	Sigma Aldrich	57-87-4
Cholecalciferol	≥ 98 % (HPLC)	Sigma Aldrich	67-97-0
Cholecalciferol 6,19,19-d ₃	97 %	Sigma Aldrich	MFCD11656127 ¹
Ergocalciferol	≥ 98 %	Sigma Aldrich	50-14-6
Ergocalciferol 6,19,19-d ₃	97 %	Sigma Aldrich	1217448-46-8
25-Hydroxyvitamin D ₃	≥ 98 % (HPLC)	Sigma Aldrich	19356-17-3
1α, 25-Dihydroxyvitamin D ₃	≥ 97 % (HPLC)	Sigma Aldrich	32222-06-3
1α, 25-Dihydroxyvitamin D ₃ 6,19,19-d ₃	≥ 97 %	Sigma Aldrich	128723-16-0
(24R)-24,25-Dihydroxyvitamin D ₃	≥ 99 % (HPLC)	Sigma Aldrich	55721-11-4
25-Hydroxyvitamin D ₂	≥ 98 % (HPLC)	Sigma Aldrich	21343-40-8
25-Hydroxyvitamin D ₃ 6,19,19-d ₃	≥ 97 %	Sigma Aldrich	MFCD11656128*
1α, 25-Dihydroxyvitamin D ₂	≥ 99 % (HPLC)	Sigma Aldrich	60133-18-8

*MDL-Nummer

Soweit nicht anders angegeben, ist das verwendete Wasser von bidestillierter Qualität.

4.1.2 Lösungen

Standard-Lösungen

Zur Herstellung der Standard-Lösungen wurden die jeweiligen Substanzen, wie in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt, eingewogen, in Methanol gelöst und entsprechend verdünnt. Eine Ausnahme bildeten 7-DHC und Ergosterol. Diese wurden zunächst in Ethylacetat gelöst, von dieser Lösung ein Aliquot abgenommen, das Lösungsmittel bei 25 °C unter Argon-Strom verdampft, der Rückstand anschließend in Methanol aufgenommen und entsprechend der Tabelle gelöst.

Die Konzentrationsbestimmung der Standardlösungen erfolgte teilweise photometrisch, indem die Extinktion (E) der unbekanntes Lösungen bei 265 nm (D_{23}) bzw. 282 nm (7-DHC, Ergosterol) in Ethanol ermittelt wurde. Nach Umstellung des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte die Konzentration der Lösung nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$c_{VD} [mg/l] = \frac{E_{265/282} \times M \times 1.000}{\epsilon \times d}$$

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient
 M = molare Masse
 d = Schichtdicke der Küvette

Dieses Verfahren wurde für Cholecalciferol ($\epsilon = 18.460$), Ergocalciferol ($\epsilon = 18.840$) [88], 7-Dehydrocholesterol ($\epsilon = 11.300$ [157]) und Ergosterol ($\epsilon = 11.900$ [47]) angewendet. Bei allen anderen Analyten erfolgte die Konzentrationsbestimmung aufgrund der geringen verfügbaren Analytmengen (ca. 1 mg) gravimetrisch über Differenzwägung.

Misch-STD I	Verdünnung	End-Konzentration [mg/l]
7-DHC	20 mg/ 100 ml// 208 µl/ 25 ml	1,7
Ergosterol	20 mg/ 100 ml// 208 µl/ 25 ml	1,7
Cholecalciferol	20 mg/ 100 ml// 104 µl/ 25 ml	0,8
Ergocalciferol	20 mg/ 100 ml// 104 µl/ 25 ml	0,8
25(OH) D_3	1 mg/ 1000 µl// 100 µl/ 500 µl// 104 µl/ 25 ml	0,8
25(OH) D_2	1 mg/ 500 µl// 50 µl/ 500 µl// 104 µl/ 25 ml	0,8
1,25(OH) $_2D_3$	1 mg/ 500 µl// 50 µl/ 500 µl// 104 µl/ 25 ml	0,8
1,25(OH) $_2D_2$	1 mg/ 500 µl// 50 µl/ 500 µl// 104 µl/ 25 ml	0,8
(24R)-24,25(OH) $_2D_3$	1 mg/ 500 µl// 50 µl/ 500 µl// 104 µl/ 25 ml	0,8

Misch-STD II	Verdünnung	End-Konzentration [mg/l]
D_3d_3	1 mg/ 1000 µl// 100 µl/ 500 µl// 416 µl/ 20 ml	4,1
D_2d_3	1 mg/ 1000 µl// 100 µl/ 500 µl// 416 µl/ 20 ml	4,1
25(OH) D_3d_3	1 mg/ 500 µl// 50 µl/ 500 µl// 416 µl/ 20 ml	4,1
1,25(OH) $_2D_3d_3$	1 mg/ 500 µl// 50 µl/ 500 µl// 416 µl/ 20 ml	4,1
7-Dehydrocholesterol- (25,26,26,26,27,27,27-d7)	5 mg/1 ml// 20 µl/ 500 µl// 832 µl/ 20 ml	8,2

Sonstige Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Lösung I	Methanolische Kaliumhydroxyd-Lösung: 420 g KOH/1,5 l (MeOH:H ₂ O 9:1); 2,4 l H ₂ O; 5,1 l MeOH
Natriumsulfid-Lsg. (1,6 M)	123,1 g/l H ₂ O
Lösung II	Zitronensäurehaltiger Ammoniumchlorid-Puffer: 259,2 g NH ₄ Cl; 1,68 l NH ₃ ; 3,12 l H ₂ O; 1,2 l Zitronensäure-Lsg. (2,5 M): 567 g/1,2 l H ₂ O
Zitronensäure-Lsg. (1 M)	192 g/l H ₂ O

4.1.3 Geräte

HPLC-DAD

Gerät	Hersteller
Detektor	Jasco MD-2015 Plus Multiwavelength Detector
Pumpe	Jasco PU-2080 Plus Intelligent HPLC-Pump
Eluentenmischkammer	Jasco LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit
Entgaser	Jasco DG-2080-54 4-Line Degasser
Injektor	Jasco AS-2055 Plus Intelligent Sampler
AD-Wandler	Jasco LC-Net II/ADC
Säule	KNAUER Eurospher II 100-3 C18-Säule (100x2 mm) mit Vorsäule

LC-MS/MS

(LC-MS/MS system 4000 Q Trap Applied Biosystems MDS Sciex)

Gerät	Hersteller
Detektor	Jasco MD-2015 plus Multiwavelength Detector
Pumpe	Jasco PU-2080 Plus Intelligent HPLC-Pump
Eluentenmischkammer	Jasco LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit
Entgaser	Jasco DG-2080-54 4-Line Degasser
Injektor	Jasco AS-2057 Plus Intelligent Sampler
AD-Wandler	Jasco LC-Net II/ADC

4.1.4 Sonstige Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Satorius TE 1502 S
Argon-Abdampfstation	-
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf
Faltenfilter	Whatman (597,5; Flächengewicht 85 g/m ²)

Gerät	Hersteller
Gefriertrocknungsanlage	VirTis, Benchtop K
Laborzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 R
pH-Meter	Typ CG 837, Schott Geräte
Reinstwasseranlage	Siemens ultra clear
SPE-Säulen, RP	Strata-SDB-L Styrene Divinylbenzene Polymer(200 mg/ 3 ml); Phenomenex
SPE-Säulen, NP	Strata SI-1 Silica (500 mg/ 3 ml); Phenomenex
Spektrophotometer	UV/VIS Spectrophotometer V-530, Jasco
Trockenschrank	Loading Modell 100-800, Memmert

4.1.5 Probenmaterial

Insgesamt wurden ca. 650 Proben hauptsächlich aus dem hallischen Lebensmitteleinzelhandel im Zeitraum von Dezember 2012 bis April 2013 erworben. In Abbildung 27 ist die Zusammensetzung des Probenmaterials aufgeschlüsselt nach Lebensmittelgruppen dargestellt.

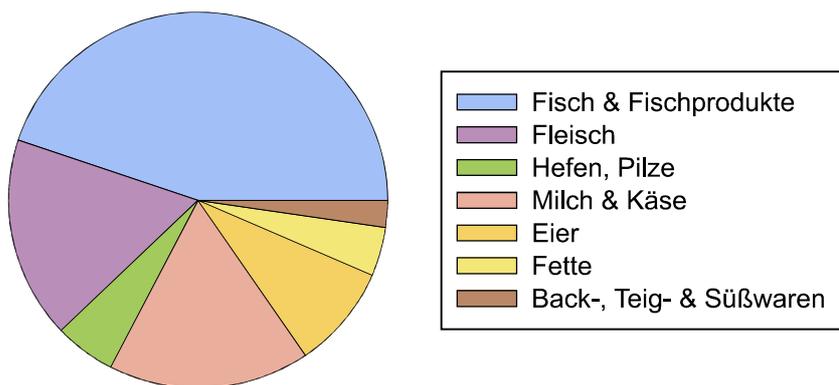


Abbildung 27: Zusammensetzung Probenmaterial [%]

4.2 Methoden

4.2.1 Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS

4.2.1.1 Probenvorbereitung

Im Rahmen der Probenvorbereitung wurde von jeder Probe ein repräsentativer Teil in 0,3 x 0,3 cm große Würfel zerkleinert, gründlich vermengt und bis zur Analyse bei -30 °C eingefroren. Flüssigkeiten wurden nach der Homogenisierung direkt aufgearbeitet.

4.2.1.2 Probenaufarbeitung

Die Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen und Misch-Standards sind in 4.1.2 aufgeführt.

Verseifung

In Abhängigkeit vom Fettgehalt wurden 2-10 g der frischen oder tiefgekühlten Probe mit 1 g Natriumascorbat in ein druckresistentes 250 ml-Laborglas eingewogen und mit methanolischer Kaliumhydroxydlösung (Lösung 1) auf 150 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 133 µl des deuterierten internen Mischstandards (Misch-Standard II) und 2 ml 0,5 M Natriumsulfid-Lösung wurde der Reaktionsansatz mit Stickstoff überschichtet, fest verschlossen, gut durchmischt und im Trockenschrank je nach Fettgehalt der Matrix für 3 ½-5 h bei 70 °C über Nacht hydrolysiert. Zu der vollständig aufgeschlossenen und verseiften Probelösung folgte nach Abkühlen die Zugabe von 50 ml eines zitronensäurehaltigen Ammoniumchlorid-Puffers (Lösung II) sowie 3-4 ml einer 1 M Zitronensäurelösung zur Einstellung des pH-Wertes, welcher zwischen 10 und 11 liegen sollte. Anschließend wurden die Lösungen mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt, gut durchmischt und mittels Faltenfilter filtriert.

SPE (RP-Phase, Strata-SDB-L, Phenomenex)

Zur Vorbereitung der SDBL-Kartuschen wurden diese zunächst mit 2 x 3 ml Elutionsmittel gespült um mögliche vom Sorbens stammende Verunreinigungen im Probenextrakt zu vermeiden. Anschließend folgte die Konditionierung mit 2 x 3 ml Methanol und 2 x 3 ml Wasser. Auf die vorbereiteten Säulen wurden 50 ml des Filtrats aufgegeben. Zur Aufreinigung der Analyten folgte das Waschen des Sorbens mit 12 ml + 3 ml Methanol/Wasser (Waschphase I; [10:90; v/v]) und je nach Farbintensität der Proben 2 bis 4 x 3 ml Methanol/Wasser (Waschphase II; [70:30; v/v]). Die Elution erfolgte mit 2 x 3 ml 70 % Ethylacetat/Isopropanol (70:30 [v/v]) von den zuvor unter Stickstoffstrom getrockneten Säulen. Das Eluat wurde bei 36 °C unter Argon-Strom getrocknet.

