

# Dietary folates in human nutrition : analysis, intake, bioavailability and association with colorectal cancer

Citation for published version (APA):

Konings, E. J. M. (2001). *Dietary folates in human nutrition : analysis, intake, bioavailability and association with colorectal cancer*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20010914ek>

## Document status and date:

Published: 01/01/2001

## DOI:

[10.26481/dis.20010914ek](https://doi.org/10.26481/dis.20010914ek)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

Folic acid does not occur naturally in foods in significant amounts. It is the common, most stable, synthetic form used in supplements or food fortification. Natural folates comprise an extended family of mono- and polyglutamates of pteric acid, which qualitatively exhibit the biological activity of folic acid. The pteridine ring is reduced to give the 7,8-dihydrofolate and subsequently 5,6,7,8-tetrahydrofolate. These reduced forms can be substituted with a covalently bonded one-carbon adduct attached to the nitrogen positions 5 or 10, or bridged across these two positions. Besides tetrahydrofolate, the most substituted forms in the human diet are: 5-formyl, 10-formyl, 5-methyl. Other frequently occurring folates are 10-formyldihydrofolate and 10-formylfolic acid. Approximately 80% of all food folates exist as polyglutamates, which need to be cleaved into folate monoglutamates by pteroylpolyglutamate hydrolase (conjugase), present in the intestinal brush border, before they can be absorbed in the intestine. Certain factors in food, like dietary fiber and certain organic acids in for example orange juice, may inhibit the deconjugation of polyglutamates.

There are a number of important processes in which folates play a significant role in human health (**Chapter 1**). The folate-mediated transfer of one-carbon units from serine provides a major source of substrate in the one-carbon metabolism. Folate coenzymes play a role in the synthesis of thymidylate and purines, which are building blocks for RNA and DNA. The conversion of homocysteine to methionine, involves both a vitamin B<sub>12</sub> coenzyme and 5-methyltetrahydrofolate as substrates.

The RDA for folate in the Netherlands is currently 200-300 µg/d for adults, 40-60 µg/d for children, and 400 µg folic acid per day for pregnant women or women capable of becoming pregnant.

A number of diseases are associated with folate metabolism. Folic acid plays a role in the prevention of neural tube defects. It was estimated that adequate intake of folic acid (400µg/day) by women capable of becoming pregnant would reduce the prevalence of neural tube defects in The Netherlands with about 60%. Several studies have shown that cardiovascular disease risk is associated with high levels of plasma homocysteine. Increased intake of folic acid as well as food folates was found to decrease the plasma homocysteine level. Cancer of the colon and the rectum is the fourth most common incident cancer and cause of death from cancer throughout the world. An estimated 875,000 cases occurred in 1996, accounting for 8.5% of all new cases of cancer. Incidence of and death rates from this cancer are generally increasing, most of all in the developed world and in urban areas of the developing world. Colorectal cancer is thought to be modified mainly by food and nutrition (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer

Research 1997). The following mechanisms may play a role in these processes. Folate deficiency causes massive incorporation of uracil into human DNA, which may result in the initiation of neoplastic transformation. In addition reduced methylation of DNA has been observed in human colorectal cancer, possibly due to a low folate intake. A mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in combination with folate intake may also play a positive or negative role regarding colorectal cancer.

When dietary folate intake is assessed, which is needed to study associations with diseases, a number of problems are encountered. Firstly, no up-to-date folate data were available in the Dutch food composition table. Secondly, differences in analytical methods and sample preparation are thought to be the most crucial factors impeding an accurate determination of dietary folate intake when data of foreign food consumption tables are used. This thesis addresses a number of these emerging issues, before finally investigating the association between dietary folate intake and colorectal cancer risk.

The microbiological methods commonly used for folate analysis can only quantify total folate. Certain non-folate compounds may either stimulate or inhibit bacterial growth, resulting in unreliable data. Above all, the apparent reduced bioavailability of polyglutamates compared to monoglutamates, as well as the possible difference in bioavailability of different folate vitamers, indicate the need for a validated method for the analysis of individual folate vitamers in foods, so that associations with diseases can be studied as accurate as possible.

For the determination of folates in foods in this study a liquid chromatographic (HPLC) method was elaborated (**Chapter 2**). Folates were extracted by homogenizing in buffer and heat treatment. A portion was incubated with an enzyme preparation. After purification by affinity chromatography, folate monoglutamates were determined by reversed-phase LC with fluorescence and diode array detection. The most abundant folate forms naturally present in foods were detected, including tetrahydrofolic acid, 5-methyltetrahydrofolic acid, and 5-formyltetrahydrofolic acid. 10-Formylfolic acid could be detected by applying a second fluorescence detector. Folic acid, used for fortification, might also be quantified with this system. The difference between folate concentrations in sample extracts, with and without treatment of conjugase, is a measure of the quantity of polyglutamates in the food matrixes. An additional treatment with conjugase, amylase, and protease reflects the amount of matrix-bound folates. Repeatability relative standard deviation values for separate folates in 4 Certified Reference Materials (CRMs): mixed vegetables (CRM 485), pig liver (CRM 487), whole-meal flour (CRM 121) and milk powder (CRM 421) varied from 3.3 to 21.0% for the concentration range 1.8-1440 µg/100g. Recoveries ranged from 73-109%. Use of

amylase and protease was advantageous. Use of a commercially available folate-binding protein for cleanup saved time and money and was effective. Results for 5-methyltetrahydrofolic acid were in good agreement with results obtained with other LC methods. Results for total folates were lower than results obtained with microbiological methods.

The purposes of the second study (**Chapter 3**) were first to analyze 125 of the most important foods that contribute to folate intake in the Netherlands and second to estimate the folate intake of a representative sample of the Dutch population. The folate content of particularly vegetables, fruit, potatoes, bread, milk and milk products, and meat and meat products were analyzed by using the newly developed HPLC trienzyme method combined with an affinity chromatography cleanup step. These results were then used to estimate the folate intake of persons aged 1-92 who participated in the second Dutch National Food Consumption Survey (DNFCS) in 1992 (n=6218). The newly compiled data comply with specific quality criteria for analytical methods, analytical quality control, sample handling and sampling plan, to produce high quality food folate composition data. Total folate amounts in foods analyzed by HPLC were approximately 25% lower than amounts listed in recent food composition tables estimated by use of the microbiological method. However, this was not statistically significant for all tables. The most important folate vitamer in all food categories was 5-methyltetrahydrofolate (62%). Tetrahydrofolate was present in liver and liver products in significant amounts (40%). Of all vitamers 71% was present as polyglutamates. The mean dietary folate intake of the DNFCS according to the current food composition tables, based on microbiological food folate data, was  $251 \pm 97 \mu\text{g/d}$ . The mean dietary folate intake, based on the new HPLC data was  $182 \pm 119 \mu\text{g/d}$ . The mean daily dietary folate intake for participants aged  $\geq 16\text{y}$  was  $193 \pm 112 \mu\text{g/d}$  (n=4777, 95<sup>th</sup> percentile:  $319 \mu\text{g/d}$ ; men:  $215 \pm 120 \mu\text{g/d}$ ; women:  $173 \pm 100 \mu\text{g/d}$ ). The mean dietary folate intake for participants  $< 16\text{y}$  was  $130 \pm 64 \mu\text{g/d}$  (n=1419), whereas the intake for pregnant women was  $187 \pm 62 \mu\text{g/d}$  (n=58). Nobody used folic acid containing supplements. Total intake of supplement users (n=86) was  $344 \mu\text{g/d}$ , with  $147 \mu\text{g/d}$  originating from supplements. On the basis of these findings 42% of men and 54% of women do not meet current Dutch recommendations of  $60 \mu\text{g/d}$  for children and  $200 \mu\text{g/d}$  for adults. However, 4% of adult men and 11% of adult women consumed less than the minimum requirement of  $100 \mu\text{g/d}$ . The current recommended intake of 200 g vegetables and 2 pieces of fruit a day should ensure a folate intake of more than  $100 \mu\text{g/d}$  for everyone. Many foods with high folate contents, such as broad beans, spinach, Brussels sprouts, and broccoli do not rank high in actual dietary folate intake because of their low consumption rate. Furthermore, based on analytical results strawberries, leek, cauliflower, asparagus, kale, endive, kiwi and orange are

rich sources of folate. Increased consumption of these products could be recommended to enhance folate intake.

The study described in **chapter 4** was designed to determine the bioavailability of the different natural folates in healthy ileostomy volunteers (N=11). Up till now the bioavailability of food folate in relation to folic acid is supposed to be 50%. Our understanding of possible causes for this poor bioavailability is incomplete. Factors that might affect folate availability are: intestinal deconjugation, intestinal stability, drugs, and food containing brush border conjugase inhibitors. In this study a single-dose short-term protocol was used. The most important issues concern the deconjugation process as a possible limiting factor in the absorption of folates. The use of ileostomy volunteers gave us the possibility to validate the use of the area under the serum response curve (AUC) from food compared to folic acid as a proxy variable for food folate bioavailability. In this study spinach was selected as food matrix based on the fact that total folate concentration is high, it is an excellent source of various folate vitamers, and in vitro experiments have indicated that spinach components inhibit human conjugase. Based on analysis of test meals and ileostomy effluents, there was no difference in folate absorption between spinach with a mono-/polyglutamate ratio of 40:60 and the same spinach with a 100:0 ratio. Vitamers present in cooked spinach were 5-methyltetrahydrofolate, 10-formyldihydrofolate and 10-formylfolic acid. In contrast the general accepted level of 50% absorption based on one study, the actual absorption levels were 89%, 88% and 74% respectively. Supplemental folic acid was absorbed for 91%.

The results from this study revealed that the bioavailability of spinach folate is approximately 90% of that of synthetic folic acid. Recently, another study showed that the bioavailability of folate from vegetables and citrus fruits was higher than 50% relative to folic acid. We found 25-30% lower total folate values compared to levels listed in the current food composition tables. If intake levels of food folate are assumed to be 25-30% higher in the up to now described studies, the bioavailability relative to folic acid decreases by the same percentage. Based on these data, it can be concluded that the bioavailability of food folate is higher than 50%.

After consumption of the spinach meals and the folic acid supplements, comparable AUCs were found. According the amount of folic acid/folates absorbed, the AUC from the supplement was expected to be approximately 45% higher than the AUCs from spinach. This suggests a metabolic difference between uptake and clearance of dietary folates and synthetic folic acid. This suggestion is supported by the fact that unmetabolized folic acid was found in the serum. Results from this study revealed that the absolute bioavailability of spinach folate (78%) calculated from the difference between folate intake and folate content of ileostomy effluents was not equal to the relative bioavailability (114%), calculated from AUCs

after consumption of spinach meals in relation to AUCs after consumption of the folic acid supplement. This means that comparing AUCs of food folate versus supplemental folic acid may not be suitable for assessing relative food folate bioavailability. It would be interesting to compare the spinach AUCs with an AUC after the intake of 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate, the most common natural source of folate.

Several studies have reported inverse associations between folate intake and colorectal cancer risk; very few were prospective studies however, and none examined the association between the intake of individual folate vitamers and colorectal cancer risk. The aim of the fourth study (**Chapter 5**) was to investigate the relationship between dietary folate intake and the risk of colon and rectal cancer in a large prospective cohort study in the Netherlands among 120,852 men and women aged 55-69 y, named the Netherlands Cohort on diet and cancer (NLCS). This study was started in 1986. At baseline, all participants completed a questionnaire on habitual dietary intake, dietary supplement use, lifestyle characteristics, medical history and other potential risk factors for cancer. Follow-up for incident cancer was established by record linkage with all regional cancer registries in The Netherlands and the national pathology register. After 7.3 years of follow-up, 760 colon and 411 rectal cancer cases were available for analysis. Data processing and analysis used the case-cohort approach, which means that cases were gathered from the entire cohort, whereas the accumulated person years in the cohort and intake were estimated from a subcohort sample consisting of 3500 subjects. The new Dutch database (chapter 3) was used to estimate intakes of total and individual folates. Total folate intake for the subcohort was  $224 \pm 73$  µg/d for men and  $200 \pm 65$  µg/d for women. The most important vitamers which contributed to this intake was 5-methyltetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate for 60% and 11% respectively. Analyses adjusted for age, energy intake, family history of colorectal cancer, alcohol, vitamin C, iron and dietary fiber intake yielded an inverse association between colon cancer risk and total dietary folate intake (RR highest vs. lowest quintile, Men: 0.73; 95% CI, 0.46-1.17, P trend = 0.03; Women: 0.68; 95% CI, 0.39-1.20, P trend = 0.18). An inverse association between rectal cancer and total dietary folate intake was found only among men. (RR highest vs. lowest quintile, Men: 0.66; 95% CI, 0.35-1.21, P trend = 0.03).

Analyses for individual folates revealed that the associations of 5-methyltetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate corresponded best with the above associations regarding total folate intake. Results described in **Chapter 5** confirm the role of a reduced folate intake as a potential risk factor of colorectal cancer. Results revealed that dietary folate was significantly inversely related to colon cancer (and to male rectal cancer). This means that the use of folate-rich vegetables and fruits may reduce the risk of colorectal cancer and not necessarily folic acid from supplements. To date, it is not allowed in the Netherlands to fortify

foods with folic acid. For the time being, an intake of 200 g vegetables and 2 pieces of fruit daily is recommended to enhance intake of folate and other nutrients. This is approximately double the amount of fruit and vegetables found to be consumed in the Dutch National Food Consumption Survey (DNFCS) carried out in 1992. The current population-based fruit and vegetable intake accounts for approximately 50 µg folate. To calculate a possible risk reduction resulting from an additional folate intake of 50 µg/d, corresponding to the current recommendations of the Dutch Health Council, the association between folate intake and colon and rectal cancer risk was calculated per increment of 50 µg. The associations found in the present study suggest that an increase in folate intake of 50 µg/d might result in an approximately 10% reduction of the risk of colorectal cancer.

Our results, indicating a protective role of dietary folate, were confirmed by several other studies, mostly case-control studies. In these studies, dietary folate intake seemed to be inversely related to colorectal cancer, with a 35-40% risk reduction in those with the highest folate intake compared with those with the lowest intake. An inverse association between folate and colon and rectal cancer in the lower half of methionine intake seemed to be limited to men, although interaction was not statistically significant. A greater benefit of folate in the lower half of methionine intake would underline the role of folate in methionine synthesis. An insufficient folate level combined with low methionine intake might result in inadequate DNA methylation, leading to a greater risk of colon cancer, as hypomethylation is regarded as one of the earliest events in colon carcinogenesis.

Although there is evidence of subsite-specific differences in colon cancer risk associated with vegetable consumption, this was not observed for folate intake, suggesting that another component in vegetables might be responsible for this effect.

A protective effect of folate and methionine against colorectal cancer may be impaired by high alcohol consumption since alcohol acts as a methyl-group antagonist. In our study it was found that men who use a low-methyl diet (low folate-low methionine and high alcohol) were almost three times as likely to develop rectal cancer as men who on a high-methyl diet. This antagonism was less pronounced for colon cancer, however.

Intervention studies are currently underway to investigate whether homocysteine lowering therapies with folic acid lead to a decrease in cardiovascular disease. There are three large, randomized, double blind, placebo-controlled multi-center folate chemoprevention trials ongoing in the USA at present. Intervention trials should anticipate the possibility of using 5-methyltetrahydrofolate, which is the most abundant folate vitamers in foods. The use of 5-methyltetrahydrofolate could also overcome the drawback of folic acid, viz. that it masks vitamin B<sub>12</sub> deficiency.

# Samenvatting

Foliumzuur komt in voedingsmiddelen van nature niet in grote hoeveelheden voor. Het is de meest stabiele synthetische vorm die wordt toegepast bij de verrijking van levensmiddelen en voedingssupplementen. Deze vorm wordt in de Engelstalige literatuur aangeduid als "folic acid". Natuurlijk voorkomende foliumzuurverbindingen omvat een uitgebreide groep van mono- en polyglutamaten van pterinezuur, die kwalitatief gezien dezelfde biologische activiteit bezitten als foliumzuur. Deze groep wordt in de Engelstalige literatuur aangeduid als "folates". De pteridineringsring wordt gereduceerd naar 7,8-dihydrofoliumzuur en vervolgens naar 5,6,7,8-tetrahydrofoliumzuur. Deze gereduceerde vormen kunnen gesubstitueerd zijn met een covalent gebonden koolstofverbinding aan de stikstofpositie 5 en/of 10. Naast tetrahydrofoliumzuur, komen de volgende gesubstitueerde vormen het meest in voeding voor: 5-formyltetrahydrofoliumzuur, 10-formyltetrahydrofoliumzuur, 5-methyltetrahydrofoliumzuur. Andere veel voorkomende foliumzuurverbindingen zijn 10-formyldihydrofoliumzuur en 10-formylfoliumzuur. Ongeveer 80% van alle foliumzuurverbindingen in de voeding komen voor als polyglutamaten die gesplitst moeten worden in foliumzuurmonoglutamaten door pteroylpolyglutamaathydrolase (conjugase), aanwezig in de darmwand, alvorens ze kunnen worden opgenomen in de dunne darm. Bepaalde componenten in levensmiddelen zoals voedingsvezel en organische zuren in bijvoorbeeld sinaasappelsap remmen mogelijk de deconjugatie van polyglutamaten.

Er zijn een aantal humaan fysiologische processen waarbij foliumzuur een rol speelt (**Hoofdstuk 1**). Serine wordt omgezet in één-koolstof eenheden onder invloed van foliumzuur. Deze verbindingen vormen een voorraad reactieve koolstofgroepen die bij de meest uiteenlopende processen gebruikt kunnen worden. Zo spelen deze verbindingen een rol bij de synthese van purine- en pyrimidine-verbindingen, die de basen leveren welke als bouwstenen voor DNA en RNA belangrijk zijn voor de synthese van celkernmateriaal. Bij de omzetting van homocysteïne naar methionine zijn een vitamine B<sub>12</sub>-coenzym en 5-methyltetrahydrofoliumzuur betrokken als substraat.

De aanbevolen dagelijkse hoeveelheid (ADH) voor foliumzuur is in Nederland momenteel 200-300 µg/dag voor volwassenen, 40-60 µg/dag voor kinderen en 400 µg synthetisch foliumzuur voor zwangeren en vrouwen met een zwangerschapswens.

Een aantal aandoeningen worden geassocieerd met het foliumzuurmetabolisme. Foliumzuur speelt een belangrijke rol bij de preventie van neuraalbuis defecten



oftewel "open ruggetje". Er wordt geschat dat bij een adequaat foliumzuurgebruik door vrouwen met een zwangerschapswens (400 µg/dag) de prevalentie van neuraalbuis defecten zou verminderen met ongeveer 60%. Een aantal studies hebben laten zien dat het risico op hart- en vaatziekten wordt geassocieerd met hoge homocysteïne gehalten in het bloed. Een verhoogde inname van foliumzuur, zowel als voedingsfoliumzuur of als synthetisch foliumzuur, laten een daling van dat homocysteïne gehalte in het bloed zien. Darmkanker is de vierde meest voorkomende vorm van kanker in de wereld. Ongeveer 875.000 nieuwe gevallen werden geconstateerd in 1996. Dit komt neer op 8,5% van alle nieuwe gevallen van kanker. De incidentie en sterfte naar aanleiding van darmkanker nemen over het algemeen toe, voornamelijk in de westerse wereld en de dichtbevolkte steden van de ontwikkelingslanden. Darmkanker is een aandoening waarvan gedacht wordt dat het risico wordt verhoogd door de voeding (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research). De volgende mechanismen kunnen in dit proces een rol spelen. Een tekort aan foliumzuur zorgt voor een toegenomen inbouw van uracil in DNA, dat kan resulteren in neoplastische transformatie. Verder wordt een verminderde methylering van DNA geconstateerd bij darmkanker van de mens. Dit is mogelijk het gevolg van een tekort aan foliumzuur. Een mutatie in het methyleentetrahydrofoliumzuur-reductase (MTHFR) gen speelt mogelijk in combinatie met de foliumzuurinname een positieve en/of negatieve rol met betrekking tot darmkanker.

Het bepalen van de inname van foliumzuur via de voeding, die nodig is om de associatie met ziekte te bestuderen, is problematisch. Ten eerste zijn er geen up-to-date gegevens van foliumzuur beschikbaar in de Nederlandse Voedingsmiddelentabel. Ten tweede, verschillen in analytische methoden en monstervoorbereiding van gegevens uit buitenlandse voedingsmiddelentabellen zijn de meest cruciale factoren die een nauwkeurige berekening van de foliumzuurinname verhinderen. In deze dissertatie zijn een aantal voornoemde problemen uitgewerkt alvorens de associatie tussen de inname van foliumzuur via de voeding en het risico op dikke darm- en endeldarmkanker kon worden onderzocht.

Microbiologische methoden die over het algemeen worden toegepast in de foliumzuuranalyse kunnen alleen totaal foliumzuur kwantificeren. Mogelijk kunnen andere componenten in de voeding de bacteriële groei remmen of juist stimuleren. Dit resulteert in onbetrouwbare gegevens. Bovenal, de vermeende gereduceerde biologische beschikbaarheid van foliumzuurpolyglutamaten ten opzichte van foliumzuurmonoglutamaten alsook het mogelijk verschil in biologische beschikbaarheid van de verschillende foliumzuurvitameren, tonen de behoefte aan van een gevalideerde analysemethode voor de individuele foliumzuurvitameren in

voedingsmiddelen, zodat associates met aandoeningen zo specifiek mogelijk kunnen worden bestudeerd. Voor de analyse van foliumzuur in voedingsmiddelen werd in dit onderzoek een vloeistofchromatografische (HPLC) methode ontwikkeld (**Hoofdstuk 2**). Foliumzuur werd geëxtraheerd door homogenisatie en verwarmen in buffer. Een gedeelte werd geïncubeerd met een mengsel van enzymen. Na zuivering van de extracten met behulp van affiniteitschromatografie werden foliumzuurmonoglutamaten geanalyseerd met reversed-phase chromatografie met fluorescentie en diode-array detectie. De meest voorkomende foliumzuurverbindingen in de voeding werden bepaald: tetrahydrofoliumzuur, 5-methyltetrahydrofoliumzuur en 5-formyltetrahydrofoliumzuur. 10-Formylfoliumzuur werd gedetecteerd met een tweede fluorescentiedetector. Synthetisch foliumzuur kon ook gekwantificeerd worden met dit systeem. Het verschil in foliumzuurconcentratie in de monsterextracten die wel en niet geïncubeerd werden met conjugase, was een maat voor de hoeveelheid foliumzuurpolyglutamaat in de voedingsmatrix. Een aanvullende behandeling met conjugase, amylase en protease gaf de hoeveelheid matrix-gebonden foliumzuur weer. De herhaalbaarheid voor de individuele foliumzuurvitameren in 4 gecertificeerde referentiematerialen (CRMs): gemengde groente (CRM 485), varkenslever (CRM 487), volkorenmeel (CRM 121) en melkpoeder (CRM 421) varieerde van 3.3 tot 21.0% voor het concentratiebereik van 1.8-1440  $\mu\text{g}/100\text{g}$ . Recoveries varieerden van 73-109%. Het gebruik van amylase en protease was zinvol. Gebruik van commercieel verkrijgbaar foliumzuur-bindend-eiwit voor de zuivering van extracten spaarde tijd, geld en was tevens effectief. Resultaten voor 5-methyltetrahydrofoliumzuur kwamen goed overeen met waarden die gevonden waren in andere vloeistofchromatografische onderzoeken. Resultaten voor totaal foliumzuur met behulp van vloeistofchromatografie waren over het algemeen lager dan de gehalten die gekwantificeerd zijn door microbiologische analysemethodes.

Het doel van de tweede studie (**Hoofdstuk 3**) was ten eerste: de analyse van de 125 meest belangrijke voedingsmiddelen die een bijdrage leveren aan de foliumzuurinname in Nederland en ten tweede: het schatten van de foliumzuurinname voor een representatieve steekproef van de Nederlandse bevolking. De foliumzuurgehaltes in met name groente, fruit, aardappelen, brood, melk- en melkproducten en vlees- en vleesproducten werden geanalyseerd aan de hand van de nieuw ontwikkelde HPLC-methode. Deze resultaten zijn vervolgens gebruikt om de foliumzuurinname te schatten van personen in de leeftijd van 1-92 jaar die deelnamen aan de tweede Nederlandse Voedselconsumptiepeiling (VCP) in 1992 ( $n=6218$ ). De nieuw geanalyseerde gehalten voor voedingsfoliumzuur kwamen overeen met specifieke kwaliteitscriteria gesteld voor analytische methodes, analytische kwaliteitscontrole, monsterbehandeling en monsterplan. De totale hoeveelheid foliumzuur,

geanalyseerd aan de hand van HPLC, was ongeveer 25% lager dan de hoeveelheden in de huidige voedingsmiddelentabellen, die vastgesteld zijn aan de hand van microbiologische analysemethoden. Dit resultaat was echter niet significant voor alle voedingsmiddelentabellen. De belangrijkste vitamine die in alle categorieën van producten voorkwam is 5-methyltetrahydrofoliumzuur (62%). Verder kwam tetrahydrofoliumzuur in aanzienlijke hoeveelheden voor in met name in lever- en leverproducten (40%). Van alle vitameren kwam 71% voor als polyglutamaat. De gemiddelde voedingsfoliumzuurinnname, voor deelnemers aan de VCP, op basis van de huidige voedingsmiddelentabellen met microbiologische analysegegevens was  $251 \pm 97$  µg/dag. De gemiddelde voedingsfoliumzuurinnname op basis van de nieuwe HPLC gegevens was  $182 \pm 119$  µg/dag. Voor de leeftijd  $\geq 16$  jaar was de innname gemiddeld  $193 \pm 112$  µg/dag ( $n=4777$ , 95<sup>ste</sup> percentiel: 319 µg/dag; mannen:  $215 \pm 120$  µg/dag; vrouwen:  $173 \pm 100$  µg/dag). De gemiddelde voedingsfoliumzuurinnname voor personen  $< 16$  jaar was  $130 \pm 64$  µg/dag ( $n=1419$ ). De gemiddelde voedingsfoliumzuurinnname voor zwangeren was  $187 \pm 62$  µg/dag ( $n=58$ ). Niemand van hen gebruikte supplementen met foliumzuur. Dagelijkse foliumzuurinnname voor supplementgebruikers ( $n=86$ ) was 344 µg, waarvan 147 µg afkomstig was van supplementen. Op basis van deze gegevens voldoen 42% van de mannen en 54% van de vrouwen niet aan de Nederlandse aanbevelingen van 60 µg/dag voor kinderen en 200 µg/dag voor volwassenen. Echter, 4% van de volwassen mannen en 11% van de volwassen vrouwen hadden een innname die lager was dan de minimum behoefte van 100 µg/dag. De huidige aanbeveling van 200 gram groente en 2 stuks fruit zal een minimale innname van 100 µg/dag voor iedereen zeker stellen. Een aantal voedingsmiddelen die rijk zijn aan foliumzuur, zoals tuinbonen, spinazie, spruitjes en broccoli, scoren niet hoog in de bijdrage aan de foliumzuurinnname omdat ze weinig gegeten werden. Verder is naar aanleiding van de analyseresultaten gebleken dat aardbeien, prei, bloemkool, asperges, boerenkool, andijvie, kiwi en sinaasappel rijke bronnen van foliumzuur zijn. Een verhoogd gebruik van dergelijke producten zou aanbevolen moeten worden om de foliumzuurinnname te verhogen.

De studie die in **hoofdstuk 4** is beschreven, was opgezet om de biologische beschikbaarheid van verschillende foliumzuurvitameren nader te onderzoeken bij gezonde vrijwilligers ( $n=11$ ) met een ileostoma. Tot op heden wordt verondersteld dat de biologische beschikbaarheid van voedingsfoliumzuur 50% is ten opzichte van synthetisch foliumzuur. Kennis over de mogelijke oorzaken van die gereduceerde biologische beschikbaarheid is niet compleet. Factoren die mogelijk de biologische beschikbaarheid van foliumzuur uit voeding beïnvloeden zijn: deconjugatie in de dunne darm, stabiliteit in de darm, geneesmiddelen en conjugaseremmers uit voedingsmiddelen.

In deze studie is gebruik gemaakt van een enkele dosering korte termijn protocol. De belangrijkste kwesties die onderzocht zijn hebben te maken het deconjugatieproces als mogelijk limiterende factor in de absorptie van foliumzuur uit spinazie. Door gebruik te maken van proefpersonen met een ileostoma gaf de studie de gelegenheid om het gebruik van het oppervlak onder de serumresponscurve (AUC) van voedingsfoliumzuur ten opzichte van synthetisch foliumzuur te valideren als maat voor de biologische beschikbaarheid van voedingsfoliumzuur. Spinazie werd uitgekozen als voedingsmatrix omdat het foliumzuurgehalte hoog was en uit resultaten van in vitro studies bleek dat door componenten uit spinazie de activiteit van humaan conjugase geremd werd. Op basis van de analyse van testmaaltijden en stomavloeistoffen kon worden geconcludeerd dat er geen verschil was in de absorptie van foliumzuur uit spinazie met een mono-/polyglutamaat ratio van 40:60 en een vergelijkbare spinazie met een ratio van 100:0. De verschillende foliumzuurvitameren in spinazie zijn 5-methyltetrahydrofoliumzuur, 10-formyldihydrofoliumzuur en 10-formylfoliumzuur. In tegstelling tot de in het algemeen geaccepteerde voedingsfoliumzuurabsorptie van 50% was de absorptie van deze afzonderlijke verbindingen respectievelijk 89%, 88% en 74%. Foliumzuur uit een supplement werd voor 91% geabsorbeerd.

De resultaten van deze studie lieten zien dat de biologische beschikbaarheid van foliumzuur in spinazie ongeveer 90% was ten opzichte van synthetisch foliumzuur. Recent liet een andere studie zien dat de biologische beschikbaarheid van foliumzuur uit groente en citrusfruit >50% was ten opzichte van synthetisch foliumzuur. In ons onderzoek waren 25-30% lagere waarden gevonden voor het totaal foliumzuurgehalte in voedingsmiddelen als deze werden vergeleken met waarden uit bestaande voedingsmiddelentabellen. Als in de tot nu toe beschreven biologische beschikbaarheidstudies verondersteld wordt dat de inname van voedingsfoliumzuur 25-30% hoger zijn, op basis van gegevens in de bestaande voedingsmiddelentabellen, dan daalt de veronderstelde relatieve biologische beschikbaarheid ten opzichte van synthetisch foliumzuur met 25-30%. Op basis van deze gegevens kan geconcludeerd worden dat de biologische beschikbaarheid van voedingsfoliumzuur hoger is dan de tot nu toe veronderstelde 50%.

Na consumptie van spinazie en de foliumzuursupplementen werden vergelijkbare AUCs gevonden. Op basis van de geabsorbeerde hoeveelheden foliumzuur uit spinazie en synthetisch foliumzuur werd verwacht dat de AUC na inname van het foliumzuursupplement ongeveer 45% hoger zou moeten zijn dan de AUCs na de consumptie van spinazie. Dit suggereert een metabolisch verschil tussen de opname en klaring van voedingsfoliumzuur en synthetisch foliumzuur. Deze suggestie werd ondersteund door het feit dat er ongemetaboliseerd foliumzuur wordt aangetroffen in serum. Resultaten van deze studie lieten zien dat de absolute biologische beschikbaarheid van spinaziefoliumzuur (78%), berekend

uit het verschil tussen foliumzuurinnname en foliumzuurgehalte in de stomavloeistoffen niet gelijk was aan de relatieve biologische beschikbaarheid (114%), berekend op basis van de AUCs na consumptie van spinazie ten opzichte van de AUCs na inname van het foliumzuursupplement. Dit betekent dat vergelijking van AUCs van voedingsfoliumzuur versus synthetisch foliumzuur niet geschikt is voor de bepaling van de relatieve biologische beschikbaarheid. Het zou interessant zijn om de AUCs na de consumptie van spinazie te vergelijken met een AUC na de inname van 5-methyltetrahydrofoliumzuur, de meest van nature voorkomende vitameer.

Verschillende studies hebben inverse associaties aangetoond tussen foliumzuurinnname en het risico op darmkanker. Echter, zeer weinig studies hadden een prospectief karakter en geen studie onderzocht de associatie tussen de inname van individuele foliumzuurvitameren en het risico op darmkanker. Het doel van de vierde studie (**Hoofdstuk 5**) was om de relatie te onderzoeken tussen de inname van foliumzuur via de voeding en het risico op darmkanker. Daarbij werd onderscheid gemaakt in dikke darm- en endeldarmkanker. Deze studie werd uitgevoerd aan de hand van een grote Nederlandse prospectieve cohortstudie onder 120.852 mannen en vrouwen in de leeftijd van 55-69 jaar, genoemd de Nederlandse Cohortstudie naar voeding en kanker (NLCS). Deze studie is gestart in 1986. Aan de hand van een voedselfrequentielijst werden voedingsgewoonten van een jaar voor de start van de NLCS vastgelegd. Er werd ook gevraagd naar het gebruik van voedingssupplementen, leefstijl, medische geschiedenis en andere potentiële risicofactoren voor kanker. Door koppeling van NLCS-gegevens met de kankerregistratie en het pathologieregister werden er na 7,3 jaar follow-up 760 gevallen van dikke darmkanker geconstateerd en 411 gevallen van endeldarmkanker. Gegevensverwerking en analyse heeft plaatsgevonden aan de hand van de zogenaamde 'patiënt-cohort' benadering. Dit betekent dat patiënten werden verzameld uit het gehele cohort en gegevens als inname en opgebouwde persoonsjaren geschat werden aan de hand van een subcohort van 3500 personen. De nieuwe voedingsmiddelentabel met foliumzuurgegevens uit hoofdstuk 3 was gebruikt om de inname van totaal en individuele foliumzuurvitameren vast te stellen. De inname voor totaal foliumzuur in het subcohort was voor mannen  $224 \pm 73 \mu\text{g}/\text{dag}$  en voor vrouwen  $200 \pm 65 \mu\text{g}/\text{dag}$ . De belangrijkste vitameren die deel uit maakten van die inname waren 5-methyltetrahydrofoliumzuur en 5-formyltetrahydrofoliumzuur voor respectievelijk 60 en 11%. Na statistische correctie voor leeftijd, energie inname, darmkanker in de familie, alcohol consumptie en de inname van vitamine C, ijzer en voedingsvezel werd er een inverse associatie vastgesteld tussen het risico op dikke darmkanker en de inname van totaal foliumzuur (RR hoogste vs. laagste kwintiel, Mannen: 0,73; 95% CI, 0,46-1,17, P trend = 0,03; Vrouwen: 0,68; 95% CI, 0,39-1,20, P trend

= 0,18). Een inverse associatie tussen endeldarmkanker en totaal foliumzuuriname werd alleen berekend voor mannen (RR hoogste vs. laagste kwintiel: 0,66; 95% CI, 0,35-1,21, P trend = 0,03).

Analyse voor de individuele foliumzuurvitaminen liet zien dat de associaties van 5-methyltetrahydrofoliumzuur en 5-formyltetrahydrofoliumzuur het best overeenkwamen met de bovengenoemde associaties voor totaal foliumzuur. De resultaten die beschreven zijn in **hoofdstuk 5** bevestigen de rol van een lage foliumzuuriname als een potentiële risicofactor voor darmkanker. Het gebruik van foliumzuurrijke groente en fruit kan mogelijk het risico op het krijgen van darmkanker verlagen, en niet persé foliumzuur uit supplementen.

Tot nu toe is het niet toegestaan in Nederland om voedingsmiddelen te verrijken met foliumzuur. Voorlopig wordt een inname van 200 gram groente en 2 stuks fruit aanbevolen om de inname van foliumzuur, maar ook van andere nutriënten te verhogen. Dit is ongeveer het dubbele van de hoeveelheid die in feite geconsumeerd werd tijdens de tweede Nederlandse Voedselconsumptiepeiling in 1992. Die geconsumeerde hoeveelheid groente en fruit is goed voor een foliumzuuriname van ongeveer 50 µg per dag. Om een mogelijke risicovermindering te berekenen als gevolg van een extra portie groente en fruit, zoals geadviseerd wordt door de Nederlandse Gezondheidsraad, werd de associatie tussen de foliumzuuriname en het risico op dikke darm- en endeldarmkanker berekend per increment van 50 µg. De berekeningen in deze studie suggereren dat een toename in foliumzuuriname van 50 µg per dag via de voeding mogelijk resulteert in een afname van het risico op darmkanker met ongeveer 10%.

De resultaten van onze studie, die een beschermende rol aantonen voor voedingsfoliumzuur, worden bevestigd door verschillende andere studies, voornamelijk patiënt-controle onderzoeken. In die studies wordt meestal een inverse relatie gevonden tussen de inname van voedingsfoliumzuur en het risico op darmkanker, met een 35-40% daling van het risico bij personen met de hoogste foliumzuuriname ten opzichte van personen met de laagste foliumzuuriname.

Een hogere beschermende werking van foliumzuur bij de laagste methionine innames zou de rol van foliumzuur in de methioninesynthese onderstrepen. Een te lage foliumzuuriname gecombineerd met een lage methionine inname, zou kunnen resulteren in een verminderde DNA-methylering, dat op zich kan leiden tot een hoger risico op het krijgen van dikke darmkanker omdat hypomethylering gezien wordt als een van de eerste ontwikkelingen in dikke darm carcinogenese. Een inverse associatie tussen de foliumzuuriname en dikke darm- en endeldarmkanker bij de laagste inname van methionine leek in onze studie alleen voor te komen bij mannen, alhoewel de interactie statistisch niet significant was.

Alhoewel er in andere studies werd aangetoond dat er sublocalisatiespecifieke (proximale en distale dikke darm) verschillen zijn van het risico op dikke

darmkanker geassocieerd met groenteconsumptie, werd dit niet gevonden voor foliumzuur in onze studie. Dit suggereert dat een andere component in groente verantwoordelijk is voor dit effect.

Een beschermend effect van foliumzuur en methionine bij het ontstaan van darmkanker zou verstoord kunnen worden door hoge alcoholconsumptie, omdat alcohol zich gedraagt als een methylgroep antagonist. In onze studie werd aangetoond dat mannen met een laag-methylgroephoudende voeding (lage foliumzuuriname, lage methionine-inname en hoge alcoholconsumptie) een bijna drie maal zo groot risico hadden om endeldarmkanker te krijgen dan mannen met een hoog-methylgroephoudende voeding (hoge foliumzuuriname, hoge methionine-inname en een lage alcoholconsumptie). Dit antagonisme kwam minder tot uitdrukking bij dikke darmkanker.

Op dit moment zijn interventiestudies gaande die onderzoeken of homocysteïne verlagende therapieën door foliumzuur leiden tot een daling van het aantal hart- en vaatziekten. Er lopen tevens drie grote gerandomiseerde, dubbel blinde, placebo-gecontroleerde multicenter foliumzuur chemopreventie-onderzoeken in de Verenigde Staten. Mede op basis van onze studies is het aan te bevelen dat in interventiestudies eerder gebruik zou moeten worden gemaakt van 5-methyltetrahydrofoliumzuur, de meest van nature voorkomende vorm van foliumzuur. Het gebruik van deze vorm kan het nadelig effect van synthetisch foliumzuur, namelijk het maskeren van een vitamine B<sub>12</sub>-deficiëntie, voorkomen.