

Institut für Ernährungswissenschaft
Professur für Lebensmittelwissenschaften
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Analyse von Glucosinolaten und Isothiocyanaten
mittels Flüssigkeitschromatographie- bzw.
Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ (Dr. rer. nat.)
am Fachbereich 08 - Biologie und Chemie

gestellt von

Prof. Dr. Hans Brückner

vorgelegt von

Dipl. oec. troph. Kerstin Kübler

aus Bad Schussenried

Gießen, Juni 2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XV
1 Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1 Glucosinolate und deren Abbauprodukte	2
1.1.1 Struktur und chemische Eigenschaften.....	3
1.1.2 Glucosinolat-Biosynthese	6
1.1.3 Glucosinolat-Abbau und Bildung von Zerfallprodukten	8
1.2 Metabolismus der GSL und deren Abbauprodukten	12
1.2.1 Einfluss der Prozessierung von LM auf deren GSL-Gehalte.....	13
1.2.2 Bioverfügbarkeit von GSL und deren Metabolismus im Menschen.....	15
1.3 Physiologische Eigenschaften von GSL und deren Abbauprodukten	18
1.3.1 Positive Eigenschaften von GSL auf den menschlichen Organismus.....	18
1.3.2 Antinutritive und toxische Effekte auf den menschlichen Organismus.....	20
1.4 Lebensmittel mit wesentlichen Gehalten an GSL und ITCs	22
1.4.1 <i>Brassicaceae</i>	24
1.4.2 <i>Capparaceae</i>	30
1.4.3 <i>Moringaceae</i>	31
1.4.4 <i>Maca (Lepidium meyenii)</i>	32
1.5 Methodisches Vorgehen	33
2 Aufgabenstellung	37
3 Materialien und Proben	38

3.1	Geräte	38
3.1.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (HPLC) mit Elektronenspray-Ionisierungs-Massenspektrometer (HPLC/ESI-MS)	38
3.1.2	Gaschromatograph mit Massenspektrometer (GC-MS)	39
3.1.3	Weitere Geräte	40
3.2	Chemikalien	41
3.2.1	Festphasen	41
3.2.2	Weitere Chemikalien.....	41
3.3	Probenmaterial	43
3.3.1	Rucolaprogen	43
3.3.2	Kressen.....	43
3.3.3	Sprossen.....	44
3.3.4	Rettich und Radieschen.....	44
3.3.5	Speisesenf	45
3.3.6	Meerrettich und Wasabi	45
3.3.7	Kapern	46
3.3.8	<i>Moringa</i> -Proben.....	46
3.3.9	Nahrungsergänzungsmittel	46
4	Methodenentwicklung und -optimierung HPLC	47
4.1	Probenvorbereitung HPLC	47
4.1.1	Probenaufbereitung	47
4.1.2	Aufreinigung der Proben	47
4.1.3	Herstellung der Standards	49
4.2	Optimierung des chromatographischen Systems	49
4.3	Methoden HPLC	54
4.3.1	Methode 1 (Varian Polaris® C18-Ether)	54
4.3.2	Methode 2 (Phenomenex Luna® HILIC)	55
4.3.3	Massenspektrometrische Analyse	55

5	Methodenentwicklung und -optimierung GC	56
5.1	Probenvorbereitung GC	56
5.1.1	Aufarbeitung der frischen Lebensmittelproben	56
5.1.2	Aufarbeitung der pastösen Lebensmittelproben	56
5.1.3	Aufarbeitung der pulverförmigen Proben	57
5.1.4	Herstellung der Standards	57
5.2	Methode GC	58
6	Ergebnisse HPLC	59
6.1	Methodenvalidierung	59
6.1.1	Methodenvalidierung an Polaris [®] C18-Ether (Methode 1)	59
6.1.2	Methodenvalidierung an Luna [®] HILIC (Methode 2)	62
6.1.3	Massenspektrometrische Charakterisierung der Standards	64
6.2	Ergebnisse der HPLC-Analyse der Proben	66
6.2.1	Rucola	66
6.2.2	Kressen und Sprossen	68
6.2.3	Nahrungsergänzungsmittel	82
6.2.4	<i>Moringa</i> -Proben	87
7	Ergebnisse GC	91
7.1	Methodenvalidierung	91
7.1.1	Ermittlung der Korrekturfaktoren (Responsefaktoren)	92
7.1.2	Massenspektrometrische Bestimmung der Standards	93
7.2	Ergebnisse der GC-Analyse der Proben	94
7.2.1	Rucola	94
7.2.2	Kressen und Sprossen	95
7.2.3	Rettich und Radieschen	99
7.2.4	Senf, Meerrettich und Wasabi	101
7.2.5	Kapern	106
7.2.6	Nahrungsergänzungsmittel	106

8	Diskussion	110
8.1	Methodenvergleich HPLC	110
8.2	Methodenbeurteilung GC	112
8.3	Diskussion der Lebensmittelproben	114
8.3.1	Rucola.....	114
8.3.2	Kressen und Sprossen.....	117
8.3.3	Rettich und Radieschen.....	125
8.3.4	Speisesenf	126
8.3.5	Meerrettich und Wasabi	129
8.3.6	Kapern	135
8.3.7	Nahrungsergänzungsmittel	137
8.3.8	<i>Moringa</i> -Proben	144
9	Zusammenfassung	148
10	Literaturverzeichnis	152
	Anhang	169
	Eidesstattliche Erklärung	189
	Danksagung	190
	Lebenslauf	191
	Publikationen	192

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Grundstruktur der Glucosinolate mit aliphatischer, aromatischer und indolischer Seitenkette (R) (modifiziert nach WITTSTOCK und HALKIER 2002); Glc = Glucose	4
Abb. 1-2	Schematische Darstellung der Glucosinolat-Biosynthese aus Methionin (modifiziert nach PADILLA et al. 2007, MITHEN et al. 2000); R = Rest	6
Abb. 1-3	Bildung des GSL-Grundgerüsts (nach WITTSTOCK und HALKIER 2002); Glc = Glucose	7
Abb. 1-4	Hydolysewege von Glucosinolaten, ihre möglichen Abbauprodukte und hierbei relevante Einflussgrößen (modifiziert nach HALKIER und GERSHENZON 2006, GRUBB und ABEL 2006); Glc = Glucose	10
Abb. 1-5	Hydrolyse von Glucosinolaten zu Isothiocyanaten durch eine intramolekulare Lossen-Umlagerung (modifiziert nach SHIKITA et al. 1999); Glc = Glucose	11
Abb. 1-6	Abbau von GSL über Isothiocyanate zu Mercaptursäuren (nach VERMEULEN et al. 2003); Glc = Glucose	17
Abb. 1-7	Physiologische Eigenschaften von Glucosinolat-Abbauprodukten (modifiziert nach TERNES et al. 2005)	18
Abb. 1-8	Strukturformel von 4-Mercaptobutylglucosinolat (nach CATALDI et al. 2007); Glc = Glucose	26
Abb. 1-9	4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat in <i>Moringa</i> -Arten (nach FAHEY et al. 2005)	32
Abb. 4-1	Vergleich unterschiedlicher HPLC Säulen (1-6) anhand ihres Retardierungsvermögens bzgl. des GSL Sinigrin, chromat. Bedingungen s. Tab. 4-2	51
Abb. 4-2	Trennung der intakten GSL Sinigrin (A), Sinalbin (B1) (mit Sinapin (B2) als Gegenion), Gluconasturtiin (C) und Glucotropaeolin (D) nach ursprünglichem (Tabelle 4-2) und optimierten Gradienten (Tabelle 4-4) auf einer Polaris [®] C18-Ether-HPLC-Säule bei 229 nm	52
Abb. 6-1	Chromatogramm eines GSL-Gesamtstandards bestehend aus A (Glucoiberin), B (Glucocheirolin), C (Progoitrin), D (Sinigrin), E (Epiprogoitrin), F (Glucoraphanin), G (Glucoraphenin), H (Gluconapin), I (Sinalbin), J (Glucosibarin), K (Glucotropaeolin), L (Glucobarbarin), M (Glucoerucin) und N (Gluconasturtiin) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris [®] C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1	59

-
- Abb. 6-2** Zusammenhang zwischen Peakfläche (y in [mAU*s]) und Glucoraphenin-Konzentration (x in [mg/ml]), sowie der daraus resultierenden Kalibrierfunktion $y = 22092x + 172,91$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9999$ (Methode 1)60
- Abb. 6-3** Chromatogramm eines GSL-Gesamtstandards bestehend aus K (Glucotropaeolin), N (Gluconasturtiin), M (Glucoerucin), L (Glucobarbarin), H (Gluconapin), J (Glucosibarin), D (Sinigrin), I (Sinalbin), E (Epiprogoitrin), C (Progoitrin), B (Glucocheirolin), F (Glucoraphenin), G (Glucoraphanin) und A (Glucoiberin) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.262
- Abb. 6-4** Zusammenhang zwischen Peakfläche (y in [mAU*s]) und Glucoraphenin-Konzentration (x in [mg/ml]), sowie der daraus resultierenden Kalibrierfunktion $y = 3876,1x - 31,118$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9998$ (Methode 2).....63
- Abb. 6-5** TIC-Chromatogramm 1 $m/z = 230-1000$ und Selected-Ion-Chromatogramme eines Glucosinolat-Standards mit den Massenbereichen 2 $m/z = 357-359$, 3 $m/z = 371-373$, 4 $m/z = 387-389$, 5 $m/z = 407-409$, 6 $m/z = 419-425$ und 7 $m/z = 433-439$ detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3).....65
- Abb. 6-6** Chromatogramm einer Rucolaprobe RU4 (aufgereinigt über DEAE Sephadex A-25) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris[®] C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.167
- Abb. 6-7** Chromatogramm der Probe SP5 (Radieschensprossen) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris[®] C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.169
- Abb. 6-8** Chromatogramm eines Extraktes von SP5 (Radieschensprossen) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.270
- Abb. 6-9** Selected-Ion-Chromatogramm einer lyophilisierten Probe SP6 (Rettichsprossen) mit dem Massenbereich für Glucoraphenin $m/z = 433-435$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3).....70
- Abb. 6-10** Chromatogramm der Probe K7 (Mustard Cress) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris[®] C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.171
- Abb. 6-11** Chromatogramm eines Extraktes von K7 (Mustard Cress) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.272

-
- Abb. 6-12** Selected-Ion-Chromatogramm der lyophilisierten Probe K7 (Mustard Cress) mit dem Massenbereich für Sinigrin $m/z = 357-359$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3).....72
- Abb. 6-13** Chromatogramm der Probe SP2 (Broccosprouts[®]) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris[®] C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.173
- Abb. 6-14** Chromatogramm der Probe SP2 (Broccosprouts[®]) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2...74
- Abb. 6-15** Selected-Ion-Chromatogramm der Probe SP2 (Broccosprouts[®]) mit dem Massenbereich $m/z = 435-437$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3).....74
- Abb. 6-16** Chromatogramm der Probe K1 (Gartenkresse) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris[®] C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.175
- Abb. 6-17** Chromatogramm der Probe K1 (Gartenkresse) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2...76
- Abb. 6-18** Selected-Ion-Chromatogramm der Probe K1 (Gartenkresse) im Massenbereich $m/z = 407-409$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3).....76
- Abb. 6-19** Chromatogramm der Probe NEM5 detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2.....83
- Abb. 6-20** Selected-Ion-Chromatogramm der Probe NEM5 mit dem Massenbereich $m/z = 437-439$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3).....84
- Abb. 6-21** Chromatogramm der Probe NEM14 detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2.....84
- Abb. 6-22** Chromatogramm der Probe NEM1 detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2.....85
- Abb. 6-23** Chromatogramm einer *Moringa oleifera*-Probe detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2 ...87
- Abb. 6-24** Selected-Ion-Chromatogramm einer *Moringa oleifera*-Probe mit dem Massenbereich $m/z = 611-613$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3).....88
- Abb. 6-25** Chromatogramm einer *Moringa stenopetala*-Probe detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2 ...88

-
- Abb. 6-26** Chromatogramm einer *Moringa peregrina*-Probe detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2 ...89
- Abb. 6-27** Chromatogramm einer *Moringa drouhardii*-Probe detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2 ...90
- Abb. 7-1** Chromatogramm eines ITC-Gesamtstandards aus A (Methyl-ITC), B (Ethyl-ITC), C (Allyl-ITC), D (Sulforaphan), E (Phenyl-ITC), F (Benzyl-ITC), G (Methylthiobutyl-ITC), H (Phenylethyl-ITC), I (Methylthiopentenyl-ITC), J (Methylsulfonylpropyl-ITC) und K (Sulforaphen) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogrammprogramm s. Kap. 5.291
- Abb. 7-2** Chromatogramm eines Probenextraktes von RU6 (Rucola) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.294
- Abb. 7-3** Chromatogramm eines Probenextraktes von SP6 (Rettichsprossen) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.296
- Abb. 7-4** Chromatogramm eines Probenextraktes von K7 (Mustard Cress) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.297
- Abb. 7-5** Chromatogramm eines Probenextraktes von SP2 (Broccosprouts[®]) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.298
- Abb. 7-6** Chromatogramm eines Probenextraktes von K1 (Gartenkresse) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.298
- Abb. 7-7** Chromatogramm eines Probenextraktes von RE2 (Rettich) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2100
- Abb. 7-8** Chromatogramm eines Probenextraktes von S5 (Speisesenf) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2103
- Abb. 7-9** Chromatogramm eines Probenextraktes von M4 (Meerrettich) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kapitel 5.2104
- Abb. 7-10** Chromatogramm eines Probenextraktes von KA5 (Kapern) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2106
- Abb. 7-11** Chromatogramm eines Probenextraktes von NEM5 detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2.....107
- Abb. 7-12** Chromatogramm eines Probenextraktes von NEM1 detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2.....108

Abb. 8-1	Vergleich der gemittelten Gehalte [%] an Glucoraphanin und Glucoerucin der Proben RU1-RU5 anhand verschiedener Probenvorbehandlung (frisch, bei -20 °C TK, lyophilisiert) detektiert mittels HPLC Methode 1, s. Kap. 4.3.1.....	116
Abb. 8-2	Vergleich der Glucoraphaningehalte [mg/100 g FM] in frisch bzw. lyophilisiert (lyo) extrahierten, direkt bzw. über DEAE Sephadex® A-25 aufgereinigt analysierten Extrakten der Proben K5 (BroccoCress®) und SP2 (Broccosprouts®) detektiert mittels HPLC Methode 2, s. Kap. 4.3.2	119
Abb. 8-3	Chromatogramm der Probe S6 (rot) im Vergleich zum Gesamtstandard (schwarz) sowie Aufnahme des Massenspektrums zur Retentionszeit 8,6 min detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kapitel 5.2.....	128
Abb. 8-4	Gegenüberstellung der Zutatenlisten von (a) Probe W1 (Wasabisoße) und (b) Probe M3 (Sahnemeerrettich).....	132
Abb. 8-5	Zusammenhang zwischen dem Anteil an Meerrettich [%] und dem detektierten Gehalt an Phenylethyl-ITC in mg/100 g FM dreier verschiedener Wasabiprobe.....	133
Abb. 8-6	Chromatogramm der ITCs einer Wasabiprobe W3 (rot) im Vergleich zu einer Meerrettichprobe M1 (blau) und Senf S5 (grün) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2	135
Abb. 8-7	Zusammenhang zwischen prozentualem Anteil an Macaknolle im Produkt und ermitteltem Gehalt an Glucotropaeolin [mg/100 g]; Werte vgl. Tab. 8-1	138
Abb. 8-8	Peakflächenvergleich des Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-GSL in Probenextrakten von <i>M. oleifera</i> (rot), <i>M. stenopetala</i> (grün), <i>M. peregrina</i> (blau) und <i>M. drouhardii</i> (lila)	146
Abb. A-1	Alkanreihe zur Bestimmung der Retentionsindizes nach Kováts (KI) ..	169
Abb. B-1	Chromatogramm eines Probenextraktes von Rettichsprossen (SP6) detektiert mittels HPLC (Methode 1).....	173
Abb. B-2	Chromatogramm eines Probenextraktes von Sangosprossen (SP8) detektiert mittels HPLC (Methode 1).....	173
Abb. B-3	Chromatogramm eines Probenextraktes von Daikon Cress® (K6) detektiert mittels HPLC (Methode 1).....	174
Abb. B-4	Chromatogramm eines Probenextraktes von Sakura Cress® (K9) detektiert mittels HPLC (Methode 1).....	174
Abb. B-5	Chromatogramm eines Probenextraktes von BroccoCress® (K9) detektiert mittels HPLC (Methode 1).....	174

Abb. B-6	Chromatogramm eines Probenextraktes von Rettichsprossen (SP6) detektiert mittels HPLC (Methode 2).....	175
Abb. B-7	Chromatogramm eines Probenextraktes von Sangosprossen (SP8) detektiert mittels HPLC (Methode 2).....	175
Abb. B-8	Chromatogramm eines Probenextraktes von Sakura Cress® (K9) detektiert mittels HPLC (Methode 2).....	175
Abb. B-9	Chromatogramm eines Probenextraktes von Daikon Cress® (K6) detektiert mittels HPLC (Methode 2).....	176
Abb. B-10	Chromatogramm eines Probenextraktes von BroccoCress® (K9) detektiert mittels HPLC (Methode 2).....	176
Abb. B-11	Chromatogramm eines Probenextraktes von Rettichsprossen (SP6) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	177
Abb. B-12	Chromatogramm eines Probenextraktes von Sangosprossen (SP8) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	177
Abb. B-13	Chromatogramm eines Probenextraktes von Daikon Cress® (K6) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	178
Abb. B-14	Chromatogramm eines Probenextraktes von Sakura Cress® (K9) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	178
Abb. B-15	Chromatogramm eines Probenextraktes von BroccoCress® (K9) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	178
Abb. B-16	Chromatogramm eines Probenextraktes von Radieschen (RA1) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	179
Abb. B-17	Chromatogramm eines Probenextraktes von Süßem Senf (S4) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	179
Abb. B-18	Chromatogramm eines Probenextraktes von frischem Meerrettich (M5) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	180
Abb. B-19	Chromatogramm eines Probenextraktes von Wasabipaste (W2) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	180
Abb. B-20	Chromatogramm eines Probenextraktes von Wasabipulver (W4) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	180
Abb. B-21	Chromatogramm eines Probenextraktes von Wasabi-Erdnüssen (W5) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	181
Abb. B-22	Chromatogramm eines Probenextraktes von Wasabi-Chips (W6) detektiert mittels GC-SIM-MS.....	181

Abb. B-23	Massenspektrum von Glucoiberin.....	182
Abb. B-24	Massenspektrum von Progoitrin	182
Abb. B-25	Massenspektrum von Glucocheirolin	182
Abb. B-26	Massenspektrum von Sinigrin.....	183
Abb. B-27	Massenspektrum von Epiprogoitrin.....	183
Abb. B-28	Massenspektrum von Glucoraphanin	183
Abb. B-29	Massenspektrum von Glucoraphenin	183
Abb. B-30	Massenspektrum von Gluconapin.....	184
Abb. B-31	Massenspektrum von Sinalbin.....	184
Abb. B-32	Massenspektrum von Glucosibarin.....	184
Abb. B-33	Massenspektrum von Glucotropaeolin.....	184
Abb. B-34	Massenspektrum von Glucobarbarin	185
Abb. B-35	Massenspektrum von Glucoerucin.....	185
Abb. B-36	Massenspektrum von Gluconasturtiin.....	185
Abb. B-37	Massenspektrum von Methyl-ITC	186
Abb. B-38	Massenspektrum von Ethyl-ITC.....	186
Abb. B-39	Massenspektrum von Allyl-ITC	186
Abb. B-40	Massenspektrum von Sulforaphan	187
Abb. B-41	Massenspektrum von Phenyl-ITC.....	187
Abb. B-42	Massenspektrum von Benzyl-ITC.....	187
Abb. B-43	Massenspektrum von Methylthiobutyl-ITC.....	187
Abb. B-44	Massenspektrum von Phenylethyl-ITC	188
Abb. B-45	Massenspektrum von Methylthiopentenyl-ITC.....	188
Abb. B-46	Massenspektrum von Methylsulfonylpropyl-ITC	188
Abb. B-47	Massenspektrum von Sulforaphen	188

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1	14 ausgewählte Glucosinolate, deren chemische Bezeichnung, Trivialname sowie Struktur des Aglykonrestes (R) und des Grundgerüsts (modifiziert nach FAHEY et al. 2001, HALKIER und GERSHENZON 2006).....	5
Tab. 1-2	Effekte pflanzenbauerischer Maßnahmen auf die GSL-Gehalte ausgewählter Modellpflanzen (modifiziert nach SCHREINER et al 2005).....	23
Tab. 1-3	Einteilung der Kapernsorten anhand ihrer Größe und Beschaffenheit (TERNES et al. 2005)	30
Tab. 1-4	Darstellung gängiger Nachweismethoden für Glucosinolate und deren Abbauprodukte (nach MORENO et al. 2006)	34
Tab. 4-1	Ausgewählte Festphasen und ihre Eignung zur Aufreinigung intakter Glucosinolate.....	48
Tab. 4-2	Gradientenprogramm zur Trennung intakter Glucosinolate mittels HPLC bei 229 nm. Säule: VARIAN Polaris® C18-Ether, Eluent A: H ₂ O bidest. + 0,1 % TFA; Eluent B: MeCN + 0,1 % TFA.....	50
Tab. 4-3	Methodenoptimierung für Luna® HILIC; dargestellt anhand der Änderungen von Eluent A, Eluent B und deren Verhältnis [%] zueinander.....	53
Tab. 4-4	Gradientenprogramm zur Trennung intakter Glucosinolate mittels HPLC bei 229 nm. Säule: VARIAN Polaris® C18-Ether, Eluent A: H ₂ O bidest. + 0,1 % TFA; Eluent B: MeCN + 0,1 % TFA.....	54
Tab. 4-5	Isokratisches Programm zur Trennung intakter Glucosinolate mittels HPLC bei 229 nm. Säule: Luna® HILIC, Eluent A: Acetonitril-/25 mM Ammoniumformiatpuffer (85:15, v/v), pH 5,4; Eluent B: MeCN 100 % ..	55
Tab. 5-1	Temperaturprogramm zur Trennung der Isothiocyanate mittels GC (HP6890) an Factor Four™-Kapillarsäule, Trägergas: Helium 5.0	58
Tab. 5-2	Druckprogramm zur Trennung der Isothiocyanate mittels GC (HP6890) an Factor Four™-Kapillarsäule, Trägergas: Helium 5.0	58
Tab. 6-1	Retentionszeiten, Steigung, Achsenabschnitt und Bestimmtheitsmaß R ² der 14 Standards mittels Methode 1	61
Tab. 6-2	Relative Standardabweichung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ) sowie Wiederfindungsraten (WF) von 14 Glucosinolaten mittels Methode 1.....	61
Tab. 6-3	Retentionszeiten, Steigung, Achsenabschnitt und Bestimmtheitsmaß R ² der 14 Standards mittels Methode 2.....	63

Tab. 6-4	Relative Standardabweichung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ) sowie Wiederfindungsraten (WF) von 14 Glucosinolaten mittels Methode 2.....	64
Tab. 6-5	Massen und zugehörige Fragmente 14 intakter Glucosinolate ermittelt über HPLC-ESI-MS im negativen Ionisierungsmodus; HPLC vgl. Kap. 4.3.2.....	65
Tab. 6-6	Gehalte an Glucoraphanin (G) und Glucoerucin (M) [mg/100 g FM] in fünf Rucolaproben (RU) je frisch, bei -20 °C tiefgekühlt und lyophilisiert analysiert, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1	67
Tab. 6-7	Kresse (K)- und Sprossenproben (SP) mit darin detektierten intakten GSL	69
Tab. 6-8	Gehalte an intakten Glucosinolaten in mg/100 g FM in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) (frisch; lyophilisiert) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris® C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1	77
Tab. 6-9	Gehalte an intakten Glucosinolaten in mg/100 g FM in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) (frisch; lyophilisiert; über DEAE-Sephadex® Anionenaustauscher aufgereinigt) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris® C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1	78
Tab. 6-10	Gehalte an intakten Glucosinolaten in mg/100 g FM in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) (frisch; lyophilisiert) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna® 5 µ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2...80	
Tab. 6-11	Gehalte an intakten Glucosinolaten in mg/100 g FM in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) (frisch; lyophilisiert; über DEAE-Sephadex® Anionenaustauscher aufgereinigt) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna® 5 µ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2...81	
Tab. 6-12	Nahrungsergänzungsmittel (NEM1-14) und darin detektierte intakte Glucosinolate.....	82
Tab. 6-13	Gehalte an intakten Glucosinolaten in verschiedenen Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) ohne Aufreinigung in mg/100 g Produkt; detektiert mittels HPLC, Säule: Luna® 5 µ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2	86
Tab. 7-1	Retentionszeiten (RT) und -indizes ($KI_{\text{ermittelt}}$) sowie Vergleich mit Literaturangaben ($KI_{\text{vergleicht}}$) der analysierten Isothiocyanatstandards detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2	92
Tab. 7-2	Massen und zugehörige Fragmente [m/z] der analysierten ITCs detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2	93

Tab. 7-3	ITC-Gehalte verschiedener Rucolaprobe (RU) in mg/100 g FM detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2	95
Tab. 7-4	Isothiocyanate in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2	96
Tab. 7-5	ITC-Gehalte verschiedener Kresse (K)- und Sprossensorten (SP) in mg/100 g FM detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2.....	99
Tab. 7-6	ITC-Gehalte verschiedener Rettich (RE)- und Radieschenproben (RA) in mg/100 g Frischmasse detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2	101
Tab. 7-7	Isothiocyanate in verschiedenen Senf (S)-, Meerrettich (M)- und Wasabiprobe (W) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2.....	102
Tab. 7-8	ITC-Gehalte verschiedener Speisesenfproben (S) in mg/100 g FM detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2	103
Tab. 7-9	ITC-Gehalte verschiedener Meerrettich (M)- und Wasabiprobe (W) in mg/100 g FM, detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2.....	105
Tab. 7-10	Isothiocyanate in verschiedenen Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2	107
Tab. 7-11	ITC-Gehalte verschiedener Nahrungsergänzungsmittel (NEM) in mg/100 g Produkt detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2.....	109
Tab. 8-1	Deklarierte prozentuale Anteile an Macaknolle in den Proben NEM4-NEM10 sowie NEM13 und die ermittelten Gehalte an Sinalbin (I), Glucotropaeolin (K) und Methoxy-Glucotropaeolin (ME-K), chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2	138
Tab. A-1	Gemittelte Responsefaktoren (RF) verwendeter ITCs und ihre relative Standardabweichung (RSD) berechnet aus acht Einzelmessungen	171

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
DAD	Diodenarray Detektor
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrosprayionisierung
ESP	Epithiospecifier-Protein
et al.	et alii; und andere
Fe	Eisen
FM	Frischmasse
GC	Gaschromatograph/-chromatographie
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLC	Gasflüssigkeitschromatographie
GSH	Glutathion
GSL	Glucosinolat
GST	Glutathion-S-Transferase
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatograph/-graphie
IS	Interner Standard
ITC	Isothiocyanat
KI	Kováts-Index
LM	Lebensmittel
LOD	Limit of detection, Nachweisgrenze
LOQ	Limit of quantification, Bestimmungsgrenze
M	Stoffmengenkonzentration
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer/-spektrometrie
N	Stickstoff

NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NIR	Nahinfrarotreflexionsspektroskopie
NMR	Hochauflösende Kernspinresonanzspektroskopie
PAPS	Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Sulfotranferase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
RSD	Relative Standardabweichung
RT	Retentionszeit
S	Schwefel
SIM	Single Ion Monitoring
SPI	Sekundärer Pflanzeninhaltsstoff
TFA	Trifluoressigsäure
TFP	Thiocyanatforming-Protein
TIC	Total Ion Chromatogram
TM	Trockenmasse
u. a.	unter anderem
UDPG	Uridin-Diphosphoglucose
UV	Ultra Violett
v. a.	vor allem
WF	Wiederfindungsrate
XRF	Röntgenfluoreszenzspektroskopie
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung und Literaturübersicht

Die große Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe (SPI) steht heutzutage mehr und mehr im Fokus der Wissenschaft, da Ergebnisse der molekularen Ernährungsforschung darauf hinweisen, dass diese Substanzklasse in der Lage ist, unterstützend zu essentiellen Nährstoffen wie Kohlenhydraten oder Proteinen, Stoffwechselprozesse auf zellulärer Ebene zu beeinflussen.

In der Pflanze dienen sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe primär dem Schutz vor Fraßfeinden oder Schädlingen sowie als Wachstumsregulatoren oder Farbstoffe. Beim Menschen haben sie durch spezifische Geruchs- und Geschmackseindrücke Bedeutung für die Nahrungsauswahl, können aber zudem aufgrund ihrer pharmakologischen Wirkungen als Basis für die Gesunderhaltung des Organismus gelten (WATZL und LEITZMANN 1995).

Diesen postulierten und inzwischen in zahlreichen Studien belegten gesundheitsfördernden Effekten wird unter anderem in der Lebensmittelindustrie durch die Entwicklung so genannter *Functional Foods* Rechnung getragen, welchen gezielt SPIs zugesetzt werden, um mit deren Wirkungen beim Verbraucher werben zu können (TERNES et al. 2005). Darüber hinaus gibt es inzwischen eine Vielzahl an Nahrungsergänzungsmitteln, die bestimmte SPIs in isolierter Form oder auf Basis von Pflanzenextrakten enthalten und zusätzlich zur täglichen Aufnahme durch pflanzliche Lebensmittel einer ausreichenden Versorgung mit diesen Stoffen dienen sollen. Daneben versucht die moderne Pflanzenzüchtung durch gezielte Auswahl von Zuchtmaterial oder Gentechnik bzw. durch Modifizierung von Umweltfaktoren und Düngemitteln Sorten zum späteren Einsatz in der Lebensmittelindustrie hervorzubringen, die reich an solchen positiv belegten Inhaltsstoffen sind (SCHREINER 2005).

Neben bekannten SPIs wie den Carotinoiden oder Flavonoiden, die technologisch in vielen Bereichen der Lebensmittelindustrie etabliert sind, gilt auch die Gruppe der Glucosinolate (GSL), auf die im Rahmen dieser Arbeit näher eingegangen wird, als wichtiger Vertreter der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe.

1.1 Glucosinolate und deren Abbauprodukte

Glucosinolate sind eine Gruppe schwefelhaltiger Pflanzeninhaltsstoffe die im Sekundärmetabolismus bestimmter Pflanzengattungen, hauptsächlich der Familie der Kreuzblütler (*Brassicaceae*), gebildet werden. Darüber hinaus gibt es weitere GSL-synthetisierende Pflanzenfamilien, wie z. B. die Kapernstrauchgewächse (*Capparaceae*), Melonenbaumgewächse (*Caricaceae*), Resedagewächse (*Resedaceae*) und Benußgewächse (*Moringaceae*) (FAHEY et al. 2001). Ebenfalls reich an Glucosinolaten ist die in Peru beheimatete Macapflanze (*Lepidium peruvianum* oder *Lepidium meyenii*) (LI et al. 2001).

Bisher wurden 120 Glucosinolate in 16 Pflanzenfamilien identifiziert. Je nach Pflanzenart und -organ gibt es sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede in der GSL-Zusammensetzung. In manchen *Brassica*-Arten variieren die Gehalte zwischen 1 % bis 10 % der Trockenmasse. Die Verteilung der GSL in der Pflanze verändert sich je nach Entwicklungsstand (BELLOSTAS et al. 2004), wobei die Gehalte im Samen meist höher und die Zusammensetzung anders ist als in den Sprossen, die sich daraus entwickeln. Je nach Pflanzenart gibt es zudem quantitative Unterschiede zwischen Wurzel-, Blätter-, Stengel- und Samengewebe (FAHEY et al. 2001, AL-GENDY und LOCKWOOD 2003, BLAŽEVIĆ und MASTELIĆ 2009, SULTANA et al. 2003a, SULTANA et al. 2003b, WARTON et al. 2001). Umweltfaktoren wie Bodenfruchtbarkeit bzw. Kultivierungsbedingungen, pathogener Befall, Klima, Verletzungen oder Wachstumsregulatoren beeinflussen außerdem die GSL-Gehalte (FAHEY et al. 2001, FENWICK et al. 1983).

Auch wurde festgestellt, dass der Gehalt an GSL in Wildformen einer Pflanzenart wesentlich höher ist als in Zuchtformen (WATZL 2001). Ein Beispiel für eine spezielle glucosinolatarme Zuchtform ist der sogenannte „00-Raps“ (*Brassica napus*). Er enthält nur geringe Mengen an Erucasäure und Glucosinolaten, die besonders in der Futtermittelherstellung als unerwünscht gelten (SCHUMANN et al. 2005).

Allen Glucosinolaten ist eine Grundstruktur gemeinsam. Die strukturelle Vielfalt dieser Stoffklasse ergibt sich lediglich durch ihre aus verschiedenen AS gebildeten Seitenketten, was wiederum für das unterschiedliche physikalisch-chemische Verhalten bzw. die differierende biologische Aktivität dieser Substanzen zugrunde gelegt werden kann. Wird das Zellgewebe der Pflanze zerstört, wie z. B. beim

Schneiden oder Zerkauen derselben, wird das zelleigene Enzym Myrosinase freigesetzt, welches die bis dato intakt vorliegenden Glucosinolate hydrolysiert und hierüber eine Reihe von Zerfallsprozessen in Gang setzt. Die eigentliche biologische Aktivität ist in diesen enzymatisch hervorgerufenen Hydrolyseprodukten zu sehen, unter denen neben Nitrilen oder Thiocyanaten die Gruppe der Isothiocyanate (ITCs) quantitativ eine besondere Stellung einnimmt (BONES und ROSSITER 2006). ITCs sind als maßgeblich für den Schärfeeindruck von Speisesenf (STAHL et al. 2009a) und Meerrettich (GILBERT und NURSTEN 1972) oder das typisch bittere Aroma von Pflanzen wie Rucola oder Rosenkohl anzusehen (PADILLA et al. 2007, VAN DOORN et al. 1998).

Auch positive pharmakologische Wirkungen entsprechender Pflanzenarten sind hauptsächlich auf diese Substanzklasse zurückzuführen (GRUBB und ABEL 2006, WATZL und LEITZMANN 1995), während GSL allein wahrscheinlich nicht oder nur in sehr geringem Maße ein dahingehendes Potential aufweisen (GRUBB und ABEL 2006, MUSK et al. 1995).

Oxazolidin-2-thioneine und hier im Speziellen das aus dem Precursor Progoitrin gebildete, die Schilddrüse hemmende Goitrin (HERRMANN 1977) dagegen werden aufgrund ihrer unerwünschten Wirkung auf den menschlichen Organismus diskutiert.

1.1.1 Struktur und chemische Eigenschaften

GSL sind je nach Seitenkette mehr oder weniger polare, wasserlösliche Verbindungen, die eine gewisse chemische Stabilität aufweisen, solange das umgebende Pflanzengewebe unverletzt bleibt. Durch Zerschneiden oder Verletzen der Pflanze, z. B. durch das Kauen des Materials durch Tiere, wird das Enzym Myrosinase (β -Thioglucosidase) freigesetzt und die GSL u. a. zu Isothiocyanaten hydrolysiert, welche die Pflanze vor Frass schützen (MITHEN et al. 2000).

Die gemeinsame Struktur aller bisher bekannten GSL setzt sich zusammen aus einer Glucoseeinheit, welche über eine Thioetherbrücke und Stickstoff an einen Sulfatrest gebundenen ist, sowie einem organischen Aglykonrest R (FAHEY et al. 2001), der für jedes Glucosinolat charakteristisch ist und von dessen Ausgangssubstrat, einer bestimmten Aminosäure, determiniert wird (HALKIER und GERSHENZON 2006).

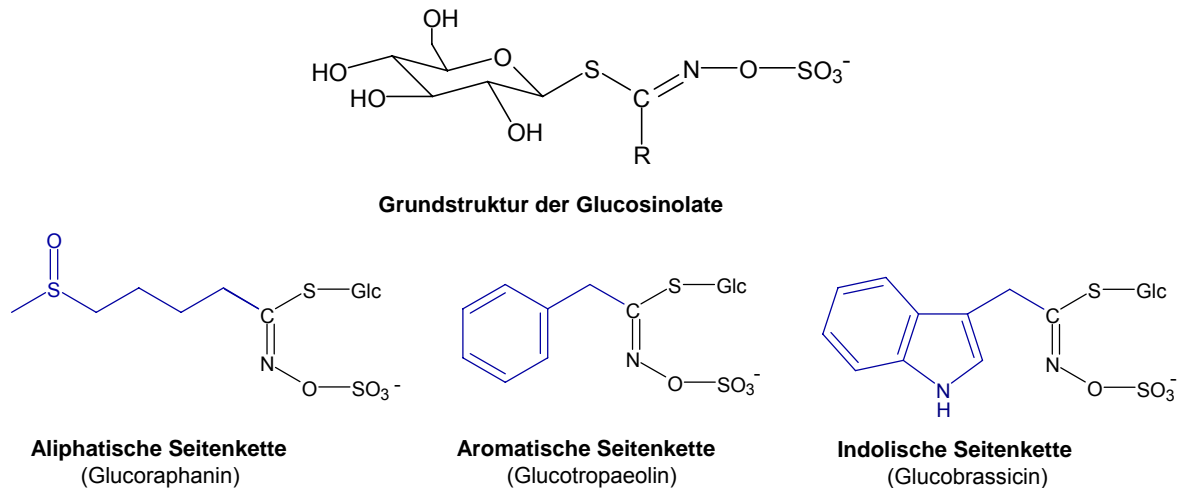
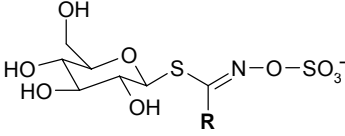
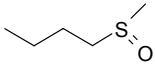
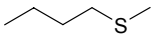
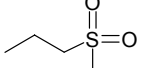
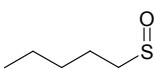
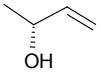
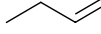
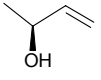
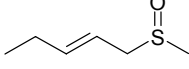
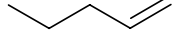
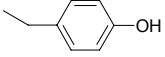
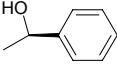
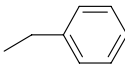
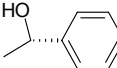
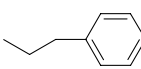


Abb. 1-1 Grundstruktur der Glucosinolate mit aliphatischer, aromatischer und indolischer Seitenkette (R) (modifiziert nach WITTSTOCK und HALKIER 2002); Glc = Glucose

Je nach Art der für die Glucosinolat-Biosynthese zur Verfügung stehenden Aminosäure werden drei Gruppen von Glucosinolaten unterschieden (siehe Abbildung 1-1). Aliphatische GSL entstehen hauptsächlich aus den Aminosäuren Methionin, Alanin, Leucin bzw. Isoleucin und Valin, aromatische GSL aus Phenylalanin oder Tyrosin. Indolyl- oder Indol-GSL werden aus Tryptophan gebildet. Deren Hydrolysate haben im Gegensatz zu den Abbauprodukten der aliphatischen und aromatischen GSL keine aromatischen Eigenschaften. Sie entstehen hauptsächlich, wenn die Pflanze unter Stress gesetzt wird (HOLST et al. 2004). Beispiele für diese Gruppe sind unter anderem das Glucobrassicin und Neoglucobrassicin (HALKIER und GERSHENZON 2006).

In Tabelle 1-1 sind die im Rahmen dieser Arbeit analysierten intakten GSL mit chemischer Bezeichnung, Trivialname und Struktur des Aglykonrestes aufgeführt.

Tab. 1-1 14 ausgewählte Glucosinolate, deren chemische Bezeichnung, Trivialname sowie Struktur des Aglykonrestes (R) und des Grundgerüsts (modifiziert nach FAHEY et al. 2001, HALKIER und GERSHENZON 2006)

Grundstruktur	Chemische Bezeichnung	Trivialname	Rest (R)
Aliphatische (Alkyl-)GSL (gesättigter Rest)			
	5-Methylsulfinylpropyl-GSL	Glucioiberin	
	4-Methylthiobutyl-GSL	Glucocerucin	
	3-Methylsulfonylpropyl-GSL	Glucocheirolin	
	4-Methylsulfinyl-butyl-GSL	Glucoraphanin	
Aliphatische (Alkenyl-)GSL (ungesättigter Rest)			
	2(<i>R</i>)-2-Hydroxy-3-butenyl-GSL	Progoitrin	
	2-Propenyl-GSL; Allyl-GSL	Sinigrin	
	2(<i>S</i>)-2-Hydroxy-3-butenyl-GSL	Epiprogoitrin	
	4-Methylsulfinyl-3-butenyl-GSL	Glucoraphenin	
	3-Butenyl-GSL	Gluconapin	
Aromatische GSL			
	4-Hydroxybenzyl-GSL	Sinalbin	
	2(<i>R</i>)-Hydroxy-2-phenylethyl-GSL	Glucosibarin	
	Benzyl-GSL	Glucotropaeolin	
	2(<i>S</i>)-Hydroxy-2-phenylethyl-GSL	Glucobarbarin	
	2-Phenylethyl-GSL	Gluconasturtiin	

1.1.2 Glucosinolat-Biosynthese

Die Biosynthese der Glucosinolate und die daran beteiligten Enzymsysteme sind bisher nicht zur Gänze aufgeklärt (MITHEN et al. 2000). Anhand von Untersuchungen an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (GRUBB und ABEL 2006) sowie basierend auf Untersuchungen mittels Isotopenmarkierung (^{14}C) (LYKKESFELDT und MØLLER 1993) wurde ein möglicher Verlauf konstruiert, welcher im Folgenden dargestellt ist.

Grundsätzlich kann die Glucosinolat-Biosynthese in drei Schritte gegliedert werden: die Kettenverlängerung einer Aminosäure (AS), die Synthese des GSL-Grundgerüsts sowie die Modifikation der GSL-Seitenketten (FAHEY et al. 2001). Ausgangsverbindung für die meisten GSL stellen die AS Methionin, Phenylalanin und Tryptophan dar, wobei die GSL-Synthese prinzipiell aus allen acht proteinogenen AS möglich ist (GRUBB und ABEL 2006).

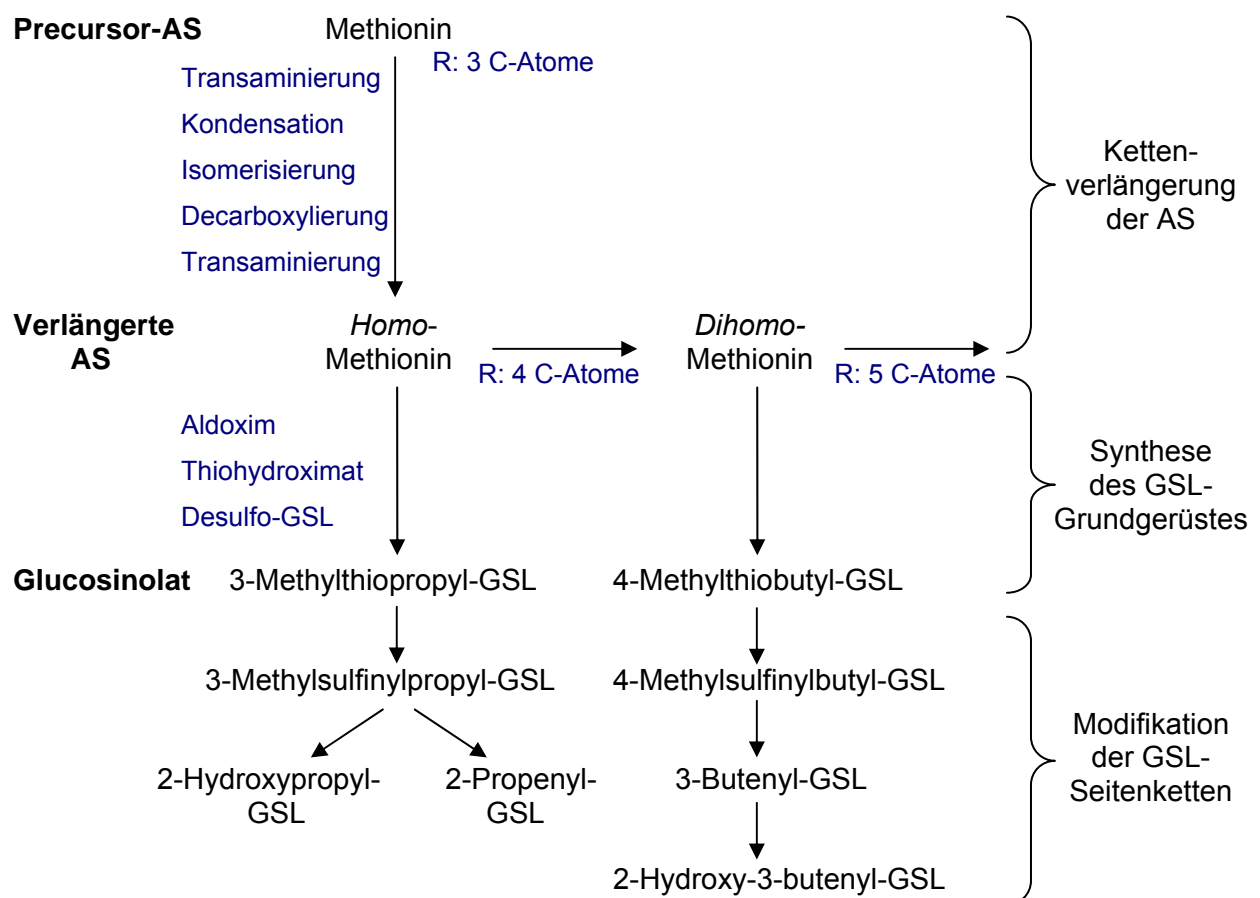


Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Glucosinolat-Biosynthese aus Methionin (modifiziert nach PADILLA et al. 2007, MITHEN et al. 2000); R = Rest

Der erste Schritt der Biosynthese wird durch Transaminierung der zugrunde liegenden AS (in Abbildung 1-2 am Beispiel der AS Methionin dargestellt) in eine α -Ketosäure (2-Oxo-Säure) eingeleitet, welche als Schnittstelle zwischen dem primären AS-Metabolismus und der sekundären GSL-Biosynthese fungiert (HALKIER und GERSHENZON 2006). Durch Kondensation mit Acetyl-CoA, anschließender Isomerisierung und oxidativer Decarboxylierung vollzieht sich die Verlängerung der Ketosäure jeweils um eine Methylengruppe. Dieser Elongationsschritt kann noch bis zu acht weitere Male durchlaufen werden, bevor die Ketosäure den Zyklus verlässt und durch eine erneute Transaminierungsreaktion wieder in eine AS überführt wird (FAHEY et al. 2001).

Die verlängerten AS dienen nun als Ausgangssubstrate für die zweite Phase der Synthese, der Bildung des GSL-Grundgerüsts (Abbildung 1-3) durch Anlagerung von Sauerstoff, Glucose und einer Sulfatgruppe.

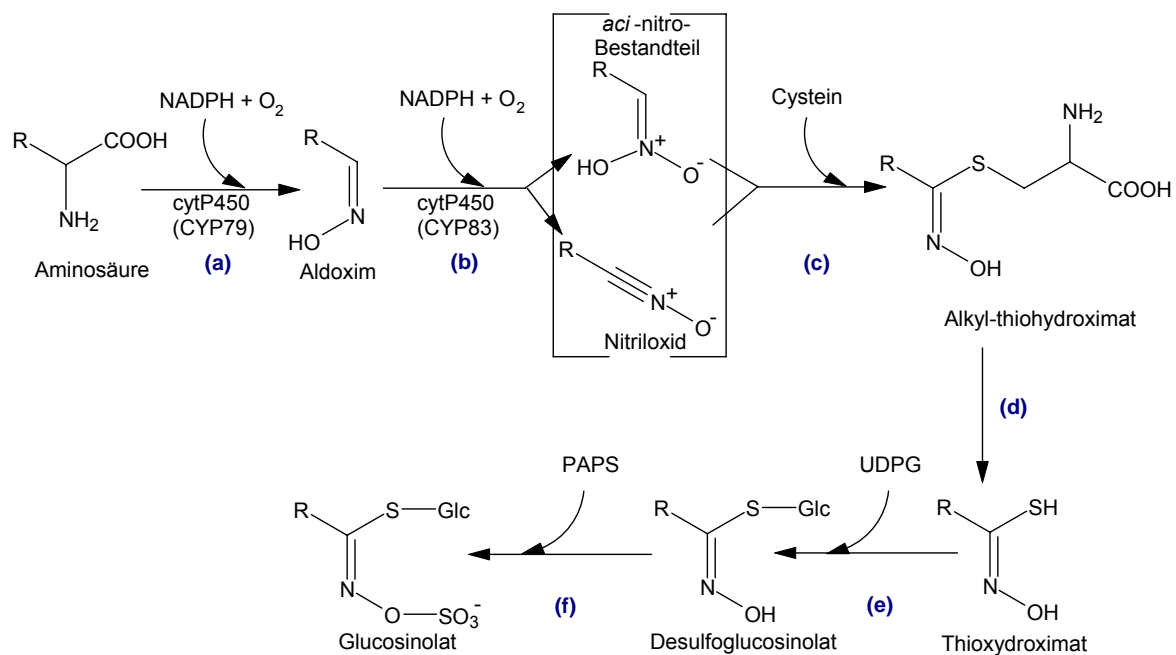


Abb. 1-3 Bildung des GSL-Grundgerüsts (nach WITTSTOCK und HALKIER 2002); Glc = Glucose

Über zwei unabhängige durch Cytochrom P450-Monooxygenase katalysierte Schritte entsteht zunächst ein Aldoxim **(a)**, dann ein noch nicht näher charakterisiertes Zwischenprodukt **(b)**. Die Struktur dieses sehr reaktiven und somit instabil vorliegenden Intermediats (*aci*-nitro-Bestandteil oder Nitriloxid) und die weiteren Reaktionsschritte bis hin zum Thiohydroximat sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Man vermutet, dass über Oxidation, eine anschließende Gluthation-S-transferase-katalysierte Konjugation mit Cystein (**c**) als bevorzugtem Schwefeldonor und Spaltung durch eine Lyase erst ein S-alkyl-Thiohydroximat entsteht, welches zu einem Thiohydroximat (**d**) weiter reagiert (MITHEN et al. 2000). Zur vollständigen Synthese des Glucosinolat-Grundgerüsts wird das Thiohydroximat im letzten Schritt mittels des Enzyms UDPG-Thiohydroximat-Glucosyltransferase S-glycosyliert (**e**) und das so entstandene Desulfoglucosinolat schließlich mit Hilfe von Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Sulfotranferase (PAPS) sulfatiert (**f**) (WITTSTOCK und HALKIER 2002, FAHEY et al. 2001).

Die Seitenkette des Grundgerüsts wird im dritten Schritt der Biosynthese auf verschiedene Weise modifiziert, wodurch ein breites Spektrum an unterschiedlichen GSL entstehen kann. Modifikationen sind substratspezifisch und können u. a. über Hydroxylierung, Demethylierung, Sulfatierung, Oxidation oder Anlagerung von Methoxygruppen erfolgen (FAHEY et al. 2001, MITHEN et al. 2000, HALKIER und GERSHENZON 2006). Das fertige Glucosinolat liegt bis zu einem Kontakt zu der coexistenten, aber räumlich getrennt vorliegenden Myrosinase chemisch stabil in der Zelle vor (GRUBB und ABEL 2006).

1.1.3 Glucosinolatabbau und Bildung von Zerfallsprodukten

Voraussetzung für den Abbau der GSL ist eine initiale Spaltung der Thioglycosidbindung. Dieser Schritt erfolgt durch das pflanzeigene Enzym Myrosinase, eine β -Thioglycosidase, welche im Cytoplasma spezieller Myrosinzellen vermutet wird (THANGSTAD et al. 1990, THANGSTAD et al. 1991). Kommt es zu einer mechanischen Beschädigung der Zellwände durch Zerschneiden, Vermahlen oder Kauen, kann das Enzym mit den bisher räumlich getrennt in den Zellvakuolen vorliegenden Glucosinolaten in Kontakt treten (BONES und ROSSITER 1996). Die Myrosinase bindet an das Substrat und hydrolysiert dessen Thioglycosidbindung.

Myrosinasen können prinzipiell in allen glucosinolathaltigen Pflanzen nachgewiesen werden, isoliert und charakterisiert wurde das Enzym bisher unter anderem aus gelber bzw. brauner Senfseed (VAN EYLEN et al. 2008, OHTSURU und HATA 1972), Meerrettich (LI und KUSHAD 2005), Daikon-Rettich (SHIKITA et al. 1999), Kresse (DURHAM und POULTON 1989), Wasabi (OHTSURU und KAWATANI 1979) und Raps (LÖNNERDAL und JANSON 1973).

Die Myrosinasen einzelner Pflanzenarten gehören zwar der gleichen Familie an, unterscheiden sich jedoch zum Teil erheblich in den erforderlichen Bedingungen für eine maximale Enzymaktivität. So wurde für aus Meerrettich (*Armoracia rusticana*) isolierte Myrosinase ein Temperaturoptimum von 37 bis 45 °C bei einem pH-Wert von 5 bis 8 ermittelt (LI und KUSHAD 2005), ähnliche pH-Bereiche gelten für das Enzym aus Wasabi (*Wasabia japonica*) (OHTSURU und KAWATANI 1979). Für die Myrosinase aus der weißen Senfsaat (*Sinapis alba*) dagegen gelten Temperaturoptima von bis zu 60 °C (VAN EYLEN et al. 2008), ein ähnliches Temperaturoptimum wurde für Myrosinasen aus verschiedenen Kohlarten beobachtet (YEN und WEI 1993). Bei höheren Temperaturen ab 70 °C wird das Enzym denaturiert und ist nur noch inaktiv im Pflanzengewebe vorzufinden, für die Myrosinase aus Wasabi wurde dies bereits ab 30 °C beobachtet (OHTSURU und KAWATANI 1979). Zudem ist die Aktivität der Myrosinasen substratabhängig, was bedeutet, dass nicht jedes GSL in gleicher Effektivität umgesetzt wird. Auch wurde beobachtet, dass die enzymatische Umsetzung der GSL insgesamt effektiver abläuft, wenn in einer Probe mehrere GSL als Substrat zur Verfügung stehen (WARTON et al. 2001).

Des Weiteren wurde bereits sehr früh festgestellt, dass die Anwesenheit von Ascorbinsäure die Aktivität des Enzyms entscheidend beeinflusst (ETTLINGER et al. 1961). Dabei spielt die reduzierende Wirkung der Ascorbinsäure keine Rolle, vielmehr fungiert diese als Co-Enzym, indem sie die Konformation der Myrosinase dahingehend ändert, dass Glucosinolate besser am aktiven Zentrum binden und folglich auch leichter umgewandelt werden können (BONES und ROSSITER 1996). Die Ascorbinsäure stellt in diesem System lediglich eine Art Katalysator für die Myrosinase dar – wahrscheinlich durch Bereitstellung einer nucleophilen Gruppe (BURMEISTER et al. 2000) – sie nimmt nicht aktiv an der Reaktion teil (SCHNUG et al. 1995). Es wurde gezeigt, dass bei Abwesenheit von Ascorbinsäure nahezu keine Enzymaktivität stattfindet (BURMEISTER et al. 1997; FAHEY et al. 2001).

Dem gegenüber ist auch bei Konzentrationen über dem Optimum eine Hemmung der Enzymaktivität festzustellen (SCHNUG et al. 1995). Diesem Sachverhalt liegt wahrscheinlich eine Konkurrenz zwischen Ascorbinsäure und Glucosinolat um das aktive Zentrum der Myrosinase zugrunde (BONES und ROSSITER 1996). Neben der Ascorbinsäure scheint auch $MgCl_2$ einen gewissen verstärkenden Einfluss auf die Enzymaktivität auszuüben (VAN EYLEN et al. 2008).

GSL-spaltende Enzyme kommen nicht nur in der Pflanze vor. Neben den pflanzlichen Myrosinasen existieren weitere β -Thioglucosidasen in Pilzen. Aber auch in Bakterien und somit auch in der menschlichen Darmflora ist diese Enzymklasse zu finden (FAHEY et al. 2001). Im GIT des Menschen kann folglich ebenfalls eine Umsetzung intakt absorbiertes GSL zu den entsprechenden bioaktiven Zerfallsprodukten stattfinden (KRUL et al. 2002).

In Abbildung 1-4 ist der Verlauf des Glucosinolatabbaus schematisch dargestellt. Durch enzymatische Spaltung der Thioglucosidbindung entstehen Glucose und ein instabiles Aglykon (Thiohydroximat-O-Sulfonat), welches über nichtenzymatische Abspaltung des Schwefelrestes in Abhängigkeit von Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen) oder Struktur der Seitenkette spontan in flüchtige und nicht flüchtige Produkte zerfällt (MITHEN et al. 2000). Zudem können diese Zerfallsprodukte unter verschiedenen Bedingungen weiterreagieren. Es bilden sich Isothiocyanate (ITCs), Oxazolidin-2-thione, Nitrile, Epithionitrile und Thiocyanate (HALKIER und GERSHENZON 2006, GRUBB und ABEL 2006).

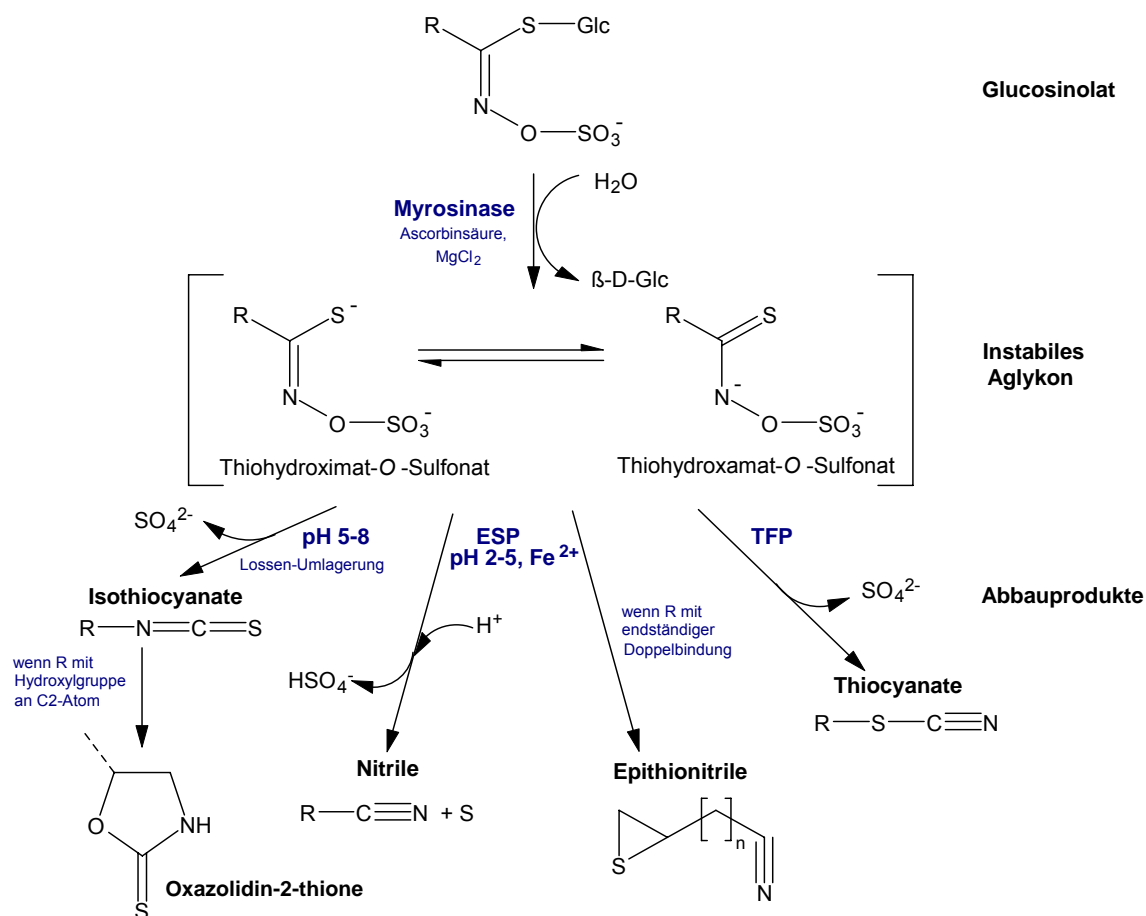


Abb. 1-4 Hydrolysewege von Glucosinolaten, ihre möglichen Abbauprodukte und hierbei relevante Einflussgrößen (modifiziert nach HALKIER und GERSHENZON 2006, GRUBB und ABEL 2006); Glc = Glucose

Aus GSL mit aliphatischer und aromatischer Seitenkette entstehen bei neutralem pH-Wert hauptsächlich Isothiocyanate. Hierbei wird im Zuge einer nichtenzymatischen intramolekularen Lossen-Umlagerung (Abbildung 1-5) nach Abspaltung der Sulfatgruppe die Seitenkette vom C-Atom des Thiohydroximats auf das benachbarte N-Atom umgelagert und eine Doppelbindung zu dem verbleibenden Sulfid ausgebildet (SHIKITA et al. 1999). Unter physiologischen Bedingungen nehmen ITCs quantitativ eine besondere Stellung ein und machen 60 – 90 % der gesamten GSL-Abbauprodukte aus (SONG et al. 2005).

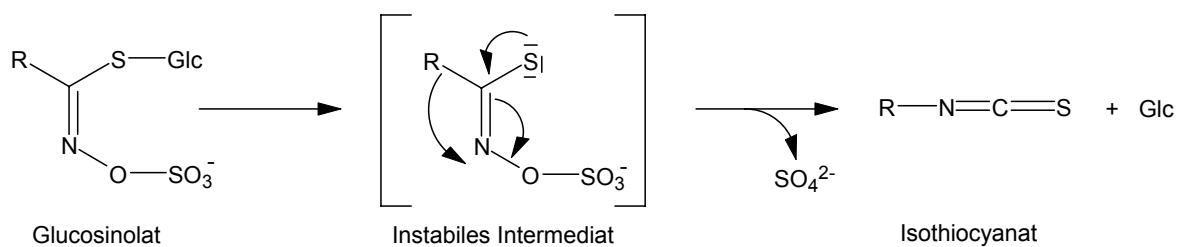


Abb. 1-5 Hydrolyse von Glucosinolaten zu Isothiocyanaten durch eine intramolekulare Lossen-Umlagerung (modifiziert nach SHIKITA et al. 1999) ; Glc = Glucose

Handelt es sich bei dem GSL um eine β -Hydroxyalkenyl-Verbindung (hydroxyliertes C2-Atom in der Seitenkette), entstehen instabile ITCs, welche spontan zu Oxazolidin-2-thionen zyklisieren (BONES und ROSSITER 1996, HAYES et al. 2008). Von Bedeutung ist hierbei das Progoitrin (2-Hydroxy-3-butenylglucosinolat) aus Raps, welches ein instabiles ITC erzeugt, das spontan zu 5-Vinyloxazolidin-2-thion zyklisiert. Dieses gilt aufgrund seiner wahrscheinlich goitrogenen Eigenschaften als in der Nahrung unerwünscht (GRIFFITHS et al. 1998).