SPE (NP-Phase, Strata SI-1 Silica, Phenomenex)

Der getrocknete Extrakt wurde in 1 ml Isopropanol/n-Hexan (0,5:99,5; v/v) gelöst, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und anschließend zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde bei der NP-SPE eingesetzt.

Die Vorkonditionierung der SI-1 Silica-Kartuschen erfolgte mit 4 x 1,5 ml Elutionsmittel, 4 x 1,5 ml Hexan und 4 x 1,5 ml Isopropanol/n-Hexan (0,5:99,5 [v/v]), bevor 800 µl Probelösung aufgegeben wurden. Zum Waschen der Säulen wurden die bereits zur Konditionierung eingesetzten Lösungsmittel bzw. -gemische eingesetzt. Anschließend erfolgte die Elution mit 3 ml Isopropanol/n-Hexan (35:65 [v/v]). Der resultierende Extrakt wurde unter Argon-Strom getrocknet.

Clean-up

Der erhaltene Rückstand wurde in 267 µl Methanol aufgenommen, gelöst bzw. homogenisiert (Vortex, ggf. Ultraschallbad) und zentrifugiert. Zur Aufreinigung der Probe wurden von der klaren Lösung 200 µl abgenommen, mit 18 % Wasser (35,2 µl) versetzt und homogenisiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden von der oberen Phase 150 µl abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Laufmittel B des chromatographischen Systems versetzt. Nachdem die Lösung für mind. eine Stunde

tiefgekühlt und der ausgefallene Niederschlag abgetrennt wurde, folgte die Vermessung des klaren Überstandes am LC-MS/MS. Die entsprechenden HPLC und MS-Parameter sind in 3.1.1 (Seite 29 f.), Tabelle 13 und 3.1.2 (Seite 30 f.), Tabelle 14, Tabelle 15 sowie Tabelle 16 zu finden.

4.2.2 Quantifizierung

Eine matrixangepasste Kalibrierung mit deuterierten internem Standard diente der Quantifizierung. Zur Aufnahme der Kalibrierungen wurden verschiedene repräsentative Proben mit unterschiedlichen Gehalten an D-Vitaminen versetzt und gemäß der vorliegenden Methode (3.1.8; Seite 41) aufgearbeitet. Die Kalibrierung erfolgte je nach Analyt im Konzentrationsbereich von 20 µg/l bis 2 mg/l, wobei die deuterierten Referenzsubstanzen (Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃); Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂); 25-Hydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃); 1α, 25-Dihydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃)) als interne Standards dienten. Zur Auswertung wurden die Peakflächenverhältnisse (Analyt/Interner Standard) linear gegen die Konzentration aufgetragen. Insgesamt kamen vier deuterierte Strukturen, vor allem aus der D₃-Reihe zum Einsatz. Da nicht für jeden Analyten (Vitamin D₂-Reihe, Provitamine) die deuterierte Referenzsubstanz zur Verfügung stand, wurden die deuterierten Standards entsprechend nach struktureller Ähnlichkeit und Retentionszeit für die Auswertung dieser Strukturen verwendet (Tabelle 48).

Tabelle 48: D-Vitamine mit den entsprechend verwendeten internen Standards

Analyt	ISTD
D ₃	Vitamin D ₃ -d ₃ (6, 19, 19-D ₃)
D ₂	Vitamin D ₂ -d ₃ (6, 19, 19-D ₂)
(24 <i>R</i>)-24,25(OH) ₂ D ₃	1α, 25-Dihydroxy-vitamin D ₃ -d ₃ (6, 19, 19-D ₃)
25(OH)D ₃	25-Hydroxyvitamin D ₃ -d ₃ (6, 19, 19-D ₃)
25(OH)D ₂	25-Hydroxyvitamin D ₃ -d ₃ (6, 19, 19-D ₃)
1α,25(OH) ₂ D ₃	1α, 25-Dihydroxy-vitamin D ₃ -d ₃ (6, 19, 19-D ₃)
1α,25(OH) ₂ D ₂	1α, 25-Dihydroxy-vitamin D ₃ -d ₃ (6, 19, 19-D ₃)
Ergosterol	Vitamin D ₂ -d ₃ (6, 19, 19-D ₂)
7-DHC	Vitamin D ₃ -d ₃ (6, 19, 19-D ₃)

Durch den Einsatz von deuterierten Standards kann die Qualität der Aufarbeitung sowie der Messung verbessert und matrixbedingte Abweichungen kompensiert werden. Zusätzlich wurde eine „externe Qualitätskontrolle“ durchgeführt, um die Variabilität der Probenaufarbeitung zu überwachen. Dafür wurde eine große Menge Wildlachs gleicher Charge homogenisiert und eingefroren. Diese „Kontrollprobe“ wurde bei jeder Aufarbeitung mitgeführt.

4.2.3 Validierung der LC-MS/MS-Methode

Es wurden die Lager- und Messstabilität, Selektivität, Spezifität, Arbeitsbereich, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Präzision (Wiederhol- und Labor-, Messunsicherheit) und die Richtigkeit für die einzelnen Analyten in verschiedenen repräsentativen Matrices (Wildlachs, Zuchtlachs) bestimmt. Zur Ermittlung der Validierungsdaten wurden die entsprechenden Matrices vor der Aufarbeitung nach 3.1.8 (Seite 41) mit Misch-Standard I (4.1.2; Seite 81) aufdotiert. Weitere Hinweise zur Durchführung sind im jeweiligen Kapitel im Abschnitt „Ergebnis und Diskussion“ aufgeführt.

4.2.4 Identifizierung von Vitamin D mittels Derivatisierung nach Fraktionierung

Zur Identifizierung einzelner D-Vitamere im Bereich unterhalb der Nachweisgrenzen wurde eine analytische HPLC mit Diodenarray-Detektor (DAD) in Kombination mit einem Fraktionssammler eingesetzt. In Tabelle 13 (Seite 29) sind die LC-Bedingungen aufgeführt.

Die einzelnen Fraktionen wurden nach Abdampfen unter Argon mit 150 µl PTAD-Lösung (1,5 mg/ml ACN) 2 h im Dunkeln derivatisiert und anschließend direkt am LC-MS/MS vermessen. Im Anhang 10.2.3 (Seite 113) sind die verwendeten MS/MS-Übergänge der derivatisierten D-Vitamere aufgeführt.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine effiziente leicht zu handhabende Screening-Methode zum Nachweis und zur Bestimmung von Vitamin D und dessen Metaboliten in verschiedenen Lebensmitteln entwickelt, validiert (hausintern) und angewendet. Die Untersuchung von etwa 650 Realproben belegte die Eignung des optimierten Verfahrens für die Routineanalytik.

Die Lebensmittelproben wurden nach Zugabe von isotopenmarkierten Standards (Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂), 25-Hydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃)) zunächst methanolisch hydrolysiert und mittels kombinierter Festphasenextraktion (Normal- und Reversed-Phase) aufgereinigt und aufkonzentriert. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS/MS im scheduled Multiple Reaction Monitoring-Modus (ESI, positiv). Die optimierte Methode ermöglichte es Ergosterol, 7-Dehydrocholesterol, Cholecalciferol, Ergocalciferol, 25-Hydroxycholecalciferol, 25-Hydroxyergocalciferol, 1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol, 1 α ,25-Dihydroxyergocalciferol sowie (24R)-24,25-Dihydroxycholecalciferol simultan in verschiedenen Lebensmitteln nachzuweisen.

Daneben konnte das modifizierte Verfahren zur Vitamin D-Analytik in Blutserum eingesetzt werden.

Methodenentwicklung

Die Herausforderung der Vitamin D-Analytik besteht zum einem in der anspruchsvollen Matrix Fett, in der die Zielstrukturen im Spurenbereich vorliegen und zum anderen in strukturähnlichen Begleitstoffen, welche die Bestimmung beeinflussen. Diese Interferenzen mussten durch sorgfältige Probenvorbereitung und instrumentelle Maßnahmen beseitigt bzw. kompensiert werden. Folgende Ansätze wurden der Entwicklung der Methode zugrunde gelegt:

1. Methanolische Verseifung
2. Aufreinigung/Anreicherung mittels Festphasen-Extraktion (SPE)
3. Identifizierung/Quantifizierung mittels LC-MS/MS

Die Probenaufarbeitung orientierte sich an bereits etablierten Methoden. Zur Optimierung der Verseifung wurden verschiedene Parameter (Art der Verseifung [kalt/heiß], Temperatur, Zeit, pH-Wert etc.) untersucht. Um einen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten, wurde die optimierte Verseifung im Trockenschrank über Nacht durchgeführt, die Chemikalien dem Probenansatz als Gesamtlösung (Lösung 1 und 2) zugegeben und der pH-Wert über einen zitronensäurehaltigen Ammoniumchlorid-Puffer eingestellt. Die Festphasenextraktion wurde hinsichtlich des Säulenmaterials, der Konditionierungs-, Wasch- und Elutionsbedingungen (Lösungsmittel, Volumen, pH-Wert) optimiert. Die finale Methode beinhaltete eine kombinierte Festphasenextraktion (SPE), beginnend mit einer Reversed-Phasen-(RP)-SPE (Strata-SDB-L) und anschließender Normal-Phasen-(NP)-SPE (Strata SI-1 Silica).

Die chromatographische Trennmethode wurde mittels kommerziell erhältlicher Standards zunächst an einer HPLC mit UV/VIS Detektion ($\lambda = 265 \text{ nm}$) entwickelt. Um eine schnelle und einfache Analytik zu etablieren, wurden unterschiedliche Trennparameter wie der Einfluss des Laufmittelsystems (Fließmittelzusammensetzung, Fließmitteladditive, isokratisch/Gradientenelution; Flussrate) sowie der Säule (Säulendurchmesser, Säulentemperatur) untersucht und anschließend auf die gekoppelte Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) übertragen. Für die massenspektrometrische Detektion der einzelnen Analyten wurden die substanzspezifischen Massenübergänge sowie die dazugehörigen Geräteparameter ermittelt und optimiert. Um die Empfindlichkeit des Verfahrens zu steigern, wurde der Einsatz von verschiedenen Additiven zum Laufmittel (Ammoniumformiat, Natriumacetat, Lithiumacetat, Methylamin, THF), einer Spülmethode und eines Derivatisierungsschritts mit PTAD überprüft. Allein der Einsatz eines Spülschrittes nach jeder Messung sowie der Zusatz von Ameisensäure führten zu einem deutlichen Intensitätsgewinn. Auf einen Derivatisierungsschritt wurde aufgrund der Diskriminierung einzelner Strukturen bei direkter Derivatisierung aus der Probelösung verzichtet.

Matrixeffekte

Bei der Messung aufdotierter Lebensmittel zeigte sich, dass die Ionisierung der Analyten starken Matrixeinflüssen unterliegt, welche sowohl zu Suppressions- als auch zu Promotionseffekten führten. Um die Matrixeffekte und Aufarbeitungsverluste zu kompensieren, erfolgte die Quantifizierung mittels matrixangepasster Kalibrierung mit deuterierten internen Standards (Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂), 25-Hydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃)).

Validierung

Für das optimierte Verfahren wurde eine hausinterne Validierung mittels deuterierter Standards (Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂), 25-Hydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃), 7-Dehydrocholesterol-d₇ (25,26,26,26,27,27,27-d₇)) bezüglich Selektivität, Spezifität, Arbeitsbereich, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Präzision (Wiederhol- und Labor-, Messunsicherheit) für die einzelnen Analyten in verschiedenen repräsentativen Matrices (Wildlachs, Zuchtlachs) durchgeführt. Die Überprüfung der Richtigkeit des Verfahrens erfolgte für Vitamin D₃ durch die Teilnahme an einem zertifizierten Ringversuch (RVEP 13347 Milchpulver Vitamin D) des Deutschen Referenzbüros für Lebensmittel-Ringversuche und Referenzmaterialien (DRRR). Um die Richtigkeit auch für die restlichen D-Vitamere zu bestätigen, wurde die Validierungsmatrix vor der Aufarbeitung mit den verschiedenen Zielanalyten aufdotiert und die Richtigkeit über die Wiederfindungsrate bestimmt.

Die zu Beginn der Validierung festgelegten Leistungsanforderungen wurden für die meisten Analyten weitestgehend erfüllt. Die Linearität war für alle D-Vitamere im gesamten Arbeitsbereich (25,2-1.940 $\mu\text{g/l}$) gewährleistet. Die hohe Selektivität und Spezifität der Methode waren durch die

Verwendung von drei Massenübergängen (ein Quantifier, zwei Qualifier) sowie die entsprechenden Retentionszeiten als gegeben anzusehen. Die ermittelten Wiederfindungen lagen für den Großteil der Analyten, mit Ausnahme von 7-Dehydrocholesterol (d₃) (160-185 %) in einem Bereich von 90 bis 120 %, wobei die großen Abweichungen bei 7-Dehydrocholesterol (d₃) vor allem auf die hohen Gehalte der Validierungsmatrix zurückzuführen waren. Die Präzisionsdaten befanden sich in einem angemessenen Bereich. Die ermittelten Nachweisgrenzen lagen oberhalb der Zielvorgaben und waren nicht geeignet um kleinste Vitamin D-Mengen in Lebensmitteln zu erfassen. Dies galt insbesondere für die mehrfach hydroxylierten Strukturen. Um die nötige Empfindlichkeit für diese Analyten im Bereich unterhalb der Nachweisgrenzen zu gewährleisten, musste eine zusätzliche Identifizierungsmethode eingesetzt werden. Gehalte an Vitamin D₃ in Fisch, Eigelb, Wildpilzen sowie angereicherten Produkten konnten jedoch ohne Schwierigkeiten nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Validierung wurde außerdem die Eignung von Vitamin D₃-d₃ (6, 19, 19-D₃) und Vitamin D₂-d₃ (6, 19, 19-D₂) als interne Standards zur vollständigen Kompensation der Aufarbeitungsverluste und matrixbedingten Abweichungen für 7-Dehydrocholesterol und Ergosterol überprüft. Als Resultat konnten für diese Metaboliten nur halbquantitative Aussagen gemacht werden.

Lebensmitteluntersuchung

Insgesamt wurden über 650 Lebensmittel aus dem hallischen Einzelhandel auf ihre Gehalte und Zusammensetzung an Vitamin D untersucht. Die Probenauswahl richtete sich nach den Ergebnissen der Nationalen Verzehrsstudie II [1], im Zusammenhang mit den aus der Literatur bekannten Daten. Die ermittelten Vitamin D-Gehalte wurden auf die jeweiligen Verzehrsmengen in der deutschen Bevölkerung bezogen, um ihren Anteil an der Gesamtversorgung zu verdeutlichen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Vitamin D₂ und D₃ nur in wenigen Lebensmitteln in nennenswertem Umfang zu finden sind. Die Vorläuferstrukturen Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol traten hingegen recht häufig, insbesondere in fettreichen Produkten auf. Hierbei ist der Gehalt an Ergosterol vermutlich auf die Anwesenheit von Pilzen zurückzuführen. Untersuchte Vertreter der Speisepilze enthielten beträchtliche Mengen des Sterols. Besonders hohe Vitamin D₃-Gehalte wurden in Hering (essbarer Teil: 30 µg/100 g), *Tilapia*-Filet (20 µg/100 g) und Wildlachs-Filet (11 µg/100 g) ermittelt. Fisch und Fischprodukte stellten damit die exogenen Vitamin D-Hauptquellen (bis zu 65 %) der deutschen Bevölkerung dar. In geringeren Mengen war Vitamin D₃ in Eigelb (3-4 µg/100 g) und angereicherten Fetten (Margarine: bis zu 7,5 µg/100 g) zu finden. Vitamin D₂ konnte ausschließlich in Speisepilzen, vor allem in Pfifferling (20 µg/100 g) bestimmt werden. In Spuren trat es zudem in Weichkäsen auf. Im Bereich Fleisch und Innereien wurden ebenfalls D-Vitamine nachgewiesen. Die Bedeutung von Fleisch für die tägliche Vitamin D-Zufuhr ist auf die hohe Verzehrsmenge zurückzuführen. Dies gilt auch für Milch- und Milcherzeugnisse. Die Relevanz von Vitamin D, das über andere Lebensmittel unter Berücksichtigung der momentanen Ernährungsgewohnheiten der deutschen Bevölkerung aufgenommen wird, ist ernährungsphysiologisch als untergeordnet anzusehen.

Basierend auf den vorliegenden Analysenergebnissen wurde eine mittlere Gesamt-Vitamin D-Aufnahme von 2,5 µg/Tag für Männer und 1,9 µg/Tag für Frauen berechnet. Diese Zufuhr liegt deutlich unterhalb der empfohlenen Menge der Deutschen Gesellschaft für Ernährung von 20 µg/Tag. Somit ist die exogene Vitamin D-Aufnahme über die üblichen aus dem Handel stammenden Lebensmittel nicht geeignet, um eine adäquate Versorgung der deutschen Bevölkerung mit Vitamin D sicherzustellen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] *Nationale Verzehrsstudie II, Ergebnisbericht Teil 2*; Max Rubner-Institut; Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel: Karlsruhe, 08.
- [2] Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE); Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE); Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung (SGE); Schweizerische Vereinigung für Ernährung (SVE) *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Vitamin D*; 1. Auflage, 4. korrigierter Nachdruck ed.; Neuer Umschau Buchverlag: Neustadt a. d. Weinstraße, 2012.
- [3] EN 12821: 2000. Foodstuffs. Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography. Measurement of cholecalciferol (D3) and ergocalciferol (D2). European Committee for Standardization: Brussels, Belgium.
- [4] Ternes W.; Täufel A.; Tunger L.; Zobel M. *Lexikon der Lebensmittel: und der Lebensmittelchemie*; 4. Auflage ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2006.
- [5] Karlson P.; Doenecke D.; Koolman J.; Fuchs G.; Gerock W. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*; Thieme Verlag: Stuttgart, 2005; Vol. 15. kompl.
- [6] Brown, A. J.; Dusso, A.; Slatopolsky, E. Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 1999, 277 (2), F157-F175.
- [7] Fraser, D. R. Vitamin-D. *Lancet* 1995, 345 (8942), 104-107.
- [8] Bills C.E. The chemistry of vitamin D. *Journal of the American Medical Association* 1938, 110 (26), 2150-2155.
- [9] Bouillon, R.; Okamura, W. H.; Norman, A. W. Structure-Function-Relationships in the Vitamin-D Endocrine System. *Endocrine Reviews* 1995, 16 (2), 200-257.
- [10] Dixon H.B.F.; Karlson P. Nomenclature of Vitamin D, Recommendations 1981. *Pure and Application Chemistry* 1982, 54 (8), 1511-1516.
- [11] Holick, M. F.; Maclaughlin, J. A.; Clark, M. B.; Holick, S. A.; Potts, J. T.; Anderson, R. R.; Blank, I. H.; Parrish, J. A. Photosynthesis of Previtamin-D3 in Human-Skin and the Physiologic Consequences. *Science* 1980, 210 (4466), 203-205.
- [12] Tian X.Q.; Chen T.C.; Matsuoka L.Y.; Wortsman J.; Holick, M. F. Kinetic and Thermodynamic Studies of the Conversion of Previtamin D3 to Vitamin D3 in Human Skin. 268 ed.; *The Journal of Biological Chemistry*: 1993; pp 14888-14892.
- [13] Esvelt, R. P.; Schnoes, H. K.; Deluca, H. F. Vitamin-D3 from Rat Skins Irradiated Invitro with Ultraviolet-Light. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1978, 188 (2), 282-286.
- [14] Holick, M. F.; Richtand, N. M.; Mcneill, S. C.; Holick, S. A.; Frommer, J. E.; Henley, J. W.; Potts, J. T. Isolation and Identification of Pre-Vitamin D3 from the Skin of Rats Exposed to Ultraviolet-Irradiation. *Biochemistry* 1979, 18 (6), 1003-1008.
- [15] Haddad, J. G.; Matsuoka, L. Y.; Hollis, B. W.; Hu, Y. Z.; Wortsman, J. Human Plasma Transport of Vitamin-D After Its Endogenous Synthesis. *Journal of Clinical Investigation* 1993, 91 (6), 2552-2555.

- [16] Bikle, D. D. Vitamin D: an ancient hormone. *Experimental Dermatology* 2011, 20 (1), 7-13.
- [17] Fraser, W. D.; Milan, A. M. Vitamin D Assays: Past and Present Debates, Difficulties, and Developments. *Calcified Tissue International* 2013, 92 (2), 118-127.
- [18] Bässler K-H.; Golly I.; Loew D. *Vitamin -Lexikon. Für Ärzte, Apotheker und Ernährungswissenschaftler*; 3. Auflage ed.; Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH: München, 2002.
- [19] Vieth, R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999, 69 (5), 842-856.
- [20] Zittermann, A.; Gummert, J. F. Sun, vitamin D, and cardiovascular disease. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 2010, 101 (2), 124-129.
- [21] Souberbielle J-C.; Cavalier E. Supplementation, Optimal Status, and Analytical Determination of Vitamin D: Where are we Standing in 2012? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2013, (13), 36-44.
- [22] Zittermann, A. The estimated benefits of vitamin D for Germany. *Molecular Nutrition & Food Research* 2010, 54 (8), 1164-1171.
- [23] Jones G.; Vriezen D.; Lohnes D. Side-chain hydroxylation of vitamin D₃ and its physiological implications. *Steroids* 1987, 49 (1-3), 29-53.
- [24] Norman, A. W.; Okamura W.H.; Bishop J.E.; Henry H.L. Update on biological actions of 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002, 197, 1-13.
- [25] Onisko, B. L.; Esvelt, R. P.; Schnoes, H. K.; Deluca, H. F. Excretion of Metabolites of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin-D₃ in Rat Bile. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1980, 205 (1), 175-179.
- [26] Deluca, H. F.; Schnoes, H. K. Vitamin-D - Recent Advances. *Annual Review of Biochemistry* 1983, 52, 411-439.
- [27] Feher, J. J.; Fullmer, C. S.; Wasserman, R. H. Role of Facilitated Diffusion of Calcium by Calbindin in Intestinal Calcium-Absorption. *American Journal of Physiology* 1992, 262 (2), C517-C526.
- [28] Stumpf, W. E.; Sar, M.; Reid, F. A.; Tanaka, Y.; Deluca, H. F. Target-Cells for 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ in Intestinal-Tract, Stomach, Kidney, Skin, Pituitary, and Parathyroid. *Science* 1979, 206 (4423), 1188-1190.
- [29] Stein, G. S.; Lian, J. B.; Uskokovic, M.; Aronow, M.; Shalhoub, V.; Owen, T.; Barone, L. Effects of 1,25(OH)₂D₃ and Vitamin-D Analogs on Developmental Control of Cell-Growth and Tissue-Specific Gene-Expression During Osteoblast Differentiation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1993, 3 (9), 1885-1890.
- [30] Howard, G. A.; Turner, R. T.; Sherrard, D. J.; Baylink, D. J. Human-Bone Cells in Culture Metabolize 25-Hydroxyvitamin-D₃ to 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ and 24,25-Dihydroxyvitamin-D₃. *Journal of Biological Chemistry* 1981, 256 (15), 7738-7740.
- [31] Whitsett, J. A.; Ho, M.; Tsang, R. C.; Norman, E. J.; Adams, K. G. Synthesis of 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ by Human-Placenta Invitro. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1981, 53 (3), 484-488.

- [32] Friedman, P. A.; Gesek, F. A. Cellular Calcium-Transport in Renal Epithelia - Measurement, Mechanisms, and Regulation. *Physiological Reviews* 1995, 75 (3), 429-471.
- [33] Bikle, D. D.; Nemanic, M. K.; Gee, E.; Elias, P. 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ Production by Human Keratinocytes - Kinetics and Regulation. *Journal of Clinical Investigation* 1986, 78 (2), 557-566.
- [34] Dusso, A. S.; Brown, A. J.; Slatopolsky, E. Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2005, 289 (1), F8-F28.
- [35] Lehmann, B.; Meurer, M. Vitamin D metabolism. *Dermatologic Therapy* 2010, 23 (1), 2-12.
- [36] Doenicke D.; Koolman J.; Fuchs G.; Gerok W. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*; Thieme Verlag: Stuttgart, 2005; Vol. 15. kompl.
- [37] Biesalski H.K.; Grimm P. *Taschenatlas Ernährung*; Thieme Verlag: Stuttgart, 2011; Vol. 5. Auflage.
- [38] Bischoff-Ferrari, H. A.; Wason-Hughes, B.; Willett, W. C.; Staehelin, H. B.; Bazemore, M. G.; Zee, R. Y.; Wong, J. B. Effect of vitamin D on falls - A meta-analysis. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2004, 291 (16), 1999-2006.
- [39] Holick, M. F. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* 2003, 88 (2), 296-307.
- [40] Souberbielle, J. C.; Body, J. J.; Lappe, J. M.; Plebani, M.; Shoenfeld, Y.; Wang, T. J.; Bischoff-Ferrari, H. A.; Cavalier, E.; Ebeling, P. R.; Fardellone, P.; Gandini, S.; Gruson, D.; Guerin, A. P.; Heickendorff, L.; Hollis, B. W.; Ish-Shalom, S.; Jean, G.; von Landenberg, P.; Largura, A.; Olsson, T.; Pierrot-Deseilligny, C.; Pilz, S.; Tincani, A.; Valcour, A.; Zittermann, A. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmunity Reviews* 2010, 9 (11), 709-715.
- [41] Linseisen J.; Bechthold A.; Bischoff-Ferrari H.A.; Hintzpeter B.; Leschik-Bonnet; Reichrath J.; Stehle P.; Volkert D.; Wolfram G.; Zittermann A. Stellungnahme, Vitamin D und Prävention ausgewählter chronischer Krankheiten. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE): Bonn, 2011.
- [42] Holick, M. F. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine* 2007, 357 (3), 266-281.
- [43] Webb, A. R.; Kline, L.; Holick, M. F. Influence of Season and Latitude on the Cutaneous Synthesis of Vitamin-D₃ - Exposure to Winter Sunlight in Boston and Edmonton Will Not Promote Vitamin-D₃ Synthesis in Human-Skin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1988, 67 (2), 373-378.
- [44] Waldmann, A.; Koschizke, J. W.; Leitzmann, C.; Hahn, A. Dietary intakes and lifestyle factors of a vegan population in Germany: results from the German Vegan Study. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003, 57 (8), 947-955.
- [45] Dulaney, E. L.; Stapley, E. O.; Simpf, K. Studies on Ergosterol Production by Yeasts. *Applied Microbiology* 1954, 2 (6), 371-379.
- [46] Holick, M. F.; Biancuzzo, R. M.; Chen, T. C.; Klein, E. K.; Young, A.; Bibuld, D.; Reitz, R.; Salameh, W.; Ameri, A.; Tannenbaum, A. D. Vitamin D-2 is as effective as vitamin D-3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008, 93 (3), 677-681.

- [47] Mattila, P.; Lampi, A. M.; Ronkainen, R.; Toivo, J.; Piironen, V. Sterol and vitamin D-2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry* 2002, 76 (3), 293-298.
- [48] Purchas R.; Zou; M.; Pearce P.; Jackson F. Concentrations of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in raw and cooked New Zealand beef and lamb. *Journal of Food Composition and Analysis* 2007, 20, 90-98.
- [49] Mattila, P.; Piironen, V.; Haapala, R.; Hirvi, T.; UusiRauva, E. Possible factors responsible for the high variation in the cholecalciferol contents of fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45 (10), 3891-3896.
- [50] Mattila, P.; Piironen, V.; UusiRauva, E.; Koivistoinen, P. Cholecalciferol and 25-Hydroxycholecalciferol contents in fish and fish products. *Journal of Food Composition and Analysis* 1995, 8, 232-243.
- [51] Ostermeyer, U.; Schmidt, T. Vitamin D and provitamin D in fish - Determination by HPLC with electrochemical detection. *European Food Research and Technology* 2006, 222 (3-4), 403-413.
- [52] Bilodeau, L.; Dufresne, G.; Deeks, J.; Clement, G.; Bertrand, J.; Turcotte, S.; Robichaud, A.; Beraldin, F.; Fouquet, A. Determination of vitamin D(3) and 25-hydroxyvitamin D(3) in foodstuffs by HPLC UV-DAD and LC-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis* 2011, 24 (3), 441-448.
- [53] Takeuchi, A.; Okano, T.; Sayamoto, M.; Sawamura, S.; Kobayashi, T.; Motosugi, M.; Yamakawa, T. Tissue Distribution of 7-Dehydrocholesterol, Vitamin-D3 and 25-Hydroxyvitamin-D3 in Several Species of Fishes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1986, 32 (1), 13-22.
- [54] Neilands, J. B.; Strong, F. M.; Elvehjem, C. A. The Nutritive Value of Canned Foods .25. Vitamin Content of Canned Fish Products. *Journal of Nutrition* 1947, 34 (6), 633-643.
- [55] Takeuchi, A.; Okano, T.; Torii, M.; Hatanaka, Y.; Kobayashi, T. Comparative-Studies on the Contents of Vitamin-D3, 25-Hydroxy Vitamin-D3 and 7-Dehydrocholesterol in Fish Liver. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 1987, 88 (2), 569-573.
- [56] Lu, Z.; Chen, T. C.; Zhang, A.; Persons, K. S.; Kohn, N.; Berkowitz, R.; Martinello, S.; Holick, M. F. An evaluation of the vitamin D-3 content in fish: Is the vitamin D content adequate to satisfy the dietary requirement for vitamin D? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2007, 103 (3-5), 642-644.
- [57] Blondin, G. A.; Kulkarni, B. D.; Nes, W. R. A Study of Origin of Vitamin-D from 7-Dehydrocholesterol in Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1967, 20 (2), 379-&.
- [58] Takeuchi, A.; Okano, T.; Tanda, M.; Kobayashi, T. Possible Origin of Extremely High Contents of Vitamin-D3 in Some Kinds of Fish Liver. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 1991, 100 (2), 483-487.
- [59] Rao, D. S.; Raghuramulu, N. Food chain as origin of vitamin D in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 1996, 114 (1), 15-19.
- [60] Copping A.M. Origin of vitamin D in cod-liver oil: vitamin D content of zooplankton. *Biochemical Journal* 1934, 28 (4), 1516-1520.
- [61] Rao, D. S.; Raghuramulu, N. Vitamin-D and Its Related Parameters in Fresh-Water Wild Fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 1995, 111 (2), 191-198.

- [62] http://www.fischinfo.de/pdf/Daten_und_Fakten_2012.pdf 2013.
- [63] Parkinson T.L. The Chemical Composition of Eggs. *Journal of science of Food and Agriculture* 1966, 17 (3), 101-111.
- [64] Mattila, P.; Ronkainen, R.; Lehikoinen, K.; Piironen, V. Effect of household cooking on the Vitamin D content in fish, eggs and wild mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 1999, 12, 153-160.
- [65] Mattila, P.; Piironen, V.; Bäckman Ch.; Asunmaa A.; UusiRauva, E.; Koivistoinen, P. Determination of vitamin D₃ in egg yolk by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Food Composition and Analysis* 1992, 5, 281-290.
- [66] Mattila, P.; Piironen, V.; UusiRauva, E.; Koivistoinen, P. Determination of 25-Hydroxycholecalciferol Content in Egg Yolk by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis* 1993, 6, 250-255.
- [67] Souci S.W.; Fachmann W.; Kraut H. *Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen*; 7., revidierte und ergänzte Auflage ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: 2008.
- [68] Takeuchi, A.; Okano, T.; Teraoka, S.; Murakami, Y.; Kobayashi, T. High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Vitamin-D in Foods, Feeds and Pharmaceuticals by Successive Use of Reversed-Phase and Straight-Phase Columns. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1984, 30 (1), 11-25.
- [69] Exler, J.; Phillips, K. M.; Patterson, K. Y.; Holden, J. M. Cholesterol and vitamin D content of eggs in the US retail market. *Journal of Food Composition and Analysis* 2013, 29 (2), 110-116.
- [70] Mattila, P.; Rokka, T.; Konko, K.; Valaja, J.; Rossow, L.; Ryhanen, E. L. Effect of cholecalciferol-enriched hen feed on egg quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51 (1), 283-287.
- [71] Mattila, P.; Valaja, J.; Rossow, L.; Venalainen, E.; Tupasela, T. Effect of vitamin D-2- and D-3-enriched diets on egg vitamin D content, production, and bird condition during an entire production period. *Poultry Science* 2004, 83 (3), 433-440.
- [72] Yao L.; Wang T.; Persia M.; Horst R.L.; Higgins M. Effects of Vitamin D₃-Enriched Diet on Egg Yolk Vitamin D₃ Content and Yolk Quality. *Journal of Food Science* 2013, 78 (2).
- [73] Mattila, P.; Lehikoinen, K.; Kiiskinen, T.; Piironen, V. Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol content of chicken egg yolk as affected by the cholecalciferol content of feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47 (10), 4089-4092.
- [74] Clausen, I.; Jakobsen, J.; Leth, T.; Ovesen, L. Vitamin D-3 and 25-hydroxyvitamin D-3 in raw and cooked pork cuts. *Journal of Food Composition and Analysis* 2003, 16 (5), 575-585.
- [75] <http://berichte.bmelv-statistik.de/DFB-0100200-2013.pdf>. 2013.
- [76] Teichmann, A.; Dutta, P. C.; Staffas, A.; Jagerstad, M. Sterol and vitamin D-2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *Lwt-Food Science and Technology* 2007, 40 (5), 815-822.
- [77] Takamura, K.; Hoshino, H.; Sugahara, T.; Amano, H. Determination of Vitamin-D₂ in Shiitake Mushroom (*Lentinus-Edodes*) by High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography* 1991, 545 (1), 201-204.

- [78] Jasinghe, V. J.; Perera, C. O. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D-2 by UV irradiation. *Food Chemistry* 2005, 92 (3), 541-546.
- [79] Mattila, P. H.; Piironen, V. I.; UusiRauva, E. J.; Koivistoinen, P. E. Vitamin-D Contents in Edible Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994, 42 (11), 2449-2453.
- [80] Rangel-Castro, J. I.; Staffas, A.; Danell, E. The ergocalciferol content of dried pigmented and albino *Cantharellus cibarius* fruit bodies. *Mycological Research* 2002, 106, 70-73.
- [81] Mau, J. L.; Chen, P. R.; Yang, J. H. Ultraviolet irradiation increased vitamin D-2 content in edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998, 46 (12), 5269-5272.
- [82] Koyyalamudi, S. R.; Jeong, S. C.; Song, C. H.; Cho, K. Y.; Pang, G. Vitamin D2 Formation and Bioavailability from *Agaricus bisporus* Button Mushrooms Treated with Ultraviolet Irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57 (8), 3351-3355.
- [83] Koyyalamudi, S. R.; Jeong, S. C.; Pang, G.; Teal, A.; Biggs, T. Concentration of vitamin D-2 in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) exposed to pulsed UV light. *Journal of Food Composition and Analysis* 2011, 24 (7), 976-979.
- [84] Roberts, J. S.; Teichert, A.; Mchugh, T. H. Vitamin D(2) formation from post-harvest UV-B treatment of mushrooms (*Agaricus bisporus*) and retention during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56 (12), 4541-4544.
- [85] Rodriguez R.J.; Low Ch.; Bottema C.D.K.; Parks L.W. Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985, 837, 336-343.
- [86] Lippert Hirsch A. Industrial Aspects of Vitamin D. In *Vitamin D*, Third Edition ed.; Feldman D.; Pike J.W.; Adam J.S., Eds.; Elsevier: 2011.
- [87] www.AMI-informiert.de, Internet Communication Sep 3, 2013.
- [88] Mattila, P. H.; Piironen, V. I.; UusiRauva, E. J.; Koivistoinen, P. E. Contents of Cholecalciferol, Ergocalciferol, and Their 25-Hydroxylated Metabolites in Milk-Products and Raw Meat and Liver As Determined by Hplc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995, 43 (9), 2394-2399.
- [89] Strobel, N.; Buddhadasa, S.; Adorno, P.; Stockham, K.; Greenfield, H. Vitamin D and 25-hydroxyvitamin D determination in meats by LC-IT-MS. *Food Chemistry* 2013, 138 (2-3).
- [90] Liu, J.; Greenfield, H.; Strobel, N.; Fraser, D. R. The influence of latitude on the concentration of vitamin D-3 and 25-hydroxy-vitamin D-3 in Australian red meat. *Food Chemistry* 2013, 140 (3), 432-435.
- [91] Montgomery, J. L.; Parrish, F. C.; Beitz, D. C.; Horst, R. L.; Huff-Lonergan, E. J.; Trenkle, A. H. The use of vitamin D-3 to improve beef tenderness. *Journal of Animal Science* 2000, 78 (10), 2615-2621.
- [92] Jakobsen, J.; Saxholt, E. Vitamin D metabolites in bovine milk and butter. *Journal of Food Composition and Analysis* 2009, 22 (5), 472-478.
- [93] <http://berichte.bmelv-statistik.de/SJT-4010500-0000.pdf>. 2013.
- [94] <http://berichte.bmelv-statistik.de/SJT-4071300-0000.pdf>. 2013.
- [95] <http://berichte.bmelv-statistik.de/SBT-0105041-0000.pdf>. 2013.

- [96] Tangpricha, V.; Koutkia, P.; Rieke, S. M.; Chen, T. C.; Perez, A. A.; Holick, M. F. Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003, 77 (6), 1478-1483.
- [97] Byrdwell, W. C.; Exler, J.; Gebhardt, S. E.; Harnly, J. M.; Holden, J. M.; Horst, R. L.; Patterson, K. Y.; Phillips, K. M.; Wolf, W. R. Liquid chromatography with ultraviolet and dual parallel mass spectrometric detection for analysis of vitamin D in retail fortified orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis* 2011, 24 (3), 299-306.
- [98] Arbeitsgruppe Fragen der Ernährung Empfehlungen zu Toleranzen für Nährstoffschankungen bei der Nährwertkennzeichnung, Positionspapier. *Lebensmittelchemie*, 2013, p 98.
- [99] Ovesen, L.; Brot, C.; Jakobsen, J. Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: A vitamin D metabolite to be reckoned with? *Annals of Nutrition and Metabolism* 2003, 47 (3-4), 107-113.
- [100] Friedrich U. Vitamin D. In *Handbuch der Vitamine*, Urban & Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore, 1987.
- [101] Yeung, B.; Vouros, P. Role of mass spectrometry in vitamin D research. *Mass Spectrometry Reviews* 1995, 14 (3), 179-194.
- [102] Brockmann H.; Chem Y.H. Über eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Vitamin D. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 1936.
- [103] Abernethy, G. A. A rapid analytical method for cholecalciferol (vitamin D-3) in fortified infant formula, milk and milk powder using Diels-Alder derivatisation and liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012, 403 (5), 1433-1440.
- [104] H.Beyer; W.Walter *Lehrbuch der Organischen Chemie*; 24. Auflage ed.; S. Hirzel Verlag Stuttgart: Leipzig, 2004.
- [105] Mitamura, K.; Nambu, Y.; Tanaka, M.; Kawanishi, A.; Kitahori, J.; Shimada, K. High-performance liquid chromatographic separation of vitamin D-3 3-fatty acid esters and their liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1999, 22 (3), 367-377.
- [106] G.Schwedt *Analytische Chemie; Grundlagen, Methoden, Praxis*; Zweite, vollst. überarbeitete Auflage ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2008.
- [107] Montgomery, J. L.; King, M. B.; Gentry, J. G.; Barham, A. R.; Barham, B. L.; Hilton, G. G.; Blanton, J. R.; Horst, R. L.; Galyean, M. L.; Morrow, K. J.; Wester, D. B.; Miller, M. F. Supplemental vitamin D-3 concentration and biological type of steers. II. Tenderness, quality, and residues of beef. *Journal of Animal Science* 2004, 82 (7), 2092-2104.
- [108] Wertz, A. E.; Knight, T. J.; Trenkle, A.; Sonon, R.; Horst, R. L.; Huff-Lonergan, E. J.; Beitz, D. C. Feeding 25-hydroxyvitamin D-3 to improve beef tenderness. *Journal of Animal Science* 2004, 82 (5), 1410-1418.
- [109] Hollis, B. W.; Roos, B. A.; Draper, H. H.; Lambert, P. W. Vitamin-D and Its Metabolites in Human and Bovine-Milk. *Journal of Nutrition* 1981, 111 (7), 1240-1248.
- [110] Bell J.G.; Christie A.A. Gas-Liquid Chromatographic Determination of Vitamin D in Cod-liver Oil. *Analyst* 1973, 98, 268-273.

- [111] Adachi, A.; Kobayashi, T. Identification of Vitamin-D₃ and 7-Dehydrocholesterol in Cows Milk by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Their Quantitation by High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1979, 25 (2), 67-78.
- [112] Gathungu, R. M.; Flarakos, C. C.; Reddy, G. S.; Vouros, P. The role of mass spectrometry in the analysis of vitamin D compounds. *Mass Spectrometry Reviews* 2013, 32 (1), 72-86.
- [113] Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Horst, R. L.; Minor, B.; Simon, R. R.; Feeney, M. J.; Byrdwell, W. C.; Haytowitz, D. B. Vitamin D and Sterol Composition of 10 Types of Mushrooms from Retail Suppliers in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011, 59 (14), 7841-7853.
- [114] Perales, S.; Alegria, A.; Barbera, R.; Farre, R. Review: Determination of vitamin D in dairy products by high performance liquid chromatography. *Food Science and Technology International* 2005, 11 (6), 451-462.
- [115] Mattila, P. H.; Piironen, V. I.; UusiRauva, E. J.; Koivistoinen, P. E. New analytical aspects of vitamin D in foods. *Food Chemistry* 1996, 57 (1), 95-99.
- [116] Buisman, J. A. K.; Hanewald, K. H.; Mulder, F. J.; Roborgh, J. R.; Keuning, K. J. Evaluation of Effect of Isomerization on Chemical and Biological Assay of Vitamin D - Analysis of Fat-Soluble Vitamins X. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1968, 57 (8), 1326-&.
- [117] Jakobsen, J.; Clausen, I.; Leth, T.; Ovesen, L. A new method for the determination of vitamin D-3 and 25-hydroxyvitamin D-3 in meat. *Journal of Food Composition and Analysis* 2004, 17 (6), 777-787.
- [118] HANEWALD.KH; Mulder, F. J.; Keuning, K. J. Thin-Layer Chromatographic Assay of Vitamin D in High-Potency Preparations - Analysis of Fat-Soluble Vitamins 9. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1968, 57 (8), 1308-&.
- [119] Perales, S.; Delgado, M. M.; Alegria, A.; Barbera, R.; Farre, R. Liquid chromatographic determination of Vitamin D-3 in infant formulas and fortified milk. *Analytica Chimica Acta* 2005, 543 (1-2), 58-63.
- [120] Takeuchi, A.; Okano, T.; Ayame, M.; Yoshikawa, H.; Teraoka, S.; Murakami, Y.; Kobayashi, T. High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Vitamin-D₃ in Fish Liver Oils and Eel Body Oils. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1984, 30 (5), 421-430.
- [121] Mattila, P. H.; Vakonen, E.; Valaja, J. Effect of Different Vitamin D Supplementations in Poultry Feed on Vitamin D Content of Eggs and Chicken Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011, 59 (15), 8298-8303.
- [122] Thompson, J. N.; Plouffe, L. Determination of Cholecalciferol in Meat and Fat from Livestock Fed Normal and Excessive Quantities of Vitamin-D. *Food Chemistry* 1993, 46 (3), 313-318.
- [123] Kurmann, A.; Indyk, H. The Endogenous Vitamin-D Content of Bovine-Milk - Influence of Season. *Food Chemistry* 1994, 50 (1), 75-81.
- [124] Gomis, D. B.; Fernandez, M. P.; Alvarez, M. D. G. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000, 891 (1), 109-114.

- [125] Kozhanova, L. A.; Fedorova, G. A.; Baram, G. I. Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Multivitamin Preparations by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* 2000, 57 (1), 40-45.
- [126] Moreno, P.; Salvado, V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multivitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000, 870 (1-2), 207-215.
- [127] Staffas, A.; Nyman, A. Determination of cholecalciferol (vitamin D-3) in selected foods by liquid chromatography: NMKL collaborative study. *Journal of Aoac International* 2003, 86 (2), 400-406.
- [128] Jakobsen, J.; Maribo, H.; Bysted, A.; Sommer, H. M.; Hels, O. 25-Hydroxyvitamin D(3) affects vitamin D status similar to vitamin D(3) in pigs - but the meat produced has a lower content of vitamin D. *British Journal of Nutrition* 2007, 98 (5), 908-913.
- [129] Phillips, K. M.; Byrdwell, W. C.; Exler, J.; Harnly, J. M.; Holden, J. M.; Holick, M. F.; Hollis, B. W.; Horst, R. L.; Lemar, L. E.; Patterson, K. Y.; Tarrago-Trani, M. T.; Wolf, W. R. Development and validation of control materials for the measurement of vitamin D-3 in selected US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 2008, 21 (7), 527-534.
- [130] Ko, J.; Kwak, B. M.; Ahn, J. H.; Shim, S. L.; Kim, K. S.; Yoon, T.; Leem, D. G.; Jeong, J. Development of Vitamin D Determination in Infant Formula by Column-Switching HPLC with UV Detector. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 2012, 32 (5), 571-577.
- [131] Plonka, J.; Toczek, A.; Tomczyk, V. Multivitamin Analysis of Fruits, Fruit-Vegetable Juices, and Diet Supplements. *Food Analytical Methods* 2012, 5 (5), 1167-1176.
- [132] El-Khoury, J. M.; Reineks, E. Z.; Wang, S. H. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues. *Clinical Biochemistry* 2011, 44 (1), 66-76.
- [133] Aberhart, D. J.; Hsu, A. C. T. Studies on Adduct of "4-Phenyl-1,2,4-Triazoline-3,5-Dione with Vitamin-D3. *Journal of Organic Chemistry* 1976, 41 (12), 2098-2102.
- [134] Higashi, T.; Shibayama, Y.; Fuji, M.; Shimada, K. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of salivary 25-hydroxyvitamin D-3: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 391 (1), 229-238.
- [135] Higashi, T.; Awada, D.; Shimada, K. Determination of 24,25-dihydroxyvitamin D-3 in human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry after derivatization with a Cookson-type reagent. *Biomedical Chromatography* 2001, 15 (2), 133-140.
- [136] Higashi, T.; Yamauchi, A.; Shimada, K. Application of 4-(4-nitrophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione to analysis of 25-hydroxyvitamin D-3 in human plasma by liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Sciences* 2003, 19 (6), 941-943.
- [137] Higashi, T.; Awada, D.; Shimada, K. Simultaneous determination of 25-hydroxyvitamin D-2 and 25-hydroxyvitamin D-3 in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing derivatization with a Cookson-type reagent. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2001, 24 (7), 738-743.

- [138] Aronov, P. A.; Hall, L. M.; Dettmer, K.; Stephensen, C. B.; Hammock, B. D. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 391 (5), 1917-1930.
- [139] Huang, M.; Winters, D. Application of Ultra-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Measurement of Vitamin D in Foods and Nutritional Supplements. *Journal of Aoac International* 2011, 94 (1), 211-223.
- [140] Holler, U.; Quintana, A. P.; Gossel, R.; Olszewski, K.; Riss, G.; Schattner, A.; Nunes, C. S. Rapid determination of 25-hydroxy vitamin D3 in swine tissue using an isotope dilution HPLC-MS assay. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2010, 878 (13-14), 963-968.
- [141] Trenerry, V. C.; Plozza, T.; Caridi, D.; Murphy, S. The determination of vitamin D-3 in bovine milk by liquid chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry* 2011, 125 (4), 1314-1319.
- [142] Gentili, A.; Caretti, F.; Bellante, S.; Ventura, S.; Canepari, S.; Curini, R. Comprehensive Profiling of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Milk from Different Animal Species by LC-DAD-MS/MS Hyphenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013, 61 (8), 1628-1639.
- [143] Bonfiglio, R.; King, R. C.; Olah, T. V.; Merkle, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1999, 13 (12), 1175-1185.
- [144] Van Eeckhaut, A.; Lanckmans, K.; Sarre, S.; Smolders, I.; Michotte, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009, 877 (23), 2198-2207.
- [145] Antignac, J. P.; de Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F.; Le Bizec, B. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue. *Analytica Chimica Acta* 2005, 529 (1-2), 129-136.
- [146] Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 2003, 75 (13), 3019-3030.
- [147] Raska Jr.; Toropov A. Comparison of QSPR models of octanol/water partition coefficient for vitamins and non vitamins. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2006, 41, 1271-1278.
- [148] <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=Search&actionHandle=clear&nextPage=chemidheavy.jsp>. 2013.
- [149] Higashi, T.; Awada, D.; Shimada, K. Liquid chromatography-mass spectrometric method combined with derivatization for determination of 1 alpha-hydroxyvitamin D-3 in human plasma. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002, 772 (2), 229-238.
- [150] Hartmann U. Erstellung einer Methode zur Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS. Unpublished Work, 2007.
- [151] Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt Prüfverfahren 21-0054-01, Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS. 2009.

- [152] Heudi, O.; Trisconi, M. J.; Blake, C. J. Simultaneous quantification of Vitamins A, D-3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004, *1022* (1-2), 115-123.
- [153] Jäpelt R.B. Vitamin D in plants occurrence, analysis and biosynthesis. 2011.
- [154] Kromidas S. *Validierung in der Analytik*; Wiley-VCH: 1999.
- [155] Horwitz, W. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical Chemistry* 1982, *54* (1), A67-&.
- [156] Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. *12. Ernährungsbericht 2012*; Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V.: 2012.
- [157] Feldman D.; Pike J.W.; Adams J.S. *Vitamin D, Third Edition*; Elsevier Inc.: San Diego, 2011.
- [158] Shepard, R. M.; Horst, R. L.; Hamstra, A. J.; Deluca, H. F. Determination of Vitamin-D and Its Metabolites in Plasma from Normal and Anephric Man. *Biochemical Journal* 1979, *182* (1), 55-69.
- [159] Honda, A.; Yamashita, K.; Miyazaki, H.; Shirai, M.; Ikegami, T.; Xu, G. R.; Numazawa, M.; Hara, T.; Matsuzaki, Y. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Lipid Research* 2008, *49* (9), 2063-2073.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die Struktur der D-Vitamere [10]	2
Abbildung 2: Übersicht über die Struktur der Provitamine [10]	3
Abbildung 3: Vitamin D ₃ -Synthese und Metabolismus	4
Abbildung 4: Anteil der fünf bedeutendsten Fischarten [%] am Fischverzehr 2011 in der BRD [62]....	8
Abbildung 5: Anteil der Fleischarten [%] am Fleischverzehr 2011 in der BRD [93]	13
Abbildung 6: A: Anteil Milcherzeugnisse [%] am Verzehr von Frischmilcherzeugnissen 2011 in der BRD [94]; B: Anteil der Käsesorten [%] am Käseverzehr 2011 in der BRD [95]	13
Abbildung 7: Peakflächen ausgewählter D-Vitamere nacheinander folgender Messungen ohne und mit Spülschritt.....	33
Abbildung 8: Derivatisierung von Cholecalciferol (Vitamin D ₃)	34
Abbildung 9: Vitamin D ₃ (oben) und 25-Hydroxycholecalciferol (unten) einer Lachsprobe.....	35
Abbildung 10: Verseifung nach Prüfverfahren 21-0054-01	36
Abbildung 11: Vergleich der Festphasenmaterialien	38
Abbildung 12: Festphasenextraktion nach Prüfverfahren 21-0054-01	39
Abbildung 13: NP-Festphasenextraktion	40
Abbildung 14: Messstabilität des Analysenverfahrens	45
Abbildung 15: LC-MS/MS-Chromatogramm eines Mischstandards a (24 <i>R</i>)-24,25-(OH) ₂ D ₃ ; b 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ ;	46
Abbildung 16: LC-MS/MS-Chromatogramm einer aufgearbeiteten Lachsprobe d 25(OH)D ₃ ; g D ₃ ; i 7-DHC;	46
Abbildung 17: Wiederfindung des Analysenverfahrens am Beispiel Wild- und Zuchtlachsfilet	52
Abbildung 18: Vitamin D ₂ und deuterierter Standard einer Hefeprobe ohne (links) und mit (rechts) Identifizierungsmethode	54
Abbildung 19: LC-MS/MS-Chromatogramm eines derivatisierten Mischstandards	55
Abbildung 20: LC-MS/MS-Chromatogramm einer derivatisierten Blutserumprobe	55
Abbildung 21: Gehalte an Vitamin D ₃ in unverarbeiteten Fischen und Krustentieren	58
Abbildung 22: Gehalte an Vitamin D ₃ in verarbeiteten und unverarbeiteten (uv.) Hering bzw. Thunfisch	59

Abbildung 23: Zusammenhang zwischen Vitamin D ₃ - und Fettgehalt in Lachsfischen.....	63
Abbildung 24: Gehalte an Vitamin D ₃ in Hühnereigelben aus verschiedenen Haltungsbedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten (Februar/März 2013; Juli/September 2011)	65
Abbildung 25: Gehalte an Vitamin D ₂ in Pilzen	67
Abbildung 26: Hauptquellen für Vitamin D in Deutschland [%].....	78
Abbildung 27: Zusammensetzung Probenmaterial [%]	83

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vitamin D-Gehalte ausgewählter Fische und Fischprodukte.....	7
Tabelle 2: Gewichtsklassen und Haltungsform.....	9
Tabelle 3: Vitamin D ₃ und 25-Hydroxycholecalciferol im Ei und Eigelb	9
Tabelle 4: Zusammenhang zwischen Vitamin D ₃ im Futter und im Eigelb [73].....	10
Tabelle 5: Vitamin D-Gehalte ausgewählter Pilze	10
Tabelle 6: Vitamin D-Gehalte in Fleisch	11
Tabelle 7: Vitamin D-Gehalte in Milch und Milchprodukten.....	12
Tabelle 8: Höchstmengen an Vitamin D in Futtermitteln	14
Tabelle 9: GC-Methoden zur Quantifizierung von D-Vitaminen in Lebensmitteln	18
Tabelle 10: HPLC-Methoden zur Quantifizierung von D-Vitaminen in Lebensmitteln.....	19
Tabelle 11: LC-MS-Methoden zur Quantifizierung von D-Vitaminen in Lebensmitteln.....	24
Tabelle 12: Eliminierung bzw. Reduzierung von Matrixeffekten [144].....	27
Tabelle 13: Optimierte LC-Parameter.....	29
Tabelle 14: MS/MS-Übergänge der D-Vitamine	30
Tabelle 15: MS/MS-Übergänge der deuterierten D-Vitamine	31
Tabelle 16: Optimierte massenspektrometrische Parameter	31
Tabelle 17: Variationskoeffizienten aus den Peakflächen der Quantifier nacheinander folgender Messungen ohne und mit Spülschritt	32
Tabelle 18: Vergleich der Intensitäten eines nativen und derivatisierten Mischstandards (0,2 mg/l)....	34
Tabelle 19: Vergleich der Intensitäten ausgewählter D-Vitamine einer aufgearbeiteten Lachs- bzw. Eigelbprobe im nativen und derivatisierten Zustand	35
Tabelle 20: Übersicht eingesetzter Festphasenmaterialien	37
Tabelle 21: Matrixeffekte der optimierten Analysenmethode.....	42
Tabelle 22: Lagerstabilität der D-Vitamine im Kühlschrank (6 °C).....	45
Tabelle 23: Arbeitsbereich und Linearität „Zuchtlachsfilet“	47
Tabelle 24: Kenndaten der Kalibrierung „Zuchtlachsfilet“	48
Tabelle 25: Wiederhol- und Laborpräzision „Zuchtlachsfilet“	49

Tabelle 26: Verfahrenskoeffizient und Messunsicherheit „Zuchtlachsfilet“	50
Tabelle 27: Ergebnisse des Ringversuchs REVP 13348	51
Tabelle 28: Wiederfindungsraten „Zuchtlachsfilet“	52
Tabelle 29: Beitrag einzelner Lebensmittelgruppen zur Vitamin D-Zufuhr [156]	56
Tabelle 30: Gehalte an D-Vitaminen in unverarbeiteten Fischen und Krustentieren.....	57
Tabelle 31: Gehalte an D-Vitaminen in verarbeiteten und unverarbeiteten Fischprodukten	59
Tabelle 32: Gehalte an D-Vitaminen in verschiedenen Geweben verarbeiteter und unverarbeiteter Fischproben	60
Tabelle 33: Gehalte an D-Vitaminen in Zucht- und Wildlachsen.....	61
Tabelle 34: Vitamin D- und Fettgehalt in Zucht- und Wildlachsfilets	63
Tabelle 35: Gehalte an D-Vitaminen in Eigelb aus den Monaten Februar und März 2013	64
Tabelle 36: Gehalte an D-Vitaminen in Eigelbproben aus den Monaten Juli und September 2011	65
Tabelle 37: Gehalte an D-Vitaminen in kommerziell erhältlichen Speisepilzen und Hefen.....	66
Tabelle 38: Gehalte an D-Vitaminen in Fleisch.....	68
Tabelle 39: Gehalte an D-Vitaminen in Innereien	70
Tabelle 40: Gehalte an D-Vitaminen in Milchprodukten.....	71
Tabelle 41: Gehalte an D-Vitaminen in Hart-, Schnitt- und halbfesten Schnittkäsen.....	71
Tabelle 42: Gehalte an D-Vitaminen in Weichkäse	72
Tabelle 43: Gehalte an D-Vitaminen in Frischkäse und -zubereitungen	73
Tabelle 44: Gehalte an D-Vitaminen in Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen	74
Tabelle 45: Gehalte an D-Vitaminen in Rahm- und Sauermilcherzeugnissen.....	75
Tabelle 46: Gehalte an D-Vitaminen in Streichfetten	76
Tabelle 47: Gehalte an D-Vitaminen in Back-, Teig-, Süßwaren und Eierlikör	77
Tabelle 48: D-Vitamine mit den entsprechend verwendeten internen Standards	85

9 Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen der Deutschen Rechtschreibung laut Duden und den Internationalen Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

1,25(OH) ₂ D	1,25-Dihydroxycalciferol
1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxycholecalciferol
1,25(OH) ₂ D ₂	1,25-Dihydroxyergocalciferol
24,25(OH) ₂ D ₃	(24 <i>R</i>)-24,25-Dihydroxycholecalciferol
25(OH)D	25-Hydroxycalciferol
25(OH)D ₂ / 25D ₂	25-Hydroxyergocalciferol
25(OH)D ₃ / 25D ₃	25-Hydroxycholecalciferol
7-DHC	7-Dehydrocholesterol
A	Analytisch
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
APCI	<i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i>
BG	Bestimmungsgrenze
BHT	Butylhydroxytoluol
BLS	Bundeslebensmittelschlüssel
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
cps	<i>counts per second</i>
CT	Calcitonin
Cyclohex	Cyclohexan
...d3 bzw. d7	3-fach bzw. 7-fach deuteriert
(d3)	mit 3-fach deuteriertem Standard berechnet
DAD	<i>Diodenarray-Detektor</i>
DBP	Vitamin-D-bindendes Protein
DC	Dünnschichtchromatography
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DLG	Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft
EA	Ethylacetat
ECD	<i>Electrochemical Detector</i>
EE	Diethylether

ESI	<i>Elektronen-Spray-Ionisation</i>
EtOH	Ethanol
ESTD	Externer Standard
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FGF23	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FIA	Fließinjektionsanalyse
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
FutMV	Futtermittelverordnung
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
H ₂ O	Wasser
Hep	Heptan
Hex	Hexan
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSS	Natriumheptan-1-Sulfonsäure
IE	Internationale Einheiten
IO	Isooctan
IPA	2-Propanol
ISTD	Interner Standard
k. A.	keine Angabe
KäseVO	Käseverordnung
KOH	Kaliumhydroxid
K _{ow}	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Tandem-Mass Spectrometry</i>
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LMvitV	Verordnung über vitaminisierte Lebensmittel
max.	Maximalwert
MeOH	Methanol
min.	Minimalwert
MU	Messunsicherheit
MW	Mittelwert
Naac	Natriumacetat
n. d.	nicht detektiert
NH ₃	Ammoniak

NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NKV	Nährwert-Kennzeichnungsverordnung
n. n.	nicht nachgewiesen
n. q.	nicht quantifiziert
NVS II	Nationale Verzehrsstudie II
NWG	Nachweisgrenze
ovn	<i>over night</i>
PE	Petrolether
PFV	Peakflächenverhältnis
PTAD	4-Phenyl-1,2,4-triazolinon-3,5-dion
PTH	Parathormon
RIA	Radioimmunoassay
RL ... EWG	Richtlinie ... der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft
RP	<i>Reversed Phase</i>
RSD	Relative Standardabweichung (Variationskoeffizient)
RSD _r	Relative Standardabweichung unter Wiederholbedingungen
RSD _T	Relative Standardabweichung unter Zwischenbedingungen
RT	Raumtemperatur
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
sMRM	<i>Scheduled Multiple Reaction Monitoring</i>
SP	(semi-)präparativ
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
TCM	Trichlormethan
THF	Tetrahydrofuran
TMSE	Trimethylsilylether
UV	Ultraviolettstrahlung
VDP	Vitamin D-Bindeprotein
VDRE	<i>Vitamin D Responsive Elements</i>
VO (EG)	Verordnung der Europäischen Gemeinschaft
WFR	Wiederfindungsrate

10 Anhang

10.1 Validierung

10.1.1 Zusammenfassung: Lachs

Analyt	Arbeitsbereich [µg/l]/ Linearität	Analytische Grenzen [µg/100 g]			Präzision [%]						Wiederfindungsrate [%]			
		NWG	EG	BG	RSD _r	RSD _T	MW	RSD _r	RSD _T	MW	WF	RSD	WF	RSD
							MU*			MU*				
					6,6 µg/100 g			23,3 µg/100 g			6,6 µg/100 g		23,3 µg/100 g	
D ₃	25,2 – 933 linear	0,3	0,6	1,0	3,2	4,3	10,4 0,3	7,6	8,8	27,9 2,0	102	5	106	9
D ₂	73,5 - 933 linear	0,9	1,7	2,9	4,5	9,0	6,8 0,3	7,2	13,3	24,3 1,7	105	10	100	6
(24R)- 24,25(OH) ₂ D ₃	76,5 - 594 linear	0,9	1,8	3,0	14,1	25,9	6,8 1,0	9,9	13,7	26,7 2,69	90	10	110	9
25(OH)D ₃	18,9 - 933 linear	0,2	0,4	0,7	4,9	6,8	7,3 0,4	3,8	7,5	24,9 1,0	104	7	103	2
25(OH)D ₂	48,4 - 933 linear	0,6	1,1	1,9	8,6	16,1	7,8 0,8	10,1	20,1	24,5 2,1	105	10	102	5
1α,25(OH) ₂ D ₃	418 - 765 linear	4,9	9,8	16,4	-	-	-	13,0	23,0	24,2 3,3	-	-	103	10
1α,25(OH) ₂ D ₂	543 - 933 linear	6,4	12,8	21,3	-	-	-	16,1	20,5	27,4 4,6	-	-	116	14

*(P=95 %)

Analyt	Arbeitsbereich [µg/l]/ Linearität	Analytische Grenzen [µg/100 g]			Präzision [%]						Wiederfindungsrate [%]			
		NWG	EG	BG	RSD _r	RSD _T	MW MU* [µg/100 g]	RSD _r	RSD _T	MW MU* [µg/100 g]	WF	RSD	WF	RSD
					14,0 µg/100 g			48,9 µg/100 g			14,0 µg/100 g		48,9 µg/100 g	
Ergosterol	530 - 1.940 linear	6,2	12,4	20,7	-	-	-	5,7	11	52,2 3,5	-	-	103	7
7-DHC	170 - 1.960 quadratisch**	2,0	4,0	6,6	4,7	9,5	350 22	3,2	5,3	395,1 14,2	107	46	120	33
Ergosterol (d3)	480 - 1.940 linear	6	11	19,0	-	-	-	11	47	74 9	-	-	109	22
7-DHC (d3)	220 - 1.610 quadratisch**	3	5	9	10	28	258 35	15	35	271 46	185	37	160	55

*(P=95 %)

**aber: lineare Regression vertretbar

(d3): ISTD: Vitamin D3-d3 (6, 19, 19-D3) für 7-DHC bzw. Vitamin D2-d3 (6, 19, 19-D2) für Ergosterol

10.1.2 Zusammenfassung: Wildlachs

Analyt	Arbeitsbereich [µg/l]/ Linearität	Analytische Grenzen [µg/100 g]			Präzision [%]						Wiederfindungsrate [%]			
		NWG	EG	BG	RSD _r	RSD _T	MW MU* [µg/100 g]	RSD _r	RSD _T	MW MU* [µg/100 g]	WF	RSD	WF	RSD
D ₃	58,6 - 933,0 linear	0,7	1,4	2,3	3,4	4,4	29,4 1,0	2,6	2,7	48,2 1,3	99	17,6	108	5,7
D ₂	180,9 - 933,0 linear	2,1	4,3	7,1	3,6	6,9	6,7 0,3	3,2	6,6	25,3 0,8	100	5,3	110	4,3
(24R)- 24,25(OH) ₂ D ₃	94,3 - 594,0 linear	1,1	2,2	3,7	8,0	11,5	7,2 0,6	4,3	8,8	25,6 1,1	112	5	108	2,8
25(OH)D ₃	30,6 - 933,0 linear	0,4	0,7	1,2	3,3	6,9	6,4 0,2	3,3	5,8	22,6 0,8	93	3,7	95	2,1
25(OH)D ₂	79,0 - 933,0 linear	0,9	1,9	3,1	6,1	12,6	6,6 0,5	5	5,2	23,4 1,2	93	6,6	102	3,6
1α,25(OH) ₂ D ₃	593 - 933 linear	7	14	23,3	-	-	-	6,2	5,6	18,1 1,6	-	-	77	5,1
1α,25(OH) ₂ D ₂	736 - 933 linear	8,7	17,4	28,9	-	-	-	8,1	19,2	24,4 2,3	-	-	116	4,1
					14,0 µg/100 g			48,9 µg/100 g			14,0 µg/100 g		48,9 µg/100 g	
Ergosterol	306 - 1.940 linear	3,6	7,2	12	-	-	-	4,2	8,7	53 3	-	-	101	6,7
7-DHC	190 - 1.959 linear	2,2	4,4	7,4	4,9	9,2	37 2	3,4	4,7	75 3	109	13,1	101	7,1
Ergosterol (d3)	313 - 1.940 linear	3,7	7,4	12,3	-	-	-	5,1	28,3	75 5	-	-	109	15,8
7-DHC (d3)	163 - 1.603 linear	1,9	3,8	6,4	7,9	28,6	37 2,5	4,6	43,5	75 5	154	23,8	110	19,5

*(P=95 %)

(d3): ISTD: Vitamin D₃-d3 (6, 19, 19-D₃) für 7-DHC bzw. Vitamin D₂-d3 (6, 19, 19-D₂) für Ergosterol

10.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in verschiedenen Matrices [$\mu\text{g}/100\text{ g}$]

Matrix	Lachs		Wildlachs		Butter		Käse		Leber		Fleisch	
	NWG	BG	NWG	BG	NWG	BG	NWG	BG	NWG	BG	NWG	BG
D ₃	0,3	1	0,7	2,3	2,2	7,2	0,8	2,7	2,2	7,4	1,4	4,8
D ₂	0,9	2,9	2,4	7,8	2,6	8,7	1,4	4,5	1,8	6	2,2	7,2
(24 <i>R</i>)-24,25(OH) ₂ D ₃	0,9	2,9	1,1	3,7	1,2	4	1	3,2	3,1	10,3	1,7	5,5
25(OH)D ₃	0,2	0,7	0,4	1,2	0,6	2	0,5	1,7	1,1	3,7	1,5	5,1
25(OH)D ₂	0,6	2	1,1	3,8	1	3,3	0,9	2,9	1,5	5	6,6	22,1
1 α ,25(OH) ₂ D ₃	4,9	16,4	6,9	23,1	8,2	27,4	8,7	29,2	23,2	77,3	6,5	21,7
1 α ,25(OH) ₂ D ₂	6,4	21,3	8,7	28,9	15,4	51,2	35,3	117,8	23,5	78,5	25,2	84,1
Ergosterol	6	20	4	12	6	20	3	11	14	47	2	6
7-DHC	2	7	2	7	6	20	8	26	24	79	9	31
Ergosterol (d3)	6	19	4	12	5	18	3	11	21	69	2	6
7-DHC (d3)	3	9	2	6	5	16	9	29	9	31	9	30

(d3): ISTD: Vitamin D₃-d3 (6, 19, 19-D₃) für 7-DHC bzw. Vitamin D₂-d3 (6, 19, 19-D₂) für Ergosterol

10.2 Identifizierungsmethode

10.2.1 HPLC-Parameter

Parameter	Bedingung
Messmethode	
Trennsäule	Knauer Eurospher II 100-3 C18 H 100 x 2 mm + Vorsäule
Laufmittel	A: H ₂ O + 0,1 % Ameisensäure B: MeOH + 0,1 % Ameisensäure
Fluss	0,3 ml/min
Temperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µl
Gradient	40/60 $\xrightarrow{2'}$ 5/95 $\xrightarrow{2'}$ 0/100 (15') $\xrightarrow{0,75'}$ 40/60 (4,25')
Dauer	24 min
Spülmethode	
Injektionsvolumen	100 µl Methanol
Gradient	40/60 $\xrightarrow{0,5'}$ 0/100 (6') $\xrightarrow{0,5'}$ 40/60 (5')
Dauer	12 min

10.2.2 MS/MS-Parameter

Parameter	Bedingung
Curtain Gas	30 psi
Temperature	550 °C
Gas 1	45 psi
Gas 2	60 psi
Collision Gas	medium
Ion Spray Voltage	5.500 V
Detection	sMRM-Mode

10.2.3 MS/MS-Übergänge der derivatisierten D-Vitamer

Analyt	Mutterion	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Rt	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
(24R)-24,25(OH) ₂ D ₃ (PTAD)	[M-18+H] ⁺	574,501	161,3	5,9	80	53	10
	[M-18+H] ⁺	574,501*	298,3*	5,9	80	25	6
	[M+H] ⁺	592,601	298,4	5,9	35	26	6
1,25(OH) ₂ D ₃ (PTAD)	[M+H] ⁺	592,6	314,3	6,1	60	23	8
	[M-18+H] ⁺	574,4	556,5	6,1	50	13,5	10
	[M-18+H] ⁺	574,4*	314,3*	6,1	50	23	10
	[M-18+H] ⁺	574,4	298,1	6,1	50	23	10

*Quantifier

Analyt	Mutterion	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Rt	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
1,25(OH) ₂ D ₂ (PTAD)	[M+H] ⁺	604,6	314,4	6,2	30	21	18
	[M+H] ⁺	604,6	586,5	6,2	30	10	10
	[M-18+H] ⁺	586,5*	314,3*	6,2	30	18	18
25(OH)D ₃ (PTAD)	[M-18+H] ⁺	558,3*	298,3*	6,6	80	19	6
	[M-18+H] ⁺	558,3	280,3	6,6	80	37	10
	[M-18+H] ⁺	558,3	161,2	6,6	80	51	10
25(OH)D ₂ (PTAD)	[M+H] ⁺	588,7	298,3	6,7	30	18,5	15
	[M-18+H] ⁺	570,5*	298,4*	6,7	30	21	18
	[M-18+H] ⁺	570,5	161,3	6,7	30	51	11
D ₂ (PTAD)	[M+H] ⁺	572,7*	298,3*	9,1	40	20	6
	[M+H] ⁺	572,7	280,3	9,1	40	40	10
	[M+H] ⁺	572,7	161,2	9,1	40	52	10
D ₃ (PTAD)	[M+H] ⁺	560,6*	298,4*	9,2	40	21	6
	[M+H] ⁺	560,6	280,3	9,2	40	39	16
	[M+H] ⁺	560,6	161,2	9,2	40	51	13
Ergosterol (PTAD)	[M+H] ⁺	572,7	377,5	9,3	30	24	10
	[M+22+H] ⁺	594,6	200,3	9,3	70	33	15
	[M+22+H] ⁺	594,6*	419,4*	9,3	70	28	11
7-DHC (PTAD)	[M+H] ⁺	560,601	365,5	9,4	30	25	9
	[M+22+H] ⁺	582,3*	407,4*	9,4	50	27	9
	[M+22+H] ⁺	582,3	365,4	9,4	50	34	9

*Quantifier

Analyt	Mutterion	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Rt	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
1,25(OH) ₂ D ₃ d ₃ (PTAD)	[M-18+H] ⁺	577,4*	317,3*	6,1	50	23	10
	[M-18+H] ⁺	577,4	559,6	6,1	50	13,5	10
	[M-18+H] ⁺	577,4	301,2	6,1	50	23	10
	[M+H] ⁺	595,5	317,3	6,1	60	23	10
25(OH)D ₃ d ₃ (PTAD)	[M-18+H] ⁺	561,3*	301,4*	6,6	80	19	10
	[M-18+H] ⁺	561,3	283,3	6,6	80	37	10
	[M-18+H] ⁺	561,3	164,6	6,6	80	51	10
D ₂ d ₃ (PTAD)	[M+H] ⁺	575,6*	301,3*	9,1	40	20	6
	[M+H] ⁺	575,6	283,3	9,1	40	40	10
	[M+H] ⁺	575,6	164,3	9,1	40	52	10
D ₃ d ₃ (PTAD)	[M+H] ⁺	563,6	164,2	9,2	40	51	13
	[M+H] ⁺	563,6*	301,4*	9,2	40	21	10
	[M+H] ⁺	563,6	283,3	9,2	40	39	16

*Quantifier

10.3 Bestimmung von Vitamin D in biologischen Proben

10.3.1 Durchführung

Proteinfällung

0,5 ml Blutserum wurden mit Internen Standard und 0,5 ml kaltem Ethanol versetzt, homogenisiert und für 10 min im Kühlschrank gelagert. Nach Zentrifugation wurden zu 0,7 ml Überstand 2 ml Wasser gegeben und die Probelösung mittels 1 mM Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Nach Hinzufügen von 5 ml 0,3 M methanolischer Natriumheptansulfonsäure wurde der Probenansatz in ein 10 ml Messkolben überführt und mit Methanol aufgefüllt.

SPE (RP-Phase, Strata-X, Phenomenex)

Die Konditionierung der Strata-X-Kartuschen erfolgte mit jeweils 6 ml Methanol und 6 ml Wasser. Auf die vorbereiteten Säulen wurden anschließend 9 ml der Probelösung aufgegeben. Zur Aufreinigung der Analyten wurde das Sorbens mit 6 ml Methanol/Wasser (90:10 [v/v]) und 6 ml Methanol/Wasser (50:50 [v/v]) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 x 3 ml Isopropanol von den zuvor unter Stickstoffstrom getrockneten Säulen. Das Eluat wurde bei 36 °C unter Argon-Strom getrocknet.

Derivatisierung

Der erhaltene Extrakt wurde in 1 ml Ethylacetat gelöst, homogenisiert und zentrifugiert. Von der überstehenden Lösung wurden 900 µl mit 50 µl PTAD-Lösung (35 mg/ml Ethylacetat) versetzt und 30 min bei RT derivatisiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol und 20 min Reaktionszeit (RT) erfolgte das Abdampfen des Lösungsmittels unter Argon-Strom. Nach erneutem Lösen mit Laufmittel B wurde der klare Überstand am LC-MS/MS (ESI, positive) vermessen.

10.3.2 HPLC-Parameter

Parameter	Bedingung
Trennsäule	Knauer Eurospher-5 C18 H 250 x 4,6 mm + Vorsäule
Laufmittel	A: H ₂ O + 0,1 % Ameisensäure B: MeOH + 0,1 % Ameisensäure
Fluss	1,0 ml/min
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µl
Gradient	40/60 $\xrightarrow{20'}$ 5/95 $\xrightarrow{15'}$ 0/100 (20') $\xrightarrow{5'}$ 40/60 (15')
Dauer	75 min

10.3.3 MS/MS-Parameter

Parameter	Bedingung
Curtain Gas	40 psi
Temperature	400 °C
Gas 1	60 psi
Gas 2	60 psi
Collision Gas	medium
Ion Spray Voltage	5.500 V
Detection	sMRM-Mode

10.3.4 MS/MS-Übergänge der derivatisierten D-Vitamer

Siehe 10.2.3, Seite 113 f., mit veränderten Retentionszeiten

10.3.5 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen in Blutserum

Analyt	NWG [ng/ml]	NWG [µg/100 g]	EG [ng/ml]	EG [µg/100 g]	BG [ng/ml]	BG [µg/100 g]	Ref.-wert [ng/ml]	Literatur
D ₃	14	1,5	28	3,0	47	5,0	8,1 ± 4,8 2,3 ± 1,6*	[101] [158]*
D ₂	17	1,8	34	3,6	57	6,1	1,2 ± 1,4*	[158]*
(24R)- 24,25(OH) ₂ D ₃	0,7	0,1	1,3	0,1	2,2	0,2	2,83 ± 7,1 % 3,5 ± 1,4*	[138] [158]*
25(OH)D ₃	0,4	0,04	0,8	0,1	1,4	0,2	16,2 ± 72,3 % 27,6 ± 9,2*	[138] [158]*
25(OH)D ₂	13	1,4	27	2,9	44	4,7	0,3 ± 7,7 % 3,9 ± 3,1*	[138] [158]*
1α,25(OH) ₂ D ₃	1,1	0,1	2,2	0,2	3,6	0,4	0,018 ± 23 % 0,031 ± 0,009*	[138] [158]*
1α,25(OH) ₂ D ₂	4,0	0,4	7,1	0,8	12	1,3	k. A.	-
Ergosterol	25	2,7	50	5,3	84	9,0	k. A.	-
7-DHC	2,2	0,2	4,3	0,5	7,2	0,8	3810 ± 1480	[159]

*in Plasma

k. A. keine Angaben

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nicole Seeburg
Geburtsdatum: 01. Februar 1985
Geburtsort: Merseburg

Beruflicher Werdegang

seit 11/2013 Stellvertretende Laborleiterin bei LEUNA-Tenside GmbH in Leuna

Wissenschaftlicher Werdegang

06/2010 - 06/2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotion
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie
Lebensmittel- und Umweltchemie
Betreuung durch: Prof. Dr. Marcus A. Glomb

Bildungsweg

06/2009 - 05/2010 Ausbildung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin
(2. Staatsexamen)
Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Lebensmittelinstitut Braunschweig

10/2004 - 04/2009 Studium der Lebensmittelchemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: 1. Staatsexamen, Diplomlebensmittelchemikerin
Titel der Diplomarbeit: „Isolierung und Reaktion von Anthocyanen aus Wein“

1995 - 2004 Domgymnasium Merseburg
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

12 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation „Entwicklung, Validierung und Anwendung einer Methode zur Vitamin D-Analytik in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Halle (Saale), den 09.07.2014

Nicole Seeburg