Weiterhin entstehen im sauren Milieu unter Anwesenheit von Eisenionen (Fe^{2+}) vermehrt Nitrile und Epithionitrile (GIL und MAC LEOD 1980, GALLETI et al. 2001). Diese Reaktion wird zudem durch ein spezielles Protein katalysiert, welches von FOO et al. (2000) erstmals isoliert und näher charakterisiert wurde. Dieses Epithiospezifische Protein (ESP) bildet einen Komplex mit dem instabilen Thiohydroximat und es entstehen Nitrile, oder im Falle einer endständigen Doppelbindung an der Seitenkette des Precursor-GSL Epithionitrile (MAC LEOD und ROSSITER 1985). Der genaue Mechanismus hierfür ist nicht geklärt, es gelang allerdings durch Überexpression des ESP-codierenden Gens unter Anwesenheit von

Fe^{2+} -Ionen den GSL-Abbau weg von der Isothiocyanat-Bildung in Richtung der Bildung von Nitrilen bzw. Epithionitrilen zu verschieben (DE TORRES ZALABA et al. 2005).

Die Thiocyanatentstehung wird ebenfalls durch spezielle Thiocyanatforming-Proteine (TFP) unterstützt (BUROW et al. 2007) und ist bisher lediglich aus den Glucosinolaten Benzyl-, Allyl- und Methylthiobutyl-GSL bekannt. Man vermutet, dass die Entstehung von Thiocyanaten aus diesen GSL begünstigt wird, da sie in der Lage sind nach der Umwandlung durch eine spezielle Isomerase ein stabiles Carbokation zu bilden, welches eine strukturell notwendige Voraussetzung für die Umlagerungsreaktion zu dieser Substanzklasse darstellt (HASAPIS und MAC LEOD 1982).

Der Abbau der indolischen Glucosinolate erfolgt leicht abweichend. Indolyl-GSL bilden bei neutralem bzw. schwach saurem pH-Wert instabile ITCs, die zunächst zum korrespondierenden Alkohol abgebaut werden und anschließend zu Diindolylmethan kondensieren. Aus diesen instabilen Isothiocyanaten wird vermutlich ebenfalls das u. a. phytoöstrogen wirkende Indol-3-Carbinol gebildet. Bei saurem pH-Wert entstehen aus Indolyl-GSL Indolyl-3-acetonitrile und elementarer Schwefel (BONES und ROSSITER 2006). Ist Ascorbinsäure im System vorhanden können eine Reihe von Ascorbigenen entstehen (BUSKOV et al. 2000).

1.2 Metabolismus der GSL und deren Abbauprodukten

Um GLS für eine Absorption im menschlichen Organismus optimal verfügbar zu machen, müssen diese zunächst durch das Enzym Myrosinase zu ihren bioaktiven Abbauprodukten hydrolysiert werden. Dies geschieht meist während der Nahrungsaufnahme durch Kauen des frischen Lebensmittels (LM) oder bei bereits prozessierten LM mit inaktivierter pflanzlicher Myrosinase erst nach der Aufnahme mittels bakterieller Myrosinasen im Darm (JOHNSON et al. 2002).

1.2.1 Einfluss der Prozessierung von LM auf deren GSL-Gehalte

Zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit von Glucosinolaten und deren Abbauprodukten ist es notwendig, das Verhalten dieser Stoffe unter verschiedenen Prozessierungsbedingungen zu kennen, da glucosinolathaltige Pflanzen mit Ausnahme von Sprossen selten frisch konsumiert werden, sondern meist gekocht, gedämpft oder blanchiert.

CIEŚLIK et al. (2007) zeigten, dass Kochen die GSL-Gehalte im Lebensmittel reduziert, wobei die Verluste bei indolischen GSL aufgrund höherer Thermolabilität deutlicher waren als bei deren aliphatischen Pendants. Die deutliche Reduzierung des Gesamtglucosinolatgehaltes gegenüber frischem Pflanzenmaterial rührte hierbei nicht von einem Abbau durch pflanzliche Myrosinase, da diese bereits ab einer Temperatur von 55 °C als vollständig inaktiviert angesehen werden kann, sondern vom Übergang eines großen Teils der wasserlöslichen GSL in das Kochwasser. Auch in anderen Arbeiten wurde ein Rückgang des GSL-Gehaltes sowohl beim Kochen in Wasser als auch beim Kochen in der Mikrowelle festgestellt, wenngleich bei letzterem weniger ausgeprägt. Die Erhöhung von Kochdauer bzw. -temperatur und die Menge an zugesetztem Kochwasser übten hier inverse Effekte auf die GSL-Gehalte aus (RUNGAPAMESTRY et al. 2006, SONG und THORNALLEY 2007). Zudem sind Verluste während des Kochens abhängig von der verarbeiteten Pflanze und deren Entwicklungszustand. So ist eine Auslaugung von GSL in weicheren Geweben wie reifem Brokkoli besser möglich als in relativ festem Sprossenmaterial (GOODRICH et al. 1989).

Dampfgaren stellt eine schonende Methode der Prozessierung von pflanzlichen Lebensmitteln dar, die über Inaktivierung der Myrosinase einen Abbau der Glucosinolate zu flüchtigen Produkten verhindert und zudem ein Auswaschen der Glucosinolate über das Kochwasser gering hält (MIGLIO et al. 2008, VALLEJO et al. 2002). Auch das vor allem in asiatischen Ländern angewandte Pfannenrühren von Gemüse zeigte nahezu keine Effekte auf den GSL-Gehalt im Lebensmittel, da die Myrosinase über die Temperaturzufuhr rasch inaktiviert wurde (SONG und THORNALLEY 2007).

Beim Frittieren von pflanzlichen Lebensmitteln wurde ein starker Rückgang der GSL-Gehalte von bis zu 84 % beobachtet, was hohem Wärmeeintrag während des Frittiervorganges und damit einhergehendem thermischen Abbau der Glucosinolate zugeschrieben wurde. Aliphatische GSL sind weniger temperaturempfindlich als

indolische, was für letztere durch deutlich niedrigere Gehalte im Endprodukt sichtbar wurde (MIGLIO et al. 2008). Untersuchungen von MORENO et al. (2007) zeigten ähnliche Ergebnisse, wobei hier der Verlust an GSL im Frittiergut zwischen den eingesetzten Ölen schwankte.

Neben den gängigen Zubereitungsarten für pflanzliche Lebensmittel wurden auch Methoden zur Haltbarmachung auf deren Einflüsse bzgl. der Glucosinolate und deren Abbau betrachtet. So zeigten tiefgekühlte Proben, die vor der Analyse für mehrere Tage bei -22 °C gelagert wurden (CIEŚLIK et al. 2007), keinen signifikanten Rückgang der Glucosinolat-Gehalte. Im Gegensatz dazu fanden SONG und THORNALLEY (2007) einen deutlichen Rückgang des Gesamtglucosinolatgehaltes, allerdings nach längerer Lagerung bei -85 °C. Die Abnahme an Gesamt-GSL wurde hier auf die Bildung von Eiskristallen zurückgeführt, welche das Pflanzengewebe verletzen. Dies setzt beim Auftauvorgang eine Hydrolyse der nicht mehr räumlich getrennt vorliegenden GSL über das Enzym Myrosinase in Gang. Durch kurzes Blanchieren der Lebensmittel vor der Tiefkühlung und der damit einhergehenden Inaktivierung der Myrosinase wurden diese Effekte behoben (RODRIGUES und ROSA 1999). Auch in anderen Arbeiten wurden z. T. signifikante Verluste an Gesamt-GSL festgestellt, wobei hiervon indolische GSL im Vergleich zu aliphatischen stärker betroffen waren (VALLEJO et al. 2003). Die gekühlte Lagerung glucosinolathaltiger Pflanzen bei +4 °C zeigte kaum Verluste (SONG und THORNALLEY 2007).

Eine weitere Methode zur Haltbarmachung von pflanzlichen Lebensmitteln stellt eine saure Fermentation derselben dar. Daneben wird auch das Einlegen einiger Gemüse in Salzlake praktiziert. Die Analyse von Sauerkraut zeigte im Vergleich zu frischem Weißkohl einen vollständigen Abbau der intakten Glucosinolate nach zweiwöchiger Fermentation. Die entstandenen Produkte waren Thiocyanate und Nitrile, ein Test auf Isothiocyanate verlief negativ. Etwas geringere Gesamtmengen der entsprechenden Abbauprodukte im Vergleich zu den ursprünglichen GSL-Gehalten im frischen Lebensmittel ließen Rückschlüsse auf Verluste über thermische Degradation während der Eindosung des Sauerkrautes zu (DAXENBICHLER et al. 1980). Eingelegte Gemüse, wie Daikon-Rettich oder weniger bekannte asiatische Gemüsearten, zeigten nach ein- bis zweiwöchiger Mazeration in Salzlake einen Anstieg des Anteils an indolischen Glucosinolaten, zurückzuführen auf Bildung derselben unter Salzstress bzw. eine höhere Myrosinaseresistenz bei gleichzeitigem

leichtem Rückgang des Gesamtglucosinolatgehaltes. Hierbei waren in kurz fermentierten Proben deutlich mehr GSL vorhanden als in mehrere Monate eingelegtem Probenmaterial (SUZUKI et al. 2006). Ebenfalls in Salzlake fermentierte Kapern enthielten nach Fermentation hohe Gehalte an flüchtigen ITCs, intakte GSL wurden nicht analysiert (ROMEIO et al. 2007).

Neben diesen Methoden werden glucosinolathaltige Pflanzen zum Einsatz in *Convenience*-Produkten aber auch mehr und mehr in Nahrungsergänzungsmitteln dem Entzug von Wasser über Trocknung bzw. Gefriertrocknung unterzogen. Es gibt allerdings nur wenige Arbeiten zu diesem Thema, das im Hinblick auf heutige Verbraucherpräferenzen großes Potential bietet. Arbeiten von SAHASRABUDHE und MULLIN (1980) zur Herstellung lagerfähiger Produkte aus Meerrettich zeigen, dass die Art der Trocknung entscheidend für die Gehalte an GSL und entsprechender daraus freigesetzter für das Aroma und unerlässlicher Substanzen im Endprodukt ist. So sind Temperaturen über 65 °C dem Gesamtgehalt an GSL abträglich, wohingegen Temperaturen darunter bzw. Wasserentzug über Gefriertrocknung diese Substanzen im Produkt erhalten. Zudem zeigen DE VOS und BLIJLEVEN (1988), dass der Trocknungsprozess die intakten GSL im Lebensmittel erhält, es aber zu beachten gilt, dass die Myrosinase dabei je nach Temperatureinfluss zerstört oder lediglich inaktiviert wird. Dies ist als entscheidend für die spätere Freisetzung bioaktiver Abbauprodukte anzusehen.

1.2.2 Bioverfügbarkeit von GSL und deren Metabolismus im Menschen

Durch diese Mechanismen der Myrosinaseinaktivierung während des Garprozesses, durch welche die Glucosinolate zwar im Lebensmittel verbleiben, aber keine Umwandlung in bioaktive Abbauprodukte stattfinden kann, sowie über Verluste durch Übergang der wasserlöslichen GSL ins Kochwasser wurde gezeigt, dass die Zubereitungsweise von LM maßgeblich an der Verfügbarkeit ihrer Inhaltsstoffe beteiligt ist.

Isothiocyanate, die unter physiologischen Bedingungen als Hauptabbauprodukte der GSL-Hydrolyse durch Myrosinase gebildet werden, passieren im oberen Bereich des GIT durch passive Diffusion die Zellwand und werden so von den Zellen absorbiert (MITHEN et al. 2000).

Ist die pflanzeneigene Myrosinase über vorherige Prozessierung der LM gehemmt, kann ein Teil der intakten Glucosinolate direkt absorbiert werden (SONG et al. 2005). Ein weiterer Teil erreicht unhydrolysiert den Dickdarm (Colon) und wird dort über bakterielle Myrosinasen weiter metabolisiert (KRUL et al. 2002, ROUZAUD et al. 2003, SHAPIRO et al. 2001). Hierbei wurden mehrere Bakterienstämme auf ihr Vermögen zur GSL-Hydrolyse getestet. Man fand, dass u. a. Bifidobakterien, Lactobazillen und *Bacteroides* in der Lage waren, GSL zu ITCs und anderen Abbauprodukten zu metabolisieren. Ein gleichzeitiger Einsatz von Probiotika zur Verstärkung der Bifidobakterien im menschlichen Colon zeigte keine erhöhte Umwandlungsrate von GSL zu ihren korrespondierenden ITCs (FULLER et al. 2007). Die endogene und damit zeitverzögerte Hydrolyse von intakten oder lediglich teilweise abgebauten GSL im Colon begründet ihre verlangsamte Absorptionszeit und bis zu sechsfach schlechtere Bioverfügbarkeit gegenüber den über pflanzliche Myrosinase hydrolysierten ITCs, die eine schnelle Absorption im oberen GIT und kurze Plasma-Halbwertzeiten aufweisen (YE et al. 2002, FIMOIGNARI et al. 2008). Die höchsten Gewebskonzentrationen an GLS-Abbauprodukten weisen hierbei die Leber, die Niere und die intestinale Mucosa auf.

Der Abbau von Isothiocyanaten erfolgt hauptsächlich über den Mercaptursäurestoffwechsel. Man fand, dass Isothiocyanate als Substrat für die körpereigene Gluthation-S-Transferase (GST) dienen können. Hierbei katalysiert das Enzym einen nucleophilen Angriff der SH-Gruppe von Glutathion (GSH) am zentralen Kohlenstoff des Isothiocyanates (KOLM et al. 1995). Die entstehenden Glutathion-Dithiocarbamate werden über mehrere Enzymreaktionen weiter zu *N*-Acetyl-L-Cystein-Dithiocarbamaten (Mercaptursäuren) verstoffwechselt, welche dann über den Urin ausgeschieden werden können (SHAPIRO et al. 1998).

VERMEULEN et al. (2003) bestätigten die Bildung von Mercaptursäuren aus Isothiocyanaten (Abbildung 1-6) indem sie diese *in vitro* aus 12 aliphatischen und aromatischen ITCs über Kopplung an *N*-Acetyl-L-Cystein analog dem Mercaptursäureweg synthetisierten.

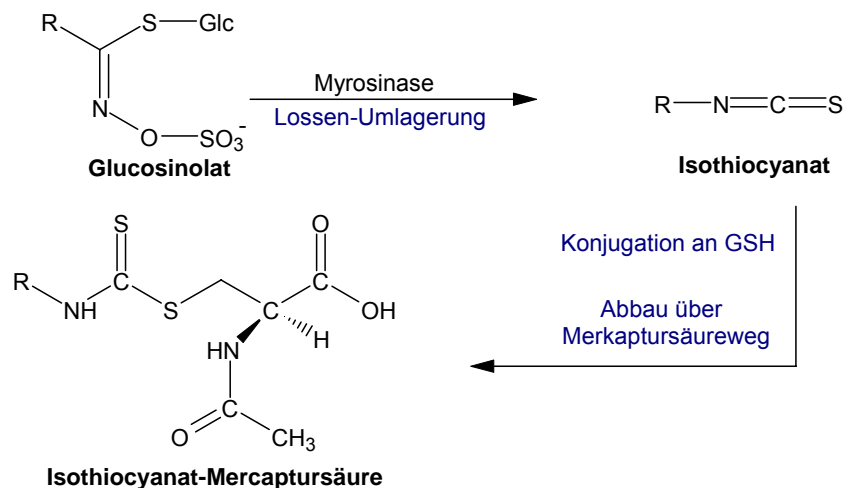


Abb. 1-6 Abbau von GSL über Isothiocyanate zu Mercaptursäuren (nach VERMEULEN et al. 2003); Glc = Glucose

Über die Quantifizierung von Mercaptursäuren im Urin zeigten SHAPIRO et al. (1998), dass die Verstoffwechslung von GSL und ITCs im menschlichen Organismus unterschiedlich effizient abläuft. So weisen ITCs, die direkt über pflanzeneigene Myrosinasen während des Ingestionsprozesses gebildet werden, direkte Korrelation mit den ausgeschiedenen Mercaptursäuren auf. Wurde die exogene Myrosinase gehemmt und GSL intakt aufgenommen, zeigten sich deutlich weniger Abbauprodukte des Mercaptursäurestoffwechsels im Urin. Zudem war die Exkretion deutlich verlangsamt, da körpereigene bakterielle Myrosinasen zwar in der Lage sind, GSL in deren Abbauprodukte zu spalten, dies aber nicht vollständig und weniger rasch erfolgt. Wurde die gastrointestinale Mikroflora zusätzlich über Antibiotika gehemmt, konnten wir erwartet keine Mercaptursäuren im Urin detektiert werden. Da das Vorkommen von Mercaptursäure im Urin dosisabhängig ist, lässt sich hieraus ein geeigneter Marker zur Bestimmung der konsumierten ITC- bzw. GSL-Menge ableiten (KRISTENSEN et al. 2007).

1.3 Physiologische Eigenschaften von Glucosinolaten und deren Abbauprodukten

Neben der Eigenschaft als Geschmacks- und Aromakomponente in pflanzlichen Lebensmitteln verfügen GSL und deren Abbauprodukte über zahlreiche weitere physiologische Funktionen (Abbildung 1-7). Darunter zählen positiv zu bewertende Eigenschaften wie krebopräventive und antimikrobielle Wirkungen sowie die

Beeinflussung des Östrogenstoffwechsels, aber auch negative goitrogene oder mutagene Effekte (TERNES et al. 2005).

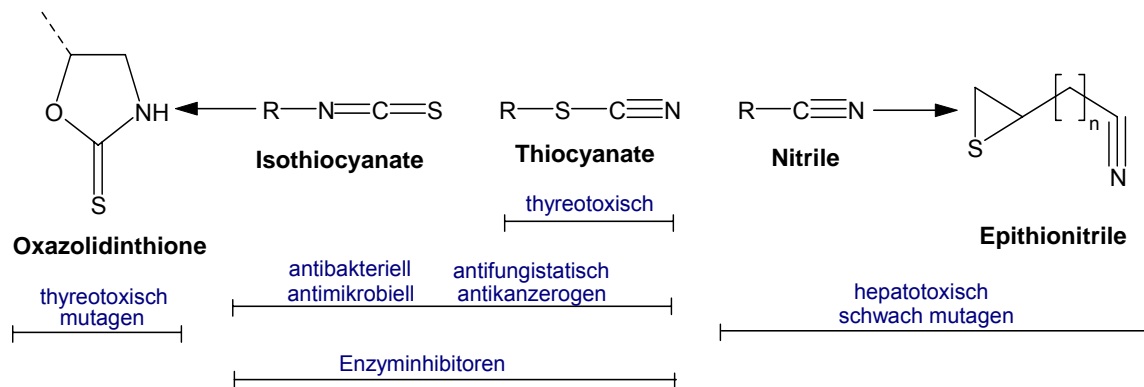


Abb. 1-7 Physiologische Eigenschaften von Glucosinolat-Abbauprodukten (modifiziert nach TERNES et al. 2005)

1.3.1 Positive Eigenschaften von GSL auf den menschlichen Organismus

Bestimmte GSL und insbesondere deren Abbauprodukte wie ITCs und Indole stellen potente Substanzen zur Krebsprävention dar. So wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass eine GSL-haltige Ernährung bzw. Gabe von bioaktiven Abbauprodukten in inversem Zusammenhang zur Entstehung von Blasenkrebs (ZHAO et al. 2007), Lungenkrebs, Magen-, Darm-, Brust- und Prostatakrebs steht (VERHOEVEN et al. 1997, TRAKA und MITHEN 2009, VAN POPPEL et al. 1999).

Im Tierversuch wurde festgestellt, dass der Zeitpunkt der Verabreichung entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit von ITCs auf die Kanzerogenese hat, da die Tumorentstehung nur verhindert werden konnte, wenn die Substanzen zeitlich vor oder gleichzeitig mit dem Kanzerogen verabreicht wurden. Dies deutet auf eine Beeinflussung der Initiationsphase der Krebsentstehung hin. Dabei werden Phase I-Enzyme, die für die Aktivierung von Prokanzerogenen zu biologisch wirksamen Kanzerogenen verantwortlich sind, kompetitiv gehemmt. Diese Inhibierung lässt sich dadurch erklären, dass ITCs mit inaktiven Kanzerogenen um die Bindung an Phase I-Enzyme der Cytochrom P450-Familie konkurrieren und dadurch eine Aktivierung verhindern können. Auf der anderen Seite können GSL-Abbauprodukte Entgiftungsenzyme (Phase II-Enzyme) wie z. B. die Quinon-Reduktase, Glutathion-S-Transferase oder die UDP-Glucuronosyl-Transferase

induzieren, die an bereits aktivierte Kanzerogene konjugieren und diese so in inaktive wasserlösliche Stoffe umwandeln, welche dann über den Urin ausgeschieden werden (RIEDL et al. 2009, MUNDAY und MUNDAY 2004, HEANEY et al. 1995, ZHANG und TALALAY 1994; FAHEY et al. 2002). Hierbei unterscheiden sich strukturell unterschiedliche ITCs deutlich hinsichtlich ihres Vermögens, Phase II-Entgiftungsenzyme zu aktivieren. So zeigte beispielsweise Sulforaphan ein deutlich größeres Potential als Benzyl-ITC oder Phenylethyl-ITC (ZHANG und TALALAY 1998).

Neben dieser direkt auf die Giftung/Entgiftung Einfluss nehmenden Effekte wurden weitere Mechanismen zur antikanzerogenen Wirkung von GSL-Abbauprodukten dargestellt. Sulforaphan und andere ITCs unterdrücken möglicherweise das Tumorwachstum, indem sie Apoptose fördern und regulierend auf den Zellzyklus wirken, Zellproliferation und -differenzierung hemmen sowie Zellsignalübertragung modulieren (CUDDIHY et al. 2008, GINGRAS et al. 2004, FIMOGNARI et al. 2004, BARILLARI et al. 2008). Sulforaphan, Phenylethyl-ITC und insbesondere eine Kombination aus beiden Komponenten zeigte sich zudem als besonders effektiv in der Hemmung inflammatorischer Prozesse durch Downregulation bestimmter Proteine und Enzyme, die initial an Entzündungsprozessen, Autoimmunerkrankungen und auch der Krebsentstehung beteiligt sind (CHEUNG 2008).

PAPI et al. (2008) beobachteten weiterhin eine direkt antioxidative Wirkung bei ITCs mit einem reduzierten Schwefelatom in ihrer Seitenkette. Dieses ist in der Lage, Hydrogenperoxide und andere Radikale zu quenchen, was wiederum eine verminderte Zahl an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Folge hat, die als starke Aktivatoren in der Tumorgenese gelten.

Die Abbauprodukte indolischer GSL nehmen eine Sonderstellung im Bezug auf das antikanzerogene Potential ein und hier insbesondere die Fähigkeit des Indol-3-Carbinol als Phytoöstrogen in den Östradiolmetabolismus einzugreifen. Durch Blockade des Östrogenrezeptors, Hemmung der Rezeptorexpression und Induktion Cytochrom P450-abhängiger Monooxygenasen, welche für die 2-Hydroxylierung von 17 β -Östradiol zu wenig östrogenen Metaboliten wie Catechol-Östrogen verantwortlich sind, vermag Indol-3-Carbinol die Entstehung und Proliferation hormoninduzierter Tumore zu hemmen (WONG et al. 1997).

Neben den wichtigen direkten und indirekten Effekten in der Krebsprävention besitzen gewisse GSL-Abbauprodukte zudem bakteriostatische Eigenschaften. Die Schädigung diverser Pflanzenpathogene durch GSL-Abbauprodukte im Zuge der Schutzmechanismen der Pflanze ist weit erforscht (RASK et al. 2000, BRADER et al. 2001, MANICI et al. 1997, MITHEN et al. 1986, TIERENS et al. 2001). Aber auch im Tierexperiment wurde gezeigt, dass z. B. Benzyl-ITC Virusinfektionen unterdrückt, indem es die Vermehrung der Viren durch Eingriffe in deren Stoffwechsel inhibiert. Da GSL fast vollständig im Duodenum absorbiert und erst in den Harnwegen zu antimikrobiellen Derivaten umgewandelt werden, ist die für die Verdauung wichtige bakterielle Darmflora des Dickdarms nicht negativ beeinträchtigt (WATZL und LEITZMANN 1995). Auf Grund seines ebenfalls antibakteriellen Charakters wird der Einsatz von Sulforaphan in der Therapie von durch *Helicobacter pylori* verursachte Gastritis und damit einhergehendem Magenkrebs (FAHEY et al. 2002, GALAN et al. 2004, HALKIER und GERSHENZON 2006) diskutiert, möglicherweise zeigen sich Methylsulfinylhexyl-Homologe ebenso wirksam gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*-Erregern (ONO et al. 1998).

1.3.2 Antinutritive und toxische Effekte auf den menschlichen Organismus

GSL-Abbauprodukte können, neben den genannten positiven, auch gewisse toxische und antinutritive Effekte auf den menschlichen Organismus ausüben, wie z. B. nachteilige Wirkungen auf den Thyroidmetabolismus. Thiocyanat-Ionen und Oxazolidin-2-thione, die aus GSL mit aliphatischer Seitenkette gebildet werden, stehen im Verdacht goitrogen zu wirken, wobei sich die zugrunde liegenden Mechanismen für beide Stoffklassen unterscheiden. Thiocyanat-Ionen sind Iod-Antagonisten und konkurrieren somit mit Iodid-Ionen um den Einbau in das Schilddrüsenhormon Thyroxin. Diese goitrogenen Effekte lassen sich durch Iod-Gabe abschwächen. Im Gegensatz dazu inhibieren Oxazolidin-2-thione die Thyroxinsynthese direkt, unabhängig von der Iodidverfügbarkeit (FENWICK und HEANY 1983). Folglich sind GSL-Abbauprodukte potentiell dazu fähig, goitrogene Effekte beim Menschen bzw. Tier hervorzurufen. Allerdings gibt es nur sehr geringe epidemiologische Evidenz für die Entstehung von Schilddrüsenerkrankungen beim Menschen (McMILLAN et al. 1986). Insgesamt gelten diese goitrogenen Mechanismen aber als ein bedeutender limitierender Faktor für die Gewinnung von Futtermitteln aus *Brassica*-Arten (MITHEN et al. 2000).

Neben den goitrogenen Effekten können GSL-Abbauprodukte weitere negative Eigenschaften aufweisen. Studien mit Phenylethyl-, Benzyl-, Methyl- und 2-Propenyl-ITC an Bakterienkulturen zeigten mutagene Effekte durch die Bildung von N-nitroso-Derivaten sowie durch erhöhte Induktion der Mikronuklei in menschlichen Hepatomzellen, wodurch diese zum Wachstum angeregt wurden. Andere Untersuchungen konnten diese Effekte nur mit den Abbauprodukten der Indol-GSL (Glucobrassicin, 4-Hydroxyglucobrassicin) in Verbindung bringen. Hohe Gehalte an Indol-3-Carbinol, welches der Nahrung von Mäusen zugesetzt wurde, zeigten dosisabhängige Hepatotoxizität und neurologische Toxizität (HEANEY und FENWICK 1995).

Im Gegensatz zu dem von PAPI et al. (2008) postulierten antioxidativen Potential gewisser ITCs stehen andere Isothiocyanate im Verdacht, selbst pro-oxidativ zu wirken. Ein Erklärungsmodell dieses Verhaltens – vor allem bei hoher Dosierung der ITC-Gabe – stellt ein fortschreitender GSH-Mangel infolge steigender intrazellulärer ITC-Konzentrationen und damit einhergehender oxidativer Stress dar (VALGIMIGLI und IORI 2009). Des Weiteren konnte die Bildung pro-oxidativer Superoxide (O_2^{\cdot}) in Redoxreaktionen der Isothiocyanatgruppe von Allyl-ITC, Benzyl-ITC und Phenylethyl-ITC mit Kupfer und Hydrogenperoxiden dokumentiert werden, was mit einer Schädigung der DNA in Verbindung steht (MURATA 2000).

Auch KASSIE et al. wiesen *in vitro* ein genotoxisches Potential von *Brassica*-Extrakten (1996) und Benzyl-ITC (1999) aber auch von Phenylethyl-ITC und Allyl-ITC sowie deren Precursoren Gluconasturtiin und Sinigrin (2000) nach, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Es wird postuliert, dass ROS eine Rolle in der genotoxischen Wirkweise dieser Substanzen spielen. *In vivo* stellte sich diese negative Wirkung deutlich weniger ausgeprägt dar, auszuschließen war sie jedoch im Speziellen bei hoher Dosierung der Einzelsubstanzen nicht. Dies ist vor allem im Hinblick auf das postulierte antikanzerogene Potential von ITCs und damit einhergehender Erhöhung des Konsums ITC-haltiger Lebensmittel oder der direkten Supplementierung mit Isothiocyanaten als bedenklich anzusehen (KASSIE et al. 2000).

1.4 Lebensmittel mit wesentlichen Gehalten an GSL und ITCs

Aufgrund der überwiegend positiven gesundheitlichen Eigenschaften vieler GSL und deren Abbauprodukte, aber auch hinsichtlich des Einsatzes derselben als Scharfstoffe und Aromakomponenten in der Lebensmittelindustrie ist es von Interesse, die genauen Gehalte dieser Inhaltsstoffe in den in Frage kommenden Pflanzen und den daraus hergestellten Lebensmitteln zu kennen. In der Natur liegen GSL in großer sortenbedingter Varianz vor, zudem spielen Umwelteinflüsse wie die Beschaffenheit und Zusammensetzung des Bodens und der darin enthaltenen Nährstoffe oder auch jahreszeitlich bedingte Schwankungen von Temperatur und Niederschlagsmenge (CARTEA et al. 2008) eine wichtige Rolle bei der GSL-Synthese in der Pflanze. Kennt man diese Faktoren und die damit einhergehenden Änderungen in GSL-Gehalt und -Zusammensetzung kann gezielt auf diese Einfluss genommen werden. So zeigen mehrere Arbeiten zum S- bzw. N-Haushalt der Pflanze in Zusammenhang mit deren GSL-Synthese, dass der Gehalt an aliphatischen und aromatischen GSL (bzw. ITCs) bei moderater N-Ernährung und gesteigerter S-Gabe maximiert werden kann, was über die vermehrte Bereitstellung von nichtproteinogenem Schwefel und damit einhergehender gesteigerter GSL-Produktion über die AS Methionin erklärt werden kann (ZHAO et al. 1994, GERENDÁS et al. 2008a, 2008b, 2009). Für diese These spricht zudem eine erhöhte Synthese der indolischen GSL aus Tryptophan bei gesteigerter N-Gabe (LI et al. 2007). Daneben kann das GSL-Profil auch – wie in Tabelle 1-2 zusammenfassend dargestellt – über Modulation weiterer pflanzenbauerischer Maßnahmen wie Wasserzufuhr, Temperatur, Entzeitpunkt oder ähnlichem verändert werden (SCHREINER et al. 2005).

Tab. 1-2 Effekte pflanzenbauerischer Maßnahmen auf die GSL-Gehalte ausgewählter Modellpflanzen (modifiziert nach SCHREINER et al 2005)

Pflanzenbauerische Maßnahme:	Modellpflanze		
	Brokkoli	Blumenkohl	Rettich
Genotypische Effekte	↑ Indolische GSL: violetter Brokkoli ↑ Alkylische GSL: grüner Brokkoli	↑ Indolische GSL: violetter und grüner Blumenkohl	↔
Tägl. mittlere Temperatur	↑ Gesamt-GSL: geringe Temperatur (14 °C)	↑ Gesamt-GSL: geringe Temperatur (14 °C)	↔
Tägl. mittlere Bestrahlungsdauer	↑ Gesamt-GSL: hohe Bestrahlung (450 µmol/m ² ·s)	↑ Gesamt-GSL: hohe Bestrahlung (450 µmol/m ² ·s)	↔
S-Zufuhr	↑ Indolische und Alkyl-GSL (600 mg S/Pflanze)	/	↑ Alkenyl-GSL (30 mg S/Pflanze)
N-Zufuhr	↑ Gesamt-GSL: reduzierte N-Zufuhr	↑ Gesamt-GSL: reduzierte N-Zufuhr	↑ Gesamt-GSL: reduzierte N-Zufuhr
Wasser-Zufuhr	↑ Gesamt-GSL: reduzierte Wasser- Zufuhr	↑ Gesamt-GSL: reduzierte Wasser- Zufuhr	↑ Gesamt-GSL: reduzierte Wasser- Zufuhr
Produktionszeitraum	↑ Gesamt-GSL: Frühling und Herbst	↑ Gesamt-GSL: Frühling und Herbst	↔
AS- Supplementierung	↑ Alkylische GSL: Methionin	/	↑ Alkyenyl-GSL: Methionin
Entwicklungsstadium	↑ Indolische GSL: nicht voll entwickelte Blütenköpfe	/	↔

↑ erhöhte Gehalte; ↔ kein Effekt; / nicht untersucht

Ein anderes Feld zur gezielten Einflussnahme auf Komposition und Gehalt an GSL in der Pflanze ist ein Einsatz der Gentechnik. Wie an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gezeigt, könnte so über gerichtete Überexprimierung bestimmter die GSL-Synthese codierender Gene der Familie Cytochrom P450 (CYP79) eine höhere Schädlingsresistenz der Pflanze bzw. eine verbesserte ernährungsphysiologische Relevanz derselben erreicht werden. Der regulatorische Eingriff erfolgt hierbei an der Stelle der Aldoxim-Bildung aus einer entsprechenden AS. Dies geschieht zum einen über gezielte Downregulierung bzw. Überexprimierung endogener CYP79-Untergruppen, was im Falle von *Arabidopsis thaliana* durch Behandlung mit einen

pathogenen Befall simulierenden Substanzen eine deutlich erhöhte Bildung indolischer GSL zur Folge hatte, eine typische Reaktion der Pflanze auf Verwundungen durch Schädlinge. Zum anderen werden exogene die Bildung von Aldoximen initialisierende Sequenzen derselben Genfamilie aus anderen Pflanzen eingeführt, was wiederum die GSL-Synthese aus normalerweise von dieser Pflanze nicht bevorzugt verstoffwechselten AS anregt und somit das GSL-Muster verändert. Dies kann letztendlich nicht nur in einer Verschiebung der GSL-Zusammensetzung münden, sondern sogar für diesen Pflanzentypus bislang unbekannte GSL in das System einführen (MIKKELSEN et al. 2002).

Aufgrund der antikanzerogenen Wirkung des Sulforaphan wurde darauf aufbauend durch Übertragung bestimmter Gensequenzen des Wildtypus *Brassica villosa* auf herkömmliche Brokkolisorten eine Hybridsorte entwickelt, die erhöhte Gehalte an 4-Methylsulfinylbutyl-GSL bzw. 3-Methylsulfinylpropyl-GSL aufwies. Ersteres gilt als Precursor für Sulforaphan, welches nach mildem Kochen bis zu 3fach höhere Gehalte im verzehrsfähigen Produkt zeigte (SARIKAMIS et al. 2006). Auch über Kreuzungen aus Rettich und Raps (*Raphanobrassica*) versuchte man ein verbessertes GSL-Profil zu erzeugen (SCHÜTZE et al. 1999).

1.4.1 *Brassicaceae*

Kresse

Auf Grund der beim Kauen freigesetzten Aroma- und Scharfstoffe werden Keimpflanzen gerne roh zum Verzehr als Blattsalate oder zum Würzen von Quark oder ähnlichem verwendet. Dazu eignen sich verschiedene Kressesorten, wie z. B. die Gartenkresse (*Lepidium sativum*), die an Gewässern beheimatete Brunnenkresse (*Nasturtium officinale*) oder die gelbe bis orange-rote essbare Blüten entwickelnde Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*).

Diese Arten weisen zum Teil hohe Gehalte an GSL auf, wobei meist ein Glucosinolat dominiert. So enthält Gartenkresse ca. 0,1-0,2 % Glucosinolate mit Glucotropaeolin (Benzyl-GSL) als Major Komponente und geringen Gehalten an Gluconasturtiin (2-Phenylethylglucosinolat). Brunnenkresse dagegen enthält große Mengen von bis zu 1 % an Gluconasturtiin, aber auch Glucotropaeolin, 7-Methylsulfinylheptyl-GSL sowie 8-Methylsulfinyloctyl-GSL. Kapuzinerkresse enthält hauptsächlich (0,1 % in

den Blättern, 1 % im Samen) Glucotropaeolin, aber auch 4-Hydroxybenzyl-GSL und 4-Methoxybenzyl-GSL (TERNES et al. 2005).

Neben der geschmacklichen Komponente, meist hervorgerufen durch die Abbauprodukte der GSL wie Isothiocyanate (Schärfteeindruck) oder Nitrile (Aroma), werden den Kressen zudem appetitanregende, antimikrobielle oder harntreibende Wirkungen zugeschrieben (TERNES et al. 2005).

Neuerdings als "Kressen" in den Handel gebrachte Keimlinge gehören zu keiner der oben genannten Familien. Aufgrund des scharfen Geschmacks kommen hier Keimlinge verschiedener anderer *Brassica*-Arten zum Einsatz, aber auch junge Pflanzen – sog. *Micro Greens* – anderer z. T. exotischer Arten, deren Gehalte an GSL jedoch fraglich bleiben.

Rucola

Rucola (*Eruca sativa*), auch bekannt als Ackerrauke, ist ein weiterer Vertreter der Pflanzenfamilie *Brassicaceae*. Die gezahnten Blätter dieser Pflanzengattung werden aufgrund ihres leicht säuerlichen, intensiven Geschmacks zu Salaten beigemischt oder als Gemüse verzehrt. Zudem werden neuerdings auch Rucolaschösslinge in Form von Sprossen oder Kressen zum Verzehr angeboten.

Neben einem hohen Gehalt an Vitamin C (TERNES et al. 2005) enthält Rucola Glucosinolate, deren Abbauprodukte das charakteristische scharfe Aroma dieser Pflanze ausmachen. Hier variieren Gehalt und Zusammensetzung der GSL in den unterschiedlichen Pflanzenorganen bzw. Wachstumsstadien. Im Samen herrscht Glucoerucin (4-Methylthiobutylglucosinolat) vor, kleine Mengen an Glucoraphanin (4-Methylsulfinylbutylglucosinolat) wurden ebenfalls nachgewiesen (FAHEY et al. 2001, DAXENBICHLER et al. 1991). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Blätter als Majorkomponente 4-Mercaptobutylglucosinolat (Abbildung 1-8) enthalten. Dieses entsteht über S-Demethylierung aus Glucoerucin und stellt eine Vorstufe des 4-Mercaptobutylisothiocyanates dar, welches für den stechenden Geschmacks-eindruck von Rucola verantwortlich ist (BENNETT et al. 2002). Daneben wurden ebenfalls geringere Mengen an Glucoerucin und Glucoraphanin detektiert (BENNETT et al. 2006).

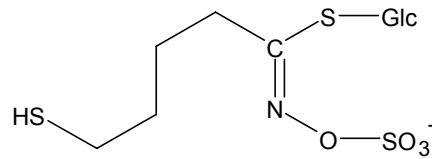


Abb. 1-8 Strukturformel von 4-Mercaptobutylglucosinolat (nach CATALDI et al. 2007); Glc = Glucose

Zusätzlich zu seinen Aspekten auf die Ernährung des Menschen werden Rucola zudem antiphlogistische, diuretische, die Verdauung unterstützende und entzündungshemmende Effekte bzgl. *Colitis ulcerosa* zugeschrieben (MAHRAN et al. 1991, DE FEO und SENATORE 1993).

Brokkoli

Brokkoli (*Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *italica*) ist eine zu den Kohlarten gehörende Pflanzengattung. Die dunkel- bis violettgrünen Knospenstände (Köpfe) dieser Art werden roh als Salat aber hauptsächlich in gekochter Form als Gemüse konsumiert (TERNES et al. 2005).

Brokkoli stellt aufgrund seines hohen Gehaltes an Glucoraphanin (4-Methylsulfinylbutyl-GSL) eine ideale Quelle für das daraus gebildete ITC Sulforaphan dar, welches in der Tumörprävention als Aktivator für Phase II-Enzyme eine herausragende Stellung einnimmt. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass sich das Glucosinolatprofil über den Wachstumszeitraum der Pflanze weg von Glucoraphanin, welches v. a. im Schössling dominiert, zu indolischen GSL wie Glucobrassicin oder Neoglucobrassicin in der adulten Pflanze ändert (FAHEY et al. 1997). Bezugnehmend auf diese Eigenschaft werden heutzutage vermehrt junge Brokkolischösslinge in Form von frischen oder lyophilisierten Sprossen angeboten, die neben der Hauptkomponente Glucoraphanin noch weitere GSL enthalten, v. a. Glucoerucin (4-Methylthiobutyl-GSL) und Glucoiberin (4-Methylsulfinylpropyl-GSL) aber auch Sinigrin (Allyl-GSL), Gluconapin (3-Butenyl-GSL) und lediglich in Spuren die indolischen GSL Glucobrassicin, Neoglucobrassicin und Methoxyglucobrassicin (TIAN et al. 2005). Die höchsten Konzentrationen des Sulforaphan-Precursor Glucoraphanin bei gleichzeitig niedrigsten Konzentrationen an evtl. gesundheitsschädliche Abbauprodukte erzeugender Indol-GSL wurden in Brokkolisamen detektiert (WEST et al. 2004), weshalb ein Einsatz derselben als Nahrungsergänzungsmittel oder Lebensmittelzusätze diskutiert wird.

Rettich

Andere Arten der *Brassicaceae*, wie der Rettich (*Raphanus sativus*) und dessen kleinere Subspezies Radieschen (*Raphanus sativus* subsp. *sativus*), zu der auch der weiße längliche "Eiszapfen" gerechnet wird, sowie dessen asiatische Zuchtformen wie der Daikon-Rettich, enthalten ebenfalls Glucosinolate. Die Rettichwurzel kann in verschiedenen Farbvarianten von weiß über rot zu schwarz auftreten und wird aufgrund ihres charakteristischen scharfen Geschmacks meist roh als Salatbeilage verzehrt. Aber auch die Keimlinge bzw. Sprossen dieser Pflanzengattung werden zum Verkauf angeboten. Im asiatischen Raum, und hier vor allem in Japan, wird der dort gebräuchliche Daikon-Rettich auch in eingelegter oder getrockneter Form als Beilage zu Fleischgerichten oder ähnlichem konsumiert (CURTIS et al. 2003).

Das Glucosinolatprofil aller Unterarten der Gattung *Raphanus sativus* besteht aus den Glucosinolaten Glucoraphsatin (4-Methylthio-3-butenyl-GSL), Glucoraphanin (4-Methylsulfinylbutyl-GSL) und Glucoraphenin (4-Methylsulfinyl-3-butenyl-GSL) (CARLSON et al. 1985), wobei in Samen und frühen Keimlingen die GSL Glucoraphanin und Glucoraphenin dominieren, in der adulten Knolle dagegen Glucoraphsatin als Major Komponente anzusehen ist, welches in Daikon-Rettich die höchsten Gehalte aufweist (ISHII et al. 1989). In Extrakten der Rettichwurzel konnten zusätzlich Methylthiobutyl-ITC (aus Glucoerucin), Methylthiopentyl-ITC und Phenylethyl-ITC (aus Gluconasturtiin) detektiert werden (BLAŽEVIĆ und MASTELIĆ 2009).

Neben dem Einsatz als Nahrungsmittel sind seit langem auch gesundheitliche Aspekte dieser Pflanzengattung bekannt. So soll der Konsum von Rettich neben den Isothiocyanaten zugrunde gelegten antikanzerogenen Wirkungen auch bei verschiedenen gastrointestinalen Beschwerden oder bei Problemen im Beatmungstrakt oder mit der Leber Linderung verschaffen. Zudem weisen Extrakte aus Rettich oder Rettichsprossen großes antimikrobielles Potential auf (PÉREZ GUTIÉRREZ und PEREZ 2004).

Senf

Ausgangsmaterialien für die Produktion von Speisesenf sind hauptsächlich die zur Familie der *Brassicaceae* gehörenden ölreichen Samen von gelbem Senf (*Sinapis alba*), als Sarepta- oder Indischer Senf bezeichnetem braunen Senf (*Brassica juncea*), sowie seltener schwarzem Senf (*Brassica nigra*). Diese Gewürzpflanze wird

weltweit in klimatisch gemäßigten Zonen, überwiegend aber in Mitteleuropa, Chile, China sowie in Russland angebaut (SEIDEMANN 1993).

Braune und schwarze Senfsaat zeichnen sich durch hohe Gehalte an Sinigrin aus, welches als Precursor für das leicht flüchtige, stechend riechende Allyl-ITC gilt, das maßgeblich an Aroma und Schärfeeindruck des Speisesenfs beteiligt ist. Gelbe Senfsaat enthält hauptsächlich Sinalbin, dessen korrespondierendes Isothiocyanat Hydroxybenzyl-ITC eine mildere Schärfe besitzt (LIEBEREI 2007).

Speisesenf ist eine verzehrfertige, mehr oder weniger scharf schmeckende Zubereitung von breiiger Konsistenz, die auf der Basis von gemahlene Senfsamen durch Zusatz von Essig, Wasser oder Wein, Salz, Zucker und ggf. weiteren Gewürzen und Zusatzstoffen nach verschiedenen Verfahren hergestellt wird (SEIDEMANN 1993). Die Senfherstellung erfolgt in der Regel nach zwei Verfahren. Das üblichere ist das sog. Bordeaux-Verfahren. Hierzu werden entölte oder nicht entölte Senfkörner grob vermahlen oder gepresst und mit den übrigen Zutaten in einem Maischbottich angemaischt, wobei über das durch den Quetschprozess freigesetzte Enzym Myrosinase aus Glucosinolaten die ITCs als Scharfstoffe des Senfes gebildet werden. Nach der nassen Feinvermahlung bilden sich in der Ruhephase durch Nachquellen der Samen der endgültige Geschmack, das Aroma und die Konsistenz des Speisesenfes aus. Beim Dijonverfahren hingegen werden nicht entölte, vorwiegend braune oder schwarze Senfsamen zunächst in Wasser oder Wein vorgequollen, anschließend aufgebrochen und von den Samenschalen abgetrennt. Erst danach erfolgt die Zugabe der übrigen Zutaten und der eigentliche Maischprozess beginnt (SEIDEMANN 1993).

Meerrettich

Die Meerrettichstaude (*Armoracia rusticana*) gehört ebenfalls zur Familie der *Brassicaceae*. Meerrettich wird als ganze Wurzel oder auch getrocknet und vermahlen gehandelt (SEIDEMANN 1993). Hauptsächlich wird Meerrettich jedoch als tafelfertige Würzpaste verzehrt, für deren Herstellung der geriebenen Wurzel Pflanzenöl, teilweise zusätzlich Sahne und Gewürze sowie Salz, Zucker, Essig, Citronensäure oder andere Konservierungsmittel zugesetzt werden (TERNES et al. 2005).

Für den scharfen Geschmack und Geruch des Meerrettichs sind ähnlich dem Senf vor allem Isothiocyanate verantwortlich. Auch hier stellt das GSL Sinigrin und dessen scharf schmeckendes Abbauprodukt Allyl-ITC die Major Komponente dar, daneben enthält Meerrettich Gluconasturtiin bzw. als Folgeprodukt Phenylethyl-ITC (GILBERT und NURSTEN 1972, SULTANA et al. 2003b). Außerdem wurden Spuren an Glucobrassicinapin und mehrere Glucobrassicin-Derivate (3-Indolylmethyl-GSL, 4-Methoxy-3-Indolylmethyl-GSL und Hydroxy-3-Indolylmethyl-GSL) nachgewiesen, welche allerdings nicht zu ITCs, sondern zu Hydroxymethylindolderivaten sowie Rhodanid abgebaut werden (TERNES et al. 2005) und somit für den scharfen Geschmackeindruck von nebensächlicher Bedeutung sind.

Neben der für den Verbraucher maßgeblichen geschmacklichen Komponente gilt Meerrettich zudem aufgrund eines hohen Vitamin C-Gehalts, seiner antibakteriellen Wirkung sowie einer verstärkten Magensekretion und somit verbesserten Verdauungstätigkeit nach dem Verzehr als ernährungsphysiologisch bedeutsam (TERNES et al. 2005).

Wasabi

Der in Geschmack und Aussehen an Meerrettich erinnernde Wasabi (*Wasabia japonica*) zählt ebenfalls zu den Kreuzblütlern. Wurzeln, aber auch Blätter und Blattstiele dieser erstmals vor mehr als 1000 Jahren in Japan kultivierten Pflanze werden vor allem im asiatischen Raum zum Würzen von Speisen eingesetzt. Insbesondere in Japan wird die Wurzel frisch gerieben zu verschiedensten Gerichten gereicht, während Wasabi in anderen Teilen der Welt meist lediglich in Form von Pasten oder Pulver erhältlich ist (LIEBEREI 2007, DEPREE et al. 1999). Diese auch im deutschen Handel erhältlichen Wasabiprodukte werden häufig auf Basis von Meerrettich hergestellt, dem lediglich ein geringer Anteil an echtem Wasabi zugesetzt wurde, um die charakteristische Farbgebung dieser Produkte zu erhalten. Teilweise werden zusätzlich Farbstoffe wie Tartrazin und Brillantblau sowie geschmacksgebende Komponenten zugesetzt.

Bezüglich seines Glucosinolatprofils unterscheidet sich Wasabi nur wenig von Meerrettich. Auch hier stellt Sinigrin bzw. das daraus gebildete Allyl-ITC den mengenmäßig größten Anteil dar. Neben Allyl-ITC wurden hier zudem *sec*-Butyl-, 3-Butenyl-, 4-Pentenyl- und 5-Hexenyl-ITC nachgewiesen. Anders als Meerrettich enthält Wasabi jedoch kein Phenylethyl-ITC (SULTANA et al. 2003b, DEPREE et al.

1999), was als wichtiges Unterscheidungskriterium dieser Pflanzengattungen angesehen werden kann.

1.4.2 *Capparaceae*

Auch andere Pflanzenfamilien, wie z. B. die hauptsächlich im Mittelmeerraum angebauten Kaperngewächse (*Capparaceae*), weisen relevante Gehalte an Glucosinolaten auf. Ein Vertreter hierfür ist der mehrjährige Echte Kapernstrauch (*Capparis spinosa*). Als Kapern werden die geschlossenen und abgewelkten Blütenknospen bezeichnet, die eine oliv- bis blaugrüne Farbe besitzen und pfefferkorn- bis erbsengroß sind. Kapern werden in der Regel nicht roh konsumiert, sondern in Salzlake oder Essig fermentiert bzw. in Öl eingelegt angeboten und zum Würzen von Fleisch- und Fischgerichten, Soßen und Salaten verwendet, wobei hier je nach Größe und Qualität der Knospen sechs Arten (Tabelle 1-3) unterschieden werden (TERNES et al. 2005).

Tab. 1-3 Einteilung der Kapernsorten anhand ihrer Größe und Beschaffenheit (TERNES et al. 2005)

Sorte	Beschaffenheit	Größe [mm]
<i>Nonpareilles</i>	fest geschlossen	4-7
<i>Surfines</i>	fest geschlossen	7-8
<i>Capucines</i>	vereinzelt nicht fest geschlossen	8-9
<i>Capotes</i>	vorwiegend fest geschlossen	9-10
<i>Fines</i>	vorwiegend fest geschlossen	12-13
<i>Hors calibres</i>	vorwiegend fest geschlossen	13-15

Das Glucosinolatprofil der Gattung *Capparaceae* unterscheidet sich von dem anderer glucosinolathaltiger Pflanzen deutlich. So wurde das GSL Glucocapparin (Methylglucosinolat) bisher lediglich in dieser Pflanzengattung nachgewiesen, wo es ca. 80 % des Gesamtglucosinolatgehaltes ausmacht. Das aus diesem GSL gebildete Methyl-ITC macht den charakteristischen stechenden Geschmack der Kapern aus (ROMEO et al. 2007). Neben Glucocapparin wurden in Kapern zudem geringe Mengen an Glucoiberin (5-Methylsulfinylpropyl-GSL) und Sinigrin (Allylglucosinolat) bzw. deren entsprechende Isothiocyanate nachgewiesen (MATTHÄUS und ÖZCAN 2002).

Neben den eigentlichen Kapern werden unter der Bezeichnung Kapernbeeren auch die aus den Blütenknospen entwickelten schotenförmigen Früchte von *Capparis spinosa* angeboten. Zudem sind in Essig eingelegte Blütenknospen anderer Pflanzenarten wie Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*), Sumpfdotterblume (*Caltha palustris*, *Ranunculaceae*) oder Scharbockskraut (*Ranunculus ficaria*, *Ranunculaceae*) als Kapernersatz im Handel (TERNES et al. 2005).

1.4.3 *Moringaceae*

Die Pflanzenfamilie der *Moringaceae* umfasst zehn Arten, wobei die Gattung *Moringa oleifera* (Meerrettichbaum), ein schnell wachsender Baum, der ursprünglich aus Indien, Pakistan, Bangladesch und Afghanistan stammt, die weiteste Verbreitung zeigt. *Moringa oleifera* wird inzwischen in vielen Gebieten der Tropen kultiviert, da er für den Menschen neben der Bedeutung als Nahrungspflanze auf Grund seiner Gehalte an hochwertigem Protein, Vitaminen und Mineralstoffen sowohl einen medizinischen als auch einen industriellen Nutzen aufweist.

In Teilen Afrikas und Asiens wird *Moringa* als Nahrungsmittel eingesetzt, um Mangelernährung besonders bei Kindern und stillenden Müttern entgegen zu wirken. Dies geht auf die hohe Nährstoffdichte der Pflanze zurück, die reich an Calcium, Eisen, Vitamin C und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen ist. Zudem ist der *Moringa*-Baum bis zum Ende der Trockenzeit in den Tropen voll beblättert und stellt so eine sichere Nahrungsquelle dar, wenn andere Nahrungspflanzen knapp sind (FAHEY et al. 2005). Blätter des *Moringa*-Baumes werden zusätzlich aufgrund ihrer antibakteriellen Eigenschaften (EILERT et al. 1981) zur Aufbereitung von Trinkwasser oder als Biopestizid verwendet. Zudem werden Extrakte aus verschiedenen Geweben der *Moringa*-Pflanzen wegen der hohen Gehalte an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen als entzündungshemmende, hepatoprotective und antitrypanosomale Mittel sowie in der Krebsprävention eingesetzt (BENNETT et al. 2003).

Alle *Moringa*-Arten sind reich an Glucosinolaten, wobei im Samen wiederum die höchsten Gehalte nachgewiesen wurden. *Moringaceae* weisen charakteristische GSL auf, die den Einfachzucker Rhamnose enthalten. Der wichtigste Vertreter hierfür ist das 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-GSL (Abbildung 1-9) sowie dessen drei Monoacetyl-Derivate. Neben diesen Komponenten wurden je nach *Moringa*-Art und

Pflanzenteil variierend Glucotropaeolin (Benzyl-GSL), Isopropyl-GSL, Isobutyl-GSL sowie 2-Methylpropyl-GSL nachgewiesen (BENNETT et al. 2003).

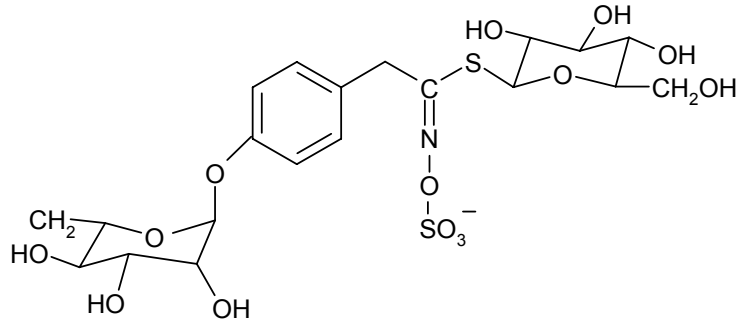


Abb. 1-9 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat in *Moringa*-Arten (nach FAHEY et al. 2005)

Zusätzlich zu einem weit gefächerten Einsatz verschiedener Teile der *Moringa*-Pflanze als Nahrungsmittel und in der Medizin wird aus dieser Pflanze unter anderem Tierfutter, Haushaltsreinigungsmittel, Farbstoff, Pflanzengummi oder Düngemittel bzw. Gründünger hergestellt. Des Weiteren findet das aus den Samen des *Moringa*-Baums gewonnene Öl Verwendung in der Kosmetikindustrie (FAHEY et al. 2005).

1.4.4 Maca (*Lepidium meyenii*)

Die Macapflanze gehört ebenfalls zur Gruppe der *Brassicaceae*, soll aber hier gesondert dargestellt werden. Sie stammt aus den Höhenlagen Perus und wächst dort auf trockenen Wüstenböden. Die knolligen cremefarbenen bis gelb-violetten oder fast schwarzen Wurzeln sind reich an Stärke, Zucker, Protein und essentiellen Mineralstoffen wie Eisen und Iod (MUHAMMAD et al. 2002). Dank dieser Eigenschaften stellt die Macawurzel für die peruanische Bevölkerung ein nützliches Grunderzeugnis dar, welches in der Sonne getrocknet über mehrere Jahre ohne erhebliche Nährstoffverluste gelagert werden kann. Ihr Aroma wird als süßlich, moschusartig bis würzig-scharf beschrieben (Report of an Ad Hoc Panel of the Advisory Committee on Technology Innovation 1989).

Neben der Eignung als Grundnahrungsmittel stellt die Macawurzel eine bedeutsame Quelle für sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe dar. Dies zeigt sich unter anderem in einem hohen Gehalt an Glucosinolaten von bis zu 1 % der Frischmasse. Hierbei handelt es sich um eine Kombination der Glucosinolate Glucotropaeolin (Benzyl-GSL) und Methoxybenzyl-GSL, welche in dieser Form in keiner weiteren GSL-haltigen Pflanze nachgewiesen wurde (FAHEY et al 2001, DINI et al 2002).

Diese Tatsache kann somit als Qualitätsparameter zur Identifizierung von Maca in Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln herangezogen werden.

Die pulverisierte Wurzel von *Lepidium meyenii* hat heute als Nahrungsergänzung weltweit Bedeutung erlangt. Neben chemopräventiven und antioxidativen Effekten wird die auch als „peruanischer Ginseng“ bezeichnete Pflanze wegen ihrer angeblich fertilitätssteigernden, aphrodisierenden und leistungssteigernden Wirkung in Form von Tabletten, Kapseln aber auch Likören oder Softdrinks angeboten (MUHAMMAD et al. 2002). Die gesundheitliche Unbedenklichkeit dieser Produkte kann aufgrund einer bislang nur unzureichenden wissenschaftlichen Datenlage über mögliche unerwünschte Nebenwirkungen nicht immer gesichert werden (Bundesinstitut für Risikoforschung (BfR), Stellungnahme Nr. 024/2007 vom 3. April 2007).

1.5 Methodisches Vorgehen

Aufgrund der eher unerwünschten Eigenschaften bestimmter GSL und deren Abbauprodukten im Futtermittelbereich begann man schon früh, Methoden zum chromatographischen Nachweis von GSL in Futtermitteln wie Raps zu entwickeln. Hierbei spielte vornehmlich der Nachweis des Gesamtgehaltes an GSL eine Rolle, weniger die individuelle Substanz, weswegen ein indirekter Nachweis durch bei enzymatischer Spaltung in äquimolaren Mengen freigesetzte Glucose (HEANY et al. 1988) bzw. abgespaltenes Sulfat (SCHNUG 1987) als geeignet erachtet wurde. Mit genaueren Kenntnissen der unterschiedlichen Bioaktivität individueller Glucosinolate und damit einhergehender Möglichkeiten zum therapeutischen Einsatz dieser Substanzen beim Menschen wurde es immer bedeutsamer, Glucosinolate und auch deren Abbauprodukte zur weiteren Verwendung intakt zu detektieren und zu isolieren.

In Tabelle 1-4 sind zusammenfassend einige gängige Methoden zum Nachweis des Gesamtglucosinolatgehaltes wie auch der Detektion intakter Glucosinolate und deren Hauptabbauprodukten dargestellt (MORENO et al. 2006).

Tab. 1-4 Darstellung gängiger Nachweismethoden für Glucosinolate und deren Abbauprodukte (nach MORENO et al. 2006)

Substanz	Nachweismethode
Gesamtglucosinolatgehalt	Palladiumchlorid bzw. Thymol-Assays
	Enzymatische Glucose- und Sulfat-Assays
	ELISA
	Nahinfrarotreflexionsspektroskopie (NIR)
	Hochauflösende Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)
Intakte Glucosinolate	Umkehrphasen-HPLC (RP)
	Thermospray LC mit Tandem-MS
	Hochauflösende Kapillarelektrophorese
Desulfo-GSL	Kapillar-GC-MS, GC-MS, GC-MS-MS
	Umkehrphasen-HPLC
Abbauprodukte	Röntgenfluoreszenzspektroskopie (XRF)
	GC bzw. GC-MS
	HPLC

Neben indirekten Nachweismethoden über flüchtige Abbauprodukte mittels Gas-Flüssigkeits-Chromatographie (GLC) oder GC-MS wurden Methoden zum direkten Nachweis von GSL entwickelt, wobei man sich auf eine Analyse mittels HPLC konzentrierte. Durch ihre ionische und somit sehr polare Struktur werden intakte Glucosinolate auf herkömmlichen HPLC-Phasen (Umkehrphasenchromatographie, RP) schlecht retardiert. Eine inzwischen als EU-Standard etablierte Methode, dieses Problem zu umgehen, basiert auf einer enzymatischen Desulfatierung der Glucosinolate, wodurch weniger polare Desulfoglucosinolate entstehen, die eine Trennung mittels Umkehrphasen-Materialien (z. B. RP18) problemlos ermöglichen (FENWICK et al. 1983). Nachteil dieser Methode ist allerdings die nicht reversible Veränderung der GSL, welche somit zum weiteren Einsatz unbrauchbar werden. Versuche mit Ionenpaar-Reagenzien auf Basis von Alkylammoniumsalzen wie Tetraoctylammoniumbromid oder Tetradecylammoniumbromid bei Trennung an herkömmlichen RP-Phasen zeigten ebenfalls sehr gute Trennergebnisse, auch bei simultaner Analyse mehrerer intakter Glucosinolate (PRESTERA et al. 1996). Nachteil dieser Chromatographieart ist jedoch der hohe Preis solcher Reagenzien und deren negative Interaktionen bei kombinierter Analytik mit Massenspektrometrie. Daher wurde mit weiteren Phasen experimentiert, unter anderem einer porösen Graphitphase (PGC), welche über Retention auf Basis delokalisierter Elektronen eine

große Bandbreite an GSL und deren desulfatierter Analoga abdeckt (ELFAKIR und DREUX 1996) oder der Kombination mehrerer Phasen unterschiedlicher Trennmechanismen in Reihe (WEST et al. 2002). Sehr gute Ergebnisse bei der Trennung intakter Glucosinolate wurden zudem über hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) erzielt. Diese Art der Chromatographie basiert auf einer Anreicherung der unpolaren stationären Phase mit dem polaren Teil des Eluentensystems (meist ein geringer Teil Wasser in Acetonitril), was sie ähnlich einer Normalphase ideal zur Trennung polarer Substanzen macht, allerdings ohne deren charakteristische Problematik wie schlechte Löslichkeit der Analyten in der stark unpolaren mobilen Phase oder schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufgrund von Drift in Retentionszeiten o. ä. (HEMSTRÖM et al. 2006). Diese von TROYER et al. (2001) etablierte und von WADE et al. (2007) weiterentwickelte Methode wurde allerdings bisher lediglich auf eine begrenzte Anzahl an simultan analysierten GSL angewandt. Gleiches gilt für eine von WEST et al. (2002) entwickelte Methode, welche es ermöglicht polare wie unpolare GSL simultan auf einer Säule zu trennen. Als Phasenmaterial diente hier silicagebundenes C18-Material mit hydrophilem Endcapping. Zur strukturellen Absicherung der über diese Methoden identifizierten GSL wurde hauptsächlich mit Kopplung an ein Massenspektrometer (FENWICK et al. 1980) gearbeitet bzw. im Falle isolierter Substanzen eine Strukturaufklärung mittels NMR angeschlossen.

Die Gruppe der Isothiocyanate stellt unter physiologischen Bedingungen die bevorzugt gebildeten Hauptabbauprodukte der GSL dar, welche zudem als wichtigste Vertreter für Aroma und Schärfeeindruck des entsprechenden glucosinolathaltigen Lebensmittels angesehen werden. Methoden zur Detektion der flüchtigen Isothiocyanate sind bisher nicht weit verbreitet. Ein gängiger Nachweis von ITCs, welcher zudem dem indirekten Nachweis der GSL dient, erfolgt über Cyclokondensation der flüchtigen ITCs mit vicinalen Dithionen, wobei beste Ergebnisse ohne negative Interventionen durch andere GSL-Abbauprodukte mit 1,2-Benzenedithiol erzielt wurden. Die hieraus entstandenen 1,3-Benzodithiol-2-thione zeigen hohe UV-Absorption und können somit schnell und zuverlässig mittels HPLC nachgewiesen werden (ZHANG et al. 1996). Nachteil dieser Methode ist die zeitaufwendige Derivatisierung der ITCs vor der eigentlichen Analyse.

Eine weitere Möglichkeit, Isothiocyanate zu bestimmen und zu quantifizieren stellt eine Analyse mittels Gaschromatographie dar (AL-GENDY und LOCKWOOD 2003). Hierbei macht man sich die natürliche Flüchtigkeit der ITCs zunutze, welche eine direkte Detektion ohne vorherige Derivatisierung ermöglicht. Die Kopplung eines Gaschromatographen an ein Massenspektrometer liefert zudem die zur Substanzidentifizierung nötige strukturelle Absicherung (SPENCER und DAXENBICHLER 1980).

2 Aufgabenstellung

Glucosinolate stellen eine wichtige Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe dar. Daher wird eine quantitative Darstellung dieser Substanzklasse immer bedeutender hinsichtlich Aussagen zur Qualität von Lebens- und Nahrungsergänzungsmitteln. Zu ihren enzymatisch gebildeten, flüchtigen Abbauprodukten gehören die Isothiocyanate, welche maßgeblich für Geruch und Aroma bestimmter Lebensmittel verantwortlich sind und somit einen wichtigen Inhaltsstoff dieser Produkte darstellen. Zudem wird mehr und mehr das gesundheitliche Potential dieser Stoffe diskutiert und darauf abzielende, pflanzenzüchterisch veränderte Produkte bzw. glucosinolathaltige Nahrungsergänzungsmittel auf den Markt gebracht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methodenplattform zur Qualitäts- bzw. Authentizitätskontrolle intakter Glucosinolate und daraus gebildeter Isothiocyanate zu schaffen. Hierzu war die Analyse eines möglichst breiten Spektrums dieser Substanzen von Interesse, um ein breites Screening mit möglichst geringem Aufwand zu ermöglichen. Hierzu sollten mit neuartigen Säulenmaterialien zur Retardierung polarer Substanzen Methoden zur flüssigchromatographischen Trennung dieser Stoffklasse entwickelt und diese über im Handel erhältliche Referenzsubstanzen auf Parameter wie Stabilität, Trennleistung und Nachweisgrenzen validiert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellte die Kopplung an ein Massenspektrometer zur Charakterisierung strukturell neuer GSL dar, um so evtl. neue Referenzsubstanzen zu erhalten.

Daneben sollte eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung der flüchtigen ITCs als den Hauptabbauprodukten der GSL entwickelt werden, wobei es Ziel war, eine schnelle und zuverlässige Trennung einer möglichst großen Bandbreite an ITCs zu schaffen und mittels handelsüblicher Referenzen zu validieren.

Aufgabe war es, diese Methoden auf ausgewählte Proben im Lebens- bzw. Nahrungsergänzungsmittelbereich inklusive neuartiger Produkte anzuwenden, wobei die hier enthaltenen GSL und ITCs sowohl qualitativ als auch quantitativ dargestellt werden sollten. Bei der Auswahl des Probenmaterials galt die Vorgabe, ein möglichst breites Prozessierungsspektrum abzudecken, um Aussagen über Einflüsse auf den Gehalt an GSL und ITCs über diese Verarbeitungen zu erhalten.

3 Materialien und Proben

3.1 Geräte

3.1.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (HPLC) mit Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometer (ESI-MS)

Anlage 1: HP 1100 Series; Agilent, D-76337 Waldbronn

Säulenofen (Modell G1316A)

Diodenarray-Detektor (Modell G1324A)

Probengeber (Modell G1313A)

Quaternäres Pumpensystem (Modell G1311A)

Vakuum Degasser (Modell G1322A)

Software: HP ChemStation for LC-Systems (Rev.A.04.02)

Anlage 2: HP 1100 Series; Agilent, D-76337 Waldbronn

Säulenofen (Modell G1316A)

UV-Detektor (Modell G1314A)

Probengeber (Modell G1313A)

Binäres Pumpensystem (Modell G1312A)

Vakuum Degasser (Modell G1322A)

Software: HP ChemStation for LC-Systems (Rev.A.04.02)

ESI-MS: LCQ; Thermo Electron GmbH, D-28197 Bremen

Sheath gas, Aux gas: N₂

Collision gas: Helium 5.0 (Messer-Griesheim, D-47793 Krefeld)

Software: Xcalibur 2.0 SUR 1

Zur automatischen Kalibrierung wurde ein Gemisch aus Coffein (m/z 195,1), Met-Arg-Phe-Ala (m/z 524,3) und Ultramark 1621 (m/z 1022,0; m/z 1122,0; m/z 1222,0; m/z 1322,0; m/z 1422,0; m/z 1522,0; m/z 1622,0; m/z 1722,0; m/z 1822,0; m/z 1921,9) verwendet.

Säulen:**Phenomenex Ltd. Deutschland, D- 63741 Aschaffenburg**

Luna[®] 5 µm HILIC
(250 x 4,6 mm ID, 5 µm Korngröße) Art.-Nr.: 00G-4450-E0

Varian Deutschland GmbH, D-64289 Darmstadt

Microsorb-MV 100-5 Amino 1/4"
(250 x 4,6 mm ID, 5 µm Korngröße) Art.-Nr.: R0086700C5

Polaris[®] C18-Ether
(250 x 4,6 mm ID, 3 µm Korngröße) Art.-Nr.: A2020250X046

Pursuit[®] PFP
(250 x 4,6 mm ID, 5 µm Korngröße) Art.-Nr.: A3050250X046

Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

LiChroCART[®] Purospher[®] RP-18e
(250 x 4,0 mm ID, 5 µm Korngröße) Art.-Nr.: 150169

Alltech Grom GmbH, D-72108 Rottenburg-Hailfingen

Grom-Sil Polyamin 2
(250 x 4,0 mm ID, 5 µm Korngröße) Art.-Nr.: GSP20510R2504

CS Chromatography

Kromasil[®] 100-5 C18
(250 x 4,6 mm ID, 5 µm Korngröße) Art.-Nr.: 059586919

3.1.2 Gaschromatograph mit Massenspektrometer (GC-MS)**Anlage: Agilent, D-76337 Waldbronn**

Gaschromatograph (Modell HP 6890)

Massenspektrometer (Modell HP 5972)

Trägergas: Helium 5.0 (Messer-Griesheim, D-47793 Krefeld)

Software: HP ChemStation for GC-Systems (Rev.A.04.02)

Säule: Varian Deutschland GmbH, D-64289 Darmstadt

Factor Four[™] Kapillarsäule VF-35 ms
(30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm stat. Phase) Art.-Nr.: 238877

3.1.3 Weitere Geräte

Bi-Destilliergerät	Destamat Bi 18E (Heraeus Quarzglas GmbH, D-63450 Hanau)
Eppendorfcentrifuge	(Carl Roth GmbH & Co., D-76185 Karlsruhe)
Feinwaage	AG 245 (Mettler-Toledo, D-35396 Giessen)
Gefriertrocknungsanlage	BETA (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, D-37520 Osterode am Harz)
Glaswolle	Filterwatte, extra fein (MAGV GmbH, D-35464 Rabenau-Londorf)
Mikrospritze	Mikroliter TM , ga 26S/43 mm/pst, 10 µl (Hamilton, CH Bonaduz)
Pasteurpipette	Länge: 7 cm (kurz), 23 cm (lang), Ø: 7 mm (Hirschmann Laborgeräte, D-74246 Eberstadt)
pH-Meter	526 Multical [®] mit Inlab [®] 422 Elektrode mit Silber/Silberchlorid Bezugssystem (Wissenschaftl.-Technische Werkstätten, D-82362 Weilheim)
Pyrexgefäß	PP-Test tubes, 50 ml, CELLSTAR [®] (Greiner Bio One, D-42719 Solingen-Wald)
Rotationsverdampfer	VV 2000, WB 2000 (Heidolph, D-93309 Kelkheim)
Rüttler	Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, New York, U.S.A.)
Ultraschallgerät	Sonorex Super RK 106 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, D-12207 Berlin)
Ultra-Turax	T ₂₅ (Janke & Kunkel IKA [®] Labortechnik, D-79219 Staufen)
Universalschüttler	SM-30 (Edmund Bühler GmbH, D-72379 Hechingen)
Vakuumkammer	LiChrolut [®] (Merck KGaA, D-64271 Darmstadt)
Variopette	10-100 µl und 100-1000 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22339 Hamburg)
Waage	PB 1501-S (Mettler-Toledo, D-35396 Gießen)
Zentrifuge	Labofuge 400 (Heraeus Instruments GmbH, D-37520 Osterode)
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml (Fisher Scientific GmbH; D-58239 Schwerte)

3.2 Chemikalien

3.2.1 Festphasen

Carl Roth GmbH & Co., D-76185 Karlsruhe

Polyamid, f. d. Säulenchromatographie Art.-Nr.: 9620.1

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, D-52313 Düren

Chromabond[®] CN Art.-Nr.: 730063

Chromabond[®] NH₂ Art.-Nr.: 730033

Mallinckrodt Baker (J.T.Baker) Deutschland, D-64347 Griesheim

Bakerbond[™] Speedisk[®] C18 Polar Plus Art.-Nr.: 8153-03

Bakerbond[™] Speedisk[®] H₂O-Philic DVB Art.-Nr.: 8108-03

Bakerbond[™] SDB Polymeric Sorbent Art.-Nr.: 751905

SIGMA-ALDRICH GmbH, D-89552 Steinheim

Anionenaustauscher DEAE Sephadex[®] A-25 Art.-Nr.: A251208108-03

Anionenaustauscher DOWEX[™] MWA-1 Art.-Nr.: 44440

Supleco, Bellefonte, PA 16823-0048 USA

Discovery[®] DPA-6S Art.-Nr.: 52625-U

3.2.2 Weitere Chemikalien

Carl Roth GmbH & Co., D-76185 Karlsruhe

Ethanol (>96 %) Art.-Nr.: 043912500

E. Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

Hexan, LiChrosolv[®] Art.-Nr.: 043912500

SIGMA-ALDRICH Laborchemikalien GmbH, D-30926 Seelze

Methanol LC-MS, Chromasolv[®] Art.-Nr.: 34966

SIGMA-ALDRICH GmbH, D-89555 Steinheim

Acetonitril, E Chromasolv [®] , gradient grade	Art.-Nr.: 34888
Allylthiocyanat (95 %)	Art.-Nr.: 377430-100G
Ammoniumacetat, puriss. p.a.	Art.-Nr.: 17836
Ammoniumbicarbonat, purum p.a. (>99 %)	Art.-Nr.: 09832
Ameisensäure, puriss. p.a. (~98 %)	Art.-Nr.: 06440
Benzylthiocyanat (98 %)	Art.-Nr.: 252492-5G
Cyclohexan (>99 %)	Art.-Nr.: 17.919-1
Ethylacetat (>99 %)	Art.-Nr.: 34972
Ethylthiocyanat (97 %)	Art.-Nr.: E33904
Helium (≥99,995 %)	Art.-Nr.: 295345-56L
Methylthiocyanat, purum (≥98,0 %)	Art.-Nr.: 67720
2-Phenylethylthiocyanat (≥99 %)	Art.-Nr.: W401404-25G-K
Trifluoressigsäure, purum (>98 %)	Art.-Nr.: 91700

VWR[®] PROLAB[®] international, B-3001 Leuven

Acetonitril, HiPerSolv CHROMANORM, gg	Art.-Nr.: 20060.320
Ammoniumformiat, AnalaR NORMAPUR	Art.-Nr.: 21254.260

PhytoLab GmbH & Co. KG, D-91487 Vestenbergsgreuth

Epiprogoitrin, Kaliumsalz (64 %)	Art.-Nr.: 89657
Glucobarbarin, Kaliumsalz (61 %)	Art.-Nr.: 89684
Glucocheirolin, Kaliumsalz (73 %)	Art.-Nr.: 89685
Glucoerucin, Kaliumsalz (94 %)	Art.-Nr.: 89686
Glucoiberin, Kaliumsalz (95 %)	Art.-Nr.: 89687
Gluconapin, Kaliumsalz	Art.-Nr.: 89688
Gluconasturtiin, Kaliumsalz (>95 %)	Art.-Nr.: 89689
Glucoraphanin, Kaliumsalz (86 %)	Art.-Nr.: 89215
Glucoraphenin, Kaliumsalz (98 %)	Art.-Nr.: 89690
Glucosibarin, Kaliumsalz (94 %)	Art.-Nr.: 89691
Glucotropaeolin, Kaliumsalz (>99 %)	Art.-Nr.: 89216
3-Methylsulfonylpropylthiocyanat	Art.-Nr.: 80846
Progoitrin, Kaliumsalz (87 %)	Art.-Nr.: 89765
Sinalbin, Kaliumsalz (>97 %)	Art.-Nr.: 89793

Sinigrin, Kaliumsalz (>99 %)	Art.-Nr.: 89279
Sulforaphen	Art.-Nr.: 80844
D/L-Sulforaphan	Art.-Nr.: 80843

Von der Arbeitsgruppe Prof. Schreiner (Institut für Organische Chemie, JLU Gießen) synthetisierte Isothiocyanate

Phenylisothiocyanat	CAS-Nr.: 103-72-0
5-Methylthiopentylisothiocyanat	CAS-Nr.: 4430-42-6
4-Methylthiobutylisothiocyanat	CAS-Nr.: 4430-36-8

3.3 Probenmaterial

3.3.1 Rucolaproben

RU1	Rucola (REWE Bio; Azienda biologica maisto pierpaolo 125 g Ökokontr. IT Bac 157394 (Italien, Pontecagnano SA)
RU2	Rucola (Bonduelle Deutschland GmbH, D-72766 Reutlingen)
RU3	Rucola (Erlenhof, REWE Handelsgruppe)
RU4	Rucola (La Serena azienda agricola (Italien) L. 02-06)
RU5	Rucola (F.Ili Napolitano C. & G. (Italien, Campania)
RU6	Rucola (Erlenhof, Havita Frischsalate GmbH, D-67125 Dannstadt-Sauernheim)
RU7	Rucola (ökofrisch Bioland, Hof Arzt, D-71254 Ditzingen)
RU8	Rucola (Landgard Obst & Gemüse, D-53332 Bornheim)
RU9	Rucola (Rewe Bio, DE-001-Öko-Kontrollstelle)

Das oben genannte Probenmaterial stammt aus dem Großhandel.

3.3.2 Kressen

K1	Gartenkresse, Bio (A.L.C. Warenvertriebsgesellschaft mbH, D-40235 Düsseldorf)
K2	Affila [®] Cress (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)
K3	Atsinacress (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)
K4	Boragecress (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)
K5	BroccoCress [®] (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)

K6	Daikon Cress® (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)
K7	Mustard Cress (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)
K8	Rock Chives® (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)
K9	Sakura Cress® (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)
K10	Sechuan Cress (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)
K11	Shiso® Purple (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)
K12	Tahoon® Cress (Koppert Cress B.V., NL-2681 MB Monster)

Das oben genannte Probenmaterial stammt aus dem Großhandel.

3.3.3 Sprossen

SP1	Alfalfasprossen (T.van der Plas b.v., NL-1721 PT Broek op Langedijk)
SP2	Broccosprouts® (T.van der Plas b.v., NL-1721 PT Broek op Langedijk)
SP3	Fenchelsprossen (T.van der Plas b.v., NL-1721 PT Broek op Langedijk)
SP4	Lauchsprossen (T.van der Plas b.v., NL-1721 PT Broek op Langedijk)
SP5	Radieschensprossen (T.van der Plas b.v., NL-1721 PT Broek op Langedijk)
SP6	Rettichsprossen (T.van der Plas b.v., NL-1721 PT Broek op Langedijk)
SP7	Rote Beete Sprossen (T.van der Plas b.v., NL-1721 PT Broek op Langedijk)
SP8	Sango Sprossen (T.van der Plas b.v., NL-1721 PT Broek op Langedijk)

Das oben genannte Probenmaterial stammt aus dem Großhandel.

3.3.4 Rettich und Radieschen

RE1	Rettich,weiß (Demeter, Jacob&Stinshoff G.b.R., 85221 Dachau)
RE2	Rettich, weiß (Herkunftsland D, <i>angebaut für</i> : Lidl Stiftung & Co. KG)
RE3	Rettich, weiß (Herkunftsland D, <i>angebaut für</i> : REWE Handelsgruppe)
RA1	Radieschen (Herkunftsland D, <i>angebaut für</i> : Lidl Stiftung & Co. KG)
RA2	Radieschen (Herkunftsland D, <i>angebaut für</i> : REWE Handelsgruppe)
RA3	Eiszapfen (Herkunftsland D, <i>eigener Anbau</i>)

Das oben genannte Probenmaterial stammt aus dem Großhandel bzw. eigenem Anbau.

3.3.5 Speisesenf

- S1 Duc De Coeur Dijonsenf (*herg. für: Lidl Stiftung & Co. KG, D-74167 Neckarsulm*)
- S2 Feuersenf scharf (*Rich. Hengstenberg GmbH & CO. KG, D-73726 Esslingen*)
- S3 Maille Dijon Originale (*Maille, F-21016 Dijon Cedex*)
- S4 Original bayerisch Hausmacher-Senf süß (*Kim, Haberland Feinkost GmbH & Co KG, D-93197 Zeitlarn*)
- S5 Original Löwensenf extra (*Düsseldorfer Löwensenf GmbH, D-40004 Düsseldorf*)
- S6 Thomy Scharfer Senf (*Nestlé Deutschland AG, D-41415 Neuss*)
- S7 Senf (*Eigene Herstellung aus Senfpulver*)

Das oben genannte Probenmaterial stammt aus dem Großhandel bzw. aus eigener Herstellung.

3.3.6 Meerrettich und Wasabi

- M1 Koch^s Tafel Meerrettich naturscharf, (*Koch^s Meerrettich GmbH, D-91083 Baiersdorf/Bayern*)
- M2 Koch^s Tafel Meerrettich scharf, (*Koch^s Meerrettich GmbH, D-91083 Baiersdorf/Bayern*)
- M3 Sahne-Meerrettich mild (*Schamel Meerrettich GmbH & Co. KG, D-91083 Baiersdorf/Bayern*)
- M4 Thomy Tafel-Meerrettich, (*Nestlé Deutschland AG, D-41460 Neuss*)
- M5 frischer Meerrettich (*Gartenbau Koch, D-35390 Gießen*)

- W1 Büsumer Feinkost Wasabi Seafood-Sauce, (*Büsumer Fischerei-GmbH & Co. KG, D-25797 Wöhrden*)
- W2 Kinjirushi Grated Wasabi, Meerrettich-Paste (*Kinjirushi Sales Co., Ltd., Japan; Kreyenhop & Kluge GmbH & Co. KG, D-28876 Oyten/Bremen*)
- W3 S&B selected Wasabi Powder, Meerrettichpulver mit echtem Wasabi (*S&B Foods inc., Tokyo, Japan; Importeur: Heuschen & Schrouff OFT B.V., NL-6370 Landgraaf, Niederlande*)
- W4 Real Wasabi, 100% natural dried ground wasabi (*Real Wasabi, USA; Importeur: Suncoast Peppers GmbH, D-88079 Kressbronn*)
- W5 Wasabi- Erdnüsse, teigummantelt (*Aldi, Asia-Spezialitäten*)
- W6 Chips, Wasabi style (*Chio-Chips Knabberartikel GmbH, Hofgut Petersau, D-67227 Frankenthal*)

Das oben genannte Probenmaterial stammt aus dem Großhandel.

3.3.7 Kapern

- KA1 Kapern (Mamma Lucia, Kappertjes, Türkei)
- KA2 Kapern (Freshona, Türkei)
- KA3 Kapernbeeren (Herkunftsland Spanien)
- KA4 Gourmet-Kapern (Feinkost Dittmann, Reichhold Feinkost GmbH)
- KA5 Salina natura (capperi al sale, Caravaglio, Italien)

3.3.8 Moringa-Proben

Proben der Gattungen *Moringa oleifera*, *Moringa stenopetala*, *Moringa drouhardii*, und *Moringa peregrina* in Pulverform wurden von Dr. Ray-yu Yang, AVRDC Taiwan bereitgestellt.

3.3.9 Nahrungsergänzungsmittel

- NEM1 Broccology, Broccoli Concentrate (Now Foods, Bloomingdale, IL 60108, U.S.A.)
- NEM2 Kohlsuppen Kapseln (Hans Bischoff GmbH, D-50996 Köln)
- NEM3 Kapuzinerkresse Tabletten (Hirundo Products Vertriebsanstalt, FL-9493 Mauren)
- NEM4 Maca 1500 New Energy (PNC-Europe, D-81313 München)
- NEM5 Maca Gold (Zein[®] Pharma Germany GmbH, D-55252 Mainz-Kastel)
- NEM6 Maca + Vitamin C und Zink (Zein[®] Pharma Germany GmbH, D-55252 Mainz-Kastel)
- NEM7 Maca origin 800 (IronMaxx[®], D-53359 Reinbach)
- NEM8 Maca Pulver (GSE-Vertrieb GmbH, D-66119 Saarbrücken)
- NEM9 Manako[®] Maca Kapseln (Manaka Ltd. NL Deutschland, D-76767 Neufeldhof)
- NEM10 Macapulver-Kapseln revoMed mit Guaranapulver und Vitamin E (revoMed GmbH, D-38855 Wernigerode)
- NEM11 Obst&Gemüse A-Z (Zirkulin Naturheilmittel GmbH, D-28333 Bremen)
- NEM12 Phytoprotektoren[®] (Regena Ney, D-73745 Ostfildern)
- NEM13 Testobolan Maca-Zink Booster (FitnessHotline GmbH, D-08209 Auerbach)
- NEM14 Vitastar complete (Purawell B.V., NL-6814 BD Arnheim)

Das oben genannte Probenmaterial stammt aus dem Großhandel bzw. aus der Apotheke.

4 Methodenentwicklung und -optimierung HPLC

4.1 Probenvorbereitung HPLC

4.1.1 Probenaufbereitung

Zur Extraktion der intakten Glucosinolate aus dem Probenmaterial wurden je 2-5 g frische bzw. 200-500 mg lyophilisierte/getrocknete Probe in eine Vorlage aus 3 ml 70 % Methanol gegeben. Anschließend wurde die Probe mittels Ultra-Turax homogenisiert und mit weiteren 3 ml 70 % Methanol versetzt. Die Probe wurde dann im Wasserbad bei 70 °C unter mehrfachem Schütteln für 20 Minuten inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurde die Probe für 30 Minuten bei 2076 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der gesamte Ablauf mit dem zurückbleibenden Pflanzenmaterial weitere zwei bis drei Male wiederholt um eine vollständige Extraktion der GSL aus dem pflanzlichen Material zu gewährleisten. Der Überstand aller Extraktionen wurde in einem Spitzkolben vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 70 °C zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1-5 ml bidest. Wasser gelöst, in ein Probengefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei einer Temperatur von -20 °C gelagert.

4.1.2 Aufreinigung der Proben

Da die Analyse intakter Glucosinolate mittels HPLC aufgrund eventuell auftretender Matrixeffekte erschwert werden könnte, wurden mehrere Festphasen unterschiedlicher Retardierungsmechanismen auf ihr Vermögen, intakte GSL aus dem vorliegenden Probenmaterial aufzureinigen, getestet (Fließschemata siehe Anhang). Eine Übersicht über die eingesetzten Materialien und deren Eignung zur Aufreinigung des untersuchten Probenmaterials ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tab. 4-1 Ausgewählte Festphasen und ihre Eignung zur Aufreinigung intakter Glucosinolate

Festphasenmaterial	Eignung
Anionenaustauscherharz DEAE Sephadex [®] A-25	+
Discovery [®] DPA-6S Kartusche	-
Chromabond [®] NH ₂ -Kartusche	-
Chromabond [®] CN-Kartusche	-
Anionenaustauscher DOWEX MWA-1	-
BAKERBOND [™] Speedisk [®] Polar Plus C18	-
BAKERBOND [™] Speedisk [®] H ₂ O-philic DVB	-
BAKERBOND [™] Speedisk [®] SDB Polymeric Sorbent	-
Polyamid	(+)

- = keine Eignung; + = gute Eignung

Man stellte fest, dass lediglich die zwei Festphasen DEAE Sephadex[®] A-25 und Polyamid für den Einsatz zur Aufreinigung intakter GSL geeignet waren, wobei letzteres eine deutlich geringere Eignung zeigte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Weiteren zur Aufreinigung der intakten Glucosinolate aus pflanzlichen Matrices der Anionenaustauscher DEAE Sephadex[®] A-25 eingesetzt.

Die zur Festphasenextraktion benötigten Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

Ammoniumacetat, 2 M

7,71 g Ammoniumacetat wurden in 50 ml bidest. Wasser gelöst.

Ammoniumbicarbonat, 2 M

39,53 g Ammoniumbicarbonat wurden in 250 ml bidest. Wasser gelöst.

Zur Aufreinigung des Probenmaterials wurde das Anionenaustauscherharz DEAE Sephadex[®] A-25 zunächst für 1 Stunde in 2 M Ammoniumbicarbonat konditioniert. Als Säule wurde eine Pasteurpipette verwendet, die etwa 2 cm hoch mit dem Harz befüllt und zunächst mit 2 ml bidest. Wasser gewaschen wurde. Anschließend wurde das Harz mit 1 ml 2 M Ammoniumacetatlösung gespült, bevor erneut mit 1 ml bidest. Wasser gewaschen wurde. Nach Aktivierung des Harzes mit weiteren 2 ml der 2 M Ammoniumbicarbonatlösung wurden 500 µl Probe auf das Harz pipettiert und die

Säule anschließend erneut mit 2 ml bidest. Wasser gespült. Im Anschluss wurden die an das Harz gebundenen GSL mittels 3 ml einer 2 M Ammoniumacetatlösung eluiert und in einem 25 ml-Spitzkolben aufgefangen. Das Eluat wurde lyophilisiert und anschließend mit 500 µl bidest. Wasser rückgelöst. Bis zur weiteren Analyse mittels HPLC wurde die aufgereinigte Probe tiefgekühlt bei -20 °C aufbewahrt.

4.1.3 Herstellung der Standards

Die Quantifizierung der im Probenmaterial detektierten intakten Glucosinolate erfolgte über externe Kalibrierung mittels handelsüblicher Referenzsubstanzen. Zur Herstellung der entsprechenden Referenzlösungen wurde je 1 mg des entsprechenden GSL-Standards in 1 ml bidest. Wasser gelöst. Aus der so erhaltenen Stammlösung (c 1 mg/ml) wurden Standards der Konzentrationen 0,5 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,05 mg/ml hergestellt. Die Erstellung der Standards zur Kalibrierung der Methode 2 erfolgte analog, wobei die Substanzen aufgrund anderer Laufmittel-Bedingungen in 80 % Acetonitril aq gelöst wurden.

Zusätzlich wurde je ein Gesamtstandard aller 14 Referenzsubstanzen erstellt indem je 100 µl der Stammlösungen zusammengegeben wurden (c je Substanz 0,07 mg/ml).

4.2 Optimierung des chromatographischen Systems

Bei der Wahl der optimalen Kombination von Eluentensystem und stationärer Phase für die Trennung intakter Glucosinolate galt es die starke Polarität der zu trennenden Substanzen zu beachten.

Es wurden verschiedene Säulentypen (im Folgenden kurz dargestellt) untersucht, die teilweise speziell für polare Trennproblematiken ausgewiesen waren:

- 1 **Polaris C18-Ether:** Phase, bei der die C18-Ketten mit der Silicaoberfläche über eine Ethergruppe verbunden sind, die neben einer kurzen Methylen-Brücke über zwei sehr hydrophile Gruppen verfügt, was zu einer sehr guten Retention sowohl polarer als auch nicht polarer Substanzen führt. Geeignet zum Einsatz 100 % wässriger Eluenten.
- 2 **LiChroCART® Purospher® RP-18e:** Phase aus hochreinem Silicagel mit Tetraalkoxysilan.

- 3 **Grom-Sil-Polyamin-2:** NH₂-Phase zur Trennung über Wechselwirkung der Aminogruppen.
- 4 **Pursuit[®] PFP:** Speziell zur Trennung polarer Substanzen entwickelte Phase. Trennprinzip über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen durch Einsatz von Pentafluorophenyl.
- 5 **Microsorb-MV Amino:** hauptsächlich in der Zuckeranalytik eingesetzte Phase, bei der Aminopropylsilan an Silicagel gebunden vorliegt. Kann wie eine Normalphase behandelt werden.
- 6 **Kromasil C18e:** Silica-Phase mit Octadecylsilan zum Einsatz in der Umkehrphasenchromatographie speziell für saure bzw. basische Elutionssysteme.

Als Ausgangspunkt für die mobile Phase wählte man eine Kombination aus Wasser und Acetonitril, da letzteres im Vergleich zum ebenfalls in Frage kommenden Methanol durch eine deutlich höhere Elutionskraft für die bestehende Problemstellung besser geeignet war. Zudem entschied man sich für das Ansäuern der Probe mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), da man feststellte, dass die Retention der Analyten in neutralem wie auch in basischem Milieu deutlich schlechter war.

Aufgrund der Komplexität des zu erwartenden Probenmaterials entschied man sich zudem nach mehreren isokratischen Probeläufen für den in Tabelle 4-2 dargestellten Gradienten bei 25 °C und einer Detektionswellenlänge von 229 nm.

Tab. 4-2 Gradientenprogramm zur Trennung intakter Glucosinolate mittels HPLC bei 229 nm. Säule: VARIAN Polaris[®] C18-Ether, Eluent A: H₂O bidest. + 0,1 % TFA; Eluent B: MeCN + 0,1 % TFA

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]	Druck [bar]
0.00	98,0	2,00	0.800	350
12.00	95,0	5,00	0.800	350
40.00	70,0	30,0	0.800	350
42.00	5,00	95,0	0.800	350
47.00	5,00	95,0	0.800	350
48.00	98,0	2,00	0.800	350
60.00	98,0	2,00	0.800	350

Das Retentionsverhalten der eingesetzten Säulen 1-6 bei dem in Tabelle 4-2 dargestellten Gradienten ist in Abbildung 4-1 am Beispiel des bis dato polarsten verfügbaren Glucosinolates Sinigrin (Allyl-GSL) dargestellt.

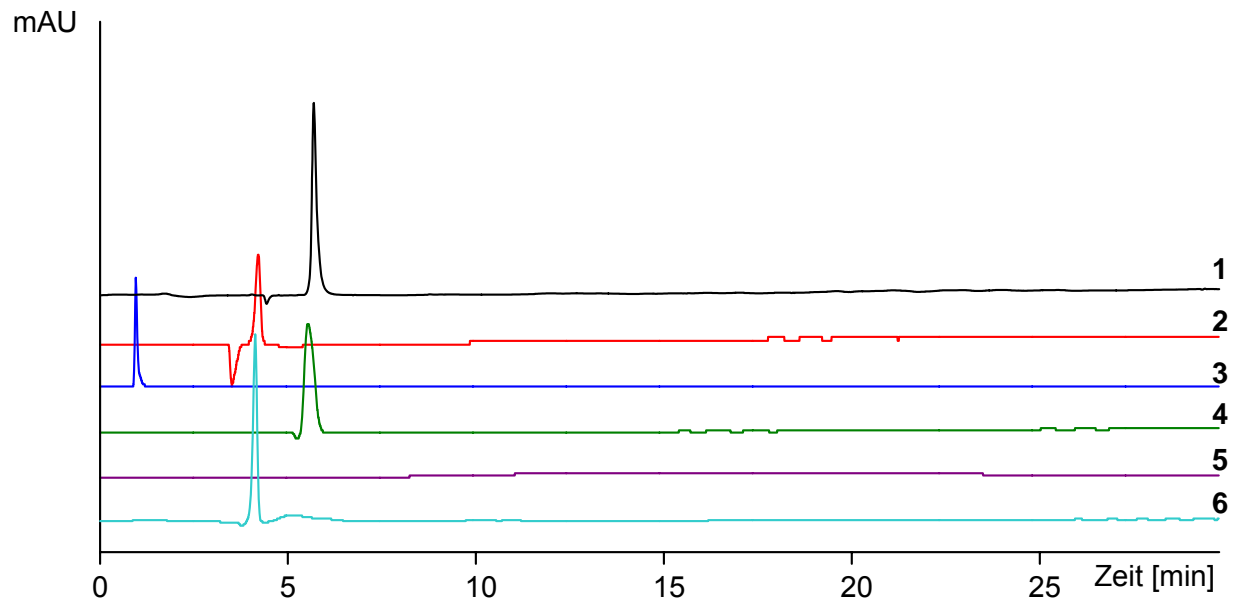


Abb. 4-1 Vergleich unterschiedlicher HPLC Säulen (1-6) anhand ihres Retardierungsvermögens bzgl. des GSL Sinigrin; chromat. Bedingungen s. Tab 4-2

Die eingesetzten RP18-Phasen **2** und **6** zeigten nahezu keine Retention des Analyten, ebenso wenig die Polyaminphase **3**. Die ebenfalls getestete Aminophase **5** zeigte keine Absorption. Etwas geeigneter stellte sich das Material Pursuit PFP **4** dar, die beste Retention war jedoch bei der speziell für polare Analyten modifizierten Phase **Polaris® C18-Ether 1** zu verzeichnen. Daher wurden weitere Methodenoptimierungen mit dieser Säule angeschlossen.

Um eine längere Verweildauer der Analyten auf der stationären Phase zu erreichen, wurde der Ausgangsgradient auf 100 % Wasser erhöht und die Methode insgesamt auf 80 min (vgl. Kap. 4.3.1) verlängert. Die Flussrate wie auch die Temperatur wurden beibehalten, da Änderungen dieser nach oben oder unten keine Unterschiede im Trennverhalten zur Folge hatten. Abbildung 4-2 zeigt ein Gemisch der 4 intakten Glucosinolate Sinigrin (**A**), Sinalbin (**B1**) (mit Sinapin (**B2**) als Gegenion), Gluconasturtiin (**C**) und Glucotropaeolin (**D**) getrennt nach dem ursprünglichen Gradienten (Tabelle 4-2). Im Vergleich dazu ein Chromatogramm mit optimiertem Gradientensystem (Kap. 4.3.1).

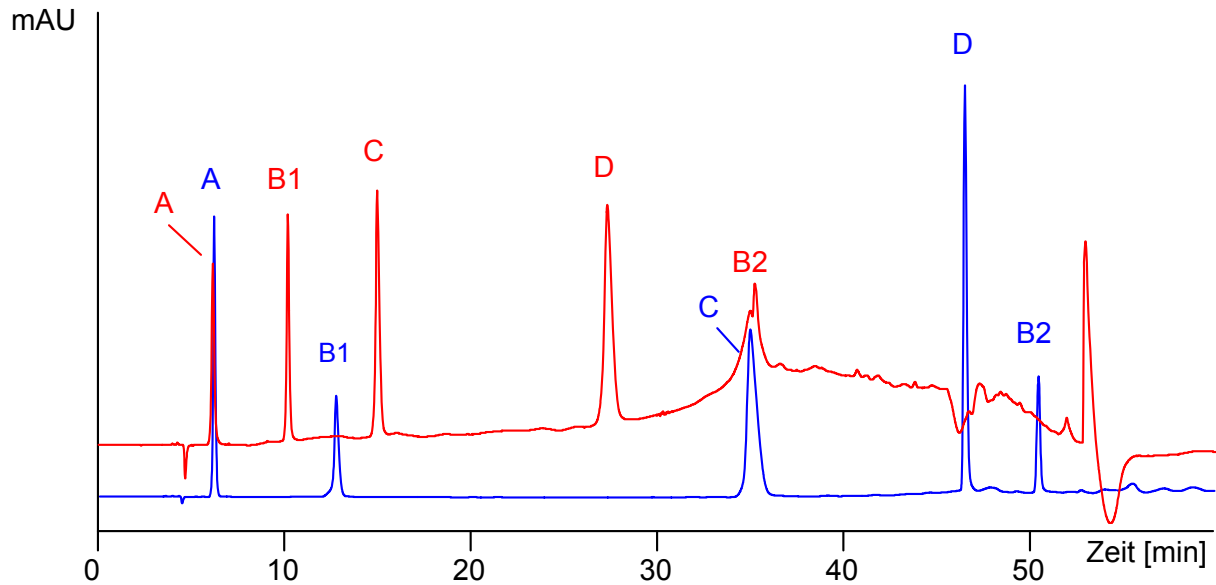


Abb. 4-2 Trennung der intakten GSL Sinigrin (**A**), Sinalbin (**B1**) (mit Sinapin (**B2**) als Gegenion), Gluconasturtiin (**C**) und Glucotropaeolin (**D**) nach ursprünglichem (Tabelle 4-2) und optimierten Gradienten (Tabelle 4-4) auf einer Polaris® C18-Ether-HPLC-Säule bei 229 nm

Da dieses optimierte System eine noch deutlich verbesserte Trennung der GSL zeigte, wurde es zur Analyse des Probenmaterials eingesetzt und wird im Weiteren als **Methode 1** bezeichnet.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war die Übertragung der vorgetrennten intakten Glucosinolate auf ein Massenspektrometer, um diese strukturell absichern zu können bzw. um in der Lage zu sein Strukturaufklärung bisher unbekannter Substanzen durchzuführen. Dies gelang mit der bestehenden Methode nicht, weswegen man sich auf den Bereich der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) konzentrierte. Hierzu wurde eine **Phenomenex Luna® HILIC** Säule verwendet, welche auf der Basis von quervernetzten Diolgruppen eine wasserangereicherte Schicht auf der Phasenoberfläche zurückhält und so die Retardierung stark polarer Substanzen ermöglicht, ohne die spezifischen Nachteile einer Normalphase.

Bei der Wahl des Eluentensystems orientierte man sich an den Firmenapplikationen für diesen Säulentyp, welche eine Kombination aus Acetonitril und mit Ammoniumformiat gepuffertes Wasser als optimal geeignet betrachten, wobei H₂O

die stärkere Elutionskraft besitzt. In Tabelle 4-3 ist zusammenfassend die Anpassung der Eluenten und Flussrate dargestellt.

Tab. 4-3 Methodenoptimierung für Luna[®] HILIC; dargestellt anhand der Änderungen von Eluent A, Eluent B und deren Verhältnis [%] zueinander

Eluent A	Eluent B	Verhältnis [%]
Puffer 30 mM	MeCN	5 : 95
Puffer 30 mM	MeCN	15 : 85
Puffer 30 mM	MeCN	30 : 70
MeCN : H ₂ O : Puffer 100 mM (90:5:5)	MeCN : H ₂ O : Puffer 100 mM (50:45:5)	60 : 40
MeCN : H ₂ O : Puffer 100 mM (90:5:5)	MeCN : H ₂ O : Puffer 100 mM (50:45:5)	90 : 10
MeCN : H ₂ O : Puffer 100 mM (90:5:5)	MeCN : H ₂ O : Puffer 100 mM (50:45:5)	95 : 5
MeCN : H ₂ O : Puffer 100 mM (90:5:5)	MeCN : H ₂ O : Puffer 100 mM (50:45:5)	Gradient
MeCN : Puffer 30 mM pH 5,4 (85:15)	-	-
MeCN : Puffer 30 mM pH 5,4 (85:15)	MeCN	90 : 10
MeCN : Puffer 30 mM pH 5,4 (85:15)	MeCN	80 : 20
MeCN : Puffer 30 mM pH 5,4 (85:15)	MeCN	70 : 30
MeCN : Puffer 30 mM pH 5,4 (85:15)	MeCN	50 : 50
MeCN : Puffer 30 mM pH 5,4 (85:15)	MeCN	60 : 40
MeCN : Puffer 25 mM pH 5,4 (85:15)	MeCN	60 : 40

Puffer = Ammoniumformiatpuffer; MeCN = Acetonitril

Man fand, dass eine optimale Retardierung der intakten GSL bei einem Verhältnis Eluent A/Eluent B von 60:40 gegeben war, mit Eluent A 25 mM Ammoniumformiat in H₂O/MeCN (85:15, v/v) bei einem pH von 5,4. Die optimale Flussrate wurde nach Testläufen mit 0,800 bis 1,5 ml/min auf 1,2 ml/min festgesetzt. Diese, im Weiteren für die Analyse der intakten Glucosinolate und deren strukturelle Charakterisierung mittels ESI-MS angewandte Methode wird folgend als **Methode 2** bezeichnet.

4.3 Methoden HPLC

4.3.1 Methode 1 (Varian Polaris® C18-Ether)

Eluent A: Wasser (0,1 % TFA)

1 Liter bidest. Wasser wurde mit 1 ml TFA versetzt.

Eluent B: Acetonitril (0,1 % TFA)

1 Liter Acetonitril wurde mit 1 ml TFA versetzt und für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Die Trennung der intakten GSL erfolgte über eine Polaris® C18-Ether-Säule mit Hilfe des in Tabelle 4-4 aufgeführten Gradienten bestehend aus Acetonitril und Wasser unter Zusatz von 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA). Die Analysentemperatur betrug 25 °C. Die Flussrate war konstant bei 0,800 ml/min, die Analysendauer belief sich auf 80 Minuten. Die intakten GSL wurden mittels DAD bei 229 nm erfasst.

Tab. 4-4 Gradientenprogramm zur Trennung intakter Glucosinolate mittels HPLC bei 229 nm. Säule: VARIAN Polaris® C18-Ether, Eluent A: H₂O bidest. + 0,1 % TFA; Eluent B: MeCN + 0,1 % TFA

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]
0,00	100	0,00	0,800
20,0	100	0,00	0,800
32,0	95,0	5,00	0,800
60,0	70,0	30,0	0,800
62,0	5,00	95,0	0,800
67,0	5,00	95,0	0,800
68,0	100	0,00	0,800
80,0	100	0,00	0,800

4.3.2 Methode 2 (Phenomenex Luna® HILIC)

Eluent A: Acetonitril-/25 mM Ammoniumformiatpuffer (85:15, v/v), pH 5,4

Für eine 25 mM Pufferlösung wurden 1,576 g Ammoniumformiat eingewogen und in 150 ml bidest. Wasser gelöst. Diese Lösung wurde mit >98 %iger Ameisensäure auf einen pH-Wert von 5,4 eingestellt, mit 850 ml Acetonitril versetzt und für 30 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Eluent B: Acetonitril (100 %)

Reines Acetonitril wurde für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Die Trennung intakter GSL erfolgte isokratisch (Tabelle 4-5) über eine Phenomenex Luna® 5 µm HILIC 200A-Säule mit einem Verhältnis Eluent A zu Eluent B von 60:40 (v/v). Die Analysentemperatur lag bei 25 °C, die Flussrate wurde auf 1,200 ml/min festgelegt. Die Detektionswellenlänge betrug 229 nm.

Tab. 4-5 Isokratisches Programm zur Trennung intakter Glucosinolate mittels HPLC bei 229 nm. Säule: Luna® HILIC, Eluent A: Acetonitril-/25 mM Ammoniumformiatpuffer (85:15, v/v), pH 5,4; Eluent B: MeCN 100 %

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]
0,00	60,0	40,0	1,200
55,0	60,0	40,0	1,200

4.3.3 Massenspektrometrische Analyse

Um die mittels HPLC gesammelten Daten zur Charakterisierung der GSL in den Proben abzusichern, wurde eine ESI-MS-Analyse angeschlossen. Diese erfolgte im negativen Ionisierungsmodus mit Stickstoff als Sheath (60 Units) und Auxiliary gas (20 Units) sowie Helium 5.0 als Kollisionsgas. Die Parameter des Massenspektrometers wurden folgendermaßen optimiert:

capillary voltage	10,0 kV
spray voltage	4,5 kV
tube lens offset	50 V
heated capillary	230°C

5 Methodenentwicklung und -optimierung GC

5.1 Probenvorbereitung GC

Zur Extraktion der Isothiocyanate aus den Probenmatrizes diente ein Gemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat (1:1, v/v). Eine anschließende Derivatisierung der Analyten war nicht notwendig, da die im Rahmen dieser Arbeit analysierte Stoffgruppe der ITCs als leichtflüchtige Substanzen bereits unzersetzt verdampfbar und somit direkt in den Gaschromatographen injizierbar waren.

Da sich die Proben in ihren Eigenschaften hinsichtlich Konsistenz und Verarbeitungsgrad unterschieden, wurde die Aufarbeitung entsprechend der Anforderungen des Probenmaterials individuell an dieses angepasst.

5.1.1 Aufarbeitung der frischen Lebensmittelproben

Die Extraktion der frischen und in ihrer Konsistenz teilweise sehr festen und faserigen Pflanzenproben konnte mittels einfacher Extraktion nicht in Vollständigkeit garantiert werden. Daher wurde hier mit einem Schüttler gearbeitet, der dazu diente, die Probe mit dem Lösungsmittel fortwährend in Bewegung zu halten und dabei zu extrahieren. Die Probenmaterialien wurden zunächst mit dem Messer grob zerkleinert und anschließend mit Hilfe eines Mörsers zerrieben. 1,5 g der zerkleinerten Probe wurden mit 2,5 ml Lösungsmittel versetzt und anschließend mit dem Ultra-Turax weiter behandelt, bis eine homogene Konsistenz erreicht war. Das Homogenisat wurde nun mit einer definierten Menge internen Standards (Methyl-ITC) versetzt und mit dem Vortex kurz aufgeschüttelt. Nach 60-minütiger Extraktion im Schüttler wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 2076 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um sicherzustellen, dass alle ITCs gelöst und in den Extrakt überführt wurden, wurde zweimalig extrahiert und der Gesamtextrakt bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

5.1.2 Aufarbeitung der pastösen Lebensmittelproben

Für die Bestimmung der ITCs in pastösen Lebensmitteln wurde je 1 g Probenmaterial mit 2,5 ml Lösungsmittel (Ethylacetat/Cyclohexan, 1:1) sowie einer definierten Menge an internem Standard (Methyl-ITC) versetzt und für 5 Minuten mittels Ultra-Turax homogenisiert. Das Homogenisat wurde zur Abtrennung der schweren Bestandteile

bei 2076 g für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Behandlung abgenommen. Zur vollständigen Extraktion der ITCs wurde die Probe erneut mit 2,5 ml Lösungsmittel versetzt, das Gemisch mit Hilfe des Ultra-Turax weitere 5 Minuten homogenisiert und der Überstand nach Zentrifugieren mit dem bereits bestehenden Extrakt vereinigt. Der nun vorliegende Gesamtextrakt wurde in ein gasdichtes Probengefäß überführt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

5.1.3 Aufarbeitung der pulverförmigen Proben

Vorversuche ergaben, dass ITCs in pulverförmigen bzw. in Tablettenform gepressten Proben nicht frei vorliegen, sondern vermutlich in Form von intakten Glucosinolaten, welche zur Bestimmung der ITCs erst enzymatisch zu diesen gespalten werden müssen. Daher wurde über das Enzym Myrosinase eine Umsetzung dieser Verbindungen veranlasst, bevor man mit dem eigentlichen Extraktionsprozess begann. Da die Zugabe von Ascorbinsäure nachweislich Vorteile für die Spaltung von GSL zu ITCs besitzt (LI et al. 2005, VAN EYLEN et al. 2008), wurde diese ebenfalls zudosiert. Für die enzymatische Umsetzung der GSL zu ITCs wurden 250 mg Probenmaterial in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 2 mg Ascorbinsäure sowie 5 mg (entspricht 1 Unit) Myrosinase versetzt. Das Gemisch wurde im Vortex homogenisiert und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor es analog Kapitel 5.1.1 mit dem Lösungsmittel sowie einer definierten Menge internen Standards bei einer verkürzten Verweildauer von 30 Minuten im Universalschüttler extrahiert und anschließend für 10 Minuten zentrifugiert wurde. Eine zusätzliche Homogenisierung der pulverförmigen Proben mittels Ultra-Turax war nicht notwendig, da nach Zugabe von Flüssigkeit sofort eine homogene Konsistenz erreicht war. Die Extrakte wurden jedoch vor der Analyse mittels GC über eine Mikroliterzentrifuge von verbleibenden feinen Partikeln getrennt.

5.1.4 Herstellung der Standards

Die zur Identifizierung der ITCs im Probenmaterial eingesetzten Isothiocyanatstandards (c 1 mg/ml) wurden hergestellt, indem je 50 mg der 11 in Rahmen dieser Arbeit analysierten Referenzsubstanzen in einen Erlenmeyerkolben gegeben und bis zur Markierung mit einem Gemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan (1:1, v/v) auf 50 ml aufgefüllt wurden. Da die Quantifizierung der ITCs über einen

internen Standard erfolgte, wurde zusätzlich ein Gesamtstandard mit einem Gesamtvolumen von 1,2 ml hergestellt, bestehend aus 200 µl Sulforaphan und je 100 µl der zehn verbleibenden Isothiocyanatstandard-Lösungen. Die Stammlösung des Sulforaphan wurde in doppelter Menge zugegeben, da dessen Signal im Chromatogramm deutlich unter den Signalen der anderen Referenzsubstanzen lag, was eine quantitative Auswertung evtl. erschwert hätte.

5.2 Methode GC

Die Bestimmung der leichtflüchtigen Isothiocyanate erfolgte ohne Derivatisierung direkt mittels Gaschromatograph an einer Factor FourTM-Kapillarsäule mit Helium 5.0 als Trägergas. In den Tabellen 5-1 und 5-2 sind die für diese Analyse programmierte Temperaturführung und die Druckeinstellungen dargestellt.

Tab. 5-1 Temperaturprogramm zur Trennung der Isothiocyanate mittels GC (HP6890) an Factor FourTM-Kapillarsäule, Trägergas: Helium 5.0

	Heizrate [°C / min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]	Gesamtdauer [min]
Start		70	2	2
	5	90	0	6
	25	160	0	8
	25	280	5	18,60
Post run		1	0	18,60

Tab. 5-2 Druckprogramm zur Trennung der Isothiocyanate mittels GC (HP6890) an Factor FourTM-Kapillarsäule, Trägergas: Helium 5.0

	Druckanstieg [kPa / min]	Druck [kPa]	Haltezeit [min]	Gesamtdauer [min]
Start		5	2	1
	0,21	7	0	12,62
	0,30	11	0	18,60
	1,60	15	5	18,60
Post run			0	18,60

Als Detektor wurde zur gleichzeitigen Charakterisierung der getrennten Substanzen ein Massenspektrometer (Modell HP 5972) eingesetzt.

6 Ergebnisse HPLC

6.1 Methodenvalidierung

Die Detektion der intakten Glucosinolate erfolgte an zwei Säulen mit unterschiedlichen Retentionsmechanismen. Zur Bestimmung der Stabilität und Reproduzierbarkeit der eingesetzten Systeme wurde zunächst eine Validierung der hier eingesetzten Methoden mittels 14 kommerziell erhältlicher Referenzsubstanzen durchgeführt. Die Quantifizierung der detektierten Substanzen erfolgte über externe Kalibrierung in Doppelbestimmung.

6.1.1 Methodenvalidierung an Polaris® C18-Ether (Methode 1)

Es wurde zunächst überprüft, ob die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Referenzsubstanzen in einem Lauf chromatographisch zu trennen waren. Hierzu wurde gemäß Kap. 4.1.3 ein Gesamtstandard erstellt, ein Aliquot in die HPLC injiziert und mittels Diodenarray-Detektor bei einer Wellenlänge von 229 nm analysiert.

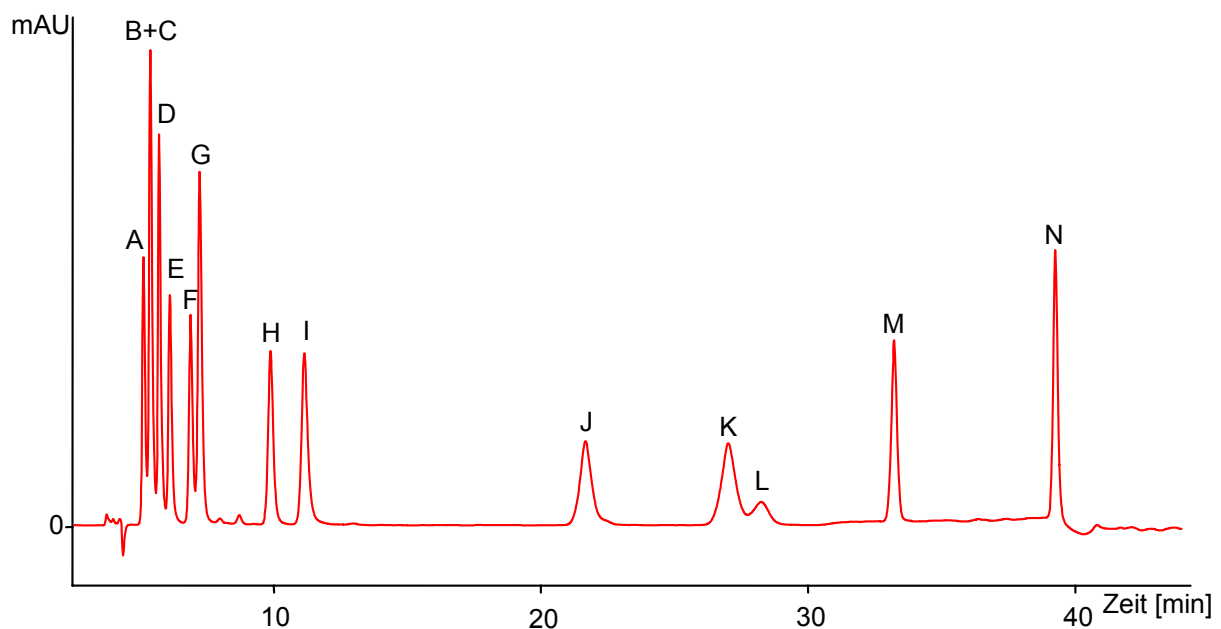


Abb. 6-1 Chromatogramm eines GSL-Gesamtstandards bestehend aus A (Glucoiberin), B (Glucocheirolin), C (Progoitrin), D (Sinigrin), E (Epiprogoitrin), F (Glucoraphanin), G (Glucoraphenin), H (Gluconapin), I (Sinalbin), J (Glucosibarin), K (Glucotropaeolin), L (Glucobarbarin), M (Glucoerucin) und N (Gluconasturtiin) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris® C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1

Abbildung 6-1 zeigt das über diese Methode erstellte Chromatogramm aus 14 intakten Glucosinolaten, wobei die Substanzen B (Progoitrin) und C (Glucocheirolin) coeluieren.

Um intakte GSL in Realproben quantifizieren zu können, wurde eine externe Fünf-Punkt-Kalibrierung anhand der vorliegenden Referenzsubstanzen durchgeführt. Hierzu wurden aus jeder Einzelsubstanz Standards in fünf Konzentrationen hergestellt (siehe Kapitel 4.1.3) und je dreimal in das chromatographische System injiziert (Injektionsvolumen: 20 µl). Die so erhaltenen Chromatogramme wurden integriert und die Peakflächen der Substanzsignale gemittelt zur Berechnung der Kalibrierfunktionen eingesetzt. In Abbildung 6-2 ist beispielhaft die Kalibrierfunktion mit Bestimmtheitsmaß R^2 für das GSL Glucoraphenin abgebildet.

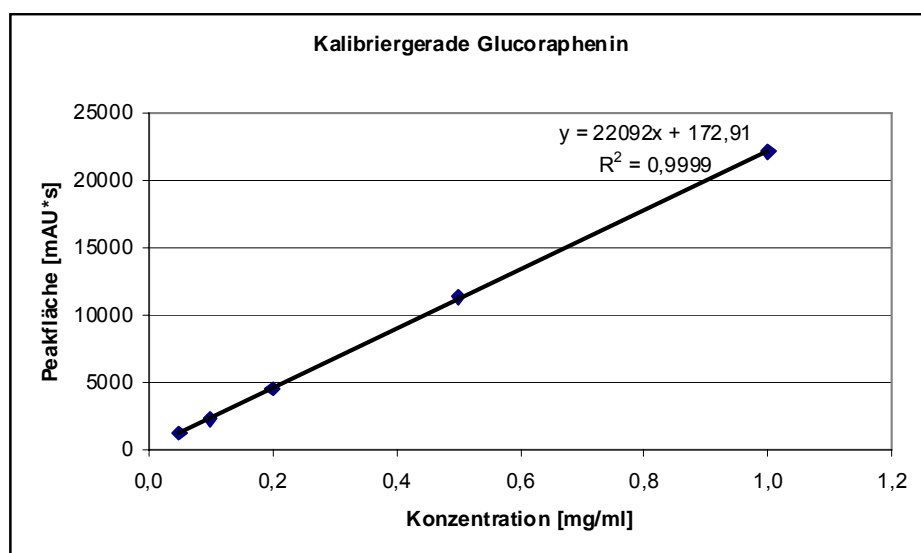


Abb. 6-2 Zusammenhang zwischen Peakfläche (y in [mAU*s]) und Glucoraphenin-Konzentration (x in [mg/ml]), sowie der daraus resultierenden Kalibrierfunktion $y = 22092x + 172,91$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9999$ (Methode 1)

Tabelle 6-1 zeigt die Retentionszeiten, Kalibrierfunktionen (dargestellt in Achsenabschnitt und Steigung) sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 der 14 im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Standardsubstanzen aus der Analyse über Methode 1. Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt Auskunft über die Stärke des Zusammenhangs bzw. der Linearität mit 0 = kein Zusammenhang und 1 = vollständiger Zusammenhang (KÖHLER 2007; 49-53).

Tab. 6-1 Retentionszeiten, Steigung, Achsenabschnitt und Bestimmtheitsmaß R^2 der 14 Standards mittels Methode 1

	Glucosinolat	Retentionszeit [min]	Steigung	Achsen- abschnitt	Bestimmtheits- maß R^2
A	Glucosiberin	5,2	14360,8	100,4	1,0000
B	Glucoscheirolin	5,5	12957,2	73,5	0,9996
C	Progoitrin	5,6	16436,8	257,2	0,9999
D	Sinigrin	5,9	22940,7	674,4	0,9891
E	Epiprogoitrin	6,2	15267,8	134,2	0,9999
F	Glucoraphenin	7,1	22091,7	172,9	0,9999
G	Glucoraphanin	7,3	9451,7	31,7	0,9999
H	Gluconapin	11,0	17972,0	106,6	0,9998
I	Sinialbin	12,1	21367,9	227,1	0,9998
J	Glucosibarin	25,6	21171,7	245,4	0,9971
K	Glucotropaeolin	31,4	29704,3	224,6	1,0000
L	Glucobarbarin	31,7	8398,3	90,4	0,9998
M	Glucoerucin	33,1	22338,1	25,1	0,9995
N	Gluconasturtiin	37,8	28497,9	74,7	0,9997

Zur Darstellung der Reproduzierbarkeit und Stabilität der entwickelten Methode wurden zusätzlich die relative Standardabweichung (RSD), die Bestimmungsgrenze (LOQ)- und Nachweisgrenzen (LOD) sowie die Wiederfindungsraten (WF) der analysierten Referenzsubstanzen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-2 dargestellt, wobei die Substanzen Progoitrin und Glucoscheirolin coeluierten und folglich nicht getrennt betrachtet werden konnten.

Tab. 6-2 Relative Standardabweichung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ) sowie Wiederfindungsraten (WF) von 14 Glucosinolaten mittels Methode 1

Glucosinolat	Methode 1 (Polaris)			
	RSD [%]	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	WF [%]
Glucosiberin	0,20	0,2	0,3	96,7
Glucoscheirolin	0,19*	0,1*	0,1*	94,4*
Progoitrin	0,19*	0,1*	0,1*	94,4*
Sinigrin	0,42	0,1	0,2	94,7
Epiprogoitrin	0,22	0,2	0,3	93,6
Glucoraphanin	0,59	0,2	0,3	106
Glucoraphenin	0,35	0,1	0,2	90,8
Gluconapin	0,74	0,2	0,4	109,0
Sinialbin	0,15	0,2	0,4	87,0
Glucosibarin	0,59	0,4	0,7	97,7
Glucotropaeolin	0,83	0,5	0,9	96,0
Glucobarbarin	0,82	2,1	3,5	88,2
Glucoerucin	1,78	0,2	0,4	79,7
Gluconasturtiin	1,63	0,2	0,3	94,4

* Substanzen konnten nicht getrennt werden

6.1.2 Methodenvalidierung an Luna[®] HILIC (Methode 2)

Analog Methode 1 wurde zunächst auch hier die Trennleistung des Systems anhand der 14 Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Referenzsubstanzen überprüft.

Hierzu wurde ebenfalls ein Gesamtstandard erstellt (Kap. 4.1.3), wovon ein Aliquot von 20 µl in die HPLC injiziert und mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 229 nm analysiert wurde. Abbildung 6-3 zeigt das über diese Methode erhaltene Chromatogramm aus 14 intakten Glucosinolaten.

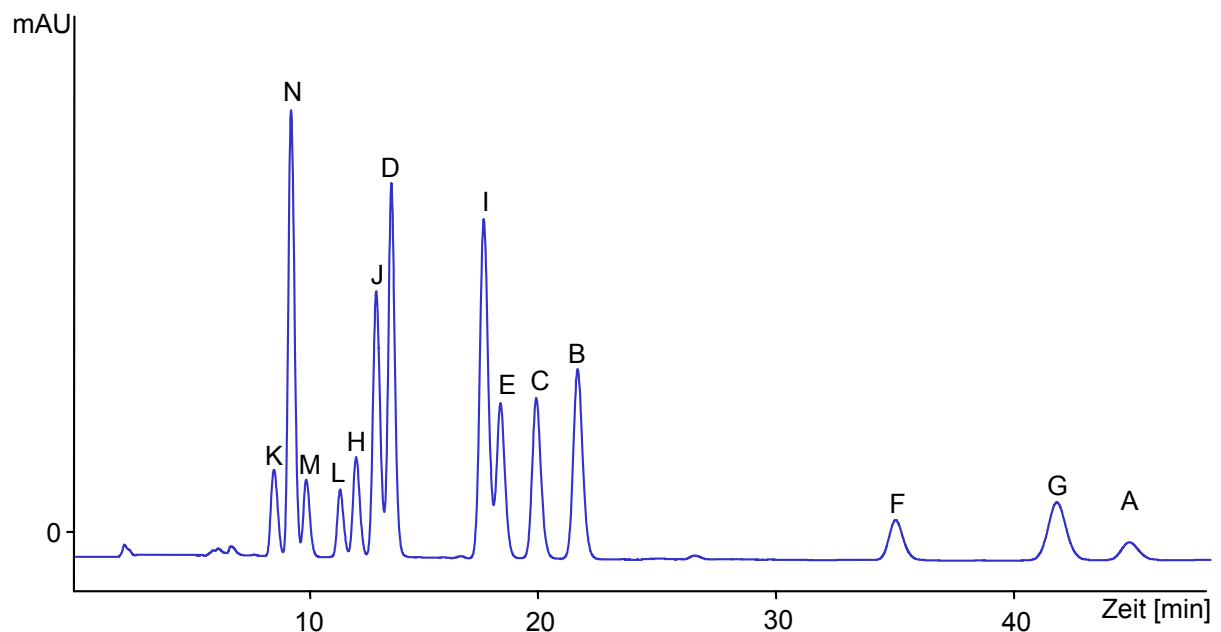


Abb. 6-3 Chromatogramm eines GSL-Gesamtstandards bestehend aus K (Glucotropaeolin), N (Gluconasturtiin), M (Glucoerucin), L (Glucobarbarin), H (Gluconapin), J (Glucosibarin), D (Sinigrin), I (Sinalbin), E (Epiprogoitrin), C (Progoitrin), B (Glucocheirolin), F (Glucoraphenin), G (Glucoraphanin) und A (Glucoiberin) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 µ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Analog Methode 1 wurden die nach dreimaliger Injektion der Glucosinolatstandards unterschiedlicher Konzentration mittels Methode 2 detektierten Peakflächen gemittelt und aus den so erhaltenen Werten Kalibrierfunktionen, in Abbildung 6-4 am Beispiel von Glucoraphenin dargestellt, und das zugehörige Bestimmtheitsmaß R^2 ermittelt.

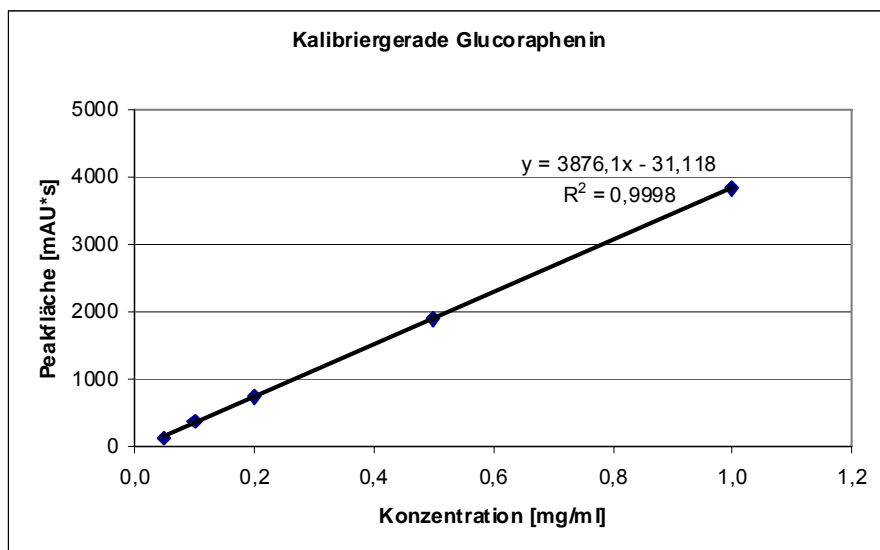


Abb. 6-4 Zusammenhang zwischen Peakfläche (y in [mAU*s]) und Glucoraphenin-Konzentration (x in [mg/ml]), sowie der daraus resultierenden Kalibrierfunktion $y = 3876,1x - 31,118$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9998$ (Methode 2)

Entsprechend Methode 1 sind auch die über Methode 2 ermittelten Retentionszeiten, Kalibrierfunktionen, dargestellt als Steigung und Achsenabschnitt, sowie die Stärke des Zusammenhangs in Form von R^2 für jede der 14 Standardsubstanzen in Tabelle 6-3 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 6-3 Retentionszeiten, Steigung, Achsenabschnitt und Bestimmtheitsmaß R^2 der 14 Standards mittels Methode 2

	Glucosinolat	Retentionszeit [min]	Steigung	Achsenabschnitt	Bestimmtheitsmaß R^2
K	Glucotropaeolin	8,4	17546,36	-154,04	0,9995
N	Gluconasturtiin	8,8	13954,27	-69,07	0,9997
M	Glucoerucin	9,0	3242,25	-66	0,9947
L	Glucobarbarin	10,0	932,06	31,16	1,0000
H	Gluconapin	10,0	3236,32	-51,46	0,9999
J	Glucosibarin	11,8	20302,65	-795,32	0,9978
D	Sinigrin	12,4	19541,06	-526,71	0,9955
I	Sinalbin	13,9	16676,73	690,41	0,9925
E	Epiprogoitrin	15,3	2123,22	3,62	0,9998
C	Progoitrin	16,2	2349,44	80,58	0,9924
B	Glucocheirolin	16,9	22378,48	-417,41	0,9999
F	Glucoraphenin	28,8	3876,12	-31,12	0,9998
G	Glucoraphenin	36,0	7439,63	-11,98	1,0000
A	Gluciberin	39,9	10063,73	-22,97	1,0000

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der hier angewandten Methodik wurden ebenfalls die relative Standardabweichung, Nachweis- und

Bestimmungsgrenze sowie die Wiederfindungsrate für jedes im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Glucosinolat bestimmt (Tabelle 6-4).

Tab. 6-4 Relative Standardabweichung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ) sowie Wiederfindungsraten (WF) von 14 Glucosinolaten mittels Methode 2

Glucosinolat	Methode 2 (HILIC)			
	RSD [%]	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]	WF [%]
Glucoiberin	4,20	4,2	7,0	94,5
Progoitrin	0,24	0,7	1,2	87,6
Glucoscheirolin	0,52	0,7	1,2	76,6
Sinigrin	0,94	0,3	0,5	88,2
Epiprogoitrin	0,77	1,1	1,8	96,3
Glucoraphanin	0,44	2,1	3,5	91,6
Glucoraphenin	1,18	2,1	3,5	75,9
Gluconapin	2,10	1,1	1,8	90,6
Sinibin	0,60	0,4	0,6	88,9
Glucosibarin	0,36	0,4	0,6	98,2
Glucotropaeolin	0,72	0,2	0,4	91,0
Glucobarbarin	2,18	0,7	1,2	93,0
Glucoerucin	0,21	1,1	1,8	90,2
Gluconasturtiin	0,66	1,1	1,8	90,1

6.1.3 Massenspektrometrische Charakterisierung der Standards

Da die Identifizierung der intakten Glucosinolate im Probenmaterial über einen Vergleich der ermittelten Retentionszeiten mit denen der Referenzsubstanzen allein nicht ausreichend war, wurde zusätzlich eine Charakterisierung über spezifische Fragmentationen vorgenommen. Hierzu wurden die Referenzsubstanzen mittels **Methode 2** (vgl. Kap. 4.3.2) an der HPLC vorgetrennt, im Anschluss daran im ESI-MS ionisiert und in charakteristische Fragmente gespalten.

Die folgende Abbildung 6-5 zeigt das Total-Ion-Chromatogramm (1) bzw. die Selected-Ion-Chromatogramme verschiedener Massenbereiche (2-7) eines Standards der 14 in Rahmen dieser Arbeit untersuchten Glucosinolate analysiert mittels HPLC/ESI-MS im negativen Ionisierungsmodus (MS-Parameter vgl. Kap. 4.3.3). Die hieraus folgenden Massenfragmente der 14 Referenzglucosinolate im Verhältnis Masse/Ladung (m/z) sind in Tabelle 6-5 dargestellt.

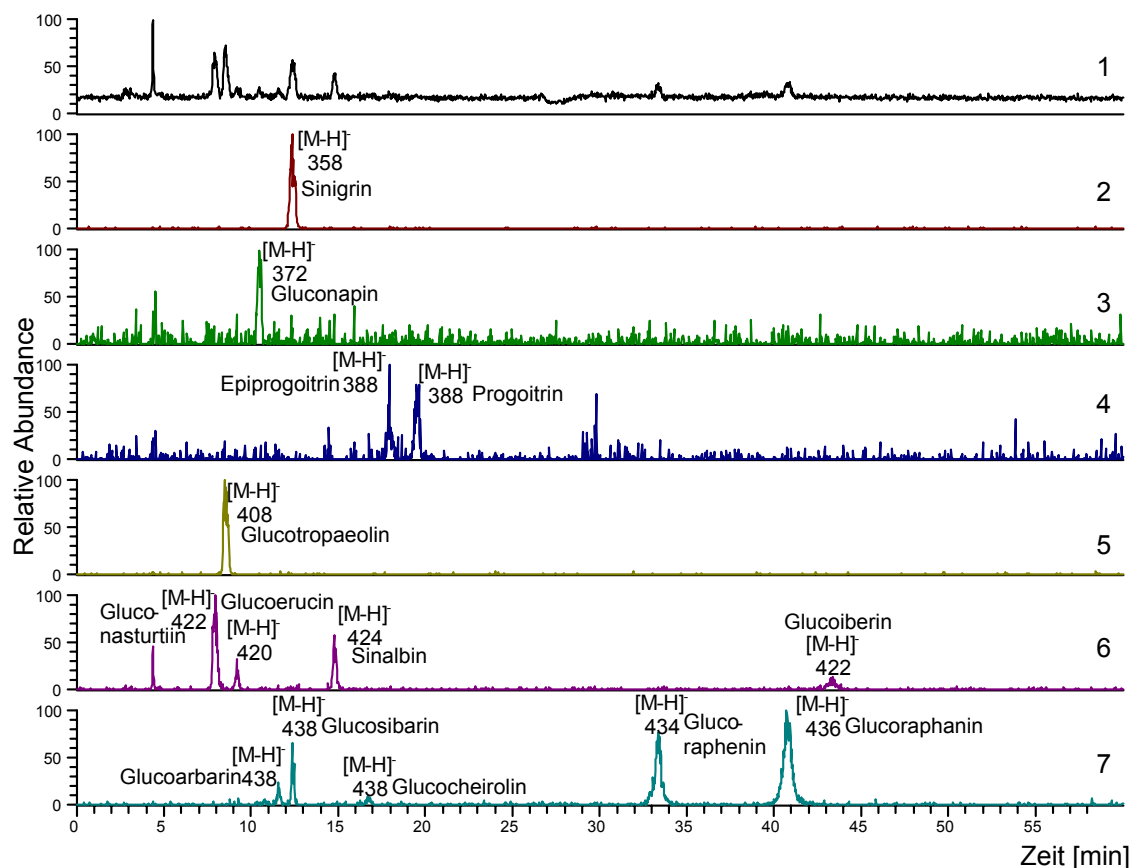


Abb. 6-5 TIC-Chromatogramm 1 $m/z = 230-1000$ und Selected-Ion-Chromatogramme eines GSL-Gesamtstandards mit den Massenbereichen 2 $m/z = 357-359$, 3 $m/z = 371-373$, 4 $m/z = 387-389$, 5 $m/z = 407-409$, 6 $m/z = 419-425$ und 7 $m/z = 433-439$ detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3)

Tab. 6-5 Massen und zugehörige Fragmente 14 intakter Glucosinolate ermittelt über HPLC-ESI-MS im negativen Ionisierungsmodus; HPLC vgl. Kap. 4.3.2

Glucosinolat	Masse [M]	Massenfragmente [m/z]
Glucoiberin	423	422 [M-H] ⁻
Progoitrin	389	388 [M-H] ⁻
Glucocheirolin	439	438 [M-H] ⁻
Sinigrin	359	358 [M-H] ⁻ , 438 [M+SO ₃ -H] ⁻ , 716 [2M-2H] ⁻ , 755 [2M-2H+K] ⁻
Epiprogoitrin	389	388 [M-H] ⁻
Glucoraphanin	437	436 [M-H] ⁻
Glucoraphenin	435	434 [M-H] ⁻
Gluconapin	373	372 [M-H] ⁻
Sinalbin	425	424 [M-H] ⁻ , 887 [2M-2H+K] ⁻
Glucosibarin	439	438 [M-H] ⁻
Glucotropaeolin	409	408 [M-H] ⁻ , 487 [M+SO ₃ -H] ⁻ , 816 [2M-2H] ⁻
Glucobarbarin	439	438 [M-H] ⁻
Glucoerucin	421	420 [M-H] ⁻ , 498 [M+SO ₃ -2H] ⁻ , 879 [2M-2H+K] ⁻
Gluconasturtiin	423	422 [M-H] ⁻ , 502 [M+SO ₃] ⁻ , 844 [2M-2H] ⁻

Für jedes der 14 Glucosinolate fand man ein Massenfragment, bei dem die Masse um eins erniedrigt war $[M-H]^-$, zudem für die Glucosinolate Sinigrin, Glucotropaeolin und Gluconasturtiin die doppelte Masse weniger zwei $[2M-2H]^-$. Des Weiteren fanden sich einige deutliche Signale unterschiedlicher Verhältnisse von Masse/Ladung, die auf komplexere Fragmente in Kombination mit Kalium bzw. einer Sulfatgruppe schließen ließen.

6.2 Ergebnisse der HPLC-Analyse der Proben

Nach Abschluss der Methodvalidierung wurden beide flüssigchromatographischen Methoden auf eine Reihe unterschiedlicher Probenextrakte angewandt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

6.2.1 Rucola

Zur Analyse mittels HPLC wurden 5 handelsübliche Rucolaproben (bezeichnet mit RU1-RU5) je dreigeteilt, wobei ein Anteil frisch, der zweite bei -20 °C tiefgekühlt (TK) und der dritte lyophilisiert extrahiert wurde. Die Proben wurden wie in Kapitel 4.1 dargestellt extrahiert, über DEAE Sephadex[®] A-25 Anionenaustauscher aufgereinigt und anschließend in die HPLC injiziert. Die Messungen erfolgten über **Methode 1** (Kap. 4.3.1) mittels DAD bei der für diese Substanzen optimalen Wellenlänge von 229 nm. Eine zusätzliche Charakterisierung mittels ESI-MS war über diese Methode nicht möglich und wurde daher nicht durchgeführt.

Die zu Beginn vorgenommene qualitative Auswertung der mittels o. g. Methodik erhaltenen Chromatogramme ergab Substanzpeaks, die im Vergleich mit den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Referenzmaterialien anhand übereinstimmender Retentionszeiten den Glucosinolaten Glucoraphanin (7 min) und Glucoerucin (33 min) zugeordnet werden konnten (Abbildung 6-6). Diese Ergebnisse wurden durch Aufstocken mit den entsprechenden Referenzsubstanzen eindeutig bestätigt.

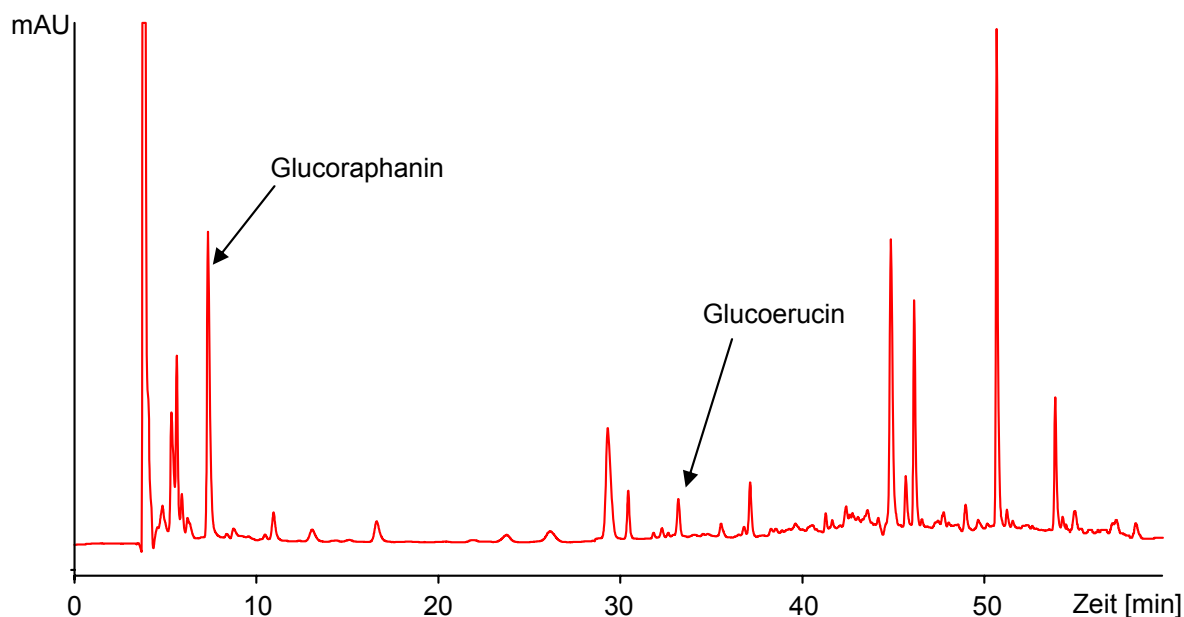


Abb. 6-6 Chromatogramm einer Rucolaprobe RU4 (aufgereinigt über DEAE Sephadex A-25) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris® C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1

Die über externe Standardkalibrierung ermittelten Gehalte dieser Glucosinolate in mg/100 g Frischmasse (FM) sind in Tabelle 6-6 dargestellt.

Tab. 6-6 Gehalte an Glucoraphanin (**G**) und Glucoerucin (**M**) [mg/100 g FM] in 5 Rucolaproben je frisch, bei -20 °C tiefgekühlt und lyophilisiert analysiert, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1

Probe	Glucosinolatgehalte [mg/100 g FM]					
	G			M		
	frisch	TK (-20 °C)	lyophilisiert	frisch	TK (-20 °C)	lyophilisiert
RU1	69,2	57,4	33,7	3,14	2,01	2,22
RU2	22,7	20,1	14,4	1,23	3,13	0,61
RU3	11,7	10,2	9,82	2,14	1,82	2,52
RU4	48,1	40,3	40,7	3,13	2,64	1,83
RU5	17,2	22,8	23,8	1,72	1,42	1,33

FM = Frischmasse

Das Glucosinolat Glucoraphanin (**G**) wurde dabei in der Probe RU1 in Mengen von 69,2 (frisch), 57,4 (TK) und 33,7 mg/100 g FM (lyophilisiert) detektiert, die Gehalte dieses GSL in Rucola 2 lagen bei 22,7, 20,1 und 14,4 mg/100 g FM (frisch, TK, lyophilisiert). In den Extrakten des Rucola RU3 lagen die Gehalte an Glucoraphanin in der frisch extrahierten Probe bei 11,7 mg/100 g FM, in der TK-Probe bei 10,2 und

in der lyophilisiert aufgearbeiteten Probe bei 9,82 mg/100 g FM. Rucola 4 enthielt Glucoraphanin in Mengen von 48,1 (frisch), 40,3 (TK) und 40,7 mg/100 g FM (lyophilisiert). In der Probe RU5 fanden sich Glucoraphanin-Gehalte von 17,2 mg/100 g FM in der frischen Probe, 22,8 mg/100 g FM in der tiefgekühlt extrahierten Probe und 23,8 mg/100 g FM in der lyophilisierten Probe.

Die Gehalte an Glucoerucin (**M**) lagen in allen Proben deutlich unter denen des Glucoraphanin. So enthielt die Probe RU1 je 3,14, 2,01 bzw. 2,22 mg/100 g FM dieses Glucosinolates in den frisch, TK und lyophilisiert eingesetzten Extrakten, in Rucola 2 wurden Gehalte von 1,23, 3,13 und 0,61 mg/100 g FM (frisch, TK, lyophilisiert) detektiert. In Rucola 3 fanden sich Glucoerucin-Gehalte von 2,14, 1,82 und 2,52 mg/100 g FM (frisch, TK, lyophilisiert), in Extrakten von RU4 3,1 mg/100 g FM (frisch), 2,64 mg/100 g FM (TK) und 1,83 mg/100 g FM (lyophilisiert). Die Analyse der Probenextrakte von Rucola 5 ergab Mengen an Glucoerucin von 1,72, 1,42 und 1,33 mg/100 g FM (frisch, TK, lyophilisiert).

6.2.2 Kressen und Sprossen

Das Probenmaterial, bestehend aus insgesamt 12 Kressen (K) und 8 Sprossen (SP) unterschiedlicher taxonomischer Zugehörigkeit, wurde zur chromatographischen Trennung wie in Kapitel 4.1 beschrieben aufgearbeitet, wobei jeder Probenextrakt einmal über DEAE Sephadex A-25 Anionenaustauscher aufgereinigt und einmal direkt zur Analyse eingesetzt wurde, und anschließend in die HPLC injiziert. Die Analyse erfolgte anhand der in Kapitel 4.3 dargestellten **Methoden 1** und **2**, mittels DAD (Methode 1) bzw. UV-Detektor (Methode 2) bei der für diese Substanzen optimalen Wellenlänge von 229 nm. Zur weiterführenden Charakterisierung wurde jede Probe zusätzlich über Methode 2 vorsepariert und anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert.

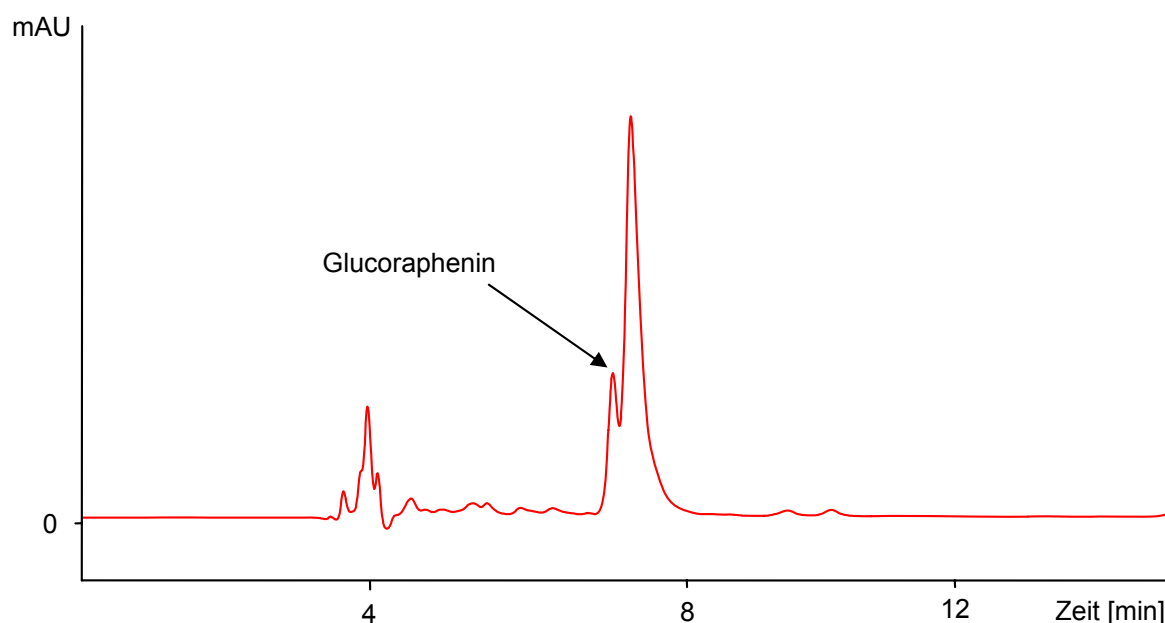
Zunächst führte man eine qualitative Untersuchung der Pflanzenextrakte durch, indem ein Aliquot, je frisch und lyophilisiert extrahiert, in die HPLC injiziert wurde. Im Anschluss daran erfolgte ein Vergleich der so erhaltenen Peaks mit den 14 Referenzsubstanzen anhand der entsprechenden Retentionszeiten. Anschließend wurden ausgesuchte Proben mit den bzgl. übereinstimmender Retentionszeiten vermuteten Standardsubstanzen versetzt, und die so erhaltenen Chromatogramme mit Chromatogrammen der jeweiligen nicht aufgestockten Proben verglichen.

Tab. 6-7 Kresse (K)- und Sprossenproben (SP) mit darin detektierten intakten GSL

Probe	Detektierte Glucosinolate
SP5	Glucoraphenin
SP6	Glucoraphenin
SP8	Glucoraphenin
K6	Glucoraphenin
K9	Glucoraphenin
K7	Sinigrin
K5	Glucoerucin, Glucoraphenin, Glucoiberin
SP2	Glucoerucin, Glucoraphenin, Glucoiberin
K1	Sinalbin, Glucotropaeolin, Gluconasturtiin

Hierüber wurden – wie in Tabelle 6-7 zusammenfassend dargestellt – in fünf Kresse- und vier Sprossenproben acht intakte Glucosinolate identifiziert. In den Kressesorten K2, K3, K4, K8, K10, K11 und K12 bzw. in den Sprossen SP1, SP3, SP4 und SP7 wurde keine der 14 Standardsubstanzen detektiert.

Abbildung 6-7 zeigt beispielhaft für die rettichartigen Proben das Chromatogramm (**Methode 1**) eines Extraktes der Probe SP5 (Radieschensprossen), welcher bei einer Retentionszeit von 7 min über Vergleich der Retentionszeiten wie auch über Ausstocung mit der entsprechenden Referenzsubstanz ein dem GSL Glucoraphenin zuzuordnendes Signal zeigte.

**Abb. 6-7** Chromatogramm der Probe SP5 (Radieschensprossen) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris® C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1

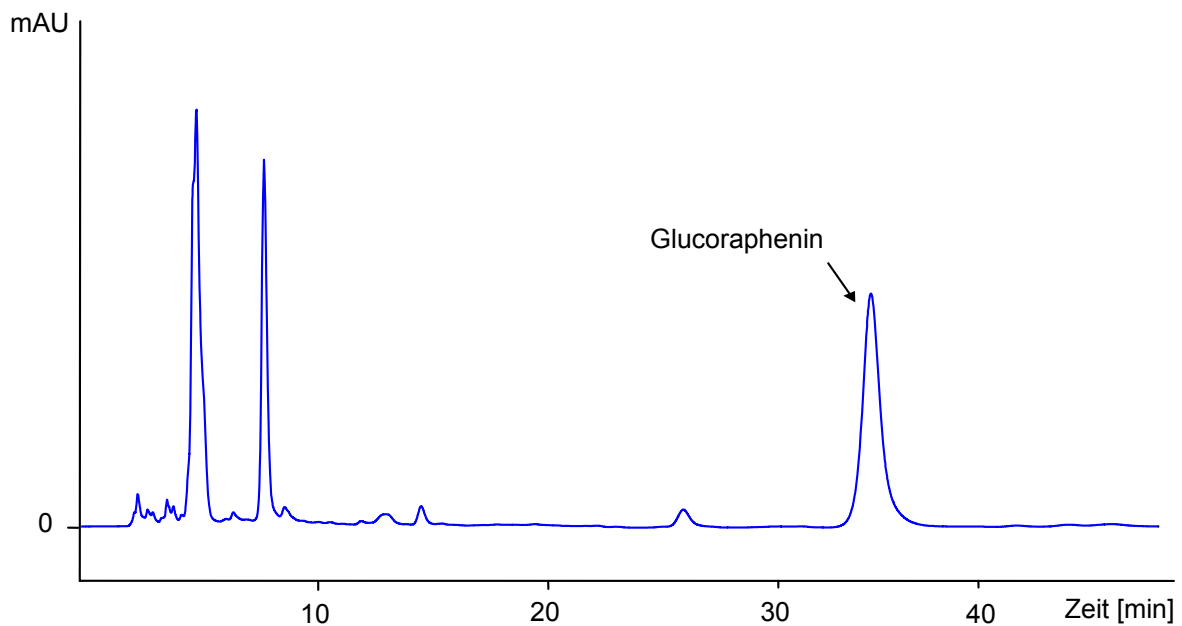


Abb. 6-8 Chromatogramm eines Extraktes von SP5 (Radieschensprossen) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Mittels **Methode 2** wurde das Glucosinolat ebenfalls (Abbildung 6-8), jedoch bei einer Retentionszeit von 36-37 min detektiert. Anhand dieser Analysen wurde sowohl nach Methode 1 wie auch nach Methode 2 in allen Extrakten der Proben SP5, SP6, SP8 (Sango Sprossen) sowie den Exsudaten der Proben K6 (Daikon Cress[®]) und K9 (Sakura Cress[®]) das Glucosinolat Glucoraphenin detektiert und über anschließende Charakterisierung mittels Massenspektrometer auch identifiziert.

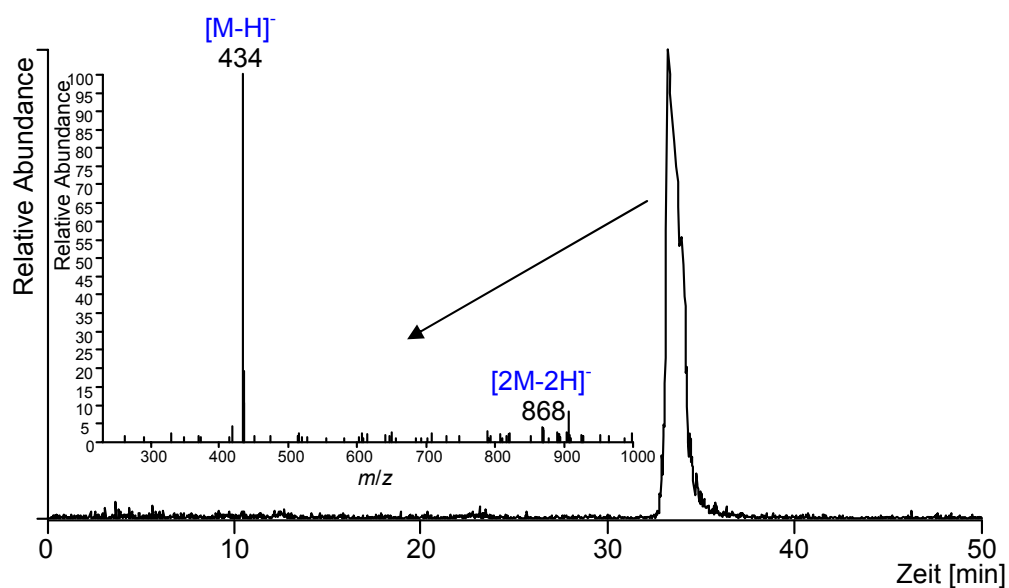


Abb. 6-9 Selected-Ion-Chromatogramm einer lyophilisierten Probe SP6 (Rettichsprossen) mit dem Massenbereich für Glucoraphenin $m/z = 433-435$ sowie dazugehörigem Massenspektrum; detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3)

Wie in Abbildung 6-9 für den Extrakt einer lyophilisierten Probe von SP6 (Rettichsprossen) erkennbar, wurde mit Hilfe der Kopplung von HPLC und ESI-MS in allen rettichartigen Proben das Glucosinolat Glucoraphenin anhand der Massenfragmente m/z 434 $[M-H]^-$ und m/z 868 $[2M-2H]^-$ eindeutig identifiziert und somit die Ergebnisse aus dem Vergleich der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen bzw. der Aufstockung mit diesen verifiziert.

In Abbildung 6-10 ist das über **Methode 1** erhaltene Chromatogramm eines Extraktes der Probe K7 (Mustard Cress) dargestellt. Auch hier wurde über einen Vergleich der Retentionszeiten von Substanzpeak und Standardpeak bei 6-8 min das GSL Sinigrin vermutet und dies anhand einer mit Sinigrin aufgestockten Probe verifiziert.

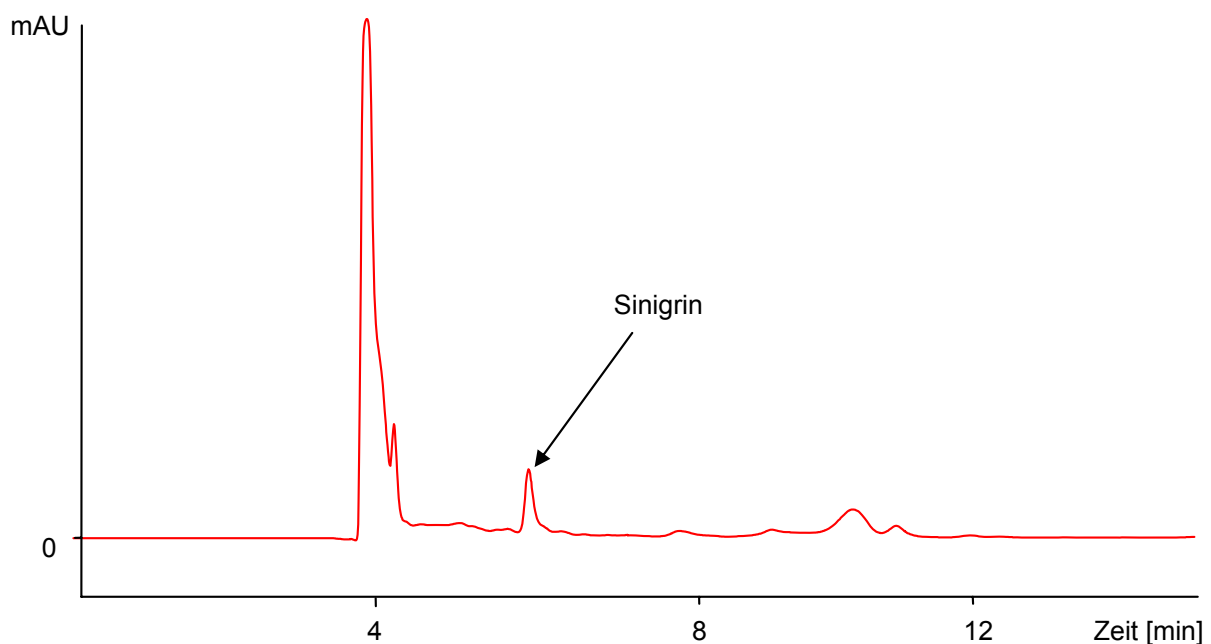


Abb. 6-10 Chromatogramm der Probe K7 (Mustard Cress) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris[®] C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1

Dieses den Sinigrin zugeordnete Signal fand sich in allen Extrakten dieser Kresse, sowohl nach Methode 1 wie auch nach Analyse mittels **Methode 2** (Abbildung 6-11; RT 12-13 min).

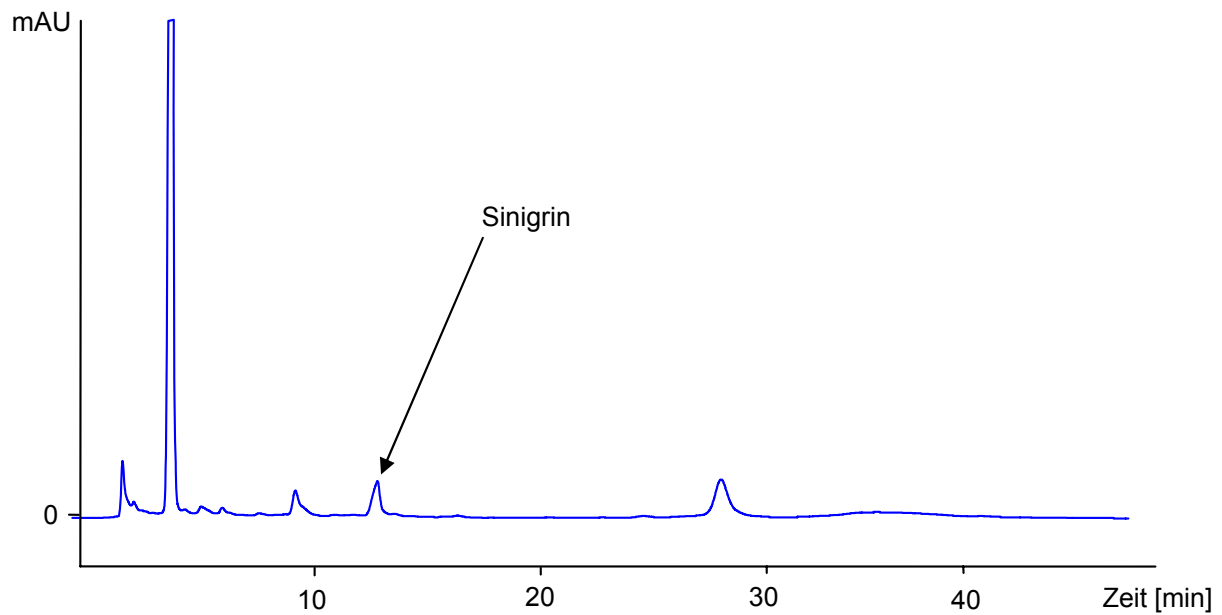


Abb. 6-11 Chromatogramm eines Extraktes von K7 (Mustard Cress) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Eine Überprüfung der Ergebnisse mittels charakteristischer Massenfragmente über ESI-MS (Abbildung 6-12) ergab eindeutig dem Sinigrin zuzuordnende Signale bei m/z 358 $[M-H]^-$ und m/z 739 $[2M-2H-Na]^-$.

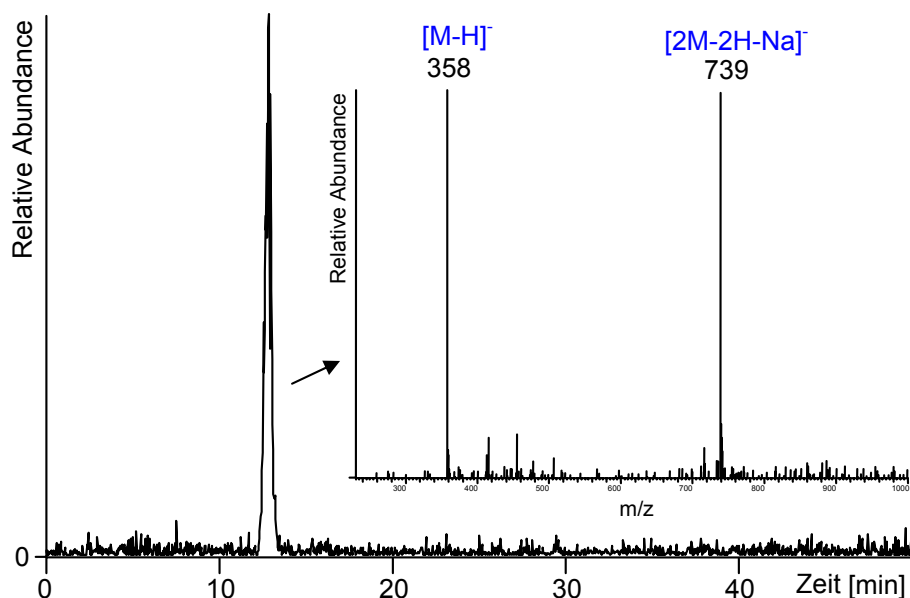


Abb. 6-12 Selected-Ion-Chromatogramm der lyophilisierten Probe K7 (Mustard Cress) mit dem Massenbereich für Sinigrin $m/z = 357-359$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3)

Abbildung 6-13 zeigt beispielhaft für alle Extrakte der von Brokkolisaatgut ausgehenden Proben das Chromatogramm eines Extraktes von SP2 (Broccosprouts[®]) analysiert über **Methode 1**.

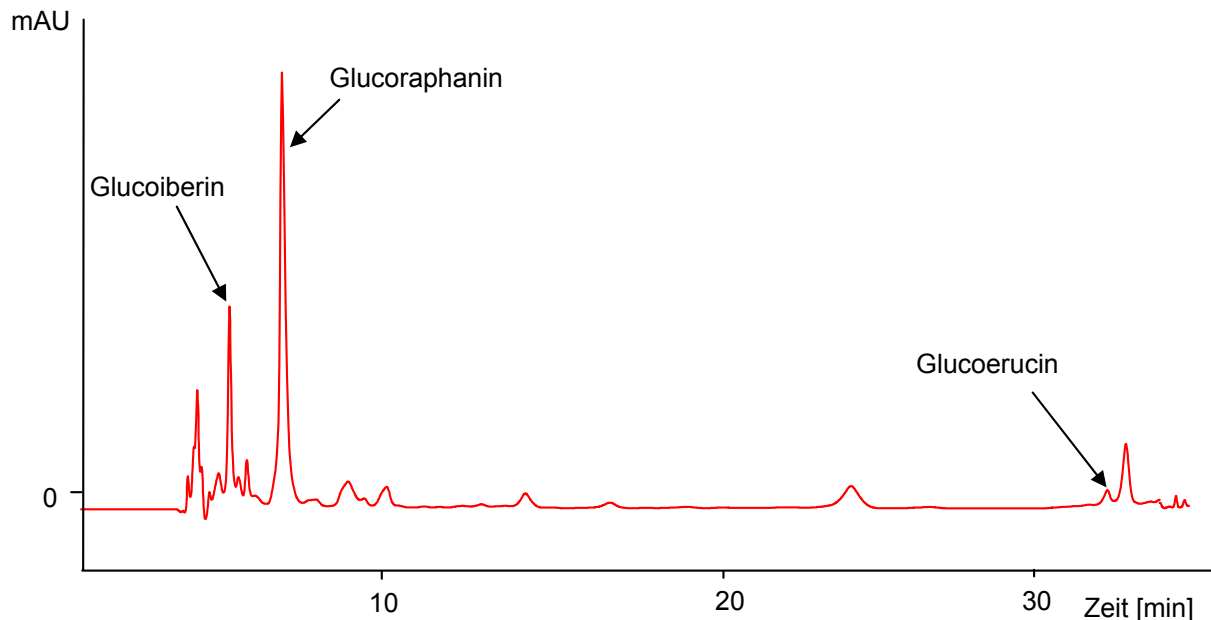


Abb. 6-13 Chromatogramm der Probe SP2 (Broccosprouts[®]) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris[®] C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1

Hier wurden Peaks detektiert, die mit den Retentionszeiten der Glucosinolate Glucoiberin (5 min), Glucoraphanin (7 min) und Glucoerucin (33 min) vergleichbar waren. Untersuchungen mittels Aufstockung der Proben mit diesen Standardsubstanzen bestätigen diese Ergebnisse.

Auch Analysen anhand **Methode 2** (Abbildung 6-14) zeigten entsprechende Signale nach 10, 42 und 44 min, welche ebenfalls über Aufstockung mit den jeweiligen Referenzsubstanzen den Glucosinolaten Glucoerucin, Glucoraphanin sowie Glucoiberin zugeordnet wurden.

In den Extrakten der Probe K5 (BroccoCress[®]) wurden ebenfalls in allen Proben über **beide Methoden** den Glucosinolaten Glucoiberin, Glucoraphanin und Glucoerucin zuzuordnende Peaks detektiert und über Aufstocken mit Referenzmaterialien verifiziert.

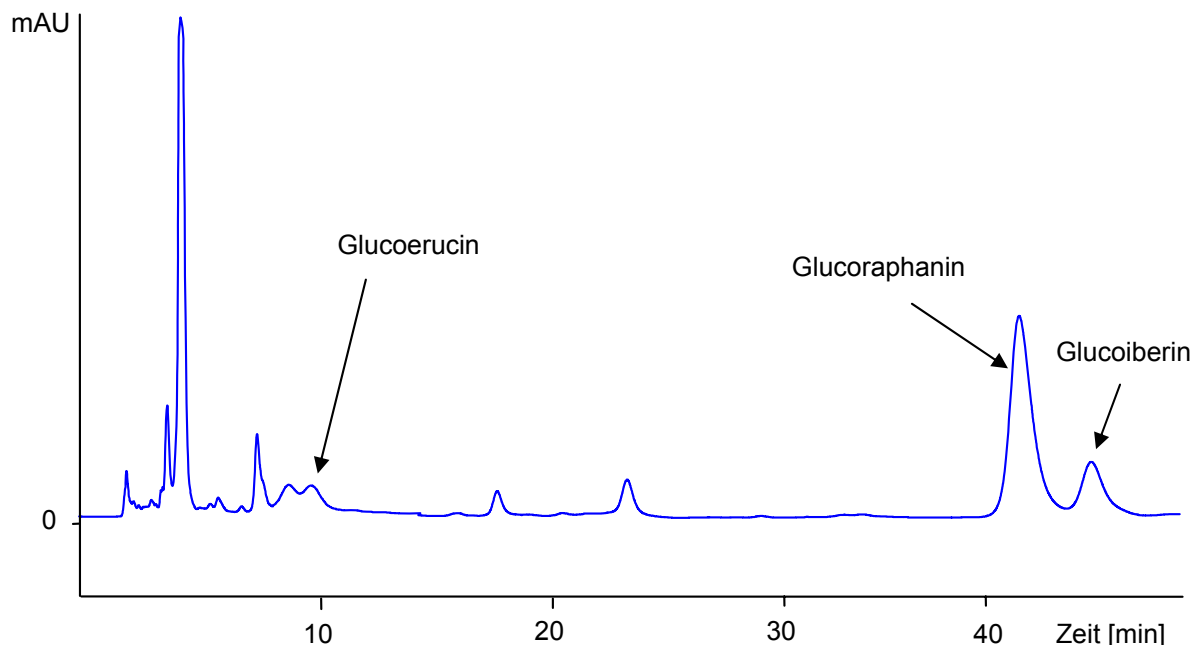


Abb. 6-14 Chromatogramm der Probe SP2 (Broccosprouts®) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna® 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Die Ionenspur des Glucosinolates Glucoraphanin aus der massenspektrometrischen Analyse zeigt in Abbildung 6-15 beispielhaft die Auswertung der Extrakte von SP2.

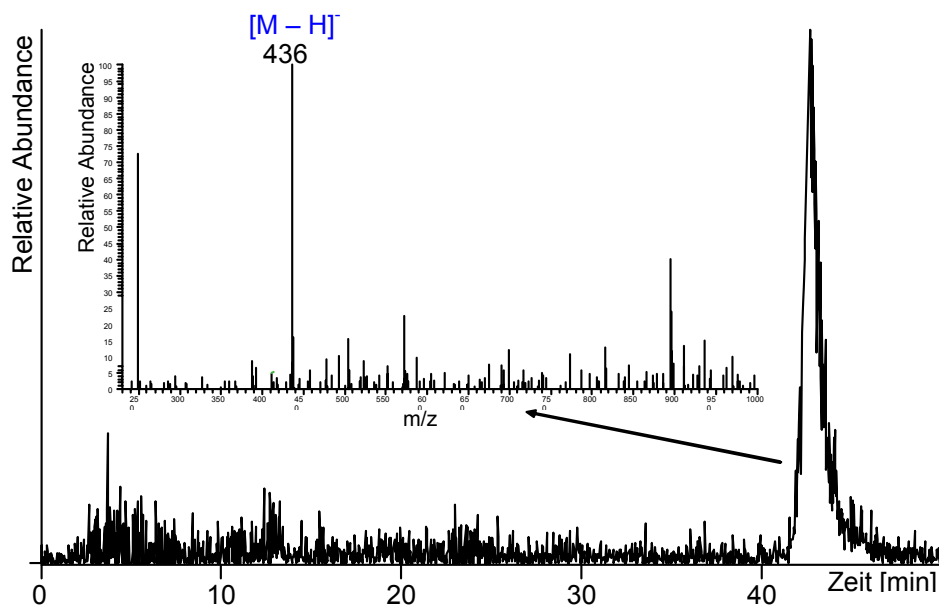


Abb. 6-15 Selected-Ion-Chromatogramm der Probe SP2 (Broccosprouts®) mit dem Massenbereich $m/z = 435-437$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3)

Hier konnten lediglich die charakteristischen Fragmentationen der Glucosinolate Glucoiberin und Glucoraphanin eindeutig identifiziert (m/z 422 $[M-H]^-$ bzw. m/z 436 $[M-H]^-$) und diese Substanzen somit im Probenmaterial bestätigt werden. In Probe K5 wurden zugehörige Massenfragmente der GSL Glucoerucin, Glucoiberin und Glucoraphanin (m/z 420, 422 und 436 $[M-H]^-$) eindeutig identifiziert.

Die Analysen der Probe K1 (Gartenkresse) über **Methode 1** ergaben Peaks, die anhand übereinstimmender Retentionszeiten (12, 30 bzw. 38 Minuten) mit den Referenzsubstanzen Sinalbin, Glucotropaeolin und Gluconasturtiin in Verbindung gebracht wurden (Abbildung 6-16).

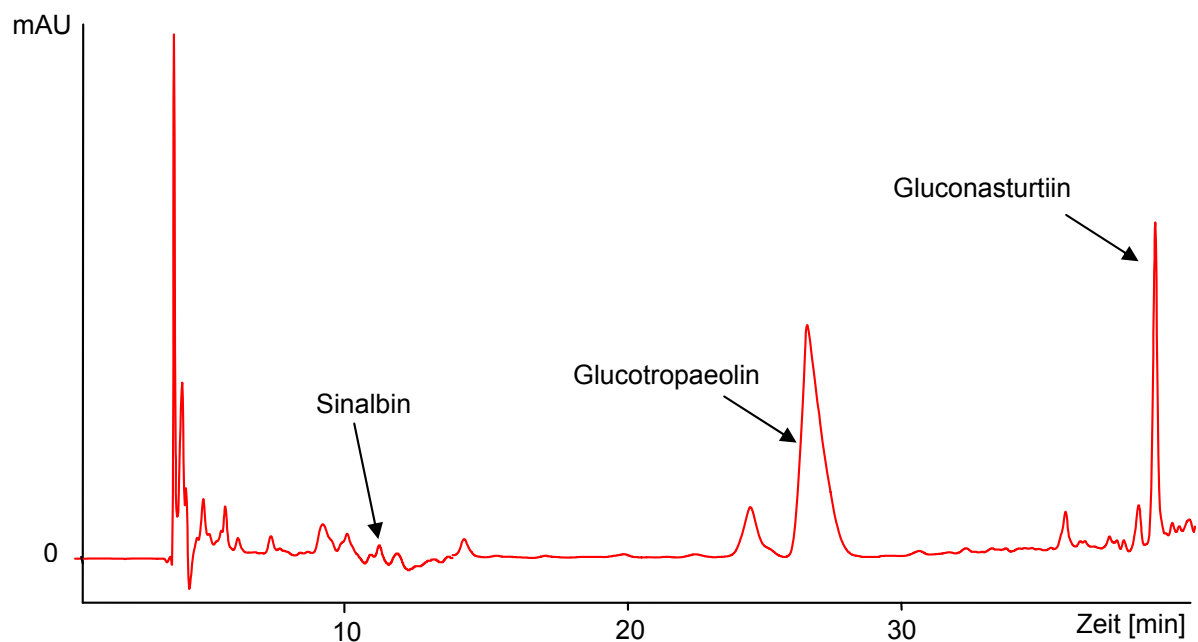


Abb. 6-16 Chromatogramm der Probe K1 (Gartenkresse) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris® C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1

Wie in Abbildung 6-17 dargestellt, konnten Peaks im Chromatogramm der Extrakte von K1 (**Methode 2**) über Vergleich mit Referenzsubstanzen ebenfalls den Glucosinolaten Glucotropaeolin (7 min), Gluconasturtiin (8,5 min) und Sinalbin (17 min) zugeordnet werden, was durch Aufstocken auch bestätigt wurde.

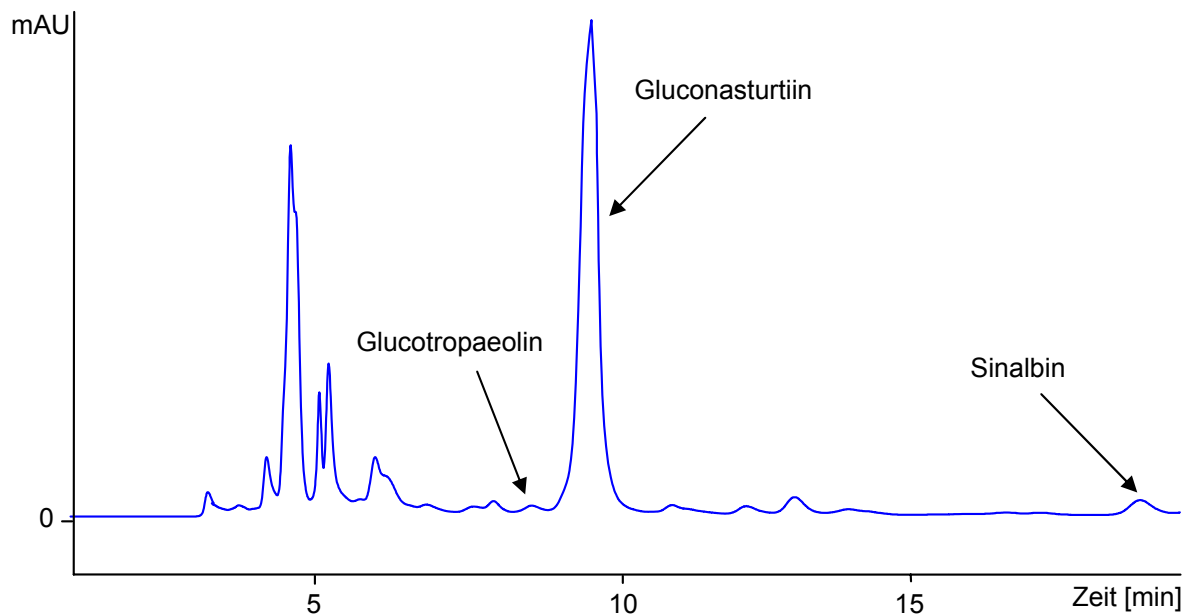


Abb. 6-17 Chromatogramm der Probe K1 (Gartenkresse) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Die massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse teilweise. So fand man charakteristische Fragmentationen, die mit m/z 408 $[M-H]^-$ auf das Glucosinolat Glucotropaeolin (s. Abbildung 6-18) und mit m/z 424 $[M-H]^-$ auf Sinalbin hindeuteten. Das ebenfalls über Vergleich der Retentionszeiten bzw. Aufstocken mit Referenzsubstanzen identifizierte Glucosinolat Gluconasturtiin konnte mittels Massenspektrometrie nicht eindeutig bestätigt werden.

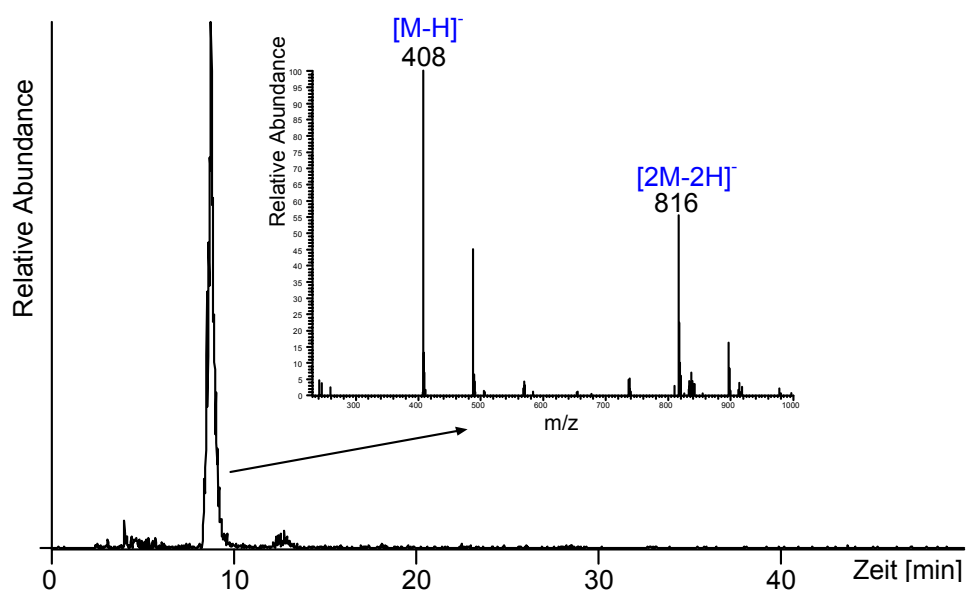


Abb. 6-18 Selected-Ion-Chromatogramm der Probe K1 (Gartenkresse) im Massenbereich $m/z = 407-409$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3)

Nachdem die intakten Glucosinolate in den Proben qualitativ eindeutig identifiziert waren, schloss man eine Quantifizierung derselben über externe Kalibrierung mittels Referenzglucosinolaten (Kap. 4.1.3) an. Die Extrakte der unterschiedlich vorbehandelten Kressen und Sprossen wurden in Doppelbestimmung bei 229 nm analysiert und anschließend quantifiziert. Auch hier wurde jede Probe zunächst über **Methode 1** (Kap. 4.3.1) analysiert, wie in Tabelle 6-8 für die nicht aufgereinigten frischen und lyophilisierten Kresse- und Sprossenproben dargestellt ist.

Tab. 6-8 Gehalte an intakten Glucosinolaten in mg/100 g FM in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) (frisch; lyophilisiert) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris® C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1

Proben		Glucosinolatgehalte [mg/100 g FM]							
		M	G	F	I	K	N	D	A
SP5	frisch	-	-	248	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	159	-	-	-	-	-
SP6	frisch	-	-	139	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	147	-	-	-	-	-
SP8	frisch	-	-	234	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	222	-	-	-	-	-
K6	frisch	-	-	328	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	438	-	-	-	-	-
K9	frisch	-	-	153	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	84,1	-	-	-	-	-
K7	frisch	-	-	-	-	-	-	3,78	-
	lyo	-	-	-	-	-	-	10,4	-
K5	frisch	n.d.	76,0	-	-	-	-	-	12,7
	lyo	n.d.	159	-	-	-	-	-	22,4
SP2	frisch	8,9	73,9	-	-	-	-	-	2,8
	lyo	38,6	248	-	-	-	-	-	19,2
K1	frisch	-	-	-	0,5	143	6,9	-	-
	lyo	-	-	-	0,6	97,3	3,1	-	-

FM = Frischmasse; n.d. = nicht detektiert; lyo = lyophilisiert

Das Glucosinolat Glucoraphenin (**F**) konnte in den Sprossen SP5, SP6 und SP8 identifiziert werden und wies Gehalte von 248, 139,5 und 234 mg/100 g FM (frisch), sowie 159, 147 und 222 mg/100 g FM (lyophilisiert) auf. Die Gehalte an Glucoraphenin in Kresse K9 lagen bei 153 in frischem und 84,1 mg/100 g FM in lyophilisierten Probenmaterial, die Kresse K6 wies Gehalte von 327 (frisch) und 438 mg/100 g FM (lyo) auf.

Die Auswertung ergab Gehalte an Glucoerucin (**M**) in Extrakten aus frischen und lyophilisierten Proben von SP2 von 8,9 und 38,6 mg/100 g FM. Die in Kresse K5 dem

Glucoerucin zugeordneten Peaks lagen unterhalb der Detektionsgrenze und waren damit nicht quantifizierbar. Die Gehalte an Glucoraphanin (**G**) in den Proben K5 und SP2 lagen in den frischen Extrakten bei 76,0 und 73,9 mg/100 g FM, bzw. in den lyophilisiert aufgearbeiteten Proben bei 159 und 248 mg/100 g FM. Glucoiberin (**A**) war in Mengen von 12,7 und 2,8 mg/100 g FM (frisch) bzw. von 22,4 und 19,2 mg/100 g FM (lyophilisiert) enthalten.

Die Probenextrakte von Mustard Cress (K7) wiesen Gehalte an Sinigrin (**D**) von 3,8 und 10,4 mg/100 g FM (frisch/lyo) auf.

In K1 wurden die GSL Sinalbin (**I**) mit 0,5 und 0,6 mg/100 g FM (frisch/lyo), Glucotropaeolin (**K**) mit 143 und 97,3 mg/100 g FM (frisch/lyo) und Gluconasturtiin (**N**) mit 6,9 und 3,1 mg/100 g FM (frisch/lyo) identifiziert.

In Tabelle 6-9 sind die Gehalte an intakten GSL in mg pro 100 g Frischmasse in den über Anionenaustausch mittels DEAE Sephadex A-25 aufgereinigten, frischen und lyophilisierten Kresse- und Sprossenproben dargestellt.

Tab. 6-9 Gehalte an intakten Glucosinolaten in mg/100 g FM in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) (frisch; lyophilisiert; über DEAE-Sephadex[®] Anionenaustauscher aufgereinigt) detektiert mittels HPLC, Säule: Polaris[®] C18-Ether, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.1

Proben aufgereinigt		Glucosinolatgehalte [mg/100 g FM]							
		M	G	F	I	K	N	D	A
SP5	frisch	-	-	35,2	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	55,6	-	-	-	-	-
SP6	frisch	-	-	9,8	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	93,0	-	-	-	-	-
SP8	frisch	-	-	4,0	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	57,4	-	-	-	-	-
K6	frisch	-	-	12,4	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	88,7	-	-	-	-	-
K9	frisch	-	-	10,9	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	14,8	-	-	-	-	-
K7	frisch	-	-	-	-	-	-	0,1	-
	lyo	-	-	-	-	-	-	6,3	-
K5	frisch	n.d.	5,3	-	-	-	-	-	0,8
	lyo	n.d.	96,5	-	-	-	-	-	14,6
SP2	frisch	0,7	5,5	-	-	-	-	-	n.d.
	lyo	11,3	156	-	-	-	-	-	1,2
K1	frisch	-	-	-	0,6	0,1	n.d.	-	-
	lyo	-	-	-	2,7	0,3	n.d.	-	-

FM = Frischmasse; n.d. = nicht detektiert; lyo = lyophilisiert

Die Auswertungen der Chromatogramme ergaben Gehalte an Glucoraphenin (**F**) in den Sprossen SP5, SP6 und SP8, sowie den Proben K6 und K9 von 35,2, 9,8, 4,0 bzw. 12,4 und 10,9 mg/100 g FM (frisch) und 55,6, 93,0, 57,4 und 88,7 bzw. 14,8 mg/100 g FM.

Die Gehalte an Glucoerucin (**M**) in frischen und lyophilisierten Probenextrakten von SP2 lagen bei 0,7 und 11,3 mg/100 g FM. Auch hier waren die in Probe K5 dem Glucoerucin zugeordneten Peaks nicht quantifizierbar. Die Gehalte an Glucoraphenin (**G**) in K5 und SP2 betragen in frischen Proben 5,3 und 5,5 mg/100 g FM, bzw. in den lyophilisierten Proben 96,5 und 156 mg/100 g FM. Glucoiberin (**A**) war in Probe K5 in Mengen von 0,8 (frisch) und 14,6 mg/100 g FM (lyophilisiert) enthalten, Probe SP2 enthielt lediglich in lyophilisierter Form auswertbare Mengen (1,2 mg/100 g FM) dieses GSL.

In Probe K7 war das Glucosinolat Sinigrin (**D**) in Mengen von 0,1 und 6,3 mg/100 g FM (frisch/lyo) enthalten.

In den Probenextrakten von K1 wurden die GSL Sinalbin (**I**) mit 0,6 und 2,7 mg/100 g FM (frisch/lyo) und Glucotropaeolin (**K**) mit 0,1 und 0,3 mg/100 g FM (frisch/lyo) identifiziert. Gluconasturtiin (**N**) konnte in diesen aufgereinigten Proben nicht detektiert werden.

Tabelle 6-10 zeigt die über **Methode 2** (s. Kap. 3.7.2) ermittelten Gehalte an intakten Glucosinolaten in mg pro 100 g Frischmasse in den nicht aufgereinigten frischen und lyophilisierten Kresse- und Sprossenproben.

Das Glucosinolat Glucoraphenin (**F**) konnte in den Sprossen SP5, SP6 und SP9 identifiziert werden und betrug darin 42,3, 185 und 254 mg/100 g FM (frisch), sowie 950, 1740 und 716 mg/100 g FM (lyophilisiert). Die Gehalte an Glucoraphenin in K6 lagen bei 652 mg/100 g FM (frisch) und 5327 mg/100 g FM (lyo), K9 enthielt Gehalte von 68,16 in frischen und 1478 mg/100 g FM in lyophilisierten Proben.

Die Gehalte an Glucoerucin (**M**) in frischen und lyophilisierten Extrakten von SP2 betragen 42,7 und 20,0 mg/100 g FM. Trotz qualitativen Nachweises von Glucoerucin in den Probenextrakten von K5 waren die Peaks, die diesem Glucosinolat zugeordnet werden konnten, nicht quantitativ auswertbar. Die Gehalte an Glucoraphenin (**G**) in K5 und SP2 lagen in den frischen Proben bei 58,3 und 150,6 mg/100 g FM, bzw. in den lyophilisierten Proben bei 137 und 249 mg/100 g

FM, sowie an Glucoiberin (**A**) von 3,8 und 26,3 mg/100 g FM (frisch) und 7,9 und 72,9 mg/100 g FM (lyophilisiert).

Tab. 6-10 Gehalte an intakten Glucosinolaten in mg/100 g FM in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) (frisch; lyophilisiert) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna® 5 µ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Proben	Glucosinolatgehalte [mg/100 g FM]								
	M	G	F	I	K	N	D	A	
SP5	frisch	-	-	42,3	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	950	-	-	-	-	-
SP6	frisch	-	-	185	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	17400	-	-	-	-	-
SP8	frisch	-	-	254	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	716	-	-	-	-	-
K6	frisch	-	-	652	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	5327	-	-	-	-	-
K9	frisch	-	-	68,2	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	1478	-	-	-	-	-
K7	frisch	-	-	-	-	-	11,0	-	
	lyo	-	-	-	-	-	15,8	-	
K5	frisch	n.d.	58,3	-	-	-	-	3,8	
	lyo	n.d.	137	-	-	-	-	7,9	
SP2	frisch	42,7	151	-	-	-	-	26,3	
	lyo	20,0	249	-	-	-	-	72,9	
K1	frisch	-	-	-	2,6	231	3,3	-	
	lyo	-	-	-	3,4	386	2,6	-	

FM = Frischmasse; n.d. = nicht detektiert; lyo = lyophilisiert

Die Probenextrakte von K7 wiesen Gehalte an Sinigrin (**D**) von 11,0 und 15,8 mg/100 g FM (frisch/lyo) auf.

In der Probe K1 wurden die GSL Sinalbin (**I**) mit 2,5 und 3,4 mg/100 g FM (frisch/lyo), Glucotropaeolin (**K**) mit 231 und 386 mg/100 g FM (frisch/lyo) und Gluconasturtiin (**N**) mit 3,3 und 2,6 mg/100 g FM (frisch/lyo) identifiziert.

In Tabelle 6-11 sind die entsprechenden Ergebnisse der über Anionenaustauscher DEAE Sephadex A-25 aufgereinigten frischen und lyophilisierten Proben dargestellt. Die Auswertungen der Proben ergaben in den Extrakten der Sprossen SP5, SP6 und SP8 Gehalte an Glucoraphenin (**F**) von 3,7, 15,4 und 32,3 mg/100 g FM in frischen Proben, 958, 383 sowie 442 mg/100 g FM in lyophilisiertem Probenmaterial. Die Proben K6 und K9 enthielten Gehalte von 332 und 4,2 mg/100 g FM (frisch) bzw. 4289 und 1012 mg/100 g FM (lyo).

Tab. 6-11 Gehalte an intakten Glucosinolaten in mg/100 g FM in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) (frisch; lyophilisiert; über DEAE-Sephadex[®] Anionenaustauscher aufgereinigt) detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Proben aufgereinigt		Glucosinolatgehalte [mg/100 g FM]							
		M	G	F	I	K	N	D	A
SP5	frisch	-	-	3,7	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	958	-	-	-	-	-
SP6	frisch	-	-	15,4	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	383	-	-	-	-	-
SP8	frisch	-	-	32,3	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	442	-	-	-	-	-
K6	frisch	-	-	332	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	4289	-	-	-	-	-
K9	frisch	-	-	4,2	-	-	-	-	-
	lyo	-	-	1012	-	-	-	-	-
K7	frisch	-	-	-	-	-	-	2,1	-
	lyo	-	-	-	-	-	-	8,3	-
K5	frisch	n.d.	4,8	-	-	-	-	-	0,3
	lyo	n.d.	85,8	-	-	-	-	-	4,2
SP2	frisch	6,0	4,3	-	-	-	-	-	0,8
	lyo	n.d.	124	-	-	-	-	-	25,1
K1	frisch	-	-	-	69,0	2,9	n.d.	-	-
	lyo	-	-	-	20,4	16,9	n.d.	-	-

FM = Frischmasse; n.d. = nicht detektiert; lyo = lyophilisiert

Der Gehalt an Glucoerucin (**M**) im frischen Probenextrakt von SP2 lag bei 6,0 mg/100 g FM. Auch hier waren die Peaks, die dem Glucoerucin im lyophilisierten Material von SP2 bzw. in den Probenextrakten von K5 zugeordnet werden konnten, nicht auswertbar. Die Gehalte an Glucoraphanin (**G**) in K5 und SP2 betragen in frischen Proben 4,8 und 4,3 mg/100 g FM, bzw. in den lyophilisierten 85,8 und 124,1 mg/100 g FM. Die Gehalte an Glucoiberin (**A**) lagen bei 0,3 und 0,8 mg/100 g FM (frisch) bzw. 4,2 und 25,1 mg/100 g FM (lyophilisiert).

Probenextrakte von K7 wiesen Gehalte an Sinigrin (**D**) von 2,1 und 8,3 mg/100 g FM (frisch/lyo) auf.

In den Kresseproben K1 wurden die GSL Sinalbin (**I**) mit 69,0 und 20,4 mg/100 g FM (frisch/lyo) und Glucotropaeolin (**K**) mit 2,9 und 16,9 mg/100 g FM (frisch/lyo) identifiziert. Gluconasturtiin (**N**) konnte in diesen aufgereinigten Proben nicht detektiert werden.

6.2.3 Nahrungsergänzungsmittel

Die hier analysierten Nahrungsergänzungsmittel wurden zur Untersuchung mittels HPLC wie in Kapitel 4.1 beschrieben aufgearbeitet, wobei die Probenextrakte ohne Aufreinigung direkt zur Analyse eingesetzt wurden, da aufgrund ihrer homogenen Konsistenz keine Matrixeffekte zu erwarten waren, und anschließend in das chromatographische System injiziert. Die Analyse erfolgte über **Methode 2** (s. Kap. 4.3.2), wobei zur Identifizierung der z. T. nicht als Standards erhältlichen im Probenmaterial vermuteten GSL eine Charakterisierung mittels Massenspektrometrie angeschlossen wurde.

Zunächst wurden die Probenextrakte einer qualitativen Untersuchung auf intakte Glucosinolate unterzogen, deren Ergebnisse in Tabelle 6-12 im Überblick dargestellt sind. Hierbei wurden die Substanzpeaks aufgrund übereinstimmender Retentionszeiten mit den entsprechenden Peaks der Standards verglichen und über Aufstocken mit den entsprechenden Substanzen verifiziert.

Tab. 6-12 Nahrungsergänzungsmittel (NEM1-14) und darin detektierte intakte Glucosinolate

Probe	Detektierte Glucosinolate
NEM1	Glucoraphanin
NEM4	Glucotropaeolin, Methoxyglucotropaeolin, Sinalbin
NEM5	Glucotropaeolin, Methoxyglucotropaeolin, Sinalbin
NEM6	Glucotropaeolin, Methoxyglucotropaeolin, Sinalbin
NEM7	Glucotropaeolin, Methoxyglucotropaeolin, Sinalbin
NEM8	Glucotropaeolin, Methoxyglucotropaeolin, Sinalbin
NEM9	Glucotropaeolin, Methoxyglucotropaeolin, Sinalbin
NEM10	Glucotropaeolin, Methoxyglucotropaeolin, Sinalbin
NEM13	Glucotropaeolin, Methoxyglucotropaeolin, Sinalbin
NEM14	Sinigrin, Sinalbin

Die Proben NEM2 und NEM3 sowie NEM11 und NEM12 enthielten keine der in Rahmen dieser Arbeit detektierbaren intakten Glucosinolate.

Die Extrakte der macahaltigen Proben NEM4-NEM10 sowie NEM13 wiesen durchweg Glucotropaeolin, sein Methoxy-Derivat und das Glucosinolat Sinalbin auf. Abbildung 6-19 zeigt das Chromatogramm einer Probe NEM5 mit den drei identifizierten intakten Glucosinolaten analysiert nach **Methode 2**.

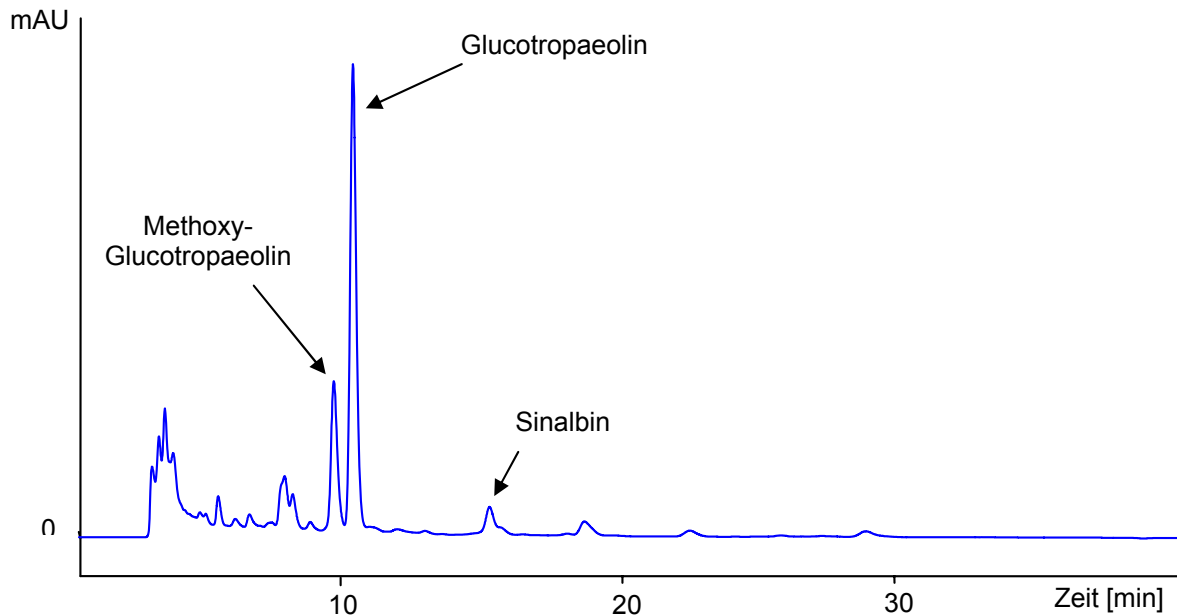


Abb. 6-19 Chromatogramm der Probe NEM5 detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Auch hier wurden die intakten Glucosinolate über einen Vergleich der Retentionszeiten von Substanzpeak und Standardpeak bestimmt. So wurde in allen macahaltigen Probenextrakten das Glucotropaeolin einem Signal nach 10 Minuten zugeordnet, was über Aufstocken mit dem entsprechenden Standard und mittels MS-Analyse bestätigt wurde. Ein deutliches Signal bei 9 min ließ auf Methoxy-Glucotropaeolin schließen, was – wie in Abbildung 6-20 dargestellt – anhand der charakteristischen Fragmente bei m/z 438 $[M-H]^-$ bzw. m/z 876 $[2M-2H]^-$ über MS auch bestätigt wurde. Desgleichen wurde in allen Proben ein Peak nach 14 min dem Sinalbin zugeordnet.

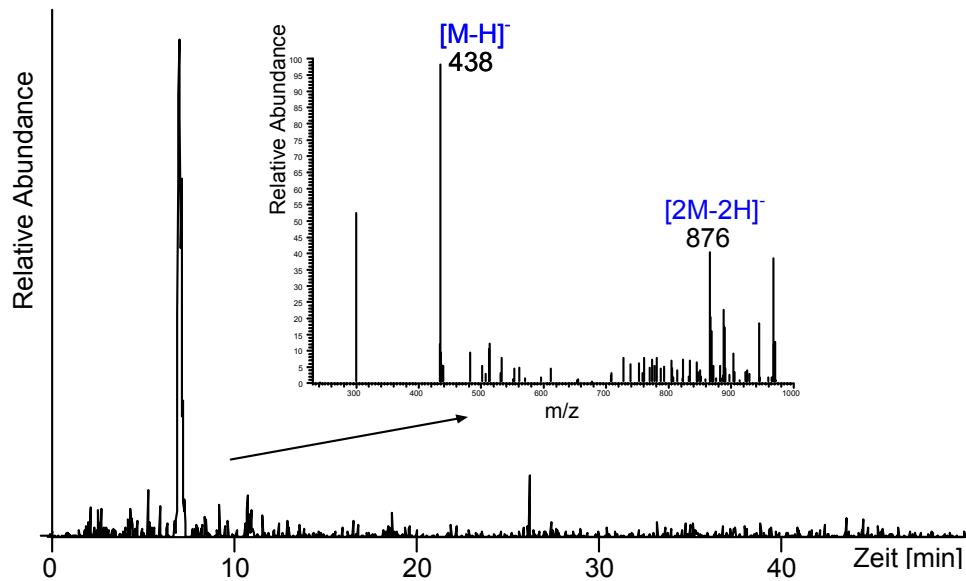


Abb. 6-20 Selected-Ion-Chromatogramm der Probe NEM5 mit dem Massenbereich $m/z = 437-439$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3)

Der Extrakt eines Obst und Gemüse-Präparates (NEM14) ergab bei der Auswertung des HPLC-Chromatogrammes, in Abbildung 6-21 dargestellt, einen dem Sinigrin zuzuordnenden Peak bei 12 Minuten, zudem ein Signal bei 14 min, welches anhand Retentionszeit und über MS erhaltene Fragmentensignale auf das intakte Glucosinolat Sinalbin hinwies.

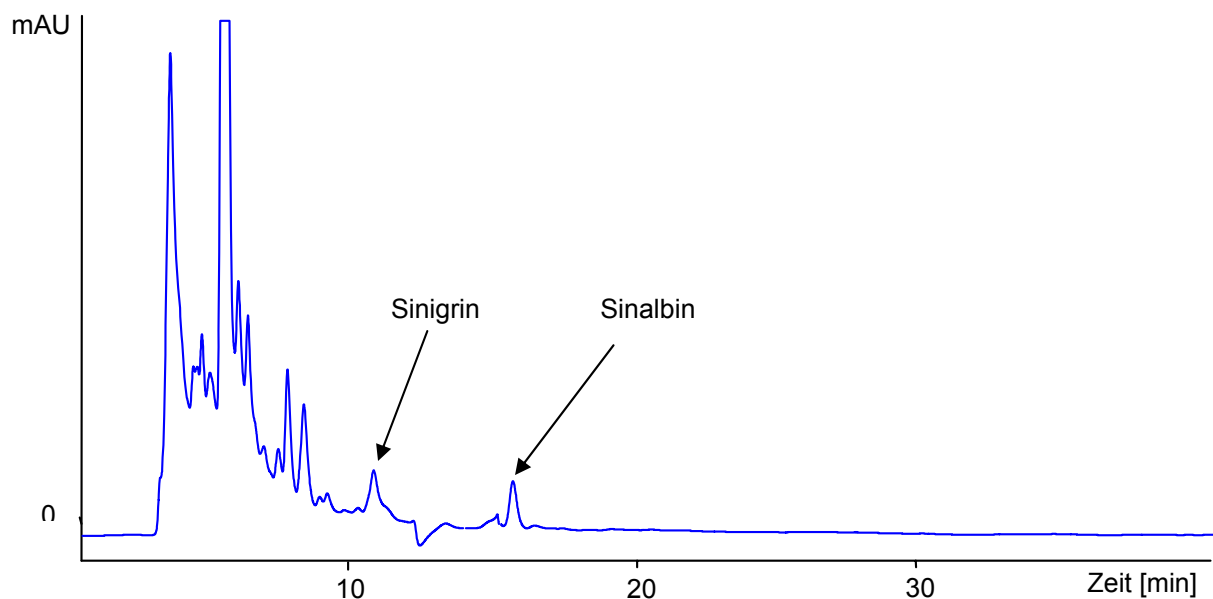


Abb. 6-21 Chromatogramm der Probe NEM14 detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Ein weiteres Nahrungsergänzungsmittel auf Brokkoli-Basis (NEM1, Abbildung 6-22) zeigte ein dem Glucoraphanin zuzuordnendes Signal bei 43 min, welches ebenfalls über den Vergleich der Retentionszeiten bzw. zusätzliches Aufstocken mit der entsprechenden Referenzsubstanz eindeutig diesem zugeordnet wurde. Zudem wurde ein Signal bei 10 min als Glucoerucin identifiziert.

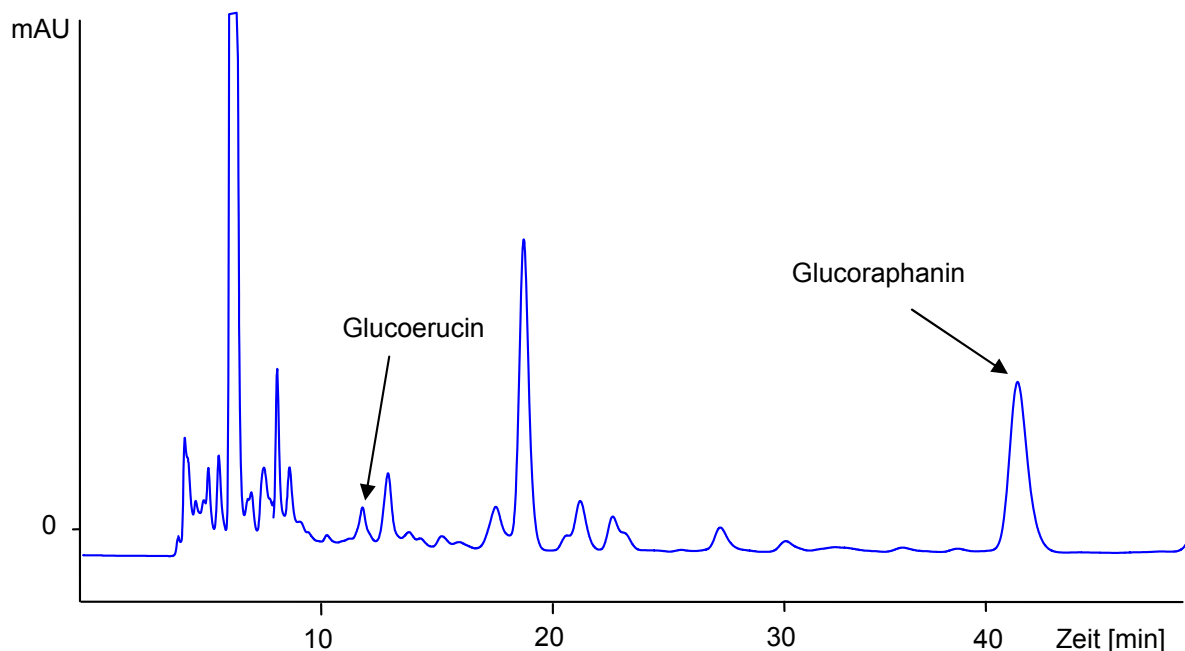


Abb. 6-22 Chromatogramm der Probe NEM1 detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Die Analyse mittels Massenspektrometer bestätigte diese Vermutung ebenfalls über charakteristische Massenfragmente für Glucoraphanin bei m/z 436 $[M-H]^-$ bzw. für Glucoerucin bei m/z 420 $[M-H]^-$.

Die anschließende Quantifizierung der im Probenmaterial identifizierten intakten Glucosinolate erfolgte auch hier über externe Kalibrierung mittels Referenzsubstanzen. Tabelle 6-13 zeigt zusammenfassend die so erhaltenen GSL-Gehalte in mg/100 g Produkt.

Tab. 6-13 Gehalte an intakten Glucosinolaten in verschiedenen Nahrungsergänzungsmitteln ohne Aufreinigung in mg/100 g Produkt detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 µ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Proben	Glucosinolatgehalte [mg/100 g Produkt]					
	G	M	D	I	K	ME-K*
NEM1	956	53,4	-	-	-	-
NEM4	-	-	-	21,4	150	52,0
NEM5	-	-	-	21,3	399	156
NEM6	-	-	-	22,5	251	75,3
NEM7	-	-	-	25,8	248	100
NEM8	-	-	-	38,2	462	116
NEM9	-	-	-	35,0	280	78,9
NEM10	-	-	-	46,6	202	58,1
NEM13	-	-	-	15,7	115	41,8
NEM14	-	-	45,0	19,7	-	-

* berechnet als Glucotropaeolin (K)

Die Probe NEM1 zeigte einen Gehalt an Glucoraphanin (**G**) von 956 mg/100 g Produkt. Weiterhin wurde das intakte Glucosinolat Glucoerucin (**M**) in einer Menge von 53,4 mg/100 g Produkt nachgewiesen.

Die macahaltigen Proben NEM4 – NEM10 sowie NEM13 zeigten Gehalte an Glucotropaeolin (**K**) zwischen 115 mg/100 g Produkt (NEM13) und 462 mg/100 g Produkt (NEM8). Die Gehalte des Methoxy-Derivates dieses Glucosinolates (**ME-K**) wurden aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu erwartenden ähnlichen Absorptionsvermögens als dieses berechnet dargestellt. Hier lagen die Gehalte zwischen 41,8 mg/100 g Produkte für NEM13 und 156 mg/100 g Produkt für Probe NEM5. Zusätzlich wurden in allen Probenextrakten geringe Gehalte an Sinalbin (**I**) zwischen 15,8 mg/100 g Produkt (NEM13) und 46,6 mg/100 g Produkt (NEM10) detektiert.

Das Nahrungsergänzungsmittel NEM14 enthielt 45,0 mg Sinigrin (**D**)/100 g Produkt sowie das Glucosinolat Sinalbin (**I**) in einer Menge von 19,7 mg/100 g Produkt.

6.2.4 *Moringa*-Proben

Die vier im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *Moringa*-Proben wurden zur HPLC-Analyse wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben aufgearbeitet, in das HPLC-System injiziert und bei einer Wellenlänge von 229 mittels UV-Detektor chromatographisch getrennt. Aufgrund der Möglichkeit, massenspektrometrische Analysen anzuschließen, wurden die Proben lediglich über **Methode 2** (HILIC) analysiert, da für die nach Literaturrecherche erwarteten GSL keine Standards vorlagen. Folglich wurden die intakten GSL anhand ihrer charakteristischen Massenfragmente lediglich qualitativ bestimmt.

In Abbildung 6-23 ist ein Chromatogramm der bekanntesten Gattung *Moringa oleifera* dargestellt.

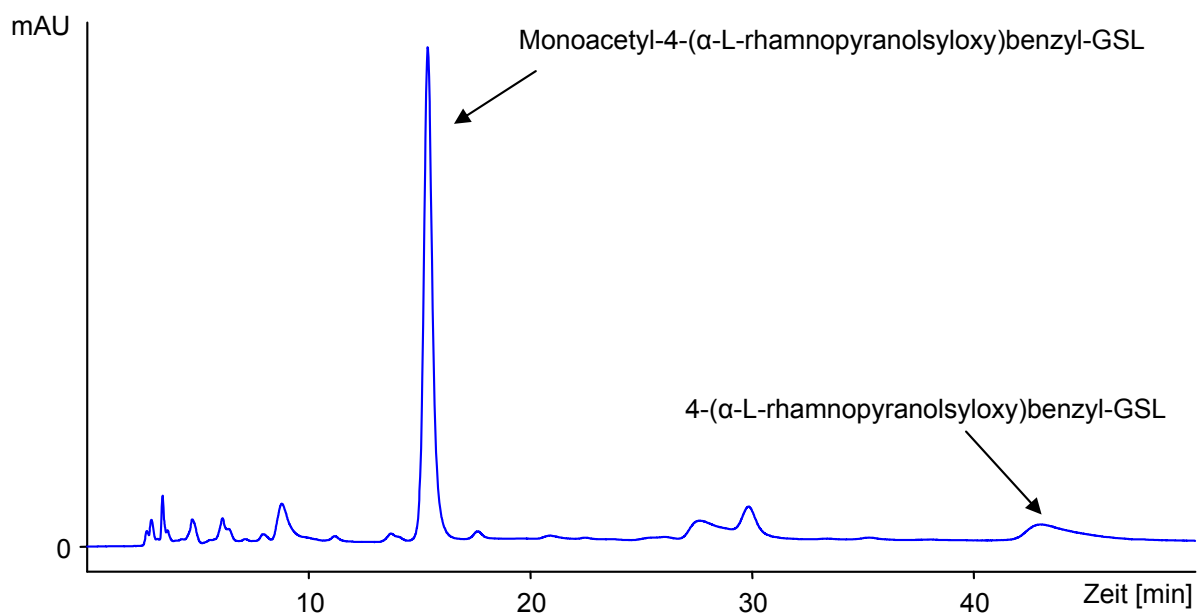


Abb. 6-23 Chromatogramm einer *Moringa oleifera*-Probe detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Peak 1 wurde hierbei anhand eines deutlichen Signals bei m/z 612 $[M-H]^-$ dem Monoacetyl-4-(α-L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat zugeordnet, Peak 2 deutet mit m/z 570 $[M-H]^-$ auf das Glucosinolat 4-(α-L-rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinolat hin.

Abbildung 6-24 zeigt exemplarisch das Selected-Ion-Chromatogramm eines Extraktes von *Moringa oleifera* im Massenbereich m/z 611-613 sowie das zugehörige

Massenspektrum, welches mit m/z 612 $[M-H]^-$ ein für das Glucosinolat Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat charakteristisches Signal aufwies.

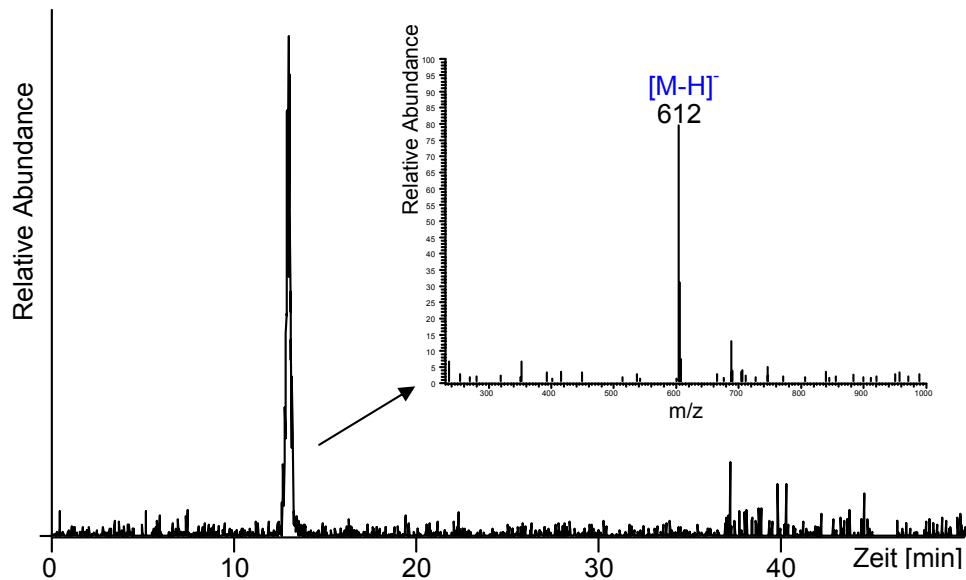


Abb. 6-24 Selected-Ion-Chromatogramm einer *Moringa oleifera*-Probe mit dem Massenbereich $m/z = 611-613$ sowie dazugehörigem Massenspektrum detektiert mittels HPLC/ESI-MS (s. Kap. 4.3.3)

Abbildung 6-25 zeigt das Chromatogramm einer Probe von *Moringa stenopetala*.

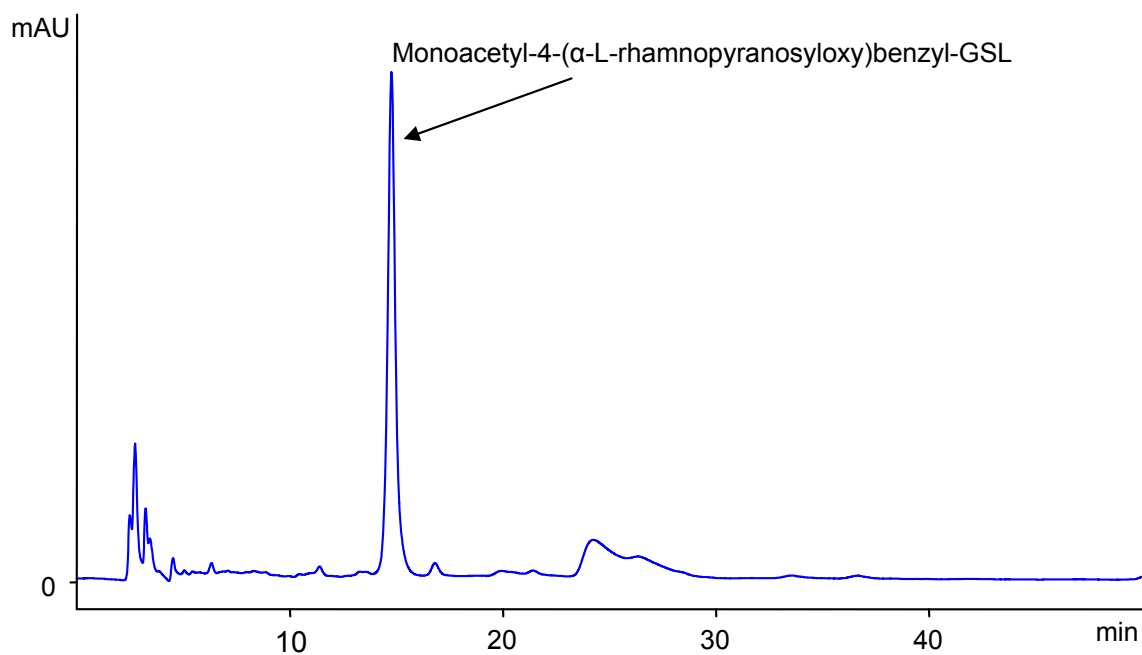


Abb. 6-25 Chromatogramm einer *Moringa stenopetala*-Probe Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Dieses wies lediglich ein deutliches Signal bei einer Retentionszeit von 16 min auf, was nach Überprüfung mittels Massenspektrometer anhand eines typischen Fragmentes bei m/z 612 $[M-H]^-$ ebenfalls dem Glucosinolat Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat zuzuordnen war.

Das Chromatogramm eines Extraktes von *Moringa peregrina* (Abbildung 6-26) zeigt Peaks, die den Glucosinolaten Glucoputranjivin (Peak 1) und Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat (Peak 2) zugehörig schienen, was über die charakteristischen Fragmente m/z 359 $[M-H]^-$ bzw. m/z 612 $[M-H]^-$ bestätigt wurde.

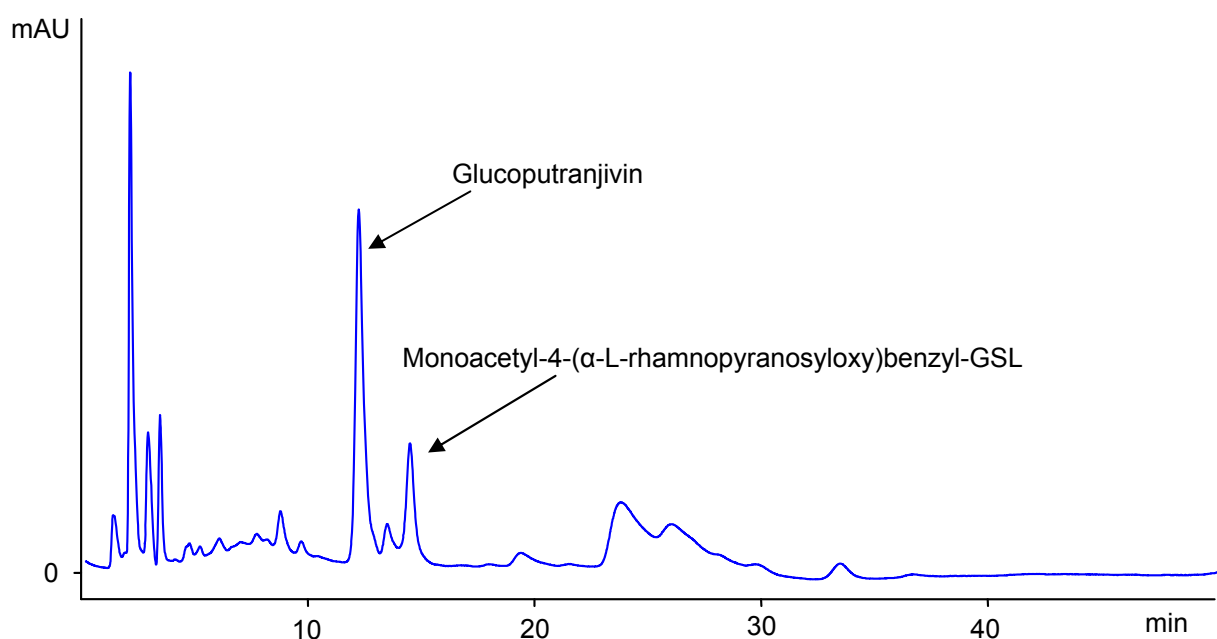


Abb. 6-26 Chromatogramm einer *Moringa peregrina*-Probe detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

In Abbildung 6-27 ist ein Probenextrakt der Art *Moringa drouhardii* dargestellt.

Auch hier zeigte die massenspektrometrische Analyse ein deutliches Signal bei m/z 612, das dem Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat zuzuordnen ist. Daneben wurde ein Signal bei m/z 623 $[M-H]^-$ detektiert, im HPLC-Chromatogramm einem Signal nach 12 min zuzuordnen, welches vermutlich ein nicht weiter identifiziertes Acetyl-GSL-Isomer darstellt.

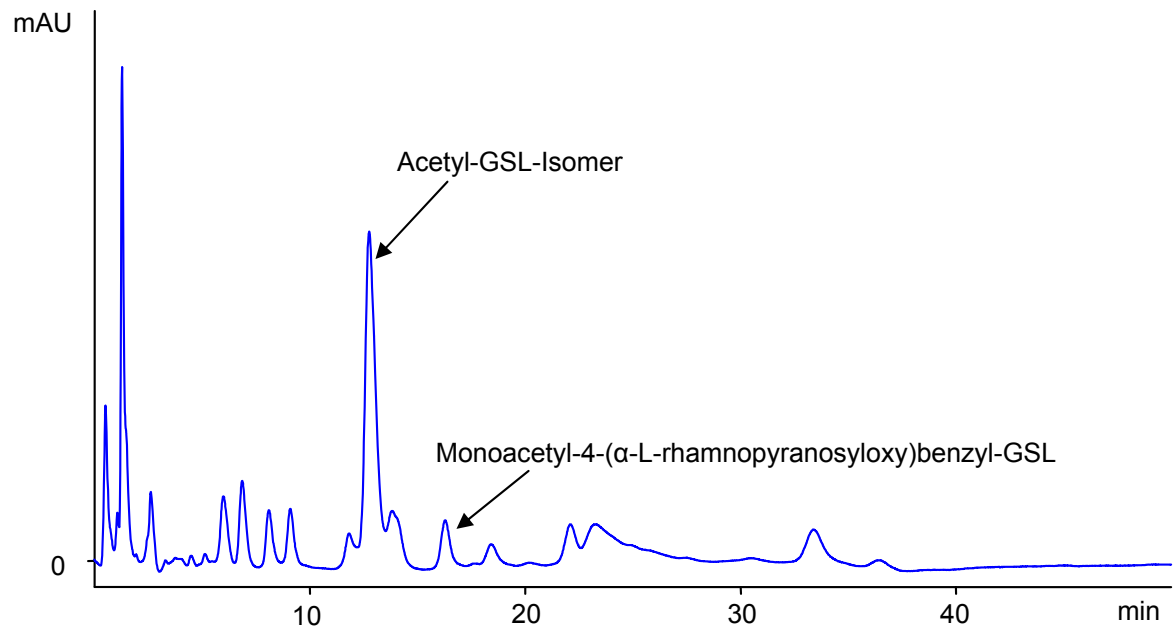


Abb. 6-27 Chromatogramm einer *Moringa drouhardii*-Probe detektiert mittels HPLC, Säule: Luna[®] 5 μ HILIC, chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

7 Ergebnisse GC

7.1 Methodenvalidierung

Zur Detektion der in den Proben enthaltenen Isothiocyanate wurde eine Factor Four™-Kapillarsäule mit dem in Kapitel 5.2 dargestellten Temperatur- und Druckprogramm verwendet. Die Validierung der Methode erfolgte anhand elf kommerziell erhältlicher Referenzsubstanzen. Eine Quantifizierung der detektierten ITCs erfolgte mittels internen Standards (IS) in Doppelbestimmung. Hier wurde das im Probenmaterial nicht enthaltene Methylisothiocyanat gewählt, da es in seinen chemisch-physikalischen Eigenschaften den zu erwartenden ITCs ähnlich war.

Zunächst wurde das Vermögen der hier verwendeten Methode geprüft, alle elf Referenzsubstanzen in einem Lauf chromatographisch zu trennen. Abbildung 7-1 zeigt das so ermittelte Chromatogramm eines Gesamtstandards (Kap. 5.1.4) der im Rahmen dieser Arbeit analysierten ITC-Standardsubstanzen nach der in Kapitel 5.2 dargestellten GC-MS Methode.

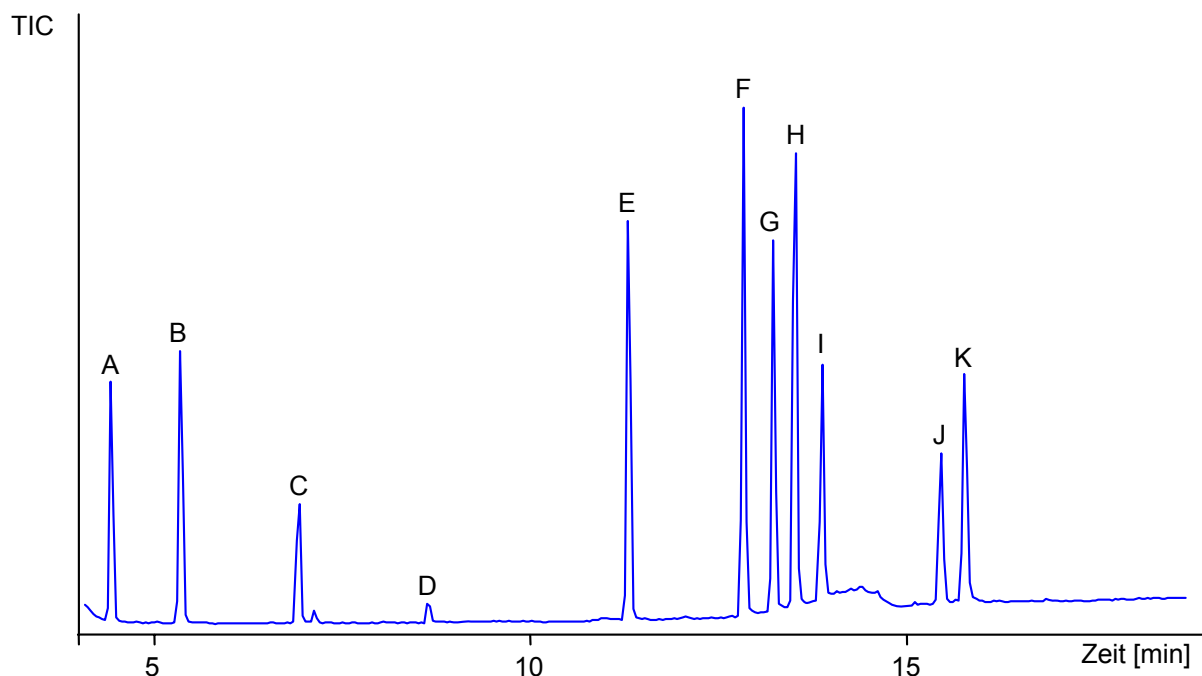


Abb. 7-1 Chromatogramm eines ITC-Gesamtstandards aus A (Methyl-ITC), B (Ethyl-ITC), C (Allyl-ITC), D (Sulforaphan), E (Phenyl-ITC), F (Benzyl-ITC), G (Methylthiobutyl-ITC), H (Phenylethyl-ITC), I (Methylthiopenteny-ITC), J (Methylsulfonylpropyl-ITC) und K (Sulforaphen) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Es zeigte sich, dass über diese Methode alle 11 Substanzen innerhalb 18 Minuten (Retentionszeiten Tabelle 7-1) basisliniengetrennt vorlagen. Wegen der in Relation geringen Peakfläche des Sulforaphans wurde hiervon für den Gesamtstandard das zweifache Volumen gegenüber den anderen Isothiocyanaten eingesetzt, um auf diese Weise Ungenauigkeiten bei der Auswertung zu vermeiden.

Zusätzlich hierzu wurden zur geräteunabhängigen Vergleichbarkeit der Retentionsdaten mit Literaturangaben die Retentionindizes nach Kováts (KI) bestimmt (s. Anhang) (KOVÁTS 1958) und abgeglichen (Tabelle 7-1).

Tab. 7-1 Retentionszeiten (RT) und -indizes ($KI_{\text{ermittelt}}$) sowie Vergleich mit Literaturangaben ($KI_{\text{vergleich}}$) der analysierten Isothiocyanatstandards detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Isothiocyanat		RT	$KI_{\text{ermittelt}}$	$KI_{\text{vergleich}}$	Literatur
A	Methyl-ITC	4,4	860	---	---
B	Ethyl-ITC	5,4	991	---	---
C	Allyl-ITC	6,9	1055	887 1372	ENGEL et al. 2002 BIANCHI et al. 2007
D	Sulforaphan	8,6	1133	---	---
E	Phenyl-ITC	11,3	1306	---	---
F	Benzyl-ITC	12,8	1400	1317 1361	FLATH et al. 1990 TELLEZ et al. 2002
G	Methylthiobutyl-ITC	13,2	1426	---	---
H	Phenylethyl-ITC	13,5	1497	1456	AFSHARYPUOR et al. 1998
I	Methylthiopentenyl-ITC	13,8	1531	---	---
J	Methylsulfonylpropyl-ITC	15,4	1789	---	---
K	Sulforaphen	15,7	1972	---	---

7.1.1 Ermittlung der Korrekturfaktoren (Responsefaktoren)

Zur Quantifizierung der im Probenmaterial enthaltenen ITCs wurde mit einem internen Standard (IS) gearbeitet, indem man die Peakfläche (Response) der identifizierten Substanz in Relation zu der des internen Standards setzte und über diese Verhältnisse die ITC-Gehalte in den Proben berechnet.

Anhand eines Gesamtstandards der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Referenzsubstanzen wurden die Flächenverhältnisse der Substanzpeaks zum internen Standard Methyl-ITC ermittelt und über die so gewonnen Korrekturfaktoren die ITC-Gehalte im Probenmaterial bestimmt. Die verwendeten Responsefaktoren (RF) sowie die relative Standardabweichung (RSD) der acht Einzelmessungen sind im Anhang dargestellt.

7.1.2 Massenspektrometrische Bestimmung der Standards

Da die Retentionszeit zwar einen guten Parameter zur Identifizierung der Isothiocyanate im Probenmaterial darstellt, jedoch zur eindeutigen Zuordnung der Peaks nicht immer ausreichend ist, erfolgte die Identifizierung der Substanzen zusätzlich über ein Massenspektrometer (GC-MS). Die hier aufgezeichneten für jede Substanz individuellen Signale entsprechen dem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) der ionisierten Teilchen der Moleküle und sind in Kombination mit den Retentionszeiten ein eindeutiges Kriterium zur Analyse der in den Proben enthaltenen ITCs. Aus diesem Grund wurde jede Referenzsubstanz massenspektrometrisch analysiert und die erhaltenen charakteristischen Massenfragmente (Tabelle 7-2) zur weiteren Identifizierung der ITCs im Probenmaterial herangezogen.

Tab. 7-2 Massen und zugehörige Fragmente [m/z] der analysierten ITCs detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Isothiocyanat	Masse [M]	Massenfragmente [m/z]
Methyl-ITC	73	73 [M], 72 [M-H] ⁻
Ethyl-ITC	87	87 [M], 59 [NCS+H], 72 [CH ₂ -NCS]
Allyl-ITC	99	99 [M], 72 [CH ₂ -NCS], 58 [NCS]
Sulforaphan	177	72 [CH ₂ -NCS], 113 [M-CH ₃ SO-H]
Phenyl-ITC	135	77 [M-NCS], 51 □, 135 [M]
Benzyl-ITC	149	91 [C ₇ H ₇] ⁺ , 65 □
Methylthiobutyl-ITC	161	115 □, 61 □, 72 [CH ₂ -NCS], 85 □, 161 [M]
Phenylethyl-ITC	163	91 [C ₇ H ₇] ⁺ , 163 [M]
Methylthiopentyl-ITC	175	61 □, 72 [CH ₂ -NCS], 175 [M]
Methylsulfonylpropyl-ITC	179	72 [CH ₂ -NCS], 99 □, 179 [M]
Sulforaphen	175	87 □, 72 [CH ₂ -NCS]

Die über das Verhältnis Masse zu Ladung (m/z) erhaltenen Massenfragmente wurden über Vergleiche mit der Literatur (KJÆR et al. 1963, AL-GENDY und LOCKWOOD 2003, VAUGHN und BERHOW 2005) den für diese ITCs entsprechenden Massenfragmenten zugeordnet, wobei in allen Standards mit Ausnahme des Sulforaphan bzw. Sulforaphen die Molekülmasse [M] direkt detektiert wurde. Des Weiteren wurden die Fragmente [NCS] und [CH₂-NCS] bzw. die jeweiligen Molekülmassen abzüglich dieser Fragmente nachgewiesen. Zusätzlich wurde bei den aromatischen ITCs ein Fragment mit m/z 91 dem Tropyliumion zugeordnet. Die in Rot dargestellten Fragmente sind unklar.

Aus den detektierten Massenfragmenten wurde eine SIM-Methode (Selected Ion Monitoring) erstellt, die alle für die ITC-Standards relevanten Massen enthielt. So stellte man sicher, dass Matrixeffekte sowie die relevanten Substanzen evtl. überlagernde Stoffe ausgeschlossen werden konnten.

7.2 Ergebnisse der GC-Analyse der Proben

Nach Abschluss der Methodvalidierung wurde die hier entwickelte gaschromatographische Methode an Extrakten unterschiedlicher Probenmatrizes getestet, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

7.2.1 Rucola

Vier frische Rucolaproben (RU6-RU9) wurden anhand der in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet und die so erhaltenen Probenextrakte in das gaschromatographische System injiziert. Das nachfolgende Chromatogramm (Abbildung 7-2) zeigt repräsentativ für die untersuchten Rucolaproben die zugeordneten Isothiocyanate.

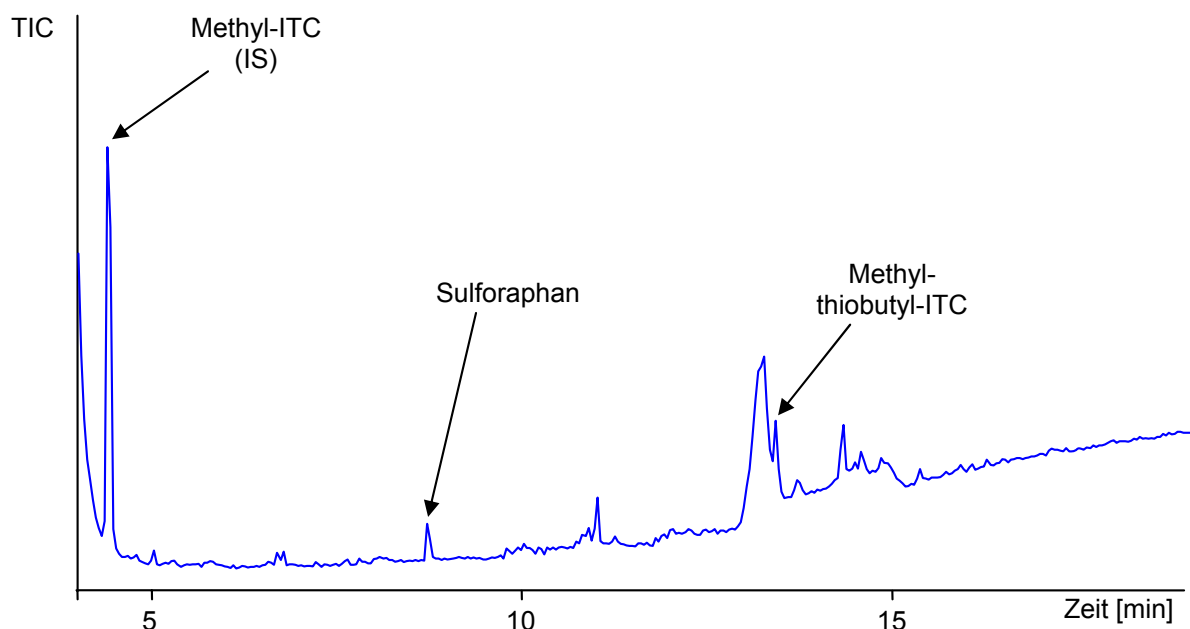


Abb. 7-2 Chromatogramm eines Probenextraktes von RU6 (Rucola) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

In allen Rucolaproben RU6-RU9 wurden mittels gaschromatographischer Trennung die Isothiocyanate Sulforaphan und Methylthiobutyl-ITC mit den Retentionszeiten 8,6 min und 13,2 min detektiert. Anhand eines Vergleiches der über Massenspektrometer erhaltenen Fragmente (m/z) mit den charakteristischen Massenfragmenten der Referenzsubstanzen konnten die Peaks eindeutig identifiziert werden.

Über anschließende Quantifizierung mittels internen Standards (Methyl-ITC) wurden die Gehalte der identifizierten Isothiocyanate im Probenmaterial bestimmt. Tabelle 7-3 zeigt im Überblick die im Rahmen dieser Arbeit mittels GC-MS untersuchten Rucolaproben mit ihren entsprechenden Gehalten an Sulforaphan und Methylthiobutyl-ITC in mg/100 g FM.

Tab. 7-3 ITC-Gehalte verschiedener Rucolaproben (RU) in mg/100 g FM detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Probe	Isothiocyanatgehalte [mg/100 g FM]	
	D	G
RU6	6,20	0,27
RU7	0,80	0,16
RU8	1,58	0,07
RU9	1,43	0,18

FM = Frischmasse

Die Gehalte an Sulforaphan (**D**) lagen hierbei zwischen 0,8 mg/100 g FM bei der Probe RU7 und 6,20 mg/100 g FM für Probe RU6.

Zudem wurde das Isothiocyanat Methylthiobutyl-ITC (**G**) in Mengen von 0,07 mg/100 g (Probe RU8) bis 0,27 mg/100 g FM (Rucola RU6) nachgewiesen.

7.2.2 Kressen und Sprossen

Die Kressen (K) und Sprossen (SP) wurden wie in Kapitel 5.1.1 dargestellt aufgearbeitet und ein Aliquot von 1 μ l in das chromatographische System injiziert. Im Gegensatz zur Detektion der intakten Glucosinolate wurde hier nur frisches Probenmaterial zur Untersuchung eingesetzt.

Es konnten in insgesamt fünf Kresse (K)- und vier Sprossenproben (SP) fünf unterschiedliche ITCs identifiziert werden (Tabelle 7-4).

Tab. 7-4 Isothiocyanate in verschiedenen Kressen (K) und Sprossen (SP) detektiert mittel GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Probe	Detektierte Glucosinolate
SP5	Sulforaphen
SP6	Sulforaphen
SP8	Sulforaphen
K6	Sulforaphen
K9	Sulforaphen
K7	Allyl-ITC
K5	Methylthiobutyl-ITC
SP2	Methylthiobutyl-ITC, Sulforaphan
K1	Benzyl-ITC

In den außerdem untersuchten Kresseproben K2, K3, K4, K8, K10, K11 und K12 bzw. in Sprossen der Sorten SP1, SP3, SP4 und SP7 konnten keine der elf im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ITCs identifiziert werden.

Die folgende Abbildung 7-3 zeigt beispielhaft für die Gruppe der im Rahmen dieser Arbeit analysierten rettichartigen Proben das Chromatogramm eines Extraktes der Probe SP6 (Rettichsprossen) analysiert über das in Kap. 5.2 dargestellte Temperatur- und Druckprogramm.

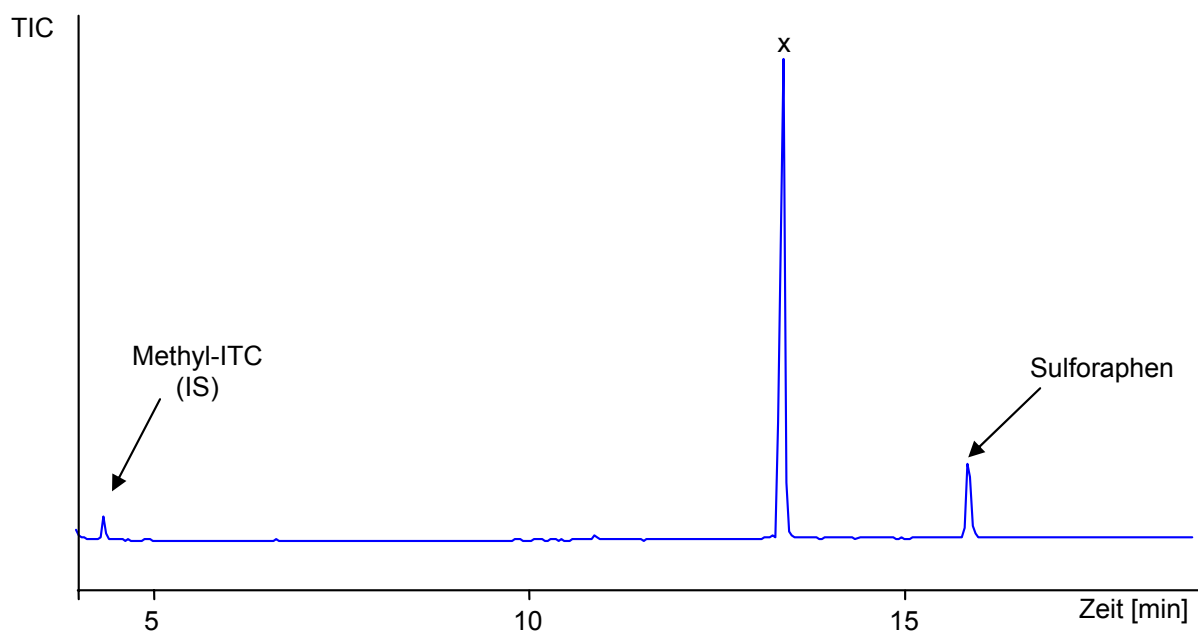


Abb. 7-3 Chromatogramm eines Probenextraktes von SP6 (Rettichsprossen) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Aus dem Vergleich der Retentionszeiten zu einem Standard aus elf Isothiocyanaten ergab sich für alle Extrakte der Proben SP5 (Radieschensprossen), SP6, SP8 (Sango Sprossen) sowie K6 (Daikon Cress[®]) und K9 (Sakura Cress[®]) ein übereinstimmender Peak mit der Referenzsubstanz Sulforaphen. Anhand charakteristischer Fragmentationen wurden diese Ergebnisse mittels MS verifiziert.

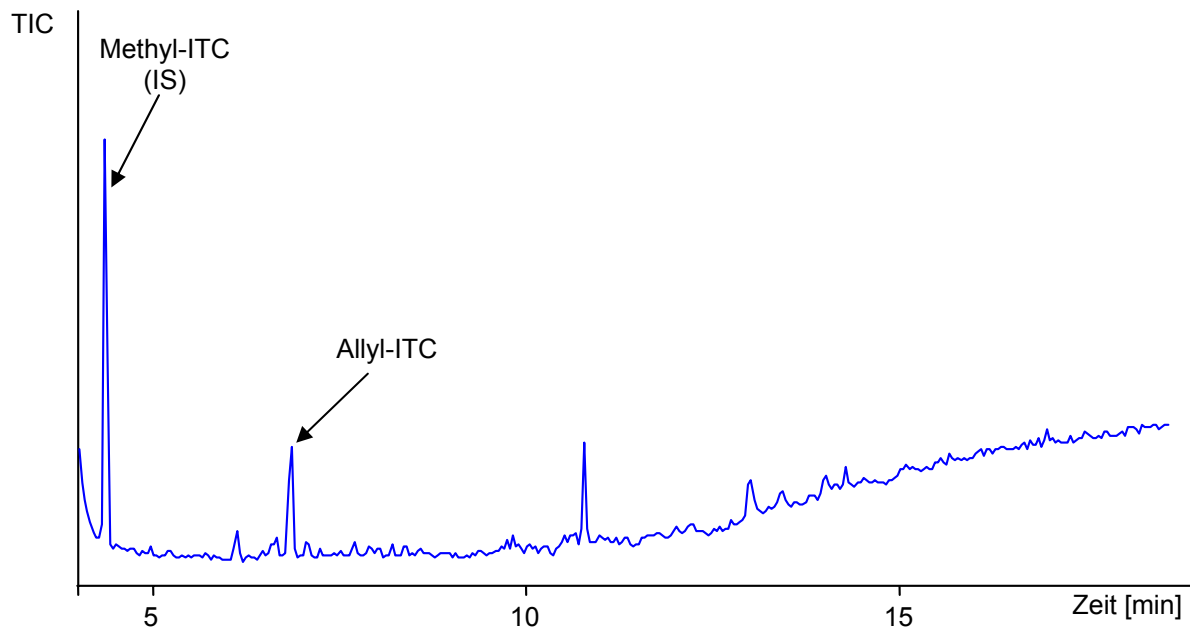


Abb. 7-4 Chromatogramm eines Probenextraktes von K7 (Mustard Cress) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Die Analyse der Probenextrakte von K7 (Mustard Cress) ergab – wie in Abbildung 7-4 dargestellt – ein dem Allyl-ITC zuzuordnendes Signal nach 7 min, welches ebenfalls im Vergleich mit dem für diese Substanz charakteristischen MS-Zerfallsmuster bestätigt wurde.

Abbildung 7-5 zeigt das Chromatogramm eines Probenextraktes von SP2 (Broccosprouts[®]). Über den Vergleich der Retentionszeiten mit denen der Referenzsubstanzen wurden Signale nach 8 bzw. 13 Minuten detektiert, die auf die ITCs Sulforaphan und Methylthiobutyl-ITC hindeuteten. Über die entsprechenden charakteristischen Fragmentationen wurden diese Ergebnisse bestätigt. Die Probenextrakte von K5 (BroccoCress[®]) enthielt lediglich Methylthiobutyl-ITC.

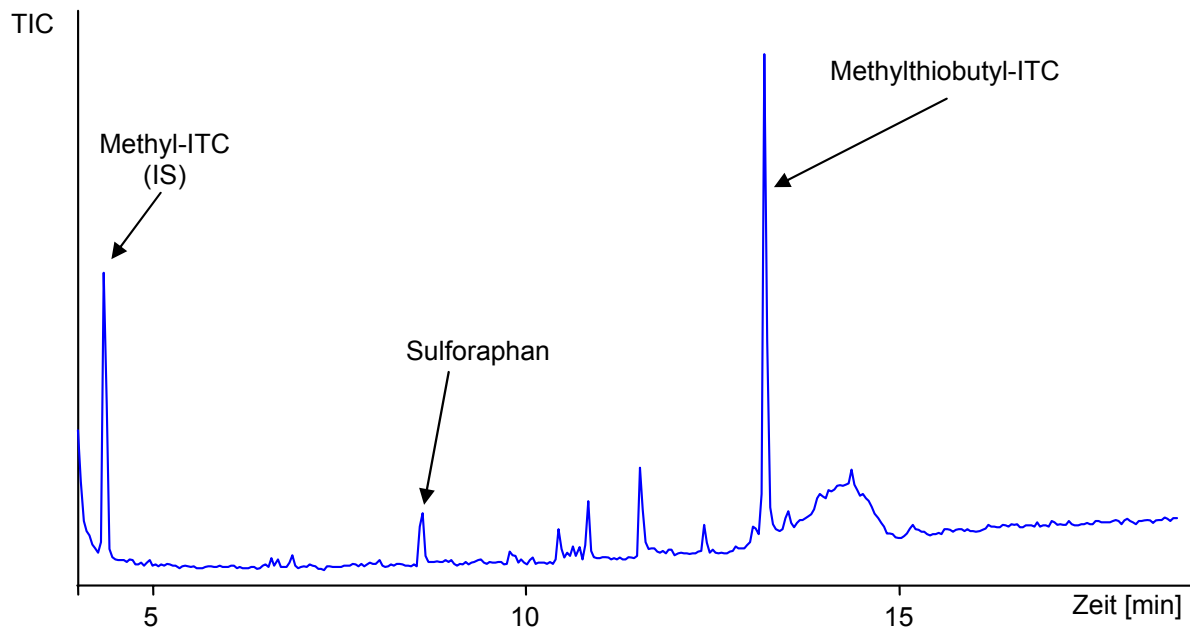


Abb. 7-5 Chromatogramm eines Probenextraktes von SP2 (Broccosprouts®) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Abbildung 7-6 zeigt das Chromatogramm eines Extraktes von K1 (Gartenkresse). Über den Vergleich von Retentionszeit und massenspektrometrisches Zerfallsmuster wurde der Peak nach 12,8 Minuten eindeutig dem Benzylisothiocyanat zugeordnet; weitere ITCs wurden nicht detektiert.

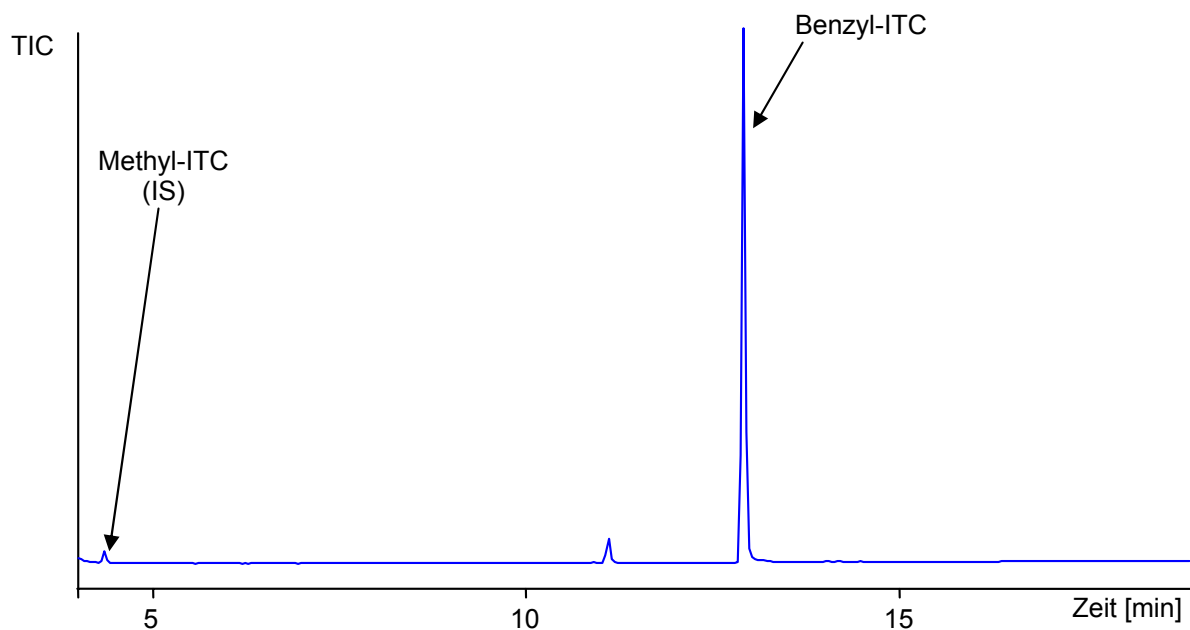


Abb. 7-6 Chromatogramm eines Probenextraktes von K1 (Gartenkresse) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Im Anschluss an die qualitative Auswertung des hier untersuchten Probenmaterials zeigt Tabelle 7-5 die quantitativen Ergebnisse der Analyse von Kresse- und Sprossenproben in mg/100 g Frischmasse über die Peakflächenverhältnisse zum internen Standard Methyl-ITC.

Tab. 7-5 ITC-Gehalte verschiedener Kresse (K)- und Sprossensorten (SP) in mg/100 g FM detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Probe	Isothiocyanatgehalte [mg/100 g FM]				
	C	F	K	G	D
SP 5	-	-	72,8	-	-
SP 6	-	-	28,9	-	-
SP 8	-	-	53,3	-	-
K 6	-	-	27,3	-	-
K 9	-	-	43,1	-	-
K 7	4,37	-	-	-	-
K 5	-	-	-	3,02	-
SP 2	-	-	-	7,64	36,9
K 1	-	158	-	-	-

FM = Frischmasse

Die Auswertung der Kresse- und Sprossenproben ergab sehr heterogene Ergebnisse. Das Isothiocyanat Sulforaphen (**K**) wurde in SP5, SP6 und SP9 mit Gehalten von 72,8, 28,9 und 53,3 mg/100 g FM nachgewiesen, K6 enthielt 27,3 mg/100 g FM, im Probenextrakt von K9 wurde ein Sulforaphengehalt von 43,1 mg/100 g FM detektiert.

Die Kresseprobe K7 enthielt das Isothiocyanat Allyl-ITC (**C**) in einer Menge von 4,37 mg/100 g FM.

Methylthiobutyl-ITC (**G**) wurde mit einem Gehalt von 3,02 mg/100 g FM in der Probe K5 nachgewiesen, SP2 enthielt 7,64 mg/100 g FM dieses ITCs. In dieser Probe wurden zusätzlich 36,9 mg/100 g FM an Sulforaphan (**D**) ermittelt.

Probe K1 enthielt Benzylisothiocyanat (**F**) in einer Menge von 158 mg/100 g FM.

7.2.3 Rettich und Radieschen

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten 3 Rettich- und 3 Radieschenproben wurden als frisches Probenmaterial wie in Kapitel 5.1.1 geschildert aufgearbeitet und ein Aliquot von 1 µl in das chromatographische System injiziert.

Abbildung 7-7 zeigt beispielhaft für die Rettich- und Radieschenproben das Chromatogramm einer Rettichprobe RE2, wobei die dargestellten Peaks anhand Retentionszeitenvergleich mit Referenzsubstanzen bzw. über charakteristische Massenfragmente eindeutig den Isothiocyanaten Methylthiobutenyl-ITC und Methylthiobutyl-ITC zugeordnet werden konnten.

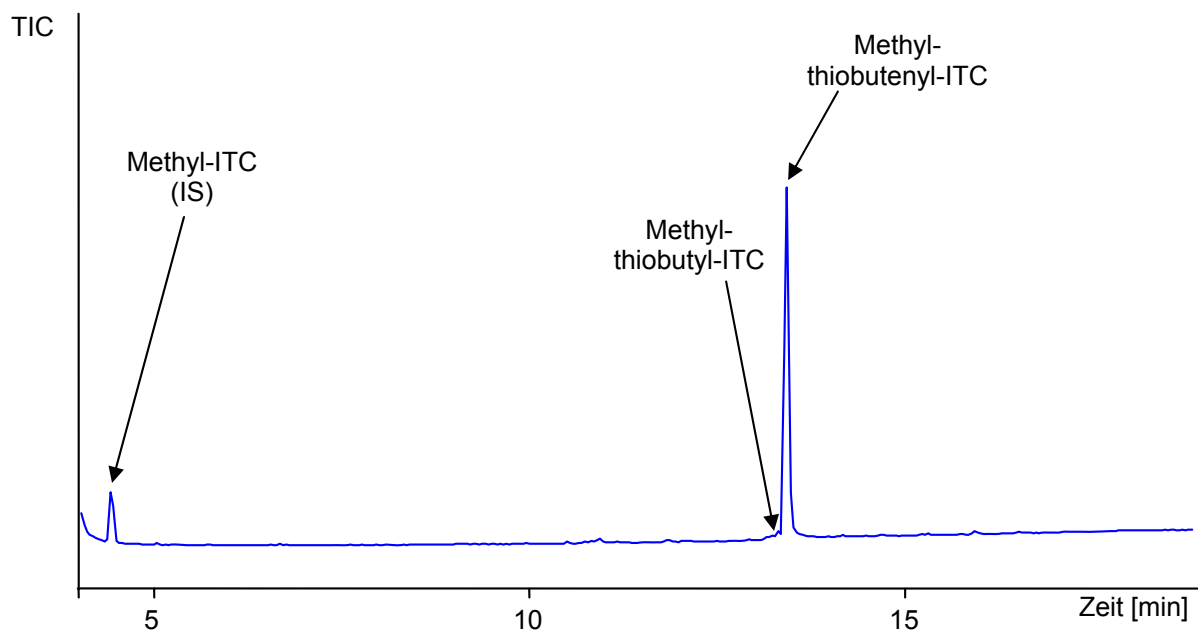


Abb. 7-7 Chromatogramm eines Probenextraktes von RE2 (Rettich) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Für die quantitative ITC-Bestimmung der Rettich- und Radieschenproben lag für die Major Komponente Methylthiobutenyl-ITC kein adäquater ITC-Standard als Referenzsubstanz vor. Zur Berechnung der Gehalte wurde daher auf Methylthiobutyl-ITC zurückgegriffen, welches strukturelle Ähnlichkeiten aufweist und folglich ein vergleichbares Absorptionsverhalten aufweisen sollte. Tabelle 7-6 zeigt zusammenfassend die Isothiocyanatgehalte aller hier analysierten Radieschen und Rettichproben in mg/100 g FM.

Tab. 7-6 ITC-Gehalte verschiedener Rettich (RE)- und Radieschenproben (RA) in mg/100 g Frischmasse detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Probe	Isothiocyanatgehalte [mg/100 g FM]	
	G	GE
RE1	0,11	5,46
RE2	0,12	30,3
RE3	0,22	33,8
RA1	-	1,44
RA2	-	4,22
RA3	0,31	16,9

FM = Frischmasse

Über diese Berechnung wurde für die Major Komponente Methylthiobutenyl-ITC (**GE**) in Probe RE1 ein Gehalt von 5,46 mg/100 g FM detektiert, die Proben RE2 und RE3 wiesen Gehalte von 30,3 mg/100 g FM und 33,8 mg/100 g FM auf.

Das Isothiocyanat Methylthiobutyl-ITC (**G**) wurde in den Proben RE1-RE3 in Mengen von 0,11 mg/100 g FM, 0,12 mg/100 g FM und 0,22 mg/100 g FM nachgewiesen.

Die Radieschenproben wurden analog der Rettichproben analysiert. Auch hier wurde das Isothiocyanat Methylthiobutenyl-ITC über die Referenzsubstanz Methylthiobutyl-ITC quantifiziert. Die Auswertung ergab für die Proben RA1 und RA2 1,44 und 4,22 mg Methylthiobutenyl-ITC/100 g FM. Für Probe RA3 konnte neben 16,9 mg Methylthiobutenyl-ITC/100 g FM ein Methylthiobutyl-ITC-Gehalt von 0,31 mg/100 g FM bestimmt werden.

7.2.4 Senf, Meerrettich und Wasabi

Es wurden insgesamt 7 Speisesenfproben, 5 Meerrettichproben und 6 Wasabiproben mittels GC-MS untersucht. Zu Beginn sollte ebenfalls ein qualitativer Nachweis der als Referenzsubstanzen vorliegenden ITCs in der Probenmatrix erfolgen. Hierzu wurden die Proben gemäß der Darstellung in Kapitel 5.1 aufgearbeitet und ein Aliquot in den Gaschromatographen gekoppelt an ein Massenspektrometer injiziert. Die so erstellten Chromatogramme wurden über einen Vergleich der Retentionszeiten wie auch der Massenfragmente des Probenmaterials mit denen der Standardsubstanzen ausgewertet.

Tab. 7-7 Isothiocyanate in verschiedenen Senf (S)-, Meerrettich (M)- und Wasabiproben (W) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Probe	Detektierte Isothiocyanate
S1	Allyl-ITC, Sulforaphan, Phenylethyl-ITC
S2	Allyl-ITC, Sulforaphan, Phenylethyl-ITC
S3	Allyl-ITC, Sulforaphan, Phenylethyl-ITC
S4	Allyl-ITC
S5	Allyl-ITC, Sulforaphan, Phenylethyl-ITC
S6	Allyl-ITC, Sulforaphan, Phenylethyl-ITC
S7	Allyl-ITC, Sulforaphan, Phenylethyl-ITC
M1	Allyl-ITC, Phenylethyl-ITC
M2	Allyl-ITC, Phenylethyl-ITC
M3	Allyl-ITC, Phenylethyl-ITC
M4	Allyl-ITC, Phenylethyl-ITC
M5	Allyl-ITC, Phenylethyl-ITC
W1	Allyl-ITC, Phenylethyl-ITC
W2	Allyl-ITC, Phenylethyl-ITC
W3	Allyl-ITC, Sulforaphan, Phenylethyl-ITC
W4	Allyl-ITC, Sulforaphan, Phenylethyl-ITC
W5	Allyl-ITC
W6	Allyl-ITC

Wie in Tabelle 7-7 dargestellt zeigte sich, dass in allen Senfproben sowohl Allyl-ITC als auch Phenylethyl-ITC detektiert werden konnte. Mit Ausnahme des süßen Senfs (S4) wiesen alle Senfproben zusätzlich das ITC Sulforaphan auf.

Die Meerrettichproben enthielten ebenfalls Allyl-ITC sowie Phenylethyl-ITC. Auch die Wasabiproben enthielten Allyl-ITC und Phenylethyl-ITC, wobei in Wasabipulver (W3 und W4) zusätzlich Sulforaphan gefunden wurde. Die Proben W5 (Erdnüsse mit Wasabi in der Teigummantelung) und W6 (Wasabi-Chips) enthielten lediglich Allyl-ITC.

Beispielhaft für die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Speisesenfproben zeigt Abbildung 7-8 ein Chromatogramm der Probe S5.

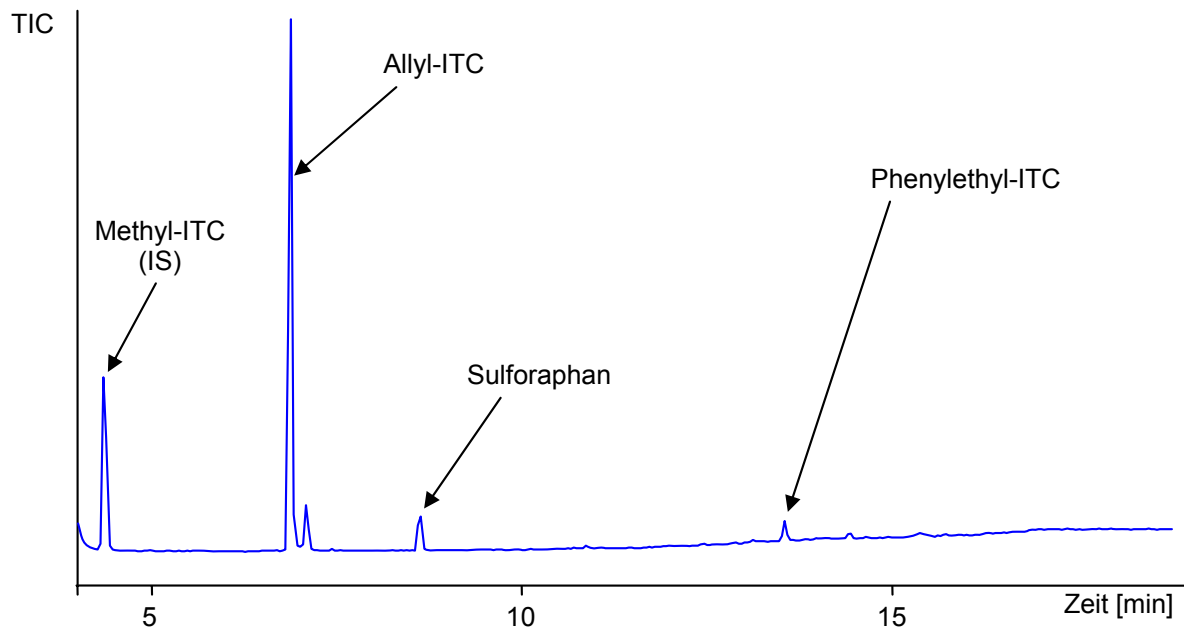


Abb. 7-8 Chromatogramm eines Probenextraktes von S5 (Speisesenf) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Über den Vergleich zwischen Retentionszeit bzw. charakteristischen Massenfragmenten mit den entsprechenden Standards wurde nach einer Retentionszeit von 7 min eindeutig das Allyl-ITC identifiziert. Eine nach 9 min eluierende Substanz konnte dem Sulforaphan zugeordnet werden, ein weiteres Signal nach 14 min wurde als Phenylethyl-ITC identifiziert.

Tabelle 7-8 stellt die über Kalibrierung mittels internen Standards ermittelten quantitativen Ergebnisse in mg/100 g Frischmasse dar.

Tab. 7-8 ITC-Gehalte verschiedener Speisesenfproben (S) in mg/100 g FM detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Probe	Isothiocyanatgehalte [mg/100 g FM]		
	C	D	H
S1	77,4	411	1,02
S2	28,1	24,3	1,11
S3	24,3	221	1,43
S4	4,02	-	-
S5	212	200	2,21
S6	118	1811	1,33
S7	205	34,2	1,98

FM = Frischmasse

Die quantitative Auswertung der Senfproben ergab in den Proben S1 und S2 Gehalte an Allyl-ITC (**C**) von 77,4 bzw. 28,1 mg/100 g FM. In der Probe S3 wurden 24,3 mg/100 g FM detektiert, während sich in den Proben S5, S6 und S7 Allyl-ITC-Gehalte von 212, 118 und 205 mg/100 g FM ergaben.

Das ITC Sulforaphan (**D**) konnte mit einem Gehalt von 411 mg/100 g FM in Senf 1 nachgewiesen werden, in den Probenextrakten S2, S3 und S5 waren Gehalte von 24,3, 221 und 200 mg/100 g FM nachweisbar. Die Proben S6 und S7 zeigten Mengen an 1811 bzw. 34,2 mg/100 g FM Sulforaphan.

Phenylethyl-ITC (**H**) war in den Proben S1, S2 und S3 in Mengen von 1,02, 1,11, und 1,43 mg/100 g FM enthalten, die Proben S5, S6 und S7 zeigten Gehalte von 2,21, 1,33 und 1,98 mg/100 g FM. Eine Ausnahme stellte Probe S4 dar, in der lediglich Allyl-ITC mit einem Gehalt von 4,02 mg/100 g FM identifiziert werden konnte.

Repräsentativ für das Isothiocyanat-Muster in Meerrettich- und Wasabiproben ist in Abbildung 7-9 ein Chromatogramm der Meerrettichprobe M4 dargestellt.

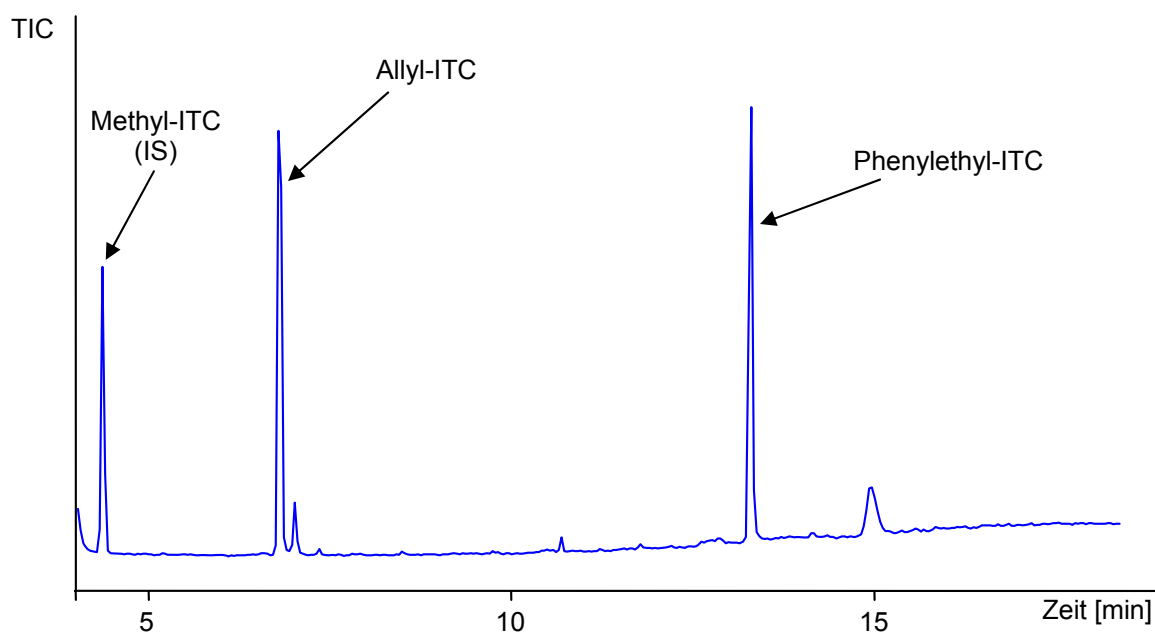


Abb. 7-9 Chromatogramm eines Probenextraktes von M4 (Meerrettich), detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kapitel 5.2

Hier wurde ein Signal nach 8 min anhand mit den Referenzsubstanzen übereinstimmender Retentionszeiten und Massenfragmente dem Allyl-ITC zugeordnet, ein weiteres Signal nach 14 min wurde als Phenylethyl-ITC identifiziert.

Tabelle 7-9 zeigt zusammenfassend die über Vergleich mit dem internen Standard

Methyl-ITC ermittelten Isothiocyanatgehalte der Meerrettich- und Wasabiprobe in mg/100 g FM.

Tab. 7-9 ITC-Gehalte verschiedener Meerrettich (M)- und Wasabiprobe (W) in mg/100 g FM detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Probe	Isothiocyanatgehalte [mg/100 g FM]		
	C	D	H
M1	89,5	-	22,1
M2	81,2	-	25,6
M3	48,3	-	10,3
M4	103	-	23,1
M5	255	-	54,1
W1	77,0	-	10,4
W2	472	-	3,08
W3	1287	244	138
W4	1162	221	-
W5	11,3	-	-
W6	96,9	-	-

FM = Frischmasse

In den Meerrettichproben wurde das Isothiocyanat Allyl-ITC (**C**) in M1 und M2 in Mengen von 89,5 bzw. 81,2 mg/100 g FM nachgewiesen, die Probenextrakte M3 und M4 enthielten 48,3 und 103 mg/100 g FM dieses Isothiocyanates. Meerrettich M5 enthielt Allyl-ITC in einer Menge von 255 mg/100 g FM.

Die Gehalte an Phenylethyl-ITC (**H**) lagen bei 22,1 mg/100 g FM (M1), 25,6 mg/100 g FM (M2), 10,3 mg/100 g FM (M3), 23,1 mg/100 g FM (M4) sowie 54,1 mg/100 g FM.

Die Wasabiprobe zeigten Gehalte an Allyl-ITC (**C**) zwischen 77,0 und 472 mg/100 g FM für W1 bzw. W2 und 1287 mg/100 g FM in Probe W3. Die Gehalte an Allyl-ITC lagen für die Proben W4, W5 und W6 bei 1162 mg/100 g FM, 11,3 mg/100 g FM bzw. 96,9 mg/100 g FM

Die Substanz Phenylethyl-ITC (**H**) wurde in Gehalten von 10,4 und 3,08 mg/100 g FM in W1 bzw. W2 detektiert, Wasabi 3 enthielt Phenylethyl-ITC in einer Menge von 138 mg/100 g FM. In den Proben W4, W5 und W6 wurde dieses Isothiocyanat nicht nachgewiesen. In den pulverförmigen Proben W3 und W4 wurden zusätzlich 244 mg/100 g FM bzw. 221 mg/100 g FM Sulforaphan (**D**) detektiert.

7.2.5 Kapern

4 in Salzlake fermentierte (KA1-KA4) und eine mit Meersalz behandelte Kapernprobe (KA5) wurden anhand der in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet und ein Aliquot der Probenextrakte (1 µl) in das gaschromatographische System injiziert. Abbildung 7-10 zeigt ein Chromatogramm der Probe KA5 mit internem Standard Ethyl-ITC. Dieser wurde gewählt, da Methyl-ITC die Majorkomponente in Kapern darstellt.

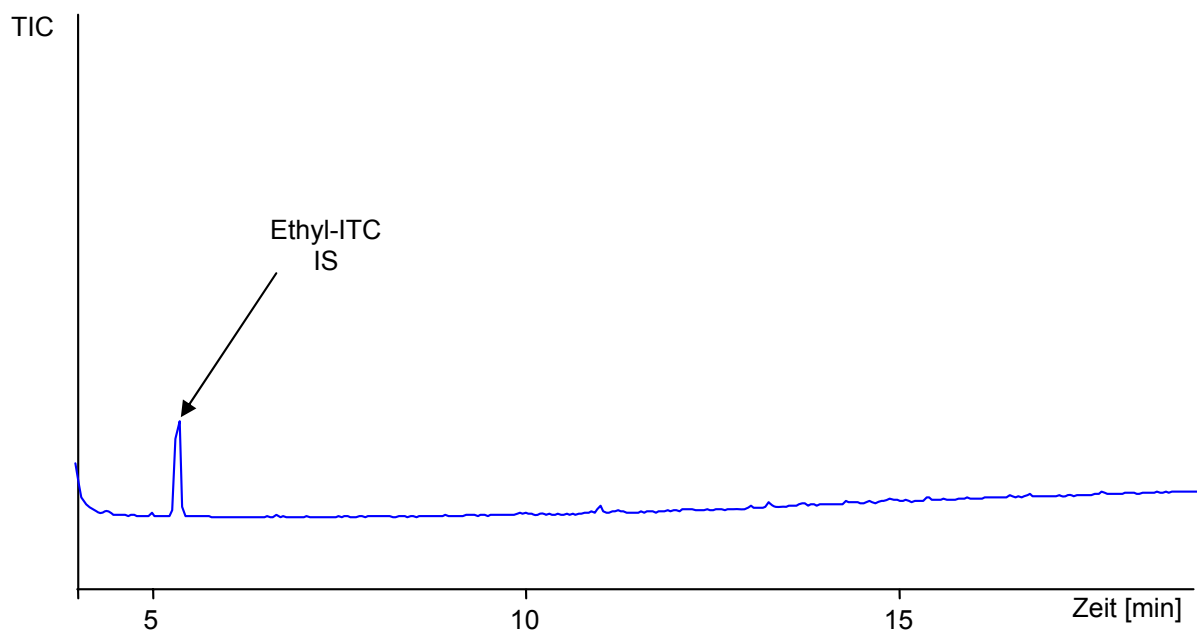


Abb. 7-10 Chromatogramm eines Probenextraktes von KA5 (Kapern) detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

In den Kapernproben KA1 bis KA5 konnte mit der verwendeten Methode keine der elf eingesetzten Standardsubstanzen gaschromatographisch detektiert werden.

7.2.6 Nahrungsergänzungsmittel

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Nahrungsergänzungsmittel wurden nach Zugabe des Enzyms Myrosinase vorinkubiert, im Anschluss gemäß Kapitel 5.4.3 aufgearbeitet und in den Gaschromatographen injiziert. Im qualitativen Vergleich mit den Referenzsubstanzen ließen sich in den Probenextrakten die Isothiocyanate Benzyl-ITC in allen macahaltigen Proben nachweisen, ein weiterer Probenextrakt enthielt die ITCs Sulforaphan und Methylthiobutyl-ITC. Tabelle 7-10 sind die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten ITCs zu entnehmen.

Tab. 7-10 Isothiocyanate in verschiedenen Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) detektiert mittels GC-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Probe	Detektierte Isothiocyanate
NEM1	Sulforaphan, Methylthiobutylisothiocanat
NEM4	Benzylisothiocyanat, Methoxybenzylisothiocyanat
NEM5	Benzylisothiocyanat, Methoxybenzylisothiocyanat
NEM6	Benzylisothiocyanat, Methoxybenzylisothiocyanat
NEM7	Benzylisothiocyanat, Methoxybenzylisothiocyanat
NEM8	Benzylisothiocyanat, Methoxybenzylisothiocyanat
NEM9	Benzylisothiocyanat, Methoxybenzylisothiocyanat
NEM10	Benzylisothiocyanat, Methoxybenzylisothiocyanat
NEM13	Benzylisothiocyanat, Methoxybenzylisothiocyanat

In den Proben NEM2 und NEM3, NEM11, NEM12 sowie NEM14 wurden keine der im Rahmen dieser Arbeit analysierten ITCs detektiert.

Das in Abbildung 7-11 dargestellte Chromatogramm zeigt repräsentativ für alle macahaltigen Präparate einen Extrakt der Probe NEM5 im Vergleich zu einem Gesamtstandard der elf analysierten Referenzisothiocyanate.

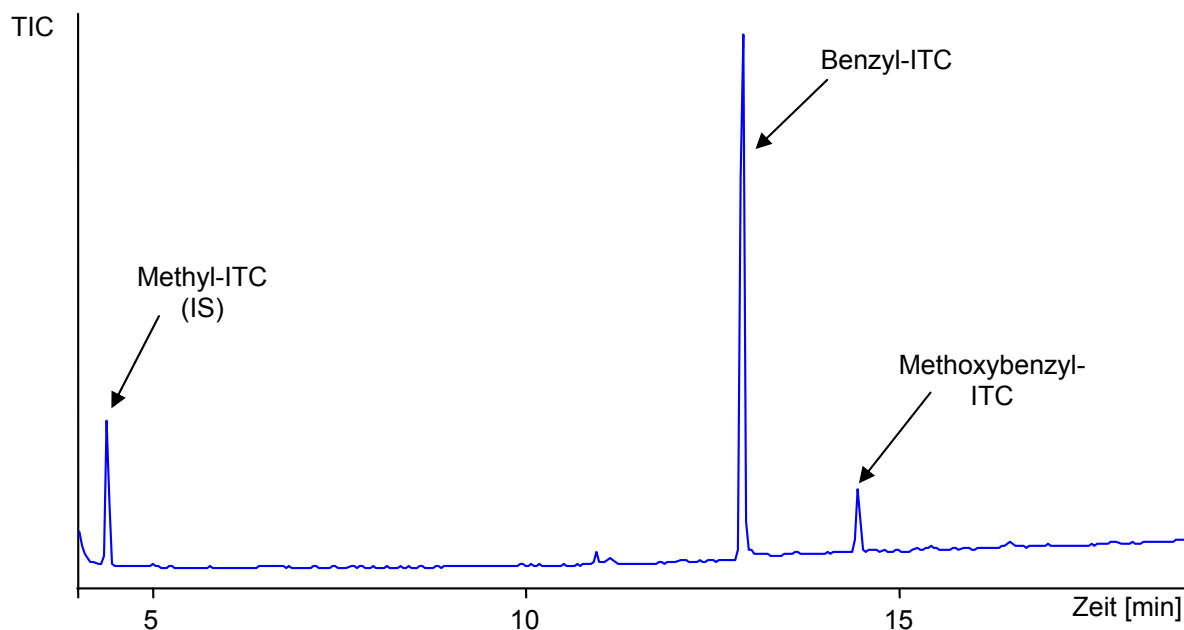


Abb. 7-11 Chromatogramm eines Probenextraktes von NEM5 detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Anhand des Vergleichs von Retentionszeiten und Massenfragmenten mit den entsprechenden Daten der Referenzsubstanzen wurde der Peak nach 12 min

eindeutig dem Benzylisothiocyanat zugeordnet. Ein für diese Proben zusätzlich durchgeführter Scan-Lauf unter Einbeziehung aller Massenbereiche ergab für das Signal nach 15 Minuten das Fragmentmuster m/z 121 und m/z 179. Dies deutet auf die ebenfalls für Maca charakteristische Substanz Methoxybenzyl-ITC hin.

Isothiocyanate wurden in den hier untersuchten Probenextrakten neben den macahaltigen Proben noch in einer auf Brokkoli basierenden Probe (NEM1) nachgewiesen, wie in Abbildung 7-12 dargestellt ist.

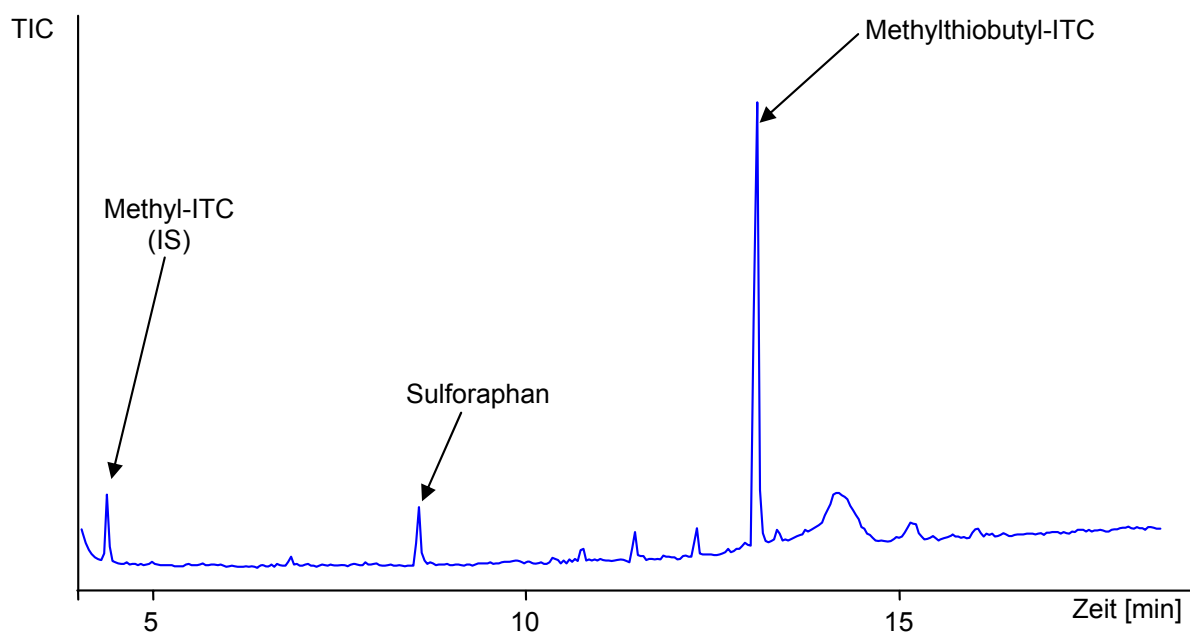


Abb. 7-12 Chromatogramm eines Probenextraktes von NEM1 detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Signale nach 8 bzw. 13 Minuten wurden über Vergleich von Retentionszeit und Massenfragmenten den Isothiocyanaten Sulforaphan und Methylthiobutyl-ITC zugeordnet.

In Tabelle 7-11 sind zusammenfassend die ITC-Gehalte der Probenextrakte in mg/100 g FM dargestellt.

Tab. 7-11 ITC-Gehalte verschiedener Nahrungsergänzungsmittel in mg/100 g Produkt detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Probe	Isothiocyanatgehalte [mg/100 g Produkt]		
	G	F	D
NEM1	853	-	237
NEM4	-	93,2	-
NEM5	-	177	-
NEM6	-	180	-
NEM7	-	150	-
NEM8	-	317	-
NEM9	-	196	-
NEM10	-	88,4	-
NEM13	-	146	-

Die Auswertung der Nahrungsergänzungsmittel ergab in den macahaltigen Proben NEM4 bis NEM10 und NEM13 zum Teil hohe Gehalte an Benzyl-ITC (**F**). Hierbei wurden Mengen zwischen 88,4 mg/100 g Produkt für NEM10 und 317 mg/100 g Produkt (NEM8) nachgewiesen. Das zusätzlich zu diesen ITCs identifizierte Methoxybenzyl-ITC konnte aufgrund fehlender Referenzsubstanz nicht quantifiziert dargestellt werden.

Das Nahrungsergänzungsmittel NEM1 wies Gehalte an Sulforaphan (**D**) von 853 mg/100 g sowie Methylthiobutyl-ITC (**G**) von 237 mg/100 g Produkt auf.

8 Diskussion

8.1 Methodenvergleich HPLC

Methoden zur direkten oder indirekten Bestimmung von Glucosinolaten in Lebensmitteln und Futtermitteln sind weit verbreitet. Die am häufigsten angewandte Methodik zur Bestimmung und Quantifizierung individueller Glucosinolate beinhaltet deren Desulfatierung und anschließende Trennung an einer RP18-Phase (FENWICK et al. 1983). Im Hinblick auf die zu bearbeitende Fragestellung ist der in dieser Methode zugrunde gelegte nicht reversible Abbau zu Desulfoglucosinolaten nicht zu tolerieren, da hierbei intakte Glucosinolate mittels HPLC nicht zu trennen und zu charakterisieren sind. Dies macht die Entwicklung einer alternativen Methode erforderlich. Ebenfalls konnten Ionenpaarreagenzien zum Ausgleich der negativen Ladung am Sulfatrest der intakten Glucosinolate nicht eingesetzt werden, da bekanntermaßen störende Interaktionen bei Analytik mit kombinierter Massenspektrometrie auftreten (PRESTERA et al. 1996). Ansätze von MELLON et al. (2002) schienen aufgrund der Einfachheit von Elutionssystem (Gradientenelution mit Wasser/Methanol angesäuert mit 0,1 % TFA) und Festphase (RP18) gut für diese spezielle Fragestellung geeignet, erwiesen sich jedoch ohne Ionenpaarreagenz im Lösungsmittel als nicht reproduzierbar. Über diese Methode erhaltene Chromatogramme zeigten unscharfe Peaks und eine erhebliche Basisliniendrift. Auch weitere Versuche, das volle Spektrum der 14 zur Verfügung stehenden Referenzsubstanzen an herkömmlichen RP18-Phasen zu trennen, schlugen fehl, da aufgrund der unpolar vorliegenden stationären Phase keinerlei zufrieden stellende Retardierung der vergleichsweise polaren Analyten stattfand.

Über Verwendung einer speziell für polare Trennproblematiken entwickelten Säule konnte dieses Problem gelöst werden. Im Gegensatz zu WEST et al. (2002), welcher zur Trennung von GSL unterschiedlicher Polaritäten Ionenpaarreagenzien in Kombination mit RP18-Material gekoppelt mit hydrophiler Interaktionschromatographie einsetzt, werden mittels der hier gezeigten Methode polare und weniger polare GSL auf einem Material ausreichend retardiert, so dass 12 der 14 intakten Glucosinolate basisliniengetrennt vorliegen. Auch die strukturell sehr ähnlichen GSL Progoitrin (2-(*R*)-2-Hydroxy-3-butenylglucosinolat) und Epiprogoitrin (2-(*S*)-2-Hydroxy-3-butenylglucosinolat) können ohne den Einsatz chiraler Materialien

getrennt werden, was unter anderem von WEST et al. (2002) nicht gezeigt werden konnte. Lediglich Progoitrin und Glucocheirolin zeigen eine Co-Elution, was als vernachlässigbar angesehen wurde, weil in keiner der untersuchten Proben diese GSL detektiert werden konnten. Die gute Trennung einer großen Anzahl intakter GSL in einem Lauf bei großer Stabilität in Retentionszeit und Reproduzierbarkeit machen diese Methode interessant für den Einsatz zur Analyse intakter GSL in Lebensmittelproben. Zudem stellt die hier entwickelte Methode mit Nachweisgrenzen um 1 ng/ml ein deutlich sensitiveres System als z. B. eine von MOHN et al. (2007) unter Einsatz von Ionenpaarreagenzien entwickelte Methode dar. Auch die Methodik von WEST et al. (2002) ist bei schlechterer Trennleistung der Analyten und höherer Nachweisgrenzen der gezeigten Methode unterlegen.

Zusätzliches Interesse ist hinsichtlich eines geplanten Upscalings zur präparativen Gewinnung von bisher nicht charakterisierten Glucosinolaten zum Einsatz als Referenzsubstanzen zu sehen. Diese Isolate könnten sich ebenfalls für weiterführende physiologische Tests anbieten. Das hauptsächlich auf Wasserbasis arbeitende Eluentensystem vereint den Vorteil geringer gesundheitlicher Risiken mit preislicher Attraktivität. Auch das Ansäuern mit TFA stellt hinsichtlich geplanter Probenisolierung kein Problem dar, da die Säure eine ausreichende Wasserdampflichkeit aufweist. Somit ist mit proteolytischem Abbau während der präparativen Isolierung nicht zu rechnen.

Als nachteilig allerdings ist der zeitliche Aufwand resultierend aus dem benötigten Gradientensystem sowie unüberwindliche Probleme (Anfangsgehalt Wasser 100 %) in der Kopplung mit Massenspektrometrie zu sehen.

Aus diesen Gründen wandte man sich der zur Trennung polarer Substanzgemische äußert günstigen und immer häufiger eingesetzten hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) zu (HEMSTRÖM et al. 2006). Zu bedenken war hier der benötigte hohe Anteil an Acetonitril. Trotz Bedenken hinsichtlich der Toxizität wurde sich für einen Einsatz entschieden, da sich erhebliche Vorteile in Trennzeit, Betriebsdruck sowie MS-Kompatibilität und -Sensitivität ergaben (HEMSTRÖM et al. 2006). Im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten von TROYER et al. (2001) bzw. WADE et al. (2007), welche sich hauptsächlich mit einem relativ geringen Spektrum an in Brokkoli enthaltenen GSL beschäftigten, zeigt die hier entwickelte Methode erstmalig 14 Referenzsubstanzen basisliniengetrennt. Ein vergleichbar breites Spektrum an GSL in einem Lauf darzustellen wurde bisher nur sehr selten verfolgt,

da meist eine bestimmte Gruppe an GSL bzw. Pflanzenarten im Fokus der Methodenentwicklung stand. Lediglich LEE et al. (2006) zeigten ein vergleichbar breites Screening, wobei 12 GSL in einem Lauf dargestellt wurden. Allerdings ist hier beispielsweise das für die Krebsprävention bedeutende Glucoraphanin im Gegensatz zu der hier gezeigten Methode nicht dargestellt. In Reproduzierbarkeit und Stabilität stellt sich die HILIC-Chromatographie (Methode 2) im Vergleich zur modifizierten RP18-Phase (Methode 1) ähnlich gut dar, wobei sie allerdings eine leicht geringere Stabilität zeigt. Dies liegt in der Chromatographieart begründet, die – in deutlich abgeschwächter Form – noch teilweise die typischen Nachteile einer Normalphase gegenüber der klassischen Umkehrphase zeigt, wie geringere Haltbarkeit des Säulenmaterials sowie sehr lange Konditionierungsphasen (IKEGAMI et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hier zwei Methoden unterschiedlicher Trennprinzipien entwickelt wurden, die optimal zur Trennung der polaren GSL geeignet sind. Eine Kombination beider Systeme garantiert eine umfassende Methodenplattform zur Analytik dieser Substanzen garantiert, da neue Strukturen über eine Kopplung von Methode 2 mit Massenspektrometrie charakterisiert und im Anschluss mittels Methode 1 isoliert und so evtl. als neue Referenzen eingesetzt werden können. Zudem stehen hiermit zwei stabile und sensitive Systeme zum Einsatz in der Lebensmittelkontrolle zur Verfügung, da die GSL-Zusammensetzung und deren individuelle Gehalte als Qualitätsparameter immer wichtiger werden. Die gezeigten Methoden lassen sich einfach und ohne großen Kostenaufwand in geeigneten Laboratorien adaptieren.

8.2 Methodenbeurteilung GC

Die Bestimmung diverser Abbauprodukte der GSL, insbesondere der ITCs, stellt ein wichtiges Feld in der Analytik sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe dar. Diese werden beispielsweise in biologischen Verfügbarkeitsstudien, Fütterungsversuchen und ähnlichem als Biomarker eingesetzt, und bedürfen somit einer begleitenden Analytik. Aber auch in der Lebensmittelanalytik sind diese Stoffe als Aromakomponenten von Bedeutung u. a. als Schärfe- und Qualitätsparameter in Senf und Rettich.

Die gängige Vorgehensweise zur Bestimmung von ITCs – ursprünglich zum indirekten Nachweis der GSL in Nahrungs- und Futtermitteln – erfolgt über eine

Cyclokondensationsreaktion von ITCs mit 1,2-Benzenedithiol mit anschließender Bestimmung mittels HPLC (JIAO et al. 1998). Darauf aufbauend wurde eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung des Gesamt-ITC-Gehaltes entwickelt, welche ohne großen Zeitaufwand innerhalb einer Laufzeit von 20 min sehr sensitive Ergebnisse liefert (CHOI et al. 2004). Diese Methoden waren allerdings für die gegebene Problemstellung ungeeignet, da sie über nichtreversible Derivatisierungsreaktion der ITCs eine Strukturaufklärung und Identifizierung unnötig erschweren. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls Focus auf die Entwicklung einer schnellen, gaschromatographischen Methode gelegt, die sich die natürliche Flüchtigkeit der Masse der ITCs zunutze macht. Einzig die indolische Untergruppe der ITCs wird auf diese Weise nicht erfasst (OKANO et al. 1990). Diese Substanzen waren jedoch nicht Ziel der im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten Analysen, so dass dieser Aspekt keine nachteiligen Folgen hatte. Wie schon bei der Entwicklung geeigneter Methoden zur Trennung intakter GSL mittels HPLC wurde auch hier das Ziel verfolgt, eine möglichst große Anzahl an Referenzsubstanzen innerhalb eines Laufes darzustellen und somit ein breites Screening zu ermöglichen. Die vorliegende Methode setzt diese Vorgaben erfolgreich um, indem innerhalb einer äußerst kurzen Analysendauer von 18 min alle 11 momentan kommerziell erhältlichen Isothiocyanat-Standards basisliniengetrennt werden können. Dies zeigt deutliche Vorteile gegenüber den Arbeiten von z. B. GIL und MAC LEOD (1980), welche bei einer Analysendauer von 14 Minuten Probleme bei der Erfassung und Identifikation langkettiger aus Methylthio-, Methylsulphinyl- und Methylsulphonyl-GSL entstandener ITCs erwähnen. AL-GENDY und LOCKWOOD (2003) wiederum bewältigen die gestellte Aufgabe nur annähernd mit einem deutlich verlängerten Temperaturprogramm von 48 Minuten. Die hier entwickelte Methode zur Detektion und Charakterisierung von Isothiocyanaten stellt eine effiziente und sensitive Methode dar, was sie zusätzlich zu den entwickelten HPLC-Methoden zum Nachweis intakter GSL optimal zum Einsatz in der Lebensmittelkontrolle geeignet macht, da somit auch die in prozessierten Lebensmitteln enthaltenen flüchtigen ITCs qualitativ und quantitativ erfasst werden können.

8.3 Lebensmittelproben

8.3.1 Rucola

Rucola wird aufgrund seines charakteristischen Geschmacks und seiner postulierten gesundheitlich positiven Eigenschaften als Salatzusatz geschätzt. Es lag daher nahe, zum einen die Gehalte an intakten GSL bzw. die Mengen an Isothiocyanaten in verschiedenen kommerziell erhältlichen Rucola-Proben zu bestimmen. Zum anderen war es hinsichtlich weiterer Einsatzmöglichkeiten wie z. B. in Tütensuppen, Saucen oder ähnlichem interessant, Versuche zum Verhalten der entsprechenden intakten GSL während unterschiedlicher Lagerung bzw. Prozessierung durchzuführen.

Die qualitative Auswertung der über HPLC (Methode 1) gewonnenen Ergebnisse in 5 Proben frischer Rucolablätter handelsüblicher Marken (RU1-RU5) zeigt in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten die Glucosinolate Glucoerucin (4-Methylthiobutylglucosinolat) und Glucoraphanin (4-Methylsulfinylbutylglucosinolat). Die Betrachtung der Einzelgehalte beider GSL steht jedoch im Widerspruch zu Arbeiten von DAXENBICHLER et al. (1991). Hier wurden in Samen von *Eruca sativa* Glucoerucin als Major- und Glucoraphanin als Minorkomponente detektiert, was durch Arbeiten von BENNETT et al. (2007) in adulten Pflanzenteilen bestätigt wird. Das hier dargestellte abweichende Ergebnis lässt sich unter anderem durch eine S-Demethylierung von Glucoerucin zu hier aufgrund fehlender Referenzsubstanz nicht detektierbarem Mercaptobutyl-GSL (BENNETT et al. 2002) erklären. Eine Identifizierung desselben mittels MS war aufgrund der Nichteignung der HPLC-Methode 1 zur MS-Kopplung ebenfalls unmöglich. Einen weiteren Erklärungsansatz bieten IORI et al. (1999), welche von einer direkten Umwandlung des Glucoerucin in Glucoraphanin ausgehen. Dieses Phänomen wurde bisher jedoch lediglich semi-synthetisch unter bestimmten Laborbedingungen (H_2O_2 ; 60 °C) über aus Samen von *Eruca sativa* isoliertes Glucoerucin nachgewiesen. Diese Vermutung bedarf daher einer zusätzlichen Verifizierung *in planta*. Vergleiche der GSL-Gehalte im Probenmaterial RU1-RU5 zeigen eine z. T. erhebliche Varianz zwischen den eingesetzten Rucola-Sorten.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden in zusätzlichen Rucolaproben (RU6-RU9) die Gehalte an Isothiocyanaten mittels GC-SIM-MS untersucht. Das erhaltene ITC-Profil lässt sich als logische Konsequenz aus den qualitativ ermittelten GSL der Proben RU1-RU5 interpretieren. So wurden die aus den GSL Glucoraphanin und

Glucoraphanin abzuleitenden Substanzen Sulforaphan und Methylthiobutyl-ITC detektiert, wobei ersteres durchweg in höheren Mengen vorlag. Wie schon bei der Glucosinolatanalytik der Proben RU1-RU5 beobachtet, zeigten die ermittelten ITC-Gehalte in den Proben RU6-RU9 ein großes Gehalts-Spektrum. Ein direkter quantitativer Vergleich der ITCs mit den intakten GSL lässt jedoch aufgrund des nicht identischen Ausgangsmaterials nur Abschätzungen zu.

Sortenbedingte große Schwankungen im Gehalt an GSL wie auch daraus resultierender ITCs sind zahlreich beschrieben, wobei Untersuchungen zu diesem Thema zeigen, dass diese v. a. auf unterschiedliche Umweltbedingungen während des Anbaus oder den Einsatz verschiedener Düngemittel zurückzuführen sind. Beide Faktoren können signifikante Effekte auf GSL-Gehalte in den verschiedenen Pflanzenteilen ausüben, da unterschiedliche Temperaturverhältnisse und pH-Werte des Bodens die Hydrolyse der GSL zu ihren spezifischen Abbauprodukten maßgeblich beeinflussen können (FAHEY et al. 2001; SCHREINER et al. 2005). Eine statistisch vertretbare Aussage zu herkunftsbedingten Schwankungen kann im Rahmen dieser Arbeit aufgrund geringer Probenmenge nicht getroffen werden. Die im Schnitt etwas höheren Gesamtglucosinolatgehalte in Probenmaterial aus Italien (RU1, RU4 und RU5) decken sich allerdings gut mit Ergebnissen von BENNETT et al. (2007), welche bei Analyse einer Vielzahl an Rucolaproben unterschiedlicher Herkunftsländer die höchsten Gehalte an GSL in Proben aus Italien detektierten. Betrachtet man die in Rucola detektierten GSL Glucoraphanin und Glucoraphanin gesondert, zeigen italienische Proben zwar durchweg höhere Gehalte an Glucoraphanin, die Mengen an Glucoraphanin sind aber in italienischen wie auch bei in Deutschland angebauten Proben (RU2, RU3, RU6-RU9) verhältnismäßig homogen. Ebenfalls zeigen Proben aus konventionellem bzw. biologisch-organischem Landbau analog zu Arbeiten am Beispiel von Brokkoli und Rotkohl (MEYER und ADAM 2008) keine signifikanten Unterschiede in ihren Gehalten an den entsprechenden GSL bzw. im Falle der ITC-Analysen an Sulforaphan oder 4-Methylthiobutyl-ITC, so dass anhand der hier ermittelten Ergebnisse keine dahingehende Tendenz bestätigt werden kann.

Interessanterweise zeigten die Rucola-Proben RU1-RU5 nach unterschiedlichen Prozessierungsverfahren geringere Unterschiede bzgl. ihres Glucosinolatgehaltes als erwartet. So zeigte das frisch eingesetzte Probenmaterial in allen Fällen die höchsten

Gehalte an intakten Glucosinolaten, die wie in Abbildung 8-1 graphisch dargestellt, gleich 100 % gesetzt wurden. Nach Tiefkühlagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sind nahezu keine Verluste zu beobachten. Nach Lyophilisation, wie sie beispielsweise in der Lebensmittelproduktion eingesetzt wird, geht hier der Gehalt auf bis zu 75 % des Ausgangswertes zurück.

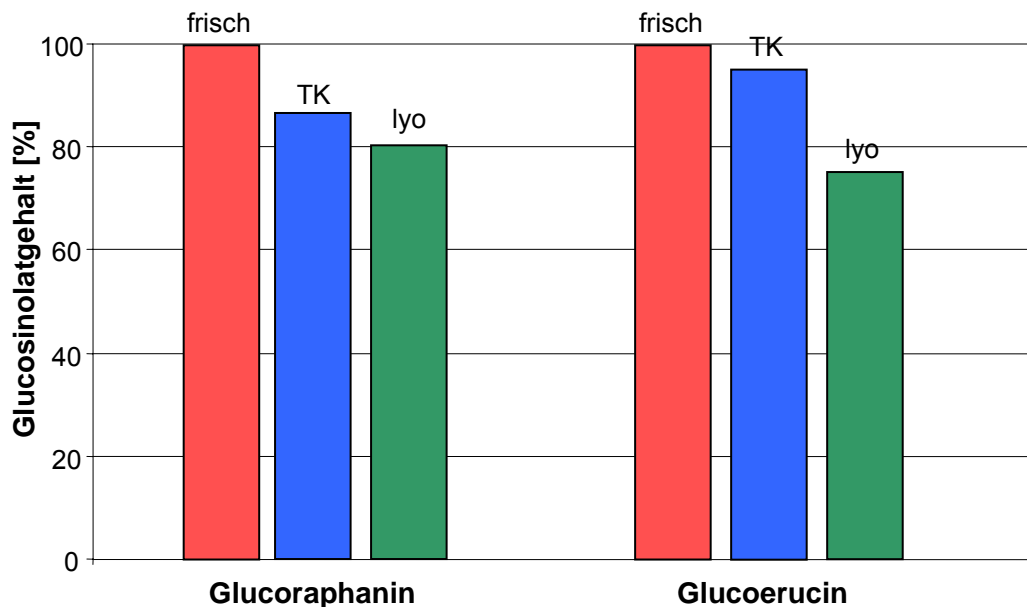


Abb. 8-1 Vergleich der gemittelten Gehalte [%] an Glucoraphanin und Glucoerucin der Proben RU1-RU5 anhand verschiedener Probenvorbehandlung (frisch, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ TK, lyophilisiert) detektiert mittels HPLC Methode 1, s. Kap. 4.3.1

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Arbeiten zur Lagerung glucosinolathaltiger Nahrungspflanzen, die lediglich geringe Abnahmen im Glucosinolatgehalt bei Lagerung im Tiefkühler bei einer Temperatur von $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ beschreiben (CIEŚLIK et al. 2007). SONG und THORNALLEY (2007) dagegen stellen eine deutliche Abnahme des Gesamtglucosinolatgehaltes von gemittelt 33 % in bei $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagertem Probenmaterial dar, was mit den hier ermittelten Ergebnissen nicht unbedingt unterstützt werden kann. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die im Rahmen dieser Arbeit analysierten gefroren gelagerten Proben ohne vorheriges Auftauen weiter verarbeitet wurden. Somit kann die Bildung von Eiskristallen und damit einhergehende Verletzung der Pflanzenzellen im anschließenden Tauprozess, was bei SONG und THORNALLEY (2007) dazu geführt hatte, dass die bis dato räumlich getrennt vorliegende Myrosinase in Kontakt mit den Glucosinolaten kam und diese abzubauen begann, hier wohl ausgeschlossen werden. Die deutlichste Abnahme des Gesamtglucosinolatgehaltes war mit 20 %

(Glucoraphanin) bzw. 25 % (Glucoerucin) in lyophilisiert analysiertem Probenmaterial zu sehen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Aussagen, dass Lyophilisieren oder Trocknen verderblicher Lebensmittel zur Haltbarmachung eine schonende Methode zur nahezu vollständigen Erhaltung der GSL im Lebensmittel darstellt (DE VOS und BLIJLEVEN 1988). Daher lässt sich aus der hier festgestellten Abnahme der Glucosinolatgehalte vorhersagen, dass Rucola zum Einsatz als getrocknetes Lebensmittel hinsichtlich der GSL-Stabilität nur begrenzt geeignet ist.

Aus Sicht der Verbraucher kann im Falle des Rucola zusammenfassend gefolgert werden, dass die Art der Prozessierung des Pflanzenmaterials nicht notwendigerweise signifikanten Einfluss auf die GLS-Gehalte hat. Viel erheblicher können sorten- oder anbaubedingte Unterschiede sein. Dies gilt es sowohl hinsichtlich des auf GSL-Abbauprodukten basierenden individuellen Geschmacks, aber auch hinsichtlich der Erwartungshaltung bzgl. eines bestimmten gesundheitlichen Potentials aufgrund der Mengen an sekundären Inhaltsstoffen wie der GSL und deren Folgeprodukten wie ITCs im erworbenen Lebensmittel zu beachten.

8.3.2 Kressen und Sprossen

Kressen wie Gartenkresse (*Lepidium sativum*) oder Kapuzinerkresse (*Nasturtium officinale*) sind bekannt für ihre hohen Gehalte an bestimmten GSL wie Gluconasturtiin oder Glucotropaeolin, wobei meist eines dieser Glucosinolate dominiert (FAHEY et al. 2001). Daher werden Kressesäfte gerne in Humanstudien zur Untersuchung der Interaktionen von GSL und deren Abbauprodukten im menschlichen Organismus eingesetzt (KASSIE et al. 2002). Folglich schien es sehr interessant, neben den eigentlichen unter der Bezeichnung „Kresse“ zusammengefassten Pflanzen auch neu entwickelte Produkte – sog. *Micro-Greens* – auf mögliche Gehalte an Glucosinolaten bzw. Isothiocyanaten zu untersuchen. Interessanterweise werden diese Produkte trotz Zugehörigkeit zu verschiedenen Pflanzengattungen als „Kressen“ bezeichnet und teilweise mit einem hohen GSL-Gehalt ausgelobt. Daneben werden sog. Sprossen, Keimlinge unterschiedlicher Pflanzengattungen, als Glucosinolatquellen beworben. Der Grund hierfür ist in der vergleichsweise höheren Wirkstoffkonzentration zur adulten Pflanze derselben Gattung zu sehen. Zudem scheint das Glucosinolatprofil aufgrund noch nicht gebildeter in der Literatur als gesundheitlich bedenklich dargestellter indolischer

Glucosinolate hier günstiger als bei den erwachsenen Pflanzen. Vor allem in Brokkolisprossen wurden erhöhte Gehalte an Glucoraphanin bei gleichzeitiger Abwesenheit indolischer GSL nachgewiesen (FAHEY et al. 1997), was sie interessant für die Tumorforschung macht, da hieraus das in der Krebsprävention bedeutsame Isothiocyanat Sulforaphan gebildet wird.

Die intakten GSL wurden sowohl in Kressen- als auch Sprossen-Proben mittels den beiden entwickelten HPLC-Methoden quali- und quantifiziert. In beiden Fällen (Methode 1, Trennung an Polaris[®] C18-Ether und Methode 2, Luna[®] HILIC) wurden im Probenmaterial die gleichen Glucosinolate gefunden. Dies war ebenfalls unabhängig von der Behandlung des Probenmaterials (frisch bzw. lyophilisiert analysiert). Dieses Ergebnis änderte sich auch nicht nach der Zwischenschaltung eines Festphasenextraktionsschrittes mittels Anionenaustauscher DEAE Sephadex[®] A-25. Das eingesetzte Festphasenmaterial wurde im Rahmen dieser Arbeit gewählt, da in der EU-Standardmethode (nach FENWICK et al. 1983) mit eben dieser Festphase eine sehr gute Aufreinigung der GSL erzielt wurde und man daher von einer optimalen Umsetzung auf die hier gegebene Fragestellung ausging. Die im Rahmen dieser Arbeit in Kressen und Sprossen detektierten GSL zeigen ebenfalls gute Übereinstimmungen mit entsprechenden Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, woraus auf eine optimale Eignung beider Methoden bzgl. der Detektion intakter Glucosinolate geschlossen werden kann.

Bei der Betrachtung der quantitativen GSL-Gehalte in den Sprossen bzw. Kresseproben zeigen sich jedoch erhebliche Unterschiede bzgl. Methodik und Aufarbeitung. Auffallend war, dass die detektierten Glucosinolatgehalte in den lyophilisierten Proben fast ausschließlich über denen der frisch analysierten Proben lagen. Dies kann unter anderem auf die schnelle Absenkung der Temperatur auf ca. -80 °C während des Gefrierprozesses vor der Trocknung zurückzuführen sein, welche der Myrosinase keinerlei Reaktionszeit zugesteht. Die Temperaturempfindlichkeit des Enzyms haben schon YEN und WEI (1993) mit einem Aktivitätsoptimum der Myrosinase bei 50-60 °C festgelegt. Im Vergleich dazu scheint das Enzym innerhalb der kurzen Zeitspanne zwischen Zerkleinerung des frischen Probenmaterials und einsetzender Inaktivierung über Methanol als Extraktionsmittel in der Lage zu sein, einen Teil der GSL, mit denen es während des Zerkleinerungsprozesse in Kontakt kommt, abzubauen. Zudem kann nach völligem

Wasserentzug in der Probe durch Gefriertrocknung von einer besseren Benetzbarkeit des Probenmaterials mit Methanol ausgegangen werden, was sich im Vergleich zu dem teilweise erhebliche Mengen an Wasser enthaltenden frischen Probenmaterial wohl ebenfalls positiv auf die Extraktion der intakten GLS auswirkt.

Der Einsatz der Festphasenextraktion kann allenfalls als mäßiger Erfolg gewertet werden, denn die bestimmten Gehalte nach Aufreinigung stellen sich durchweg als niedriger im Vergleich zu den nicht aufgereinigten Proben dar. Dieser Effekt zeigt sich trotz Bestimmung anhand von Wiederfindungsraten mit entsprechenden Referenzglucosinolaten und wird damit als valide angesehen. Folglich kann eine Aufreinigung über DEAE Sephadex[®] A-25 vernachlässigt werden, da zum einen geringere Ergebnisse erzielt werden, zum anderen die so erhaltenen Chromatogramme keine deutlichen Verbesserungen in der Trennleistung im Vergleich zu nicht aufgereinigten Proben zeigen. In Abbildung 8-2 sind die Unterschiede der GSL-Gehalte bezugnehmend auf unterschiedliche Probenbehandlung am Beispiel zweier vergleichbarer Proben (K5, blau und SP2, rot) verdeutlicht. Hier zeigt sich zusammenfassend, dass die Gehalte in lyophilisierten Proben grundsätzlich auf höherem Niveau liegen und die niedrigsten Werte in frischen, aufgereinigten Proben zu finden sind.

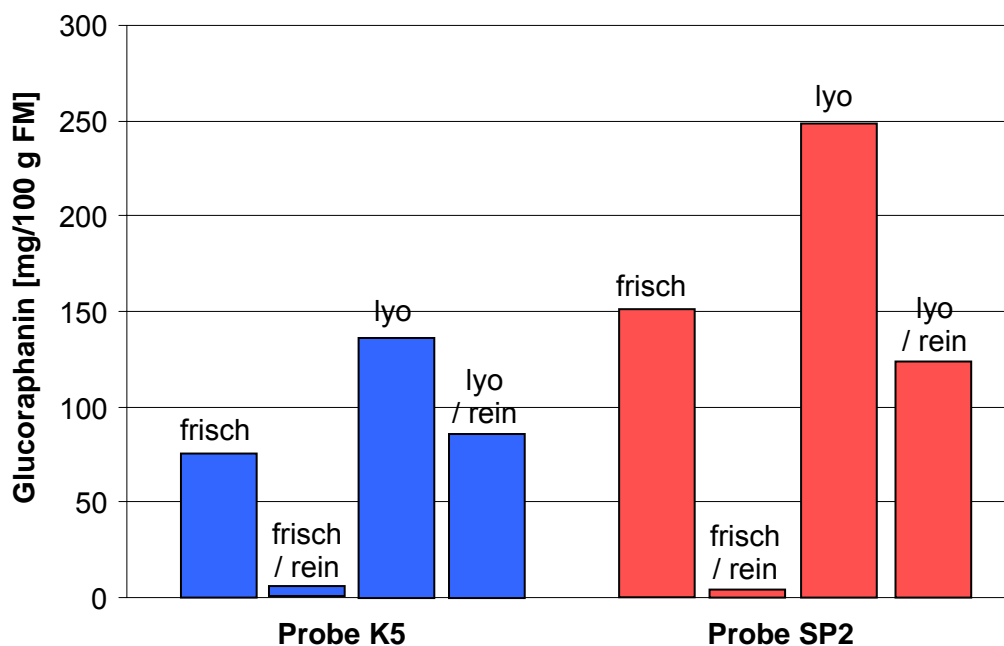


Abb. 8-2 Vergleich der Glucoraphaningehalte [mg/100 g FM] in frisch bzw. lyophilisiert (lyo) extrahierten, direkt bzw. über DEAE Sephadex[®] A-25 aufgereinigt analysierten Extrakten der Proben K5 (BroccoCress[®]) und SP2 (Broccosprouts[®]) detektiert mittels HPLC Methode 2, s. Kap. 4.3.2

Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass beide Methoden zur Quantifizierung von intakten GLS eingesetzt werden können. Allerdings gibt es deutliche Unterschiede innerhalb der verschiedenen Aufarbeitungsmethoden, wobei für eine maximale Extraktion der GSL im vorliegenden Pflanzenmaterial entgegen der Rucola-Proben die Gefriertrocknung am besten geeignet ist. Diese Aussage wird durch die Tatsache gestützt, dass in vergleichbaren Arbeiten zu diesem Thema das analysierte Probenmaterial ebenfalls lyophilisiert eingesetzt wurde (MORENO et al. 2006).

Die mittels dieser Analytik gewonnenen Ergebnisse reihen sich insgesamt gut in bereits publizierte Daten ein und zeigen somit verlässliche Gehalte in den in dieser Form erstmalig untersuchten Kresse-Züchtungen.

In den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Kressen und Sprossen zeigen die Proben K5 (BroccoCress[®]) und SP2 (Broccosprouts[®]) das in der Literatur für Brokkoli beschriebene typische Glucosinolatprofil aus Glucoraphanin, Glucoerucin und Glucoiberin (FAHEY et al. 1997, PRESTERA et al. 1996). Die Gehalte stimmen weitgehend mit der Arbeit von WEST et al. (2004) überein. So entsprechen die detektierten hohen Gehalte an Glucoraphanin in lyophilisiertem Probenmaterial den von WEST et al. (2004) und TIAN et al. (2005) ermittelten Gehalten von 58,1-190,4 mg/100 g FM. Der vom Hersteller ausgelobte Gehalt an Glucoraphanin von 225 mg/100 g wurde in lyophilisiertem Material der Probe BroccoCress[®] nahezu bestätigt. Geringe Abweichungen sind möglicherweise auf Gehaltsschwankungen im pflanzlichen Material sowie auf Verluste bei Transport oder Lagerung zurückzuführen (VALLEJO et al. 2003). Untersuchungen von TIAN et al. (2005) ergaben Gehalte an Glucoiberin in Brokkolikeimlingen von 25,3 mg/100 g FM und an Glucoerucin von 42,9 mg/100 g FM. Diese Werte sind vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Gehalten in lyophilisierten Proben.

Die Extrakte der Proben K6 (Daikon Cress[®]), K9 (Sakura Cress[®]), SP5 (Radieschensprossen), SP6 (Rettichsprossen) sowie SP8 (Sangosprossen) zeigen stark variierende teilweise sehr hohe Gehalte an Glucoraphenin von bis zu 5327 mg/100 g FM. Dieses Glucosinolat wird zusammen mit Glucoraphanin als Majorkomponente in Keimlingen der Gattung *Raphanus sativus* dargestellt (CARLSON et al. 1985), was eine Zugehörigkeit der hier untersuchten Proben zu

dieser Pflanzengattung wahrscheinlich macht. Auch Ergebnisse aus Arbeiten von SCHÜTZE et al. (1999) zeigen im Saatgut verschiedener Rettichsorten und artverwandter Kreuzungen hohe Gehalte an Glucoraphenin. Aussagen von BARILLARI et al. (2005), welche bereits in 10 Tage alten Sprossen aus Daikonrettich einen deutlichen Übergang von Glucoraphenin zu dem in adulten Pflanzen vorherrschenden 4-Methylthio-3-butenyl-GSL feststellten, können dagegen mit den hier gewonnenen Ergebnissen Mangels Standardmaterial und sehr hohen detektierten Gehalten an Glucoraphenin nicht bestätigt werden. Offensichtlich war das Probenmaterial zu jung für die beschriebene Konversion. Da man in der Literatur vergeblich nach Gehaltsangaben für intakte GLS in neueren Zuchtformen des Daikon-Rettichs, wie z. B. Sakura Cress[®], einer mit Anthocyanen angereicherten lila Variante der Daikonkresse, oder Sangosprossen sucht, stellen die hier gefundenen Gehalte die Ergebnisse der erstmaligen Untersuchung dieser Proben dar. Hierbei bleibt zu erwähnen, dass die in den analysierten rettichartigen Kressen ermittelten GSL-Gehalte erwartungsgemäß im oberen Bereich der hier analysierten rettichartigen Proben liegen (ISHII et al. 1989).

Eine weitere Probe, hier als Kresse K7 (Mustard Cress) bezeichnet, enthält Sinigrin, ein Glucosinolat, welches in großen Mengen in Samen von braunem (*Brassica juncea*) und schwarzem Senf (*Brassica nigra*) vorkommt, und dessen korrespondierendes ITC Allylisothiocyanat für den Schärfeeindruck in Speisesenf verantwortlich ist. In den Extrakten der Probe K7 fanden sich Gehalte an Sinigrin von 0,1 bis 15,8 mg/100 g FM. Verglichen mit den Werten aus Untersuchungen von ZRYBKO et al. (1997), durchgeführt an Blatt- und Stengelgewebe (80 und 100 mg Sinigrin/100 g FM) sowie Samen (880 mg Sinigrin/100 g FM) der Senfart *Brassica juncea*, nehmen sich die detektierten Gehalte ausnehmend gering aus. Die detektierten Konzentrationen sowie das Nichtauffinden von Sinalbin als Indikator für gelbe Senfsaat (*Sinapis alba*) lassen bei Mustard Cress auf eine nur weitläufig mit Senf verwandte Pflanzenkreuzung schließen. Die GSL-Gehalte in Mustard Cress wurden bisher noch nicht quantifiziert, es wären aber deutlich höhere Gehalte zu erwarten gewesen, wenn eine direktere Verbindung – wie sie sich aus dem Namen des Produktes ableiten lässt – zur Senfpflanze bestehen würde.

Im Vergleich mit diesen Neuzüchtungen wurde im Rahmen dieser Arbeit außerdem eine „herkömmliche“ Kresseprobe (*Lepidium sativum*, Gartenkresse) analysiert. Wie in der Literatur dargestellt, wurde auch hier die Major Komponente Glucotropaeolin mit geringen Mengen an Gluconasturtiin identifiziert (BENNETT et al. 2004). Zusätzlich wurde das Glucosinolat Sinalbin detektiert, welches bisher in der Literatur nicht im Zusammenhang mit Gartenkresse erwähnt wird. Die Gehalte der Hauptkomponente Glucotropaeolin liegen mit Werten zwischen 0,1 und 386 mg/100 g FM deutlich unter den von BENNETT et al. (2004) ermittelten Gehalten von 6100-8200 mg/100 g TM in Samen der Gartenkresse. KASSIE et al. (2002) geben die Konzentration an Glucotropaeolin in frisch gezogener Gartenkresse sogar mit 8000 mg/100 g an. Die in Rahmen dieser Arbeit ermittelten geringen Gehalte beruhen im Vergleich zu Ersteren auf der vielfach beschriebenen Abnahme des Gehaltes an meist aliphatischen Glucosinolaten im Verlauf des Pflanzenwachstums (FAHEY et al. 1997).

Ein Vergleich der durchgeführten unterschiedlichen Analysemethoden zeigt insbesondere im Fall von Gartenkresse bzw. dem GSL Glucotropaeolin deutliche Unterschiede zwischen den eingesetzten Säulenmaterialien C18-Ether und HILIC, was vermuten lässt, dass die hydrophile Interaktionschromatographie für das zyklische Benzyl-GSL deutlich besser geeignet ist. Dieser signifikante Unterschied wurde für die übrigen GSL nicht festgestellt.

Beim Vergleich der Daten mit Ergebnissen der Analyse des gleichen Probenmaterials mittels GC-SIM-MS auf ITCs wurden bis auf wenige Ausnahmen die erwarteten Abbauprodukte detektiert.

In den Proben SP2 (Broccosprouts[®]) und K5 (BroccoCress[®]) wurden die für Brokkoli charakteristischen ITCs Sulforaphan und Methylthiobutyl-ITC identifiziert, wobei ersteres in der BroccoCress[®] unter der Nachweisgrenze lag und somit nicht quantifizierbar war. Zu beachten ist hierbei der Umstand, dass trotz ausgelobter Sulforaphanquelle (Sulforaphan-Glucosinolat) das ITC nicht in auswertbarer Menge detektierbar war. Für eine gewünschte Sulforaphanzufuhr bedarf es also entweder einer ausgiebigen Kauaktivität zur Aktivierung der pflanzeigenen Myrosinase oder des Vertrauens auf eine endogene Myrosinaseaktivität. Im vorliegenden Fall (K5) scheint zusätzlich die pflanzeigene Myrosinase in ihrer Aktivität behindert oder

nahezu vollständig ausgeschaltet zu sein, da das von uns zugrunde gelegte Analysenverfahren auf die Freisetzung der ITCs aus GSL abzielt.

Im Falle von Probe SP2 (Broccosprouts[®]) konnten erwartungsgemäß Gehalte (36 mg/100 g FM) an Sulforaphan detektiert werden. Dies steht in guter Übereinstimmung zu Ergebnissen von FAHEY et al. (1997), die Brokkolisprossen im Vergleich zu adultem Material als optimale Quelle zur Bereitstellung von Sulforaphan sehen. Dies zeigt sich auch in Arbeiten von LIM et al. (2009), welche in Brokkolipflanzen eine stetige Abnahme an Sulforaphan von 14,5 mg/100 g bis 0,8 mg/100 g FM mit steigendem Alter der Pflanze (von 5 Tagen bis 9 Wochen) feststellten.

Die der Gattung *Raphanus sativus* (Rettich) zugeordneten Kressen K6 bzw. K9 und Sprossen SP5, SP6 sowie SP9 enthielten analog zu dem über Analyse mittels HPLC ermittelten Precursor-GSL Glucoraphenin das Isothiocyanat Sulforaphen (4-Methylsulfinyl-3-butenyl-ITC). Gaschromatographisch konnten die erwarteten Gehalte an Sulforaphen nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein einheitliches Bild, wobei nicht bestätigt werden konnte, dass die Unterart Daikon sich – wie von ISHII et al. (1989) dargestellt – durch höhere Gehalte dieses ITCs auszeichnet.

Probe K7 (Mustard Cress) zeigte mittels GC-MS Gehalte an Allyl-ITC, was auch aus den Untersuchungen der intakten GSL gefolgert werden konnte. Hier ist ebenfalls aber nur ein sehr geringer Gehalt an Allyl-ITC von 4 mg/100 g feststellbar. Die Gründe hierfür sind wiederum in verringerter oder fehlender pflanzlicher Myrosinase-Aktivität zu suchen. Zusätzlich stützt der Befund die hier bestehenden Zweifel, dass die Pflanzenart der Probe K7 nahe mit Senf verwandt sein kann. Denn Vergleiche mit der Literatur (TSAO et al 2002) zeigen für Senf Gehalte an Allyl-ITC von 10-85 mg/100 g. Zu beachten ist allerdings, dass sich diese Ergebnisse auf unterschiedlich behandeltes und verarbeitetes Saatgut beziehen (BENNETT et al. 2004).

Im Fall der Gartenkresse (K1) wurden drei intakte GSL detektiert (Glucotropaeolin, Gluconasturtiin und Sinalbin). Konsequenterweise sollten im GC-Analysenverfahren die Verbindungen Benzyl-ITC, Phenylethyl-ITC und *p*-Hydroxybenzyl-ITC nachgewiesen werden. Diese Annahme wurde nur für Benzyl-ITC bestätigt. Der

Grund hierfür ist wiederum in mangelnder Myrosinaseaktivität zu suchen. Weiterhin zeigt dieses Ergebnis deutlich die offenbar unterschiedlichen Affinitäten pflanzlicher Myrosinase zu den GSL-Substraten. Zu bemerken beliebt, dass es sich bei *p*-Hydroxybenzyl-ITC um eine instabile Substanz handelt, die folglich nicht als Referenzsubstanz erhältlich ist. Dies kann ebenfalls ein Grund für die Nichtdetektion dieses ITC sein. Das Fehlen auswertbarer Mengen an Phenylethyl-ITC ist mit anderen Arbeiten vergleichbar, im Rahmen derer ebenfalls lediglich Benzyl-ITC nachgewiesen wurde. Der gefundene Gehalt an Benzyl-ITC in Probe K1 (158 mg/100 g) liegt im Bereich der in diesen Arbeiten ermittelten Gehalte an Benzyl-ITC von 28 mg/l bzw. 264-1134 mg/100 g in Kressesaft bzw. Pflanzenmaterial (KASSIE et al. 2002, GERENDÁS et al. 2008).

Die Proben K2-K4, K8, K10, K12 sowie SP1, SP3, SP4, SP7 der hier analysierten sehr heterogenen Gruppe an Kressen und Sprossen enthielt dagegen keines der analysierten Glucosinolate bzw. Isothiocyanate. Kresse und andere Pflanzenkeimlinge werden meist aus sensorischen Gründen angeboten, finden aber auch wegen ihres dem Verbraucher suggerierten gesundheitlichen Nutzens über sekundäre Inhaltsstoffe wie GSL und deren Abbauprodukte mehr und mehr Interesse bei diesem. Eine Unterscheidung verschiedener Pflanzenarten erfährt der Konsument dabei nicht notwendigerweise, was jedoch im Bezug auf die Abhängigkeit der Zusammensetzung an SPIs von der Pflanzengattung als unbedingt notwendig anzusehen ist, sodass Bezeichnungen wie „Tahoon[®] Cress“ (K12) oder „Atsinacress“ (K3) ein hohes Potential haben, den Verbraucher zu täuschen.

Für die Aufnahme von GSL bzw. ITCs bedarf es in diesem Fall des Verzehrs von Pflanzenmaterial der Gattung der Kreuzblütler (*Cruciferae*) (FAHEY et al. 2001). Das Nichtauffinden relevanter Gehalte dieser SPIs legt den Verdacht nahe, dass es sich bei den anderen Proben um Pflanzen anderer Gattungen handelt.

Aber auch bei den GSL-haltigen Proben ist ein Verweis auf die biologische Wirksamkeit als kritisch anzusehen, da tatsächlich präventive und therapeutische Wirkungen in physiologisch nachweisbaren Dosen bisher lediglich für in Gartenkresse (KASSIE et al. 2002), Brunnenkresse (ROSE 2000), Broccolisprossen (FAHEY et al. 1997, SHAPIRO et al. 2001) sowie Daikonsprossen (PAPI et al. 2008, BARILLARI et al. 2008) enthaltene ITCs beschrieben wurden. Allerdings wäre im

Weiteren zu untersuchen, ob die bislang relativ unbekanntes nicht zur Gattung der Brassicaceen zählenden hier untersuchten „*Micro-Greens*“ möglicherweise andere gesundheitlich positive Komponenten bzw. mit der aktuellen Methodik nicht erfasste Glucosinolate oder Isothiocyanate enthalten. Auch werden hinsichtlich eines potentiell verbesserten chemoprotektiven Potentials immer neue Kreuzungen bekannter *Brassica*-Spezies gezüchtet (LIM et al. 2009, SCHÜTZE et al. 1999), wobei festzuhalten bleibt, dass dem Verbraucher zum Schutz vor Täuschung eine Unterscheidung der Produkte im Bezug auf deren tatsächlich zu erwartenden Gehalt an Glucosinolaten nahegebracht werden sollte.

8.3.3 Rettich und Radieschen

Als Ergänzung zu den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Kressen und Sprossen der Gattung *Raphanus sativus* wurden 6 Proben handelsüblichen Rettichs bzw. Radieschen als dessen kleinere Unterart bestimmt. Die Analyse des Pflanzenmaterials erfolgte hierbei lediglich mittels GC-MS.

Als Major Komponente in adulten Wurzeln von *Raphanus sativus* wird im Gegensatz zu jungen Schösslingen 4-Methylthio-3-butenyl-ITC bzw. dessen Precursor Glucoraphsatin (Dehydroglucoerucin) beschrieben (SCHÜTZE et al. 1999). Dieses wurde in den bisher bekannten glucosinolathaltigen Pflanzen ausschließlich in der Gattung *Raphanus sativus* nachgewiesen, was es gleichzeitig zu einem geeigneten Marker zur Identifizierung dieser Pflanzenfamilie macht (CARLSON et al. 1985, MONTAUT et al. 2010). Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit analysierten Rettich- und Radieschenproben enthalten dieses ITC in teilweise großer Menge. Hierbei lassen sich zudem Unterschiede zwischen Rettich und Radieschen finden, da die Rettichproben (RE1-RE3) im Mittel deutlich mehr 4-Methylthio-3-butenyl-ITC enthalten als die Radieschenproben RA1 und RA2. Allerdings können sortenspezifische Unterschiede gravierend sein. So stellt Probe RA3 (Eiszapfen) eine Ausnahme dar, da hier verhältnismäßig hohe Gehalte an 4-Methylthio-3-butenyl-ITC festgestellt wurden. Auch wurde das in der Literatur ebenfalls für adulte Pflanzen beschrieben 4-Methylthio-3-butenyl-ITC (BLAŽEVIĆ und MASTELIĆ (2009) detektiert, welches auch in allen Rettichproben enthalten ist. Dies legt den Schluss nahe, dass die zu den Radieschen zählende weiße Varietät ‚Eiszapfen‘ (Ra3) wohl dem weißen Rettich näher verwandt ist als den üblichen roten Radieschensorten. Ob hier ein Zusammenhang zwischen Farbausprägung und ITC-Zusammensetzung

besteht, kann aufgrund der geringen Probenbreite allerdings nicht ausreichend geklärt werden.

Da im Rahmen dieser Arbeit mit den Proben K6 bzw. K9 und SP5, SP6 sowie SP9 sowohl juveniles als mit den Proben RA1-RA3 und RE1-RE3 auch adultes Pflanzenmaterial der Gattung *Raphanus sativus* analysiert wurde. Es zeigte sich, dass der Gehalt an Sulforaphen in adulten Pflanzen nahezu vollständig zugunsten des 4-Methylthio-3-butenyl-ITC umgewandelt worden war. Diese Tatsache zeigt einmal mehr die große Bedeutung des Pflanzenalters hinsichtlich Menge und Zusammensetzung der ITCs (BELLOSTAS et al. 2004). Aus Verbrauchersicht ist dies zudem hinsichtlich der Unterschiede im chemoprotektiven Potential bestimmter ITCs von Bedeutung. Für 4-Methylthio-3-butenyl-ITC sind z.B. cytotoxische bzw. Apoptose fördernde Eigenschaften auf bestimmte Linien von Krebszellen nachgewiesen (PAPI et al. 2008), für Sulforaphen ist dies bisher nicht eindeutig belegt.

8.3.4 Speisesenf

Speisesenf stellt ein Produkt dar, dessen Geschmack und charakteristische Schärfe zum großen Teil über Glucosinolate determiniert wird, und hierbei im Speziellen über das aus Sinigrin gebildete scharf schmeckende Allylisothiocyanat (STAHL et al. 2009a). Die Analyse der Speisesenfproben erfolgte hier mittels GC-SIM-MS-Detektion der Isothiocyanate. Es wurde nicht von einem Vorhandensein intakter GSL ausgegangen, da bei der industriellen Verarbeitung der Würzpasten im Allgemeinen eine vollständige Umwandlung derselben stattfindet (VERMEULEN et al. 2006).

Das aus dem Glucosinolat Sinigrin gebildete Allyl-ITC stellt übereinstimmend mit anderen Arbeiten (STAHL et al. 2009b, GERENDÁS et al. 2009, TSAO et al. 2002) in allen analysierten Senfproben die Majorkomponente dar. Daneben wurde das von Gluconasturtiin abgeleitete Phenylethyl-ITC nachgewiesen, wohingegen das ebenfalls in vielen Arbeiten, wenn auch in geringen Mengen, detektierte Benzyl-ITC aus Glucotropaeolin im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert wurde.

Die Betrachtung der Gehalte an Allyl-ITC zeigt hierbei eine deutliche Abhängigkeit zwischen Isothiocyanatkonzentration und Schärfeeindruck der Senfproben. So liegt der Maximalgehalt an Allyl-ITC (212 mg/100 g FM) bei Probe S5, welche als scharfe Senfsorte ausgewiesen ist. Ähnlich hohe Gehalte zeigen die beiden weiteren

Speisesenfproben S6 und S7, welche ebenfalls als „scharfer Senf“ deklariert wurden. Im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen liegen die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Gehalte an Allyl-ITC in scharfen Speisesenfsorten mit Mengen zwischen 205 und 212 mg/100 g FM deutlich über den von z. B. STAHL et al. (2009b) dargestellten Gehalten von etwa 122 mg/100 g FM. Der Vergleich der Gehalte (30 mg/100 g) der mittelscharfen Senfsorte (S3) mit der Literatur zeigte ebenfalls eine gute Übereinstimmung.

Süßer Senf (S4) weist mit 4 mg/100 g die geringsten Gehalte an Allyl-ITC auf, was ebenfalls mit den Ergebnissen von STAHL et al (2009b) übereinstimmt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Deklaration dieses Produktes als „süßer Senf“, dessen mildere Schärfe aus der anteilig deutlich größeren Menge gelber Senfsaat (*Sinapis alba*) resultiert, welche als Majorkomponente das Glucosinolat Sinalbin enthält (STAHL et al. 2009a). Dieses wird zu dem wenig stabilen 4-Hydroxybenzyl-ITC abgebaut (BOREK und MORRA 2005), welches aufgrund nicht im Handel erhältlicher geeigneter Referenzsubstanz im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu der hier analysierten Probe detektierten STAHL et al. (2009b) in vergleichbaren Produkten zudem in geringen Mengen Phenylethyl-ITC, welches hier nicht in auswertbaren Mengen nachgewiesen werden konnte.

Die leicht abweichenden Gehalte zu den von STAHL et al. (2009b) publizierten lassen sich mit unterschiedlichen Mengen der entsprechenden GSL in den Ausgangsmaterialien erklären (PALMER et al. 1988). Ebenfalls spielt die Herstellungstechnologie eine nicht zu unterschätzende Rolle hinsichtlich des GSL-Abbaus. So hat beispielsweise die Anwesenheit von Ascorbinsäure einen anregenden Effekt auf die Enzymaktivität (ETTLINGER et al. 1961, BONES und ROSSITER 1996) und somit auf die Umsetzung der GSL zu den für den Schärfeeindruck verantwortlichen ITCs. Zudem spielt der pH-Wert der Senfmaische eine große Rolle für die aus den GSL gebildeten Hauptabbauprodukte. Hier übt ein neutraler pH-Wert positiven Einfluss auf die Umsetzung zu ITCs aus, wohingegen in saurem Milieu verstärkt Nitrile (GIL und MAC LEOD 1980) oder andere Produkte gebildet werden, was sich letztendlich negativ auf Aroma bzw. Schärfe des Produktes auswirken könnte.

Auffallend ist das im Rahmen dieser Arbeit in allen Senfproben detektierte Isothiocyanat Sulforaphan, welches bisher nicht als typischer Vertreter in Senf (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* sowie *Sinapis alba*) geführt wird (DAXENBICHLER et al. 1991, FAHEY et al. 2001). Entgegen verschiedener Untersuchungen an Senfsaat oder Speisesenf (STAHL et al. 2009b, GERENDÁS et al. 2009, TSAO et al. 2002) wurde dieses Isothiocyanat im Rahmen dieser Arbeit teilweise in unerwartet großer Menge identifiziert. Diese Aussage kann als gesichert angesehen werden, da das entsprechende Signal sowohl in Retentionszeit als auch anhand charakteristischer Fragmentierung von m/z 72 und m/z 113 eindeutig mit der ebenfalls analysierten Standardsubstanz übereinstimmt (Abbildung 8-3). Zusätzlich gestützt wird diese Aussage durch Daten von AL-GENDY et al. (2001) bzw. VAUGHN und BERHOW (2005), welche mit m/z 72 und m/z 114 (unter Beachtung der geräteüblichen Ungenauigkeit) die für Sulforaphan charakteristischen Fragmente darstellen.

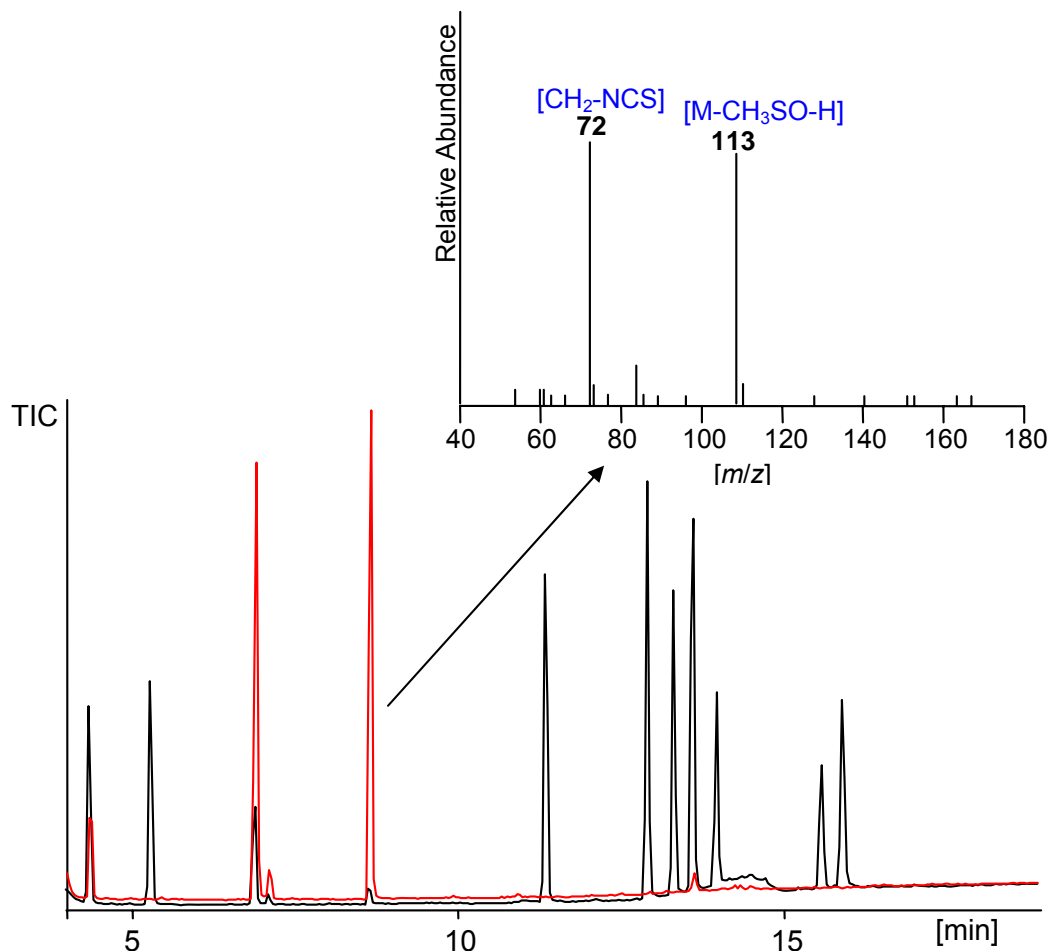


Abb. 8-3 Chromatogramm der Probe S6 (rot) im Vergleich zum Gesamtstandard (schwarz) sowie Aufnahme des Massenspektrums zur Retentionszeit 8,6 min detektiert mittels GC-SIM-MS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kapitel 5.2

Dass Sulforaphan bisher nicht in Speisesenf nachgewiesen wurde liegt an einer Fokussierung der Methoden auf die Major Komponente Allyl-ITC, die aufgrund ihrer Schärfe einen wichtigen Qualitätsparameter für das Produkt Speisesenf darstellt. Sulforaphan dagegen weist sehr milde Aromaeigenschaften auf und trägt nicht oder nur in sehr geringem Umfang zum Schärfegrad bei (CARTEA und VALESCO 2008).

Der lückenlose Herkunftsnachweis der detektierten Sulforaphans kann jedoch nicht geführt werden, da die Ausgangssubstanzen der Senfpaste nicht einzeln analysiert werden konnten. Da jedoch vermutlich keine der weiteren Zutaten in der tafelfertigen Würzpaste wie Essig, Salz oder Gewürze der Gattung der *Brassicaceae* zugehörig ist und diese zudem in anteilig vergleichsweise geringen Mengen zugesetzt werden, ist eine andere Quelle für das hier detektierte ITC eher vernachlässigbar.

Das Vorkommen von Sulforaphan in Speisesenf ist als positiv zu bewerten, da dieses ITC nicht nur ein sehr großes Potential in der Krebsprävention zeigt (FAHEY et al. 1997), sondern auch antibakterielle Eigenschaften aufweist (FAHEY et al. 2002), welche unterstützend auf die Lebensmittelstabilität gesehen werden könnten. Zudem könnte neben Allyl-ITC als Schärfeparameter über Sulforaphan ein zusätzlicher Marker für die Zusammensetzung der Senfisaaten gegeben sein, denn dieses konnte bisher nur in Produkten aus brauner Senfisaat (*Brassica juncea*) detektiert werden. Gelbe Senfisaat (*Sinapis alba*) enthaltender Süßer Senf dagegen enthält kein Sulforaphan. Somit sind mit der hier dargestellten Methode gleichzeitig Aussagen zu Schärfe und Zusammensetzung der Senfisaat als Qualitätsparameter in der Lebensmittelkontrolle möglich.

8.3.5 Meerrettich und Wasabi

Die Analyse der Meerrettich- und Wasabiprobe erfolgte analog zu denen des Speisesenfes mittels GC-SIM-MS-Detektion der Isothiocyanate. Das scharf schmeckende Allylisothiocyanat wird als Major Komponente nicht nur in Senfisaat und daraus gewonnenen Produkten beschrieben, sondern auch in Meerrettich bzw. dessen asiatischem Pendant Wasabi. Auch der Einsatz als würzende Pasten ist dem des Speisesenf vergleichbar. Daneben werden aufgrund der verstärkten Nachfrage nach Lebensmitteln, die geschmacklich der asiatischen Küche nachempfundenen sind, auch Chips oder andere Knabbereien mit Wasabi gewürzt angeboten.

Die Meerrettichproben M1-M4 wurden als verzehrsfähige Pasten analysiert, M5 diente als Vergleich hierzu in Form frisch zerkleinerter Meerrettichwurzel. Das qualitativ ermittelte ITC-Profil aller Proben ist hierbei identisch und weist neben der Hauptkomponente Allyl-ITC zusätzlich das für diese Pflanzengattung typische Phenylethyl-ITC auf. Dies stimmt mit Untersuchungen von GILBERT und NURSTEN (1972) überein, die diese ITCs als Majorkomponenten und hierbei als für die charakteristische Schärfe des Meerrettichs verantwortlich determinieren.

Die ITC-Gehalte in frischer Meerrettichwurzel (M5) liegen für Allyl-ITC mit 205 mg/100 g FM im oberen Bereich der von HORBOWICZ und ROGOWSKA (2006) ermittelten Gehalte (80-200 mg/100 g FM). Auch der Gehalt an Phenylethyl-ITC der hier analysierten Meerrettichwurzel (54,1 mg/100 g FM) stimmt gut mit Ergebnissen von KOSSON und HORBOWICZ (2008) überein, welche Gehalte von 40-45 mg/100 g FM ermittelten. SULTANA et al. (2003b) detektierten einen Gehalt von 165 mg Allyl-ITC bzw. 18 mg Phenylethyl-ITC je 100 g frischer Meerrettichwurzel, was im Vergleich zu den hier gewonnenen Ergebnissen deutlich niedriger liegt. Innerhalb der von SULTANA et al. (2003b) durchgeführten Versuchsanordnung wurden bereits sehr große Schwankungen zwischen den ITC-Gehalten zweier zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten verschiedener Jahre analysierten Meerrettichsorten festgestellt. Diese und ähnliche Arbeiten zur sortenbedingten Varianz (LI und KUSHAD 2004) bzw. über unterschiedliche Anzuchtbedingungen (HORBOWICZ und ROGOWSKA 2006) machen die großen Unterschiede zu der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Meerrettichsorte erklärbar.

Betrachtet man die Gehalte an Allyl-ITC in den analysierten Meerrettich-Würzpasten stellt man auch hier analog den Speisesenfproben einen Zusammenhang zwischen der detektierten Menge dieses Isothiocyanates und dem Schärfegrad der Proben fest, wobei alle Mengen an Allyl-ITC deutlich unter denen der frischen Meerrettichwurzel liegen. Die Proben mit einem in den Produktspezifikationen des Herstellers angegebenen Meerrettichanteil von 70-80 % enthalten Allyl-ITC in einer Menge von 80-103 mg/100 g tafelfertiger Meerrettichpaste (M1, M2 und M4), wohingegen die unter Zusatz von Sahne hergestellte Zubereitung M3 mit einem angegebenen Meerrettichanteil von 28 % lediglich vergleichsweise niedrige ITC-Gehalte von 48 mg/100 g FM enthält. Direkt vergleichbare Untersuchungen sind sich in der Literatur selten zu finden, da überwiegend die frische Meerrettichwurzel untersucht wurde und nicht die verzehrsfertige Paste. Bezieht man die hier

erhaltenen Ergebnisse jedoch auf den prozentualen Anteil an ITC im Produkt und vergleicht diese mit Ergebnissen aus Untersuchungen frischer Meerrettichproben, stimmen die Gehalte an Allyl-ITC in den Proben M1 – M4 auch auf quantitativer Ebene mit anderen publizierten Daten überein. Die Gehalte an Phenylethyl-ITC sind mit im Mittel 20 mg/100 g FM vergleichsweise hoch, was jedoch wiederum auf die enorme Variationsbreite verursacht durch Sortenunterschiede bzw. Anbaubedingungen zurückzuführen ist.

Wasabi weist ein dem Meerrettich ähnliches ITC-Profil auf, wobei die Hauptkomponente Allyl-ITC 90-93 % des Gesamt-ITC-Gehaltes ausmacht und insgesamt größere Mengen an ITCs enthalten sind. Dennoch können beide aufgrund ihrer Minorkomponenten sowohl über unterschiedliche Aromazusammensetzung wie auch analytisch hinsichtlich ihrer charakteristischen ITC-Zusammensetzungen unterschieden werden. Die neben Allyl-ITC dominierende Komponente Phenylethyl-ITC in Meerrettich ist beispielsweise in Wasabi nicht vertreten, wohingegen Meerrettich das in Wasabi in zweitgrößter Menge detektierte Pentenyl-ITC lediglich in vernachlässigbar geringer Menge enthält (SULTANA et al. 2003b).

Bei qualitativer Betrachtung der analysierten als Wasabi-haltig deklarierten Proben wurde wie erwartet die Majorkomponente Allyl-ITC nachgewiesen, daneben enthalten die Proben W1-W3 Phenylethyl-ITC, die Proben W3 und W4 zusätzlich das ITC Sulforaphan. Diese Ergebnisse sind insofern sehr auffällig, als das in teils größerer Menge detektierte Isothiocyanat Phenylethyl-ITC in Wasabi nicht vorhanden sein sollte, da es als typische Komponente für Meerrettich gilt. Weder SULTANA et al. (2003b) noch DEPREE et al. (1999) beschrieben dies in ihren Arbeiten für Wasabiprobe. Dies legt den Verdacht nahe, dass die als Wasabi deklarierten Produkte hauptsächlich aus Meerrettich hergestellt sind, welches mit Allyl-ITC in großer Menge die gleiche Schärfe Komponente aufweist, aber im Vergleich zu echter Wasabi-Wurzel weltweit vermarktet und zu wesentlich niedrigeren Preisen erworben werden kann. Alle hier untersuchten Proben werden gemäß ihrer Verkehrsbezeichnung als „Wasabipaste“ bzw. „Wasabipulver“ gehandelt, wobei die Proben W1-W3 in ihren Zutatenlisten in mehr oder weniger großen Anteilen Meerrettich enthalten.

Die Gegenüberstellung zweier Zutatenlisten von (a) „Wasabisoße“ und (b) „Sahnemeerrettich“ in Abbildung 8-4 macht die Analogien der Produkte hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe deutlich.

- (a) **Meerrettich, Rapsöl, Sahne (25%), Branntweinessig, Zucker,**
Molkenerzeugnis, Wasser, Jodsalz, **Wasabipulver (0,5%),** Karamelzuckersirup,
Säuerungsmittel: Citronensäure, Verdickungsmittel: Guarkernmehl und Xanthan,
Aroma, **Farbstoffe:** Chinolingelb und Brillantsäuregrün, Antioxidationsmittel:
Ascorbinsäure und Natriummetabisulfit
- (b) **Meerrettich (28%), Pflanzenöl, Sahne (25%), Branntweinessig, Zucker,**
Milcheiweiß, Jodsalz, Säuerungsmittel: Citronensäure und Ascorbinsäure,
Molkenerzeugnis, Stabilisatoren: Guarkernmehl und Xanthan, modifizierte
Stärke, Antioxidationsmittel: Natriummetabisulfit, natürliches Aroma

Abb. 8-4 Gegenüberstellung der Zutatenlisten von (a) Probe W1 (Wasabisoße) und (b) Probe M3 (Sahnemeerrettich)

Produkt W1 enthält lediglich zu einem vernachlässigbaren Anteil von 0,5% echten Wasabi bei nahezu gleicher Menge Meerrettich als ein Meerretticherzeugnis. Dies erklärt das Vorhandensein von Phenylethyl-ITC im vorliegenden Probenmaterial, erschwert allerdings die Zuordnung der Hauptaromakomponente Allyl-ITC zu den entsprechenden Pflanzengattungen *Armoracia rusticana* und *Wasabia japonica*. Da dies jedoch hinsichtlich der Qualität des Produktes von entscheidender Bedeutung ist, sind von Seiten der Lebensmittelkontrolle Methoden auch zur Ermittlung der prozentualen Anteile dieser Pflanzen im Produkt von Interesse.

Ein Ansatz hierzu könnte auch quantitativ über den Gehalt an Phenylethyl-ITC in der „Wasabi“zubereitung erfolgen. So wurde festgestellt, dass die Gehalte dieses Isothiocyanates in Abhängigkeit des im Produkt verarbeiteten Meerrettichanteils variieren. In Abbildung 8-5 ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt.

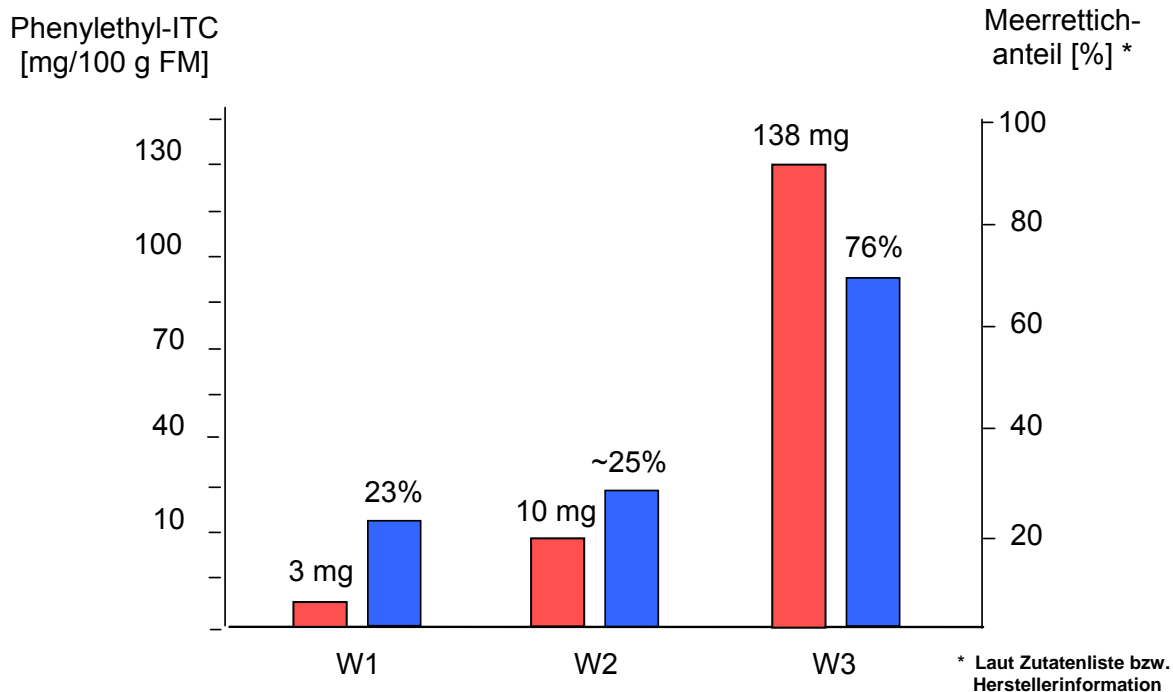


Abb. 8-5 Zusammenhang zwischen dem Anteil an Meerrettich [%] und dem detektierten Gehalt an Phenylethyl-ITC in mg/100 g FM dreier verschiedener Wasabiproben

Hieraus ergibt sich folglich die Möglichkeit, über eine direkte Korrelation zwischen Meerrettichanteil und Gehalt an Phenylethyl-ITC eine qualitätsbezogene Einstufung des LM vorzunehmen. Dieser Sachverhalt ist insofern von großer Bedeutung, da der Meerrettichanteil auf der Zutatenliste zwar angegeben ist, aber meist nur ungenügend wahrgenommen wird, bzw. nicht in allen Ländern in gleicher Weise kenntlich gemacht werden muss. Folglich kann es vorkommen, dass in ausländischen Produkten die prozentualen Anteile der wertgebenden Inhaltsstoffe nicht aufgeführt werden müssen, was einen Missbrauch noch wahrscheinlicher macht.

In den Wasabi-Proben W4-W6 konnte im Gegensatz zu den Proben W1-W3 sowie allen im Rahmen dieser Arbeit analysierten Meerrettichproben (M1-M5) kein Phenylethyl-ITC nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass diese Proben ausschließlich auf Basis von Wasabi hergestellt wurden.

Allerdings wurde in den aus reinem Wasabipulver hergestellten verzehrfertigen Pasten (W3 und W4) in Kombination mit den höchsten Gehalten an Allyl-ITC zusätzlich das ITC Sulforaphan detektiert. Das Auftreten dieses Isothiocyanates ist bislang in keiner vergleichbaren Untersuchung an Wasabiprodukten (SULTANA et al.

2003b, DEPREE et al. 1999) zu finden. Vergleicht man dies jedoch mit den im Rahmen dieser Arbeiten ermittelten teilweise hohen Sulforaphan-Gehalten in Speisesenf, liegt der Verdacht nahe, dass die untersuchten Wasabipulver (Proben W3 und W4) mit Senfpulver gestreckt wurden, welches neben Meerrettich ebenfalls Allyl-ITC als Majorkomponente enthält und so die gleichen Schärfeeigenschaften im Vergleich zu echtem Wasabi aufweist. Senfpulver ist in der Herstellung analog Meerrettich wesentlich günstiger als Wasabi, weshalb ein Einsatz desselben in den hier vorliegenden Proben als sehr wahrscheinlich – und im Falle der Probe W3 als über die Zutatenliste bestätigt – anzusehen ist.

Fasst man die hier ermittelten Ergebnisse aus Sicht der Lebensmittelsicherheit bzw. der Verbraucher zusammen, stellt man fest, dass in den wenigsten Fällen die Erwartungshaltung bzgl. eines mit „Wasabi“ bezeichneten Produktes mit den realen Gegebenheiten übereinstimmt. Im Rahmen dieser Arbeit kann lediglich bei den mit Wasabi aromatisierten Knabber-Erzeugnissen (W5 und W6) von einer ausschließlichen Verwendung dieser Pflanzengattung als schärfende Zutat ausgegangen werden. Die übrigen Produkte werden größtenteils auf der Basis von Meerretticherzeugnissen hergestellt, denen zum optischen Abgleich grüne Farbe beigemischt wurde. Trotz teilweiser Erwähnung von anderen Scharfstoffen wie Senf und Meerrettich in der Zutatenliste ist durch unterschiedliche Anteile die Möglichkeit der Irreführung des Verbrauchers gegeben. Wie in Abbildung 8-6 gezeigt, ist es jedoch im Rahmen unserer Analytik möglich, beide Gattungen anhand der typischen ITC-Muster chromatographisch zu unterscheiden, was ein zuverlässiges und sicheres Werkzeug hinsichtlich der Lebensmittelkontrolle darstellen könnte.

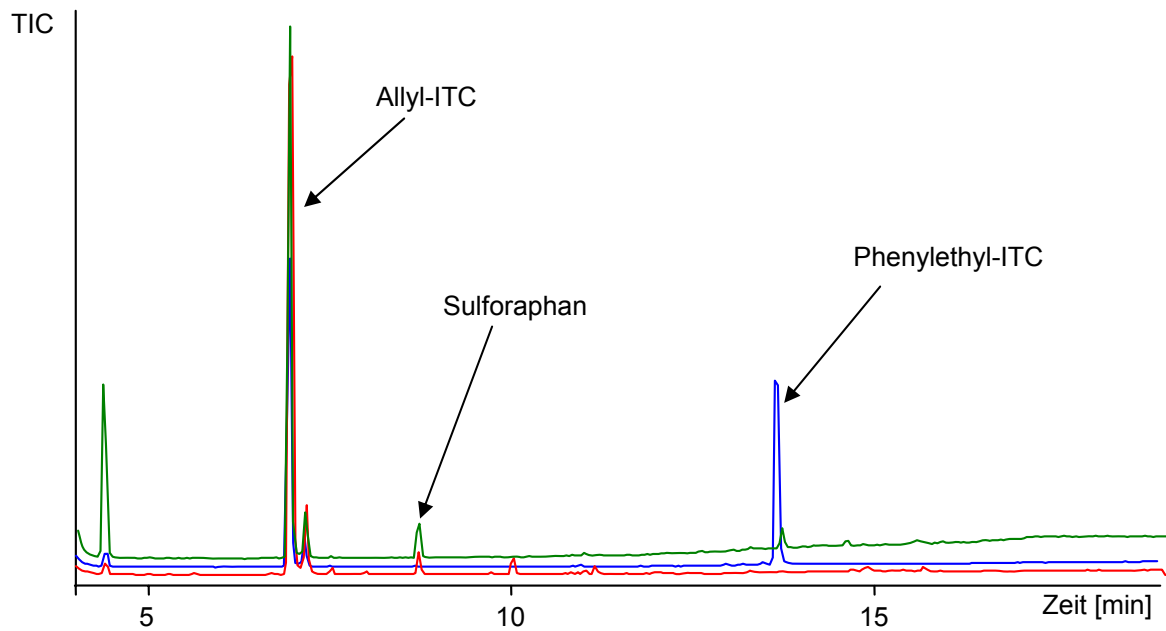


Abb. 8-6 Chromatogramm der ITCs einer Wasabiprobe W3 (rot) im Vergleich zu einer Meerrettichprobe M1 (blau) und Speisesenf S5 (grün) detektiert mittels GC-SIMS, Temperatur- und Druckprogramm s. Kap. 5.2

Zusätzlich hierzu könnte das im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Sulforaphan als Unterscheidungskriterium zwischen Wasabi, Meerrettich und beigemengtem Senf dienen, welcher ebenfalls Phenylethyl-ITC enthält aber als einzige der drei Pflanzen in nennenswerter Menge Sulforaphan. Somit wäre eine korrekte Zuordnung aller drei in Frage kommender Quellen des Allyl-ITC mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methodik einwandfrei möglich, was hinsichtlich der Authentizitätskontrolle von Wasabi in Lebensmitteln von großem Vorteil wäre.

8.3.6 Kapern

Kapern stellen eine Gruppe glucosinolathaltiger Pflanzen außerhalb der Gattung *Brassica* dar, welche zudem in einer eher unüblichen Zubereitungsform – in Salzlake fermentiert - angeboten werden. Dies macht diese Pflanzen interessant für die Analytik, da hier auch der Einfluss des Salzes auf das Verhalten von GSL bzw. ITCs dargestellt werden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Kapern wurden lediglich auf ihre Gehalte an ITCs untersucht, da man wie schon bei den pastösen Lebensmittelproben wie Senf, Meerrettich und Wasabi davon ausging, dass über die stattgefundenen Prozessierung die Glucosinolate komplett zu ihren Folgeprodukten abgebaut vorlagen.

In den Kapernproben KA1-KA5 konnten entgegen anderer Arbeiten keine der elf im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten ITC-Standardsubstanzen identifiziert werden. Mit Methyl-ITC, Isopropyl-ITC und Butyl-ITC lagen die in der Literatur als hauptsächlich auftretende Isothiocyanate und typische Geschmacksgeber der Kapern beschriebene ITCs zur Untersuchung vor (ROMEO et al. 2007, MATTHÄUS und ÖZCAN 2002). In unverarbeiteten Kapern stellt Glucocapparin (Methyl-GSL) das Precursor-GSL mit ca. 80 % des Gesamtglucosinolatgehaltes dar (MATTHÄUS und ÖZCAN 2002). In gesalzenem oder eingelegtem Gemüse kann es aber während technologischer Verarbeitungsprozesse zu Veränderungen dieses Gehaltes kommen. Zu hohe Temperaturen können beispielsweise die Enzymaktivität negativ beeinflussen und durch eine Hemmung des Enzyms Myrosinase die Umsetzung der Glucosinolate in ihre korrespondierenden ITCs vermindern (SUZUKI et al. 2006). Eine zu lange Fermentierung oder die Einwirkung hoher Temperaturen könnten zudem wegen der Flüchtigkeit der ITCs Gründe darstellen, weshalb im Probenmaterial KA1 bis KA4 keine ITCs identifiziert wurden. Allerdings scheint nicht jeder Herstellungsprozess im Falle der Kapern die ITCs vollständig zu zerstören, da in Untersuchungen von AFSHARYPUOR et al. (1998) bzw. AFSHARYPUOR und JAZY (1999) teilweise recht hohe Gehalte an Methyl-ITC, Butyl-ITC und Isopropyl-ITC detektiert wurden.

Um eine ohne hohe Temperaturen auskommende Methode des Fermentierens zu analysieren, wurden daraufhin direkt in Meersalz konservierte Kapern auf ihren ITC-Gehalt hin untersucht (Probe KA5), da beispielsweise TESORIERE et al. (2007) einen Gesamtisothiocyanatgehalt von 4,9 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ in gesalzenen Kapern nachwies. Entgegen diesen Ergebnissen wurden in der Probe K5 keine ITCs detektiert, wobei auch hier eine Beeinträchtigung der Aktivität des Enzyms Myrosinase als mögliche Ursache genannt werden kann. So lösen zu hohe Salzkonzentrationen evtl. Salzstress aus, woraufhin das Enzym inaktiviert wird und das Fehlen von ITCs im Produkt erklärt werden kann. Zudem findet unter Stress eine vermehrte Freisetzung indolischer GSL und deren Abbauprodukte statt (SUZUKI et al. 2006), welche nicht Gegenstand der vorliegenden Analyse waren.

8.3.7 Nahrungsergänzungsmittel

Nahrungsergänzungsmittel zum Ziel einer zusätzlichen Aufnahme gesundheitsfördernder Substanzen sind inzwischen weit verbreitet und für Vitamine, Mineralstoffe o. ä. bereits lange bekannt. Mehr und mehr drängen Produkte auf den Markt, die sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in konzentrierter oder isolierter Form enthalten. So wird beispielsweise die in Peru beheimatete Macaknolle (*Lepidium peruvianum*) in getrockneter und pulverisierter Form als Nahrungssupplement zur Leistungssteigerung angeboten. Da diese Pflanze auch große Mengen an GSL enthält, war sie für die im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Untersuchungen sehr interessant. Die Majorkomponente Glucotropaeolin in Kombination mit geringeren Mengen des entsprechenden Methoxy-Derivates machen das charakteristische und somit als Zuordnungskriterium in der Lebensmittel- und Arzneimittelüberwachung einsetzbare GSL-Profil dieser Pflanzengattung aus (FAHEY et al. 2001, MUHAMMAD et al. 2002). In sehr geringen Mengen enthaltene indolische Verbindungen wie Indol-3-ylmethyl-GSL und daraus entstehendes Indol-3-Carbinol (LI et al. 2001) wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt.

Alle im Rahmen dieser Arbeit analysierten macahaltigen Präparate (NEM4-NEM10, NEM13) wurden über HPLC-MS (Methode 2) und GC-SIM-MS analysiert. Dabei wurden die GSL Glucotropaeolin (K) und Methoxy-Glucotropaeolin (ME-K) mit deutlich variierenden Gehalten detektiert. Diese Schwankungen sind in erster Linie auf unterschiedliche Anteile an Macapulver in den Produkten zurückzuführen bzw. auf Unterschiede im Herstellungsprozess. Wie in Tabelle 8-1 dargestellt, sind niedrige Werte z. B. in NEM4 zu finden, welches lediglich zu 83 % aus Macaknolle besteht, bzw. in NEM13, welches zusätzlich andere Inhaltsstoffe enthält. Ein genauer Gehalt an Maca ist hier nicht deklariert, vergleicht man aber die Proben miteinander (Abbildung 8-7), kann davon ausgegangen werden, dass dieser mit 115 mg/100 g Glucotropaeolin bzw. 41,8 mg/100 g Methoxy-Glucotropaeolin deutlich geringer liegt. Andere Präparate werden als „100 % Macaknolle“ ausgelobt, was sich in vergleichsweise hohen Gehalten an entsprechenden GSL in beiden Fällen widerspiegelt. Man kann hieraus folgern, dass mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methodik zusätzlich zur Echtheitsbestätigung über die im MS detektierte Glucosinolatkombination Glucotropaeolin und dessen Methoxy-Derivat eine Abschätzung bei Macaprodukten auch hinsichtlich der eingesetzten Menge an

Macaknolle stattfinden kann, indem man die Gehalte an GSL mit dem prozentualen Anteil im Nahrungsergänzungsmittel korreliert.

Tab. 8-1 Deklarierte prozentuale Anteile an Macaknolle in den Proben NEM4-NEM10 sowie NEM13 und die ermittelten Gehalte an Sinalbin (I), Glucotropaeolin (K) und Methoxy-Glucotropaeolin (ME-K), chromat. Bedingungen s. Kap. 4.3.2

Probe	Deklariertes Anteil an Macaknolle (%)	Detektierte GSL-Gehalte im Produkt [mg/100 g]		
		I	K	ME-K*
NEM 4	83,0	21,4	150	52,0
NEM 5	100	21,3	399	156
NEM 6	96,0	22,5	251	75,3
NEM 7	89,0	25,8	248	100
NEM 8	100	38,2	462	116
NEM 9	81,8	35,0	280	78,9
NEM 10	56,8	46,6	202	58,1
NEM 13	k. A.	15,7	115	41,8

* berechnet als Glucotropaeolin (K)

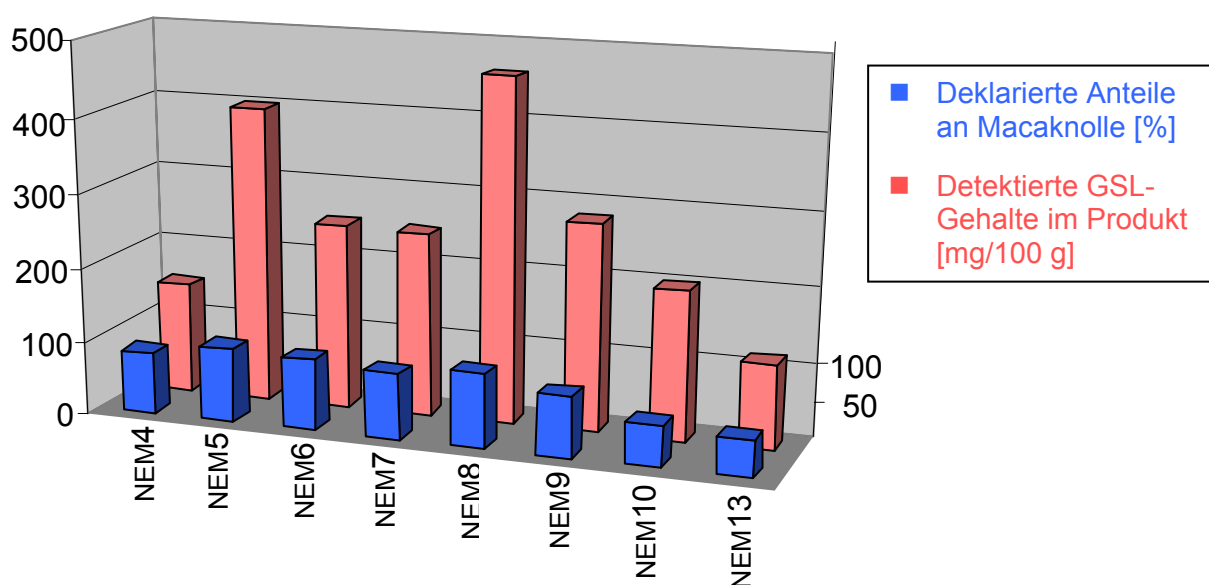


Abb. 8-7 Zusammenhang zwischen prozentualem Anteil an Macaknolle im Produkt und ermitteltem Gehalt an Glucotropaeolin [mg/100 g]; Werte vgl. Tab. 8-1

Die hier ermittelten Gehalte an Glucotropaeolin zwischen 115 und 462 mg/100 g sind als vergleichsweise hoch anzusehen. LI et al. (2001) detektierten einen Gehalt an Glucotropaeolin in getrockneter Macaknolle von 139 mg/100 g, was den hier dargestellten Ergebnissen sehr nahe kommt, aber deutlich im unteren Bereich der ermittelten Spannweite liegt. Man kann auch hier vermuten, dass bei der Herstellung der Maca-Präparate im Vergleich zu den von LI et al. (2001) untersuchten Proben

schonendere Technologien oder andere Ausgangsprodukte eingesetzt worden waren.

Zusätzlich fand man in allen Proben dieser Art das GSL Sinalbin, was bisher in dieser Gattung nicht detektiert werden konnte. Die Gehalte dieses als Majorkomponente in gelber Senfsaat vorkommenden GSL lagen bei 15,7-46,6 mg/100 g, wobei eine Korrelation mit der prozentual eingesetzten Maca-Menge in der Probe kaum zutrifft. Allerdings können auch hier die niedrigsten Gehalte in NEM13 bestimmt werden.

Neben der Analyse intakter Glucosinolate wurden auch die ITC-Gehalte dieser Proben mittels GC-MS bestimmt. Diese gelten als die eigentlichen bioaktiven Substanzen und müssen folglich optimal aus den in Tabletten bzw. Kapseln vorliegenden Nahrungsergänzungsmitteln freigesetzt werden. Davon ausgehend, dass zur Erhaltung der Precursor-GSL in den Produkten die pflanzeigene Myrosinase inaktiviert war, wurden die Proben im Vorfeld mit externer Myrosinase behandelt, um die Freisetzung von ITCs zu induzieren. So wurden in allen macahaltigen Proben die ITCs Benzyl-ITC und Methoxybenzyl-ITC gefunden. Das mittels HPLC identifizierte GSL Sinalbin bildet kein stabiles ITC, welches folglich nicht mit der hier angewandten Methodik detektiert werden konnte.

Arbeiten zu dem aus Glucotropaeolin abgeleiteten Benzyl-ITC geben in getrockneter Macaknolle Mengen von 3,2 mg/100 g an (PIACENTE et al. 2002). Das hier untersuchte Pulver weist mit Gehalten zwischen 87 und 317 mg/100 g Produkt ein Vielfaches dessen auf.

Methoxybenzyl-ITC wurde aufgrund fehlender Referenzsubstanz nicht quantifiziert, ein Peak bei einer Retentionszeit von 14 min konnte aber wie schon dessen Precursor-GSL auch mittels GC-MS anhand für diese Substanz charakteristischer Fragmentationen bei m/z 121 und m/z 179 eindeutig identifiziert werden. Diese Fragmente werden sowohl für *para*- als auch *meta*-Methoxybenzyl-ITC als typische Fragmentmuster dargestellt (KJÆR et al. 1963 und RAMALLO et al. 2004).

Neben den macahaltigen Präparaten gibt es eine Reihe weiterer Nahrungsergänzungsmittel, die unterschiedliche glucosinolathaltige Pflanzen in Form von Konzentraten, Extrakten oder Pulver enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Präparate enthielten Brokkoli (NEM1, NEM11), Meerrettich und Senf (NEM14),

Weißkohl (NEM2) oder Kapuzinerkresse (NEM3). Eine Probe (NEM12) war mit einem konkreten Gehalt an GSL aus unbekannter Quelle ausgewiesen.

In der Probe NEM1 aus getrockneten Brokkolisprossen wurden wie zu erwarten die GSL Glucoraphanin und Glucoerucin nachgewiesen, Glucoiberin war im Gegensatz zu den in vergleichbaren Proben SP2 (Broccosprouts[®]) bzw. K5 (BroccoCress[®]) ermittelten Ergebnissen nicht in auswertbarer Menge vorhanden. Eine niedrige Dosierung des entsprechenden Pflanzenmaterials als Lösung scheidet nahezu aus, denn in vergleichbaren Kresse- bzw. Sprossenproben wird Glucoerucin und Glucoiberin in etwa im gleichen Mengenbereich gefunden. Eine weitere Erklärung für das Fehlen von Glucoiberin in NEM1 könnte in der technologischen Verarbeitung des Pflanzenmaterials begründet liegen, da Glucoiberin z. B. im Gegensatz zu anderen GSL vergleichsweise thermolabil ist (CISKA und KOZŁOWSKA 2001) und der Trocknungsprozess eher auf die Major Komponente Glucoraphanin optimiert wurde, die hinsichtlich des gewünschten gesundheitlichen Potentials sicherlich von größerer Bedeutung für den Hersteller ist. Die mittels externer Myrosinase freigesetzten ITCs Sulforaphan und Methylthiobutyl-ITC bestätigen die Ergebnisse der HPLC-Analyse. Auch hier wurde kein Methylsulfinylpropyl-ITC detektiert.

Mit einem Sulforaphangehalt von 853 mg/100 g liegt ein für dieses Produkt sehr hoher Gehalt des entsprechenden ITC vor, was besonders hinsichtlich des postulierten krebspräventiven Potentials dieses Stoffes (FAHEY et al. 1997) positiv zu bewerten ist. Der Gehalt des GSL ist allerdings mit mind. 5 % angegeben, was im Rahmen dieser Analyse nicht bestätigt wurde. Dieser deutlich unter der Deklaration liegende Gehalt könnte in sorten- bzw. umweltbedingten Schwankungen im GSL-Gehalt der eingesetzten Brokkoli-Schösslinge begründet liegen (FAHEY et al. 2001). NEM11 stellt ein weiteres Brokkoli-Konzentrat enthaltendes Produkt dar. Im Gegensatz zu NEM1, welches Brokkoli als hauptsächlichen Bestandteil erhält ist dieses Produkt aus einer Vielzahl an Obst und Gemüse-Konzentraten zusammengesetzt, wobei der Anteil an Brokkoli lediglich 5,6 % ausmacht. Dies erklärt, warum innerhalb der hier durchgeführten Analysen weder intakte GSL noch die daraus gebildeten ITCs – obwohl im Falle von Sulforaphan auf der Verpackung ausgelobt – nachgewiesen werden konnten, da diese vermutlich aufgrund der geringen Menge unterhalb der Nachweisgrenzen lagen.

Nahrungsergänzungsmittel NEM14 zeigte bei der Analyse mittels HPLC-MS (Methode 2) die dem deklarierten Meerrettich-Senf-Extrakt entsprechende Komponente Sinigrin und zusätzlich v. a. in gelber Senfsaat enthaltenes Sinalbin. Das in Meerrettich zusätzlich enthaltene Gluconasturtiin dagegen wurde nicht gefunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass das enthaltene Sinigrin in der Hauptsache aus Senfsaat extrahiert wurde. Die Bestimmung der ITCs mittels GC-MS dagegen zeigte keine aus diesen GSL abzuleitende Substanz, was im Falle des aus Sinigrin gebildeten Allyl-ITC jedoch hätte erwartet werden können und daher als unüblich anzusehen ist. Möglicherweise erfolgte hier eine Spaltung des Sinigrin über die extern zugegebene Myrosinase nicht in ausreichender Form, da bekanntermaßen die Prioritäten unterschiedlicher Myrosinasen zu den entsprechenden Substraten unterschiedlich sind. Zudem war die Menge an Sinigrin im NEM möglicherweise zu gering und folglich die hieraus entstandenen Mengen an Isothiocyanat unterhalb der Nachweisgrenze. Auch könnten die äußeren Bedingungen bei dem hier analysierten Präparat eine Umsetzung der GSL zu anderen hier nicht analysierten Folgeprodukten bedingt haben, da es sich um ein Kombipräparat aus zahlreichen Pflanzenauszügen, Vitaminen und Mineralstoffen handelt und somit evtl. für eine ITC-Entstehung ungünstige pH-Werte bzw. Ascorbinsäure-Konzentrationen vorlagen (YEN et al. 1993, OHTSURU und KAWATANI 1979).

Weißkohl ist wie alle Kohlsorten Quelle verschiedener GSL wie Sinigrin, Glucotropaeolin, Sulforaphan, Glucoiberin oder Gluconasturtiin (TRONCOSO et al. 2005), aber auch einer Reihe an indolischen Substanzen wie z.B. Glucobrassicin, Neoglucobrassicin, 4-Methoxyglucobrassicin oder 4-Hydroxyglucobrassicin, welche mit zunehmenden Pflanzenalter die aliphatischen GSL übersteigen. Kapuzinerkresse enthält als Majorkomponente teils große Mengen an Glucotropaeolin (LYKKESFELDT und MØLLER 1993). Dies ließ für die Präparate NEM2 (Kohluppenkapseln) und NEM3 (Kapuzinerkressetabletten), welche ausreichende Mengen an entsprechenden Pflanzenauszügen enthalten, zumindest die Detektion der in beiden Pflanzengattungen vorkommenden aliphatischen GSL erwarten. Dies konnte jedoch weder durch Analyse mittels HPLC-MS noch durch die GC-MS-Analyse der Folgeprodukte entsprechend bestätigt werden. Zudem waren in den NEM über die Kopplung von HPLC und MS keine für indolische GSL typischen Massenfragmente (BENNETT et al. 2004) nachweisbar. Für das Fehlen jeglicher

Glucosinolate wie auch Isothiocyanate in diesen Präparaten gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. So könnte man vermuten, dass die in der Pflanze enthaltenen GSL bereits während der industriellen Verarbeitung verloren gegangen sein könnten. Zudem könnte im Fall des NEM2 ein der Trocknung vorausgegangenes Kochen des Kohls erfolgt sein, was den Gesamtgehalt an GSL nachweislich um etwa 50 % senkt, wobei der höchste Rückgang der GSL-Gehalte bereits nach 5 Minuten beobachtet werden kann (VOLDEN et al. 2008, ROSA und HEANY 1993). Unter Berücksichtigung der vorgesehenen Verwendung der Tabletten und Kapseln als wirksame Ergänzung der Nahrung ist ein solcher Vorgang unerwünscht, kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Das Fehlen dieser Substanzen mindert den Wert dieser Nahrungsergänzungsmittel und ist geeignet, den Verbraucher irrezuführen.

Auch das Präparat NEM12 - gemäß Deklaration „mit pflanzlichen Glucosinolaten“ - zeigte weder über HPLC-MS noch über GC-MS ein auf das Vorhandensein von Glucosinolaten oder ITCs deutendes Signal. Hierbei wurden neben den für die eingesetzten Referenzsubstanzen charakteristischen Massenfragmenten auf Fragmentmuster anderer evtl. für die Gesundheit relevanter GSL bzw. ITCs überprüft, welche in der Probe jedoch nicht nachzuweisen waren. Da die für dieses Produkt eingesetzten GSL oder ihre Quelle jedoch unbekannt sind, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass keine derartigen Substanzen im Präparat enthalten sind. Mögliche Abbaureaktionen im Vorfeld, welche das Fehlen von GSL in Pflanzenauszügen erklären können, sind in diesem Fall nicht sehr wahrscheinlich, da vermutlich Glucosinolate direkt in isolierter Form zugesetzt werden. Auch hier führt das Fehlen dieser Substanzen zu einer Wertminderung des Produktes und damit zu einer Irreführung des Verbrauches.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so ist der Versuch, eine gesteigerte Aufnahme von Glucosinolaten über Nahrungssupplemente zu erzielen, kritisch zu betrachten, da die tatsächlich enthaltenen Mengen dieser Inhaltsstoffe oftmals nicht mit den ausgelobten Gehalten übereinstimmen. Dies stellt die Eignung derartiger Präparate nicht nur in Frage, sondern bietet zudem Anlass, ihren Gebrauch als überflüssig zu bewerten.

Eine weitere Problematik der Zufuhr bioaktiver Substanzen über Nahrungssupplemente ist in der Form begründet, in welcher diese Stoffe im Produkt vorliegen. So kann davon ausgegangen werden, dass die Myrosinase in den zur Herstellung dieser Produkte eingesetzten Pflanzenextrakten inaktiviert wurde, um die intakten GSL im Produkt zu erhalten. Diese sind im Vergleich zu den eigentlich wirksamen Isothiocyanaten nicht flüchtig und sollen somit eine lange Haltbarkeit der Präparate ohne Substanzverluste gewährleisten. Da die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte enzymatische Erzeugung von ITCs aus diesen intakten GSL nicht in allen Fällen positiv war, führt eine Übertragung der erhaltenen Resultate auf den menschlichen Organismus zu der Hypothese, dass ein optimaler Aufschluss der in den Präparaten enthaltenen GSL, Absorption der biologisch aktiven Produkte und deren Wirkung am Zielort nur schwer gewährleistet werden kann. Zudem ist die Effektivität glucosinolathaltiger NEM stark von der individuell beschaffenen Mikroflora des Darms und der Aktivität der dort lokalisierten Myrosinase determiniert (KRUL et al. 2002). Diese endogenen Myrosinasen liegen zudem in ihrer Aktivität deutlich unter der pflanzeneigener Myrosinasen (YE et al. 2002, FIMOGNARI et al. 2008), was sich zusätzlich negativ auf die Bioverfügbarkeit solcher Nahrungsergänzungsmittel auswirkt.

Ein weiterer Kritikpunkt einer Supplementierung mit konzentriert oder isoliert vorliegenden GSL bzw. ITCs in Form von Nahrungsergänzungsmitteln ist das Risiko einer übermäßigen Aufnahme dieser Substanzen, welche Bereiche einer gesicherten Zufuhr übersteigt. Dieser Sachverhalt wird im Zuge einer Anreicherung bestimmter Pflanzen, und hier allen voran Brokkoli, über Züchtung oder Düngung bereits vielfach diskutiert. Studien an Tieren verdeutlichen ein konzentrationsabhängig gesundheitsschädliches Potential bestimmter ITCs und anderer Glucosinolat-Abbauprodukte (HEANEY und FENWICK 1995, KASSIE et al. 2000). Diese im Tierversuch eingesetzten relativ hohen Dosen der entsprechenden Substanzen könnten über eine Supplementierung zusätzlich zur täglichen Aufnahme von Glucosinolaten über die Nahrung durchaus erreicht werden. Vor diesem Hintergrund einer eventuell gesundheitlichen Beeinträchtigung bei sehr hohen Dosen und der noch nicht vollständig geklärten Wirksamkeit im menschlichen Organismus sind Notwendigkeit und Sinn einer Supplementierung mit Glucosinolaten bzw. ITCs kritisch zu hinterfragen. Weitere Studien sind notwendig, um die Auswirkungen einer

hohen Zufuhr an ITCs bzw. entsprechender glucosinolathaltiger Lebensmittel adäquat beurteilen zu können (MUSK et al. 1995).

8.3.8 *Moringa*-Proben

Die Pflanzengattung der *Moringaceae* stellt eine weitere Art GSL-liefernder Pflanzen dar, die hier enthaltenen mit Rhamnose glycosylierten GSL kommen in sonst keiner bekannten Pflanzenart vor. Hinsichtlich einer besseren Charakterisierung des großen gesundheitsfördernden Potentials dieser Gattung ist es notwendig, die Zusammensetzung an sekundären Inhaltsstoffen – und hier im Speziellen der GSL – zu kennen, um positive Wirkungen wie antikanzerogenes Potential oder antibakterielle Aktivität (FAHEY 2005) auf diese zurückführen zu können. Bisher sind diese GSL lediglich für die Gattungen *Moringa oleifera*, *Moringa peregrina* und *Moringa stenopetala* bestimmt, wobei sie nicht in isolierter Form erhältlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auf die Analyse der intakten GSL fokussiert, da ein großer Bedarf an diesen intakten und folglich unverändert weiter einsetzbaren Substanzen besteht.

Moringa oleifera gilt als bekannteste Art der Gruppe der *Moringaceae* und ist somit am Besten untersucht. Analog zu Arbeiten von BENNETT et al. (2003) wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels HPLC über Methode 2 in dieser Pflanzengattung die Inhaltsstoffe 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat sowie ein Monoacetyl-Derivat desselben ermittelt und anhand charakteristischer Fragmente mittels ESI-MS sicher identifiziert, nicht jedoch das in Samengewebe der entsprechenden Pflanzen zusätzlich nachgewiesene Benzyl-GSL. Das hier untersuchte Material stammt von getrockneten und vermahlenden Blättern dieser Pflanzengattung. Die hier gemachten Ergebnisse stimmen mit Arbeiten von BENNETT et al. (2003) überein, die Unterschiede bzgl. der GLS-Zusammensetzung in einzelnen Pflanzenteile feststellten, und hierbei in Blättern und Stamm-Teilen der Arten *Moringa oleifera* und *Moringa stenopetala* hauptsächlich 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat und 3 daraus abgeleitete Monoacetyl-Derivate nachwiesen. MEKONNEN et al. (2002) identifizierten in Proben von *Moringa stenopetala* neben 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat zusätzlich das Glucosinolat Glucoconringiin (2-Hydroxy-2-methylpropyl-GSL). Diese Verbindung konnte in den hier analysierten Proben nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise wurde dieses

GSL bereits während des Trocknungsprozesses degeneriert, da diese aufgrund struktureller Unterschiede weniger temperaturstabil als 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinolat und daraus abgeleitete GSL sein könnte.

Indirekte Nachweise der GSL in *Moringa peregrina* über Bestimmung der hieraus entstandenen flüchtigen ITCs mittels GC-MS zeigten die Substanzen Isopropyl-ITC, Isobutyl-ITC, 2-Methylpropyl-ITC, 4-(R-L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-ITC und 4-o-acetyl-4-(R-L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-ITC (KJÆR et al. 1979, DAXENBICHLER et al. 1991). Das hier analysierte Probenmaterial aus getrockneten Blättern von *Moringa peregrina* enthält in Übereinstimmung mit der Literatur Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat sowie das GSL Glucoputranjivin (Isopropyl-GSL). Diese Glucosinolate machen als Hauptkomponenten den größten Teil der GSL-Gehalte aus, was das Fehlen der anderen GSL im vorliegenden Probenmaterial mit Mengen unterhalb der Nachweisgrenze erklärbar machen könnte. In der Probe der *Moringa drouhardii* wurde lediglich das GLS-Isomer Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolat identifiziert. Daneben wurde ein auffälliges Signal bei m/z 623 detektiert, welches einem weiteren – im Rahmen der vorliegenden Methodik nicht näher zu identifizierenden – Acetyl-Isomer zugeordnet werden kann. Da die Analysen dieser *Moringa*-Art erstmalig durchgeführt wurden, ist kein direkter Vergleich mit der Literatur möglich. Die Verwandtschaft mit den anderen bereits in der Literatur aber auch in Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Arten von *Moringa* spp. lässt dennoch die Vermutung zu, dass die genannten Acetyl-Isomere in diesen Arten zu finden ist. Bezüglich des nicht näher bestimmten Isomers ist eine Strukturaufklärung mittels NMR vorgesehen, da es sich möglicherweise um ein neuartiges GSL handeln könnte.

Quantitative Aussagen zu den hier detektierten Glucosinolaten sind aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht möglich. Das in allen vier *Moringa*-Gattungen nachgewiesene Signal für Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-GSL lässt allerdings über die Peakflächenverhältnisse einen ungefähren Vergleich der Gehalte zu (Abbildung 8-8).

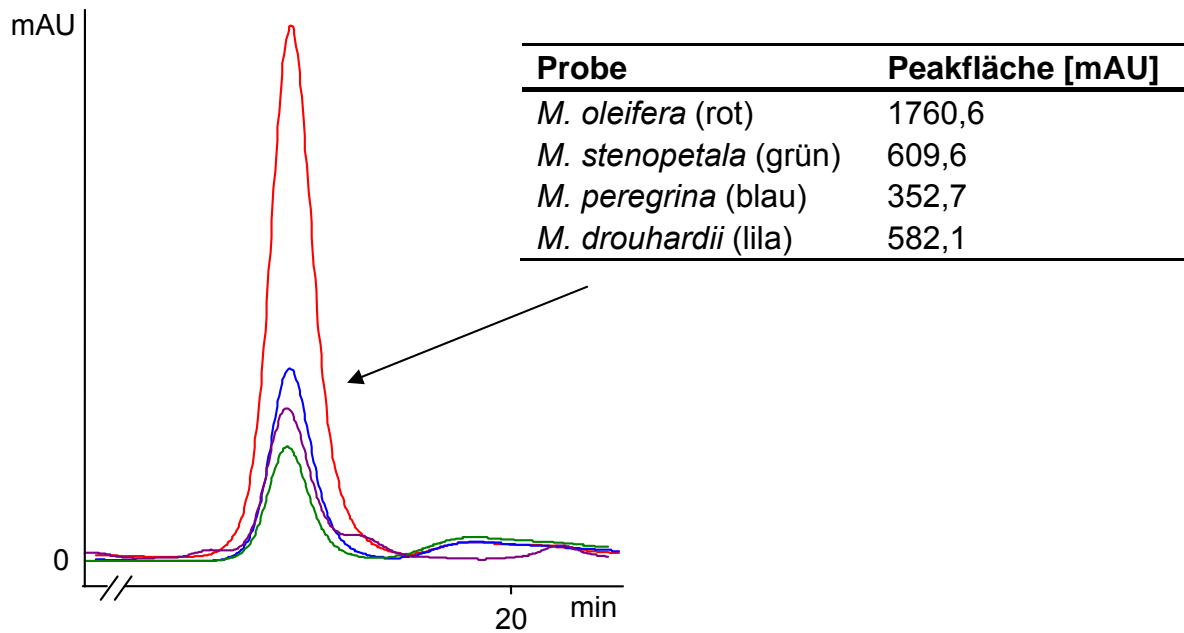


Abb. 8-8 Peakflächenvergleich des Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-GSL in Probenextrakten von *M. oleifera* (rot), *M. stenopetala* (grün), *M. peregrina* (blau) und *M. drouhardii* (lila)

Da die Einwaagen und die Injektionsvolumina der Probenextrakte für alle *Moringa*-Proben gleich waren, kann anhand der hier ermittelten Ergebnisse gezeigt werden, dass die Arten *Moringa oleifera* und *Moringa peregrina* wesentlich höhere Gehalte dieses GSL als die Art *Moringa stenopetala* aufweisen. Auch die Gattung *Moringa drouhardii* enthält diese Substanz, allerdings ebenfalls in deutlich niedrigerem Umfang als *Moringa oleifera*. Auch BENNETT et al. 2003 fanden in Blättern von *Moringa oleifera* mit 33,9 bzw. 59,4 mg/g TM deutlich höhere Gehalte dieses GSL als in *Moringa stenopetala* (5,3 bzw. 8,2 mg/g TM). Quantitative Bestimmungen der beiden anderen *Moringa*-Gattungen fehlen bislang in der Literatur. Ausgehend von den Mengen an Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-GSL, welches die Majorkomponente der GSL in der Gattung *Moringa* darstellt, können auch Aussagen bzgl. des Gesamtglucosinolatgehaltes getroffen werden. So lässt sich folgern, dass eher den Gattungen *Moringa oleifera* und *Moringa peregrina* – zumindest hinsichtlich der den GSL zugeschriebenen antibakteriellen sowie krebspräventiven Eigenschaften – ein gesundheitliches Potential zugeschrieben werden kann.

Allgemein sind bislang nur wenige Untersuchungen zu GSL in *Moringa* spp. und deren quantitativer Darstellung durchgeführt worden, was zum einen in der Art des Pflanzenmaterials begründet liegt, da diese Pflanzengattung in Europa nicht

heimisch und somit schwer verfügbar ist, zum anderen an fehlenden GSL-Referenzsubstanzen. Mittels der hier dargestellten Methode ist es jedoch möglich, auch in bisher wenig oder noch nicht untersuchten Pflanzengattungen wie *Moringa* spp. Glucosinolate zu identifizieren und über Massenspektrometrie auch strukturell zu charakterisieren. Künftig angedachte und mit der hier gegebenen Methodik sehr gut umsetzbare präparative Isolierungen der GSL aus *Moringa*-Probenmaterial weisen daher großes Potential bzgl. der Bereitstellung neuer Referenzsubstanzen auf. Dies ist besonders hinsichtlich eines Einsatzes solcher Substanzen im Tierversuch interessant, um so neue Aussagen über das gesundheitliche Potential der Pflanzengattung *Moringa* und hierbei über den genauen Wirkmechanismus der enthaltenen individuellen GSL treffen zu können.

9 Zusammenfassung

Es wurden zwei neue Methoden zur Trennung intakter Glucosinolate entwickelt, die auf unterschiedlichen Trennmechanismen beruhen. Zum einen wurde eine speziell zur Trennung polarer Substanzen modifizierte C18-Phase (Varian Polaris® C18-Ether) eingesetzt, zum anderen eine auf hydrophiler Interaktionschromatographie (Phenomenex Luna® HILIC) basierende Phase. Die Vergleiche mit verschiedenen Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse der intakten Glucosinolate in Lebensmitteln in der Literatur zeigen deutlich die Vorteile der hier verwendeten Methoden auf. So konnte mit Hilfe dieser Methoden bzw. Säulen eine vergleichsweise große Zahl an 14 intakten GSL getrennt und zusätzlich quantifiziert werden. Auch zeigten beide Phasen sehr gute Trennleistungen bei niedriger Nachweis- bzw. Detektionsgrenze.

Auf beiden HPLC-Säulen konnten die GSL Glucotropaeolin, Gluconasturtiin, Glucoerucin, Glucobarbarin, Gluconapin, Glucosibarin, Sinigrin, Sinalbin, Epiprogoitrin, Glucoraphenin, Glucoraphanin und Glucoiberin erstmalig innerhalb eines Laufes vollständig getrennt werden, auf Luna® HILIC zusätzlich zu diesen Progoitrin und Glucocheirolin.

Die HILIC-Phase bietet im Vergleich zur C18-Ether-Phase Vorteile, da sie bei kürzeren Analysenzeiten eine sehr gute Trennleistung erbringt. Zudem ist sie für HPLC-MS-Untersuchungen aufgrund des auf Acetonitril basierenden Ausgangsgradienten besser geeignet. Deshalb ist diese Phase für die Analytik von Substanzgemischen, deren Inhaltsstoffe unterschiedliche Polaritäten aufweisen, besonders gut einsetzbar.

Des Weiteren wurde eine Methode zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung und Quantifizierung von Isothiocyanaten in unterschiedlichen Probenmatrizes entwickelt, die bzgl. Analysendauer und Trennleistung vergleichbaren Untersuchungen deutlich überlegen ist. Hiermit gelang es erstmals, 11 Isothiocyanate in einem Lauf zu detektieren. Hierbei wurden die Isothiocyanate Methyl-ITC, Ethyl-ITC, Allyl-ITC, Sulforaphan, Phenyl-ITC, Benzyl-ITC, Methylthiobutyl-ITC, Phenylethyl-ITC, Methylthiopentyl-ITC, Methylsulfonylpropyl-ITC und Sulforaphen basisliniengetreunt.

Die entwickelten Methoden zur Bestimmung intakter GSL mittels HPLC sowie der daraus gebildeten Isothiocyanate mittels GC wurden auf unterschiedliche Probenmatrizes aus dem Lebensmittel- und Nahrungsergänzungsbereich übertragen.

Bei allen Proben aus dem Lebensmittelbereich wurden sowohl bzgl. der GSL als auch der ITCs gute Übereinstimmungen im qualitativen Vergleich mit in der Literatur dargestellten Profilen der entsprechenden Pflanzengattungen gefunden. Die indolischen GSL waren im Rahmen dieser Arbeit nicht nachzuweisen, da diese nicht als Referenzmaterialien zur Verfügung standen.

Untersuchungen an Rucola zeigten bzgl. der quantitativen Gehalte sowohl eine breite Streuung im Bereich der GSL-Gehalte als auch in den ITC-Mengen der unterschiedlichen Rucola-Sorten. Die Ursachen hierfür sind sowohl die nachweislich große sortenbedingte Varianz im GSL-Gehalt, wie auch die Abhängigkeit der Bildung dieser sekundären Inhaltsstoffe von Anbauzeitraum, -ort und -bedingungen. Zusätzlich unternommene Untersuchungen zum quantitativen Verhalten der GSL bei unterschiedlicher Prozessierung frischer Rucola-Proben ergaben keine deutlichen Abweichungen zu bei -20 °C gelagerten bzw. lyophilisierten Probenmaterialien. Letztere lagen im Vergleich etwas niedriger was zeigt, dass diese an sich sehr schonende Art der Prozessierung für Rucola weniger geeignet ist.

Die mittels der HPLC-Methoden detektierten Gehalte an intakten Glucosinolaten bzw. der mittels GC detektierten daraus entstandenen ITCs in Kressen und Sprossen verschiedener Pflanzengattungen liegen auch quantitativ in ähnlichen Bereichen wie in vergleichbaren Arbeiten dargestellt. Hierbei fallen insbesondere neuere Zuchtformen der Gattung *Raphanus sativus* oder *Brassica oleracea* auf, da sie teilweise sehr hohe Gehalte an GSL und daraus resultierender ITCs zeigen. Somit könnten sie hinsichtlich der postulierten positiven Wirkungen der ITCs auf den menschlichen Organismus von Interesse sein.

Mittels HPLC wurde zusätzlich die Wirkung verschiedener Probenvorbereitungen auf Unterschiede im GSL-Gehalt der Kressen und Sprossen untersucht. Hierbei zeigte eine vorhergehende Aufreinigung der intakten GSL aus der Probenmatrix über den in der EU-Standardmethode zur Aufreinigung eingesetzte Anionenaustauscher DEAE Sephadex[®] A-25 keine deutliche Verbesserung bei zudem deutlich niedrigerer Wiederfindung. Hingegen wirkte sich eine Lyophilisierung des frischen

Probenmaterials vor der Analyse positiv auf die GSL-Gehalte aus und kann somit als für die Probenvorbereitung optimal betrachtet werden.

Zudem war auffällig, dass lediglich in den der Gattung *Brassica* zugehörigen Proben GSL bzw. ITCs identifiziert wurden, was im Gegensatz zur Auslobung der Produkte durch die Hersteller steht. Auch hier zeigt sich die gute Eignung der eingesetzten Methodik, Sorten mit Gehalten an GSL bzw. gesundheitswirksamen ITCs von anderen abzugrenzen.

Die mittels GC-MS auf ihre Gehalte an ITCs analysierten pastösen Lebensmittel Senf, Meerrettich sowie Wasabi zeigten in ihren ITC-Gehalten ebenfalls teils erhebliche Abweichungen zur Literatur. Diese sind jedoch zum einen über die bereits genannte sorten- sowie umweltbedingte Varianz zu erklären, zum anderen über die nicht zu unterschätzenden Einflüsse während der Herstellung, wie Temperatur oder pH-Wert. Für die analysierten Senfproben konnte erstmalig Sulforaphan nachgewiesen werden. Dieser Befund ist im Hinblick auf das postulierte krebopräventive Potential dieses ITCs von Interesse.

Ferner ist es über die hier entwickelte GC-MS-Methode möglich, Wasabi, Meerrettich und Senfsaat anhand ihrer entsprechenden Nebenkomponenten zu unterscheiden. Dies ist hinsichtlich der Qualitätskontrolle von entscheidender Bedeutung. So werden häufig als „Wasabizubereitungen“ ausgelobte Produkte – bei gleicher Hauptaromakomponente (Allyl-ITC) – mit Meerrettich und Senf versetzt, weil dies zu deutlich reduzierten Herstellungskosten führt.

Als weiteres Lebensmittel wurden Kapern analysiert, die über Fermentation in Salzlake bzw. über direktes Einsalzen haltbar gemacht werden. Entgegen den Literaturbefunden wurden hier keine der als Referenzen vorliegenden GSL oder ITCs identifiziert, was einen völligen Verlust derselben über den Herstellungsprozess vermuten lässt.

Zusätzlich wurden die Methoden zur Detektion von GSL wie auch ITCs auf verschiedene Nahrungsergänzungsmittel angewandt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass besonders in macahaltigen Präparaten teils erhebliche Mengen an GSL vorhanden waren. In anderen Produkten waren jedoch trotz entsprechender Deklaration weder ITCs noch ihre Precursor-GSL nachzuweisen. Auch hier scheint die Herstellung der als Pulver oder in Tablettenform gepresst vorliegenden Präparate von Bedeutung für den Gehalt dieser Substanzen zu sein. Auffällig war zudem, dass

die Umsetzung der enthaltenen GSL *in vitro* zu den ITCs als ihren Hauptabbauprodukten nicht optimal erfolgte. Dies lässt darauf schließen, dass derartige Produkte vom menschlichen Organismus *in vivo* nur schwer aufgeschlossen werden können und ein gesundheitlicher Nutzen deshalb fraglich bleibt.

Die Analysen der bislang wenig untersuchten Pflanzengattung der *Moringaceae* brachten mit Hilfe der Kopplung von HPLC und MS neue Erkenntnisse in Bezug auf deren GSL-Profil. Insgesamt wurden vier verschiedene Gattungen der *Moringa* spp. untersucht (*M. oleracea*, *M. stenopetala*, *M. peregrina* und *M. drouhardii*). Dabei wurden erstmalig GSL in der Gattung *M. drouhardii* nachgewiesen. Die Analysen zeigten in Übereinstimmung mit bisherigen Literaturangaben hauptsächlich Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-GSL. Zusätzlich wurde in der Gattung *M. oleifera* das 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-GSL, in *M. peregrina* das GSL Glucoputranjivin nachgewiesen. Eine Quantifizierung der detektierten GSL konnte aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht durchgeführt werden. Ein Vergleich der Peakflächen des Monoacetyl-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl-GSL ließ jedoch ungefähre Aussagen zur Gesamtmenge an GSL zu. Dabei enthielten *M. oleifera* und *M. peregrina* deutlich größere Mengen als die anderen Gattungen. Somit kann eine größere gesundheitliche Bedeutung derselben postuliert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit entwickelten Analysemethoden zur Authentizitäts- und Qualitätskontrolle einer großen Zahl an frischen sowie prozessierten Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt werden können. Zudem ist über die hier dargestellte HPLC-Methodik die Isolierung und strukturelle Charakterisierung neuartiger, intakter GSL aus Pflanzen wie *Moringa* spp. oder aus diversen Matrices möglich.

Literaturliste

- AFSHARYPUOR S, KOOROSH J, JAZY AA (1998) First investigation of the flavour profiles of the leaf, ripe fruit and root of *Capparis spinosa* var. *mucronifolia* from Iran. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **72**: 307-309
- AFSHARYPUOR S, JAZY AA (1999) Stachydrine and Volatile Isothiocyanates from Unripe Fruit of *Capparis spinosa* L. *DARU* **7**: 11-13
- AL-GENDY AA, LOCKWOOD GB (2003) GC-MS analysis of volatile hydrolysis products from glucosinolates in *Farsetia aegyptia* var. *ovalis*. *Flavour and Fragrance Journal* **18**: 148-152
- BARILLARI J, CERVELLATI R, PAOLINI M, TATIBOUËT A, ROLLIN P, IORI R (2005) Isolation of 4-Methylthio-3-butenyl Glucosinolate from *Raphanus sativus* Sprouts (Kaiware Daikon) and Its Redox Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 9890-9896
- BARILLARI J, IORI R, PAPI A, ORLANDI M, BARTOLINI G, GABBANINI S, PEDULLI GF, VALGIMIGLI L (2008) Kaiware Daikon (*Raphanus sativus* L.) Extract: A Naturally Multipotent Chemopreventive Agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 7823-7830
- BELLOSTAS N, SØRENSEN JC, SØRENSEN H (2004) Qualitative and quantitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycles. *Agroindustria* **3**: 5-10
- BENNETT RN, CARVALHO R, MELLON FA, EAGLES J, ROSA EAS (2007) Identification and Quantification of Glucosinolates in Sprouts Derived from Seeds of Wild *Eruca sativa* L. (Salad Rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* L. (Wild Rocket) from Diverse Geographical Locations *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 67-74
- BENNETT RN, MELLON FA, BOTTING NP, EAGLES J, ROSA EAS, WILLIAMSON G (2002) Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutylglucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L. *Phytochemistry* **61**: 25-30
- BENNETT RN, MELLON FA, FOIDL N, PRATT JH, DUPONT MS, PERKINS L, KROON PA (2003) Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 3546-3553
- BENNETT RN, MELLON FA, KROON PA (2004) Screening crucifer seeds as sources of specific intact glucosinolates using Ion-pair High-Performance Liquid Chromatography negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 428-438

- BENNETT RN, ROSA EAS, MELLON FA, KROON PA (2006) Ontogenic Profiling of Glucosinolates, Flavonoids, and Other Secondary Metabolites in *Eruca sativa* (Salad Rocket), *Diplotaxis eruroides* (Wall Rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (Wild Rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish Rocket) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 4005-4015
- BIANCHI F, CARERI M, MANGIA A, MUSCI M (2007) Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness. *Journal of Separation Science* **30**: 563-572
- BLAŽEVIĆ I, MASTELIĆ J (2009) Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.). *Food Chemistry* **113**: 1-7
- BONES AM, ROSSITER JT (1996) The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum* **97**: 194-208
- BONES AM, ROSSITER JT (2006) The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* **67**: 1053-1067
- BOREK V, MORRA MJ (2005) Ionic Thiocyanate (SCN-) Production from 4-Hydroxybenzyl Glucosinolate Contained in *Sinapis alba* Seed Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 8650-8654
- BRADER G, TAS E, PALVA ET (2001) Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in Arabidopsis by culture filtrates of the non-specific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology* **126**: 849-860
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOFORSCHUNG (BfR) (2007) Risikobewertung macchaltiger Nahrungsergänzungsmittel, Stellungnahme Nr. 024/2007 des BfR vom 3. April 2007
- BURMEISTER WP, COTTAZ S, ROLLIN P, VASELLA A, HENRISSAT B (2000) High Resolution X-ray Crystallography shows that Ascorbate is a Cofactor for Myrosinase and Substitutes for the Function of the Catalytic Base. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 39385 - 39393
- BUROW M, BERGNER A, GERSHENZON J, WITTSTOCK U (2007) Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum* - identification of the thiocyanate-forming protein. *Plant Molecular Biology* **63**: 49-61
- BUSKOV S, HANSEN LB, OLSEN CE, SØRENSEN JC, SØRENSEN H, SØRENSEN S (2000) Determination of Ascorbigens in Autolysates of Various *Brassica* Species Using Supercritical Fluid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 2693-2701
- CARLSON DG, DAXENBICHLER ME, VAN ETTEN CH, HILL CB, WILLIAMS PH (1985) Glucosinolates in Radish Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **110**: 634-638

-
- CARTEA ME, VELASCO P, OBREGÓN S, PADILLA G, DE HARO A (2008) Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* **69**: 403–410
- CHEUNG KL, KHOR TO, KONG A-N (2009) Synergistic Effect of Combination of Phenethyl Isothiocyanate and Sulforaphane or Curcumin and Sulforaphane in the Inhibition of Inflammation. *Pharmaceutical Research* **26**: 224-231
- CHOI MMF, SHUANG S, LAI HY, CHENG SC, CHENG RCW, CHEUNG BKB, LEE AWM (2004) Gas chromatography-mass spectrometric determination of total isothiocyanates in Chinese medicinal herbs. *Analytica Chimica Acta* **516**: 155-163
- CIEŚLIK E, LESZCZYŃSKA L, FILIPIAK-FLORKIEWICZ A, SIKORA E, PISULEWSKI PM (2007) Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables. *Food Chemistry* **105**: 976-981
- CISKA E, MARTYNIAK-PRZYBYSZEWSKA B, KOZLOWSKA H (2000) Content of Glucosinolates in Cruciferous Vegetables Grown at the Same Site for Two Years under Different Climatic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 2862-2867
- CHUDDIHY SL, BROWN KK, THOMSON SJ, HAMPTON MB (2008) Induction of apoptosis by phenethyl isothiocyanate in cells overexpressing Bcl-XL. *Cancer Letters* **271**: 215-221
- CURTIS IS (2003) The noble radish: past, present and future. *Trends in Plant Science* **83**: 305-307
- DAXENBICHLER ME, VAN ETTEN CH, WILLIAMS PH (1980) Glucosinolate Products in Commercial Sauerkraut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**: 809-811
- DAXENBICHLER ME, SPENCER GF, CARLSON DG, ROSE GB, BRINKER AM, POWELL RG (1991) Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry* **30**: 2623-2638
- DE FEO V, SENATORE F (1993) Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan Coast, Salerno Province, Campania, Southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* **39**: 39-51
- DEPREE JA, HOWARD TM, SAVAGE GP (1999) Flavour and pharmaceutical properties of the volatile sulphur compounds of Wasabi (*Wasabia japonica*). *Food Research International* **31**: 329-337
- DE TORRES ZABALA M, GRANT M, BONES AM, BENNETT R, LIM YS, KISSEN R, ROSSITER JT (2005) Characterisation of recombinant epithiospecifier protein and its over-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **66**: 859–867

-
- DE VOS RH, BLIJLEVEN WGH (1988) The effect of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **187**: 525-529
- DINI I, TENORE GC, DINI A (2002) Glucosinolates from Maca (*Lepidium meyenii*). *Biochemical Systematics and Ecology* **30**: 1087-1090
- DURHAM PL, POULTON JE (1989) Effect of Castanospermine and Related Polyhydroxyalkaloids on Purified Myrosinase from *Lepidium sativum* Seedlings. *Plant Physiology* **90**: 48-52
- EILERT U, WOLTERS B, NAHRESDT A (1981) Antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *M. stenopetala*. *Planta Medica* **42**: 51-56
- ELFAKIR C, DREUX M (1996) Simultaneous analysis of intact and desulfated glucosinolates with a porous graphitized carbon column. *Journal of Chromatography A* **727**: 71-82
- ENGEL E, BATY C, LE CORRE D, SOUCHON I, MARTIN N (2002) Flavor-Active Compounds Potentially Implicated in Cooked Cauliflower Acceptance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 6459-6467
- ETTLINGER MG, DATEO GP, HARRISON BW, MABRY TJ, THOMPSON CP (1961) Vitamin C as a Coenzyme: the Hydrolysis of Mustard Oil Glycosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **47**: 1875-1880
- FAHEY JW (2005) *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for Life Journal* **1**: 1-15
- FAHEY JW, HARISTOY X, DOLAN PM, KENSLER TW, SCHOLTUS I, STEPHENSON KK, TALALAY P, LOZNIIEWSKI A (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7610-7615
- FAHEY JW, ZALCMANN AT, TALALAY P (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**: 5-51
- FAHEY JW, ZHANG Y, TALALAY P (1997) Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**: 10367-10372
- FENWICK GR, EAGLES J, GMELIN R, RAKOW D (1980) The Mass Spectra of Glucosinolates and Desulfoglucosinolates. *Biomedical Mass Spectrometry* **7**: 410-412

-
- FENWICK GR, HEANEY RK, MULLIN WJ (1983) Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **18**: 123-201
- FIMOGNARI C, LENZI M, HRELIA P (2008) Interaction of the Isothiocyanate Sulforaphane with Drug Disposition and Metabolism: Pharmacological and Toxicological Implications. *Current Drug Metabolism* **9**: 668-678
- FIMOGNARI C, NÜSSE M, BERTI F, LORI R, CANTELLI-FORTI G, HRELIA P (2004) Isothiocyanates as novel cytotoxic and cytostatic agents: molecular pathway on human transformed and non-transformed cells. *Biochemical Pharmacology* **68**: 1133-1138
- FLATH RA, LIGHT TM, JANG EB, MON TR, JOHN JO (1990) Headspace examination of volatile emissions from ripening papaya (*Carica papaya* L., solo variety). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**:1060-1063
- FOO HL, GRØNNING LM, GOODENOUGH L, BONES AM, DANIELSEN BE, WHITING DA, ROSSITER JT (2000) Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymatic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **468**: 243-246
- FULLER Z, LOUIS P, MIHAJLOVSKI A, RUNGAPAMESTRY V, RATCLIFFE B, DUNCAN AJ (2007) Influence of cabbage processing methods and prebiotic manipulation of colonic microflora on glucosinolate breakdown in man. *British Journal of Nutrition* **98**: 364-372
- GALAN MV, KISHAN AA, SILVERMAN AL (2004) Oral Broccoli Sprouts for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: A Preliminary Report. *Digestive Diseases and Sciences* **49**: 1088-1090
- GALLETTI S, BERNARDI R, LEONI O, ROLLIN P, PALMIERI S (2001) Preparation and Biological Activity of Four Epiprogoitrin Myrosinase-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 471-476
- GERENDÁS J, BREUNING S, STAHL T, MERSCH-SUNDERMANN V, MÜHLING K-H (2008) Isothiocyanate Concentration in Kohlrabi (*Brassica oleracea* L. Var. *gongylodes*) Plants As Influenced by Sulfur and Nitrogen Supply. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 8334-8342
- GERENDÁS J, SAILER M, FENDRICH ML, STAHL T, MERSCH-SUNDERMANN V, MÜHLING KH (2008) Influence of sulfur and nitrogen supply on growth, nutrient status and concentration of benzyl-isothiocyanate in cress (*Lepidium sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**: 2576-2580

- GERENDÁS J, PODESTAT J, STAHL T, KÜBLER K, BRÜCKNER H, MERSCH-SUNDERMANN V, MÜHLING KH (2009) Interactive Effects of Sulfur and Nitrogen Supply on the Concentration of Sinigrin and Allyl Isothiocyanate in Indian Mustard (*Brassica juncea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 3837-3844
- GIL V, MAC LEOD AJ (1980) The effects of pH on glucosinolate degradation by a thioglucoside glucohydrolase preparation. *Phytochemistry* **19**: 2547-2551
- GILBERT und NURSTEN (1972) Volatile Constituents of Horseradish Roots. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **23**: 527-539
- GINGRAS D, GENDRON M, BOIVIN D, MOGHRABI A, THÉORÊT Y, BÉLIVEAU R (2004) Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from *Brassica* vegetables. *Cancer Letters* **203**: 35-43
- GOODRICH RM, ANDERSON JL, STOEWSAND GS (1989) Glucosinolate Changes in Blanched Broccoli and Brussels Sprouts. *Journal of Food Processing and Preservation* **13**: 275-280
- GRIFFITHS DW, BIRCH ANE, HILLMAN JR (1998) Antinutritional compounds in the *Brassicaceae*: Analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73**: 1-18
- GRUBB CD, ABEL S (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* **11**: 89-98
- HALKIER BA, GERSHENZON J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 303-333
- HASAPIS X, MAC LEOD AJ (1982) Benzylglucosinolate degradation in heat-treated *Lepidium sativum* seeds and detection of a thiocyanate-forming Factor. *Phytochemistry* **21**: 1009-1013
- HAYES JD, KELLEHER MO, EGGLESTON IM (2008) The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition* **47**: 73-88
- HEANEY RK, FENWICK GR (1995) Natural toxins and protective factors in *Brassica* species, including rapeseed. *Natural Toxins* **3**: 233-237
- HEANEY RK, SPINKS EA, FENWICK GR (1988) Improved Method for the Determination of the Total Glucosinolate Content of Rapeseed by Determination of Enzymically Released Glucose. *Analyst* **113**: 1515-1518
- HEMSTRÖM P, IRGUM K (2006) Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* **29**: 1784-1821
- HERRMANN K (1977) Übersicht über nicht-essentielle Inhaltsstoffe der Gemüsearten. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **165**: 151-164

-
- HOLST B, WILLIAMSON G (2004) A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *National Product Reports* **21**: 425-447
- HORBOWICZ M, ROGOWSKA M (2006) Content of isothiocyanates and flavonols during vegetation of two types horseradish. *Vegetable Crops Research Bulletin* **65**: 95-104
- IKEGAMI T, TOMOMATSU K, TAKUBO H, HORIE K, TANAKA N (2008) Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* **1184**: 474-503
- IORI R, BERNARDI R, GUEYRARD D, ROLLIN P, PALMIERI S (1999) Formation of glucoraphanin by chemoselective oxidation of natural glucoerucin: A chemoenzymatic route to sulforaphane. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**: 1047-1048
- ISHII G, SAIJO R, MIZUTANI J (1989) A Quantitative Determination of 4-Methylthio-3-Butenyl Glucosinolate in Daikon (*Raphanus sativus* L.) Roots by Gas Liquid Chromatography. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **58**: 339-344
- JIAO D, YU MC, HANKIN JH, LOW SH, CHUNG SL (1998) Total Isothiocyanate Contents in Cooked Vegetables Frequently Consumed in Singapore. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 1055-1058
- JOHNSON IT (2002) Glucosinolates: Bioavailability and importance to Health. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **72**: 26-31
- KASSIE F, KNASMÜLLER S (2000) Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chemico-Biological Interactions* **127**: 163-180
- KASSIE F, PARZEFALL W, MUSK SRR, JOHNSON I, LAMPRECHT G, SONTAG G, KNASMÜLLER S (1996) Genotoxic effects of crude juices from *Brassica* vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells, *Chemico-Biological Interactions* **102**: 1-16
- KASSIE F, POOL-ZOBEL B, PARZEFALL W, KNASMÜLLER S (1999) Genotoxic effects of benzyl isothiocyanate, a natural chemopreventive agent. *Mutagenesis* **14**: 595-603
- KASSIE F, RABOT S, UHL M, HUBER W, QIN HM, HELMA C, SCHULTE-HERMANN R, KNASMÜLLER S (2002) Chemoprotective effects of garden cress (*Lepidium sativum*) and its constituents towards 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced genotoxic effects and colonic preneoplastic lesions. *Carcinogenesis* **23**: 1155-1161

-
- KJÆR A, MALVER O, EL-MENSHAWI B, REISCH J (1979) Isothiocyanates in myrosinase-treated seed extracts of *Moringa peregrina*. *Phytochemistry* **18**: 1485-1487
- KJÆR A, OHASHI M, WILSON JM, DJERASSI C (1963) Mass spectra of isothiocyanates. *Acta Chemica Scandinavica* **17**: 2143-54
- KÖHLER W, SCHACHTEL G, VOLESKE P (2007) Biostatistik - Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler, 4., aktualisierte und erweiterte Auflage, Springer Verlag, Berlin
- KOLM RH, DANIELSON UH, ZHANG Y, TALALAY P, MANNERVIK B (1995) Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. *Biochemistry Journal* **311**: 453-459
- KOVÁTS E (1958) Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen, Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta* **41**: 1915-32
- KRISTENSEN M, KROGHOLM KS, FREDERIKSEN H, BÜGEL SH, RASMUSSEN SE (2007) Urinary excretion of total isothiocyanates from cruciferous vegetables shows high dose-response relationship and may be a useful biomarker for isothiocyanate exposure. *European Journal of Nutrition* **46**: 377-382
- KRUL C, HUMBLLOT C, PHILLIPPE C, VERMEULEN M, VAN NUEREN M, HAVENAAR R, RABOT S (2002) Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model. *Carcinogenesis* **23**: 1009-1016
- LEE K-C, CHEUK M-W, CHAN W, LEE AW-M, ZHAO Z-Z, JIANG Z-H, CAI Z (2006) Determination of glucosinolates in traditional Chinese herbs by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**: 2225-2232
- LI G, AMMERMANN U, QUIROSI CF (2001) Glucosinolate contents in Maca (*Lepidium peruvianum caco*) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* **55**: 255-262
- LI X, KUSHAD MM (2004) Correlation of Glucosinolate Content to Myrosinase Activity in Horseradish (*Armoracia rusticana*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 6950-6955
- LI X, KUSHAD MM (2005) Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 503-511
- LI S, SCHONHOF I, KRUMBEIN A, LI L, STÜTZEL H, SCHREINER M (2007) Glucosinolate Concentration in Turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapifera* L.) Roots as Affected by Nitrogen and Sulfur Supply. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 8452-8457

-
- LIEBEREI R, REISDORFF C, FRANKE W (2007) *Nutzpflanzenkunde*. 7. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart
- LIM S, LEE J, KIM JK (2009) Analysis of isothiocyanates in newly generated vegetables, *Baemuchae* (x *Brassicoraphanus*) as affected by growth. *International Journal of Food Science and Technology* **44**: 1401-1407
- LÖNNERDAL B, JANSON JC (1973) Purification and Characterisation of a Myrosinase from Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Biochimica et Biophysica Acta* **315**: 421-429
- LYKKESFELD J, MØLLER BL (1993) Synthesis of Benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus*. *Plant Physiology* **102**: 609-613
- MAC LEOD AJ, ROSSITER JT (1985) The Occurrence and Activity of Epithiospecifier Protein in some Cruciferae Seeds. *Phytochemistry* **24**: 1895-1898
- MAHRAN GH, KADRY HA, ISAAC ZG, THABET CK, ALAZIZI MM, ELOLEMY MM (1991) Investigation of diuretic drug plants. 1. Phytochemical screening and pharmacological evaluation of *Anethum graveolens* L., *Apium graveolens* L., *Daucus carota* L., *Eruca sativa* Mill. *Phytotherapy Research* **5**:169-172
- MANICI LM, LAZZERI L, PALMIERI S. (1997) In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 2768-2773
- MATTHÄUS B, ÖZCAN M (2002) Glucosinolate Composition of Young Shoots and Flower Buds of Capers (*Capparis* Species) Growing Wild in Turkey *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 7323-7325
- McMILLAN M, SPINKS EA, FENWICK GR (1986) Preliminary Observations on the Effect of Dietary Brussels Sprouts on Thyroid Function. *Human and Experimental Toxicology* **5**: 15-19
- MEKONNEN Y, DRÄGER B (2003) Glucosinolates in *Moringa stenopetala*. *Planta Medica* **69**: 380-382
- MELLON FA, BENNETT RN, HOLST B, WILLIAMSON G (2002) Intact glucosinolate analysis in plant extracts by programmed cone voltage electrospray LC/MS: Performance and comparison with LC/MS/MS methods. *Analytical Biochemistry* **306**: 83-91
- MEYER M, ADAM ST (2008) Comparison of glucosinolate levels in commercial broccoli and red cabbage from conventional and ecological farming. *European Journal of Food Research and Technology* **226**: 1429-1437
- MIGLIO C, CHIAVARO E, VISCONTIL A, FOGLIANO V, PELLEGRINI N (2008) Effects of Different Cooking Methods on Nutritional and Physicochemical Characteristics of Selected Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 139-147

-
- MIKKELSEN MD, PETERSEN BL, OLSEN CE, HALKIER BA (2002) Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids* **22**: 279-295
- MITHEN RF, DEKKER M, VERKERK R, RABOT S, JOHNSON IT (2000) The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 967-984
- MITHEN RF, LEWIS BG, FENWICK GR (1986) In vitro activity of glucosinolates and their products against *Leptosphaeria maculans*. *Transactions of the British Mycological Society* **87**: 433-440
- MOHN T, CUTTING B, Ernst B, HAMBURGER M (2007) Extraction and analysis of intact glucosinolates—A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography–mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. *Journal of Chromatography A* **1166**: 142-151
- MONTAUT S, BARILLARI J, IORI R, ROLLIN P (2010) Glucoraphasatin: Chemistry, occurrence, and biological properties. *Phytochemistry* **71**: 6-12
- MORENO DA, CARVAJAL C, LÓPEZ-BERENGUER C, GARCÍA-VIGUERA C (2006) Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1508-1522
- MORENO DA, LÓPEZ-BERENGUER C, GARCÍA-VIGUERA C (2007) Effects of Stir-Fry Cooking with Different Edible Oils on the Phytochemical Composition of Broccoli. *Journal of Food Science* **72**: 64-68
- MUHAMMAD I, ZHAO J, DUNBAR DC, KHAN IA (2002) Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca' *Phytochemistry* **59**: 105-110
- MUNDAY R, MUNDAY CM (2004) Induction of Phase II Detoxification Enzymes in Rats by Plant-Derived Isothiocyanates: Comparison of Allyl Isothiocyanate with Sulforaphane and Related Compounds *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 1867-1871
- MURATA M, YAMASHITA N, INOUE S, KAWANISHI S (2000) Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. *Free Radical Biology and Medicine* **28**: 797-805
- MUSK SRR, SMITH TK, JOHNSON IT (1995) On the cytotoxicity and genotoxicity of allyl and phenethyl isothiocyanates and their parent glucosinolates sinigrin and gluconasturtiin. *Mutation Research* **348**: 19-23
- OHTSURU M, HATA T (1972) Molecular properties of multiple forms of plant myrosinases. *Agricultural Biology and Chemistry* **36**: 2495-2503
- OHTSURU M, KAWATANI H (1979) Studies on the myrosinase from *Wasabia japonica*: Purification and some properties of wasabi myrosinase. *Agricultural Biology and Chemistry* **43**: 2249-2255

- OKANO K, ASANO J, ISHII G (1990) A Rapid Method for Determining the Pungent Principle in Root of Japanese Radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **59**: 545-550
- ONO H, TESAKI S, TANABE S, WATANABE M (1998) 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate and its homologues as food-originated compounds with antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **62**: 363-365
- PADILLA G, CARTEA ME, VELASCO P, DE HARO A, ORDA'S A (2007) Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry* **68**: 536-545
- PALMER MV, SANG JP, ORAM RN, TRAN DA, SALISBURY PA (1988) Variation in seed glucosinolate concentrations of Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern. + Coss.). *Australian Journal of Experimental Agriculture* **28**: 779-782
- PAPI A, ORLANDI M, BARTOLONO G, BARILLARI J, LORI R, PAOLINI M, FERRONI F, FUMO MG, PEDULLI GF, VALGIMIGLI L (2008) Cytotoxic and Antioxidant Activity of 4-Methylthio-3-butenyl Isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 875-883
- PÉREZ GUTIÉRREZ RM, PEREZ RL (2004) *Raphanus sativus* (Radish): Their Chemistry and Biology. *The Scientific World Journal* **4**: 811-837
- PIACENTE S, CARBONE V, PLAZA A, ZAMPELLI A, PIZZA C (2002) Investigation of the Tuber Constituents of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 5621-5625
- PRESTERA T, FAHEY JW, HOLTZCLAW WD, ABEYGUNAWARDANA C, KACHINSKI JL, TALALAY P (1996) Comprehensive Chromatographic and Spectroscopic Methods for the Separation and Identification of Intact Glucosinolates. *Analytical Biochemistry* **239**: 168-179
- RAMALLO R, WATHELET JP, LE BOULENGÉ E, TORRES E, MARLIER M, LEDENT JF, GUIDI A, LARONDELLE Y (2004) Glucosinolates in isano (*Tropaeolum tuberosum*) tubers: qualitative and quantitative content and changes after maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**: 701-706
- RASK L, ANDREASSON E, EKBOM B, ERIKSSON S, PONTOPPIDAN B, MEIJER J (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* **42**: 93-113
- Report of an Ad hoc Panel of the Advisory Committee on Technology Innovation, Board on Science and Technology for International Development, National Research Council (1989) Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. *The National Academy Press Washington, D.C.*: 57-66

-
- RIEDL MA, SAXON A, DIAZ-SANCHEZ D (2009) Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clinical Immunology* **130**: 244-251
- RODRIGUES AS, ROSA EAS (1999) Effect of postharvest treatments on the level of glucosinolates in broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**:1028-1032
- ROMEO V, ZIINO M, GIUFFRIDA D, CONDURSO C, VERZERA A (2007) Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC-MS. *Food Chemistry* **101**: 1272-1278
- ROSA EAS, HEANEY RK (1993) The Effect of Cooking and Processing on the Glucosinolate Content: Studies on Four Varieties of Portuguese Cabbage and Hybrid White Cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **62**: 259-265
- ROSE P, FAULKNER K, WILLIAMSON G, MITHEN R (2000) 7-Methylsulfinylheptyl and 8-Methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. *Carcinogenesis* **21**: 1983-88
- ROUZAUD G, RABOT S, RATCLIFFE B, DUNCAN AJ (2003) Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition* **90**: 395-404
- RUNGAPAMESTRY V, DUNCAN AJ, FULLER Z, RATCLIFFE B (2006) Changes in Glucosinolate Concentrations, Myrosinase Activity, and Production of Metabolites of Glucosinolates in Cabbage (*Brassica oleracea* Var. *capitata*) Cooked for Different Durations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 7628-7634
- SAHASRABUDHE MR, MULLIN WJ (1980) Dehydration of Horseradish Roots. *Journal of Food Science* **45**: 1440-1441
- SARIKAMIS G, MARQUEZ J, MACCORMACK R, BENNETT RN, ROBERTS J, MITHEN R (2006) High glucosinolate broccoli: a delivery system for sulforaphane. *Molecular Breeding* **18**: 219-228
- SCHNUG E (1987) Eine Methode zur schnellen und einfachen Bestimmung des Gesamtglucosinolatgehaltes in Grünmasse und Samen von Kreuzifern durch die quantitative Analyse enzymatisch freisetzbaren Sulfates. *Fat Science Technology* **89**: 438-442
- SCHNUG E, HANEKLAUS S, BORCHERS A, POLLE A (1995) Relations between sulphur supply and glutathione and ascorbate concentrations in *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **158**: 67-69
- SCHREINER M (2005) Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition* **44**: 85-94

-
- SCHUMANN W (2005) Untersuchungen zum Glucosinolatgehalt von in Deutschland erzeugten und verarbeiteten Rapssaaten und Rapsfuttermitteln. *UFOP-Schriften* **27**: 1-69
- SCHÜTZE W, MANDEL F, SCHULZ H (1999) Identifizierung von Glucosinolaten in Rettich (*Raphanus sativus* L.) und Kreuzungen aus *R. sativus* L. x *Brassica oleracea* L. (*Raphanobrassica*) mittels LC-MS. *Nahrung* **4**: 245-248
- SEIDEMANN J (1993) Würzmittel-Lexikon - ein alphabetisches Nachschlagewerk von Abelmoschussamen bis Zwiebeln. Behr's Verlag, Hamburg
- SHAPIRO TA, FAHEY JW, WADE KL, STEPHENSON KK, TALALAY P (2001) Chemoprotective Glucosinolates and Isothiocyanates of Broccoli Sprouts: Metabolism and Excretion in Humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **1**: 501-508
- SHAPIRO TA, FAHEY JW, WADE KL, STEPHENSON KK, TALALAY P (1998) Human Metabolism and Excretion of Cancer Chemoprotective Glucosinolates and Isothiocyanates of Cruciferous Vegetables. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **7**: 1091-1100
- SHIKITA M, FAHEY JW, GOLDEN TR, HOLTZCLAW WD, TALALAY P (1999) An unusual case of 'uncompetitive activation' by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Biochemical Journal* **341**: 725-732
- SONG L, MORRISON JJ, BOTTING NP, THORNALLEY PJ (2005) Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC-MS/MS. *Analytical Biochemistry* **347**: 234-243
- SONG J, THORNALLEY PJ (2007) Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food and Chemical Toxicology* **45**: 216-224
- SPENCER GF, DAXENBICHLER ME (1980) Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Nitriles, Isothiocyanates and Oxazolidinethiones Derived from Cruciferous Glucosinolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **31**: 359-361
- STAHL T, HAIDER G, MERSCH-SUNDERMANN V, GMINSKI R (2009a) Chemopräventiv wirksame Isothiocyanate (ITC) in Senf. *Ernährungs-Umschau* **56**: 74-79
- STAHL T, HAIDER G, MERSCH-SUNDERMANN V, GMINSKI R (2009b) Chemopräventiv wirkende Komponenten in Senf und Senfprodukten. *Ernährungs-Umschau* **56**: 208-215
- STAHL T, ZEUNER CR, KRAWINKEL M, LAMY E, MERSCH-SUNDERMANN V (2008) Identifizierung und Quantifizierung chemopräventiver Isothiocyanate in *Brassicaceae*. *Lebensmittelchemie* **62**: 9-10

-
- SULTANA T, PORTER NG, SAVAGE GP, McNEIL DL (2003a) Comparison of Isothiocyanate Yield from Wasabi Rhizome Tissues Grown in Soil or Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 1477-82
- SULTANA T, SAVAGE GP, McNEIL DL, PORTER GP, CLARK B (2003b) Comparison of Flavour Compounds in Wasabi and Horseradish. *Food, Agriculture and Environment* **1**: 117-121
- SUZUKI C, OHNISHI-KAMEYAMA M, SASAKI K, MURATA T, YOSHIDA M (2006) Behavior of Glucosinolates in Pickling Cruciferous Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 9430-9436
- THANGSTAD OP, IVERSEN TH, SLUPPHAUG G, BONES A (1990) Immunocytochemical localization of myrosinase in *Brassica napus* L. *Planta* **180**: 245-248
- THANGSTAD OP, EVYEN K, BONES A (1991) Immunogold-EM localization of myrosinase in *Brassicaceae*. *Protoplasma* **161**: 85-93
- TELLEZ MR, KHAN IA, KOBASISY M, SCHRADER KK, DAYAN FE, OSBRINK W (2002) Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). *Phytochemistry* **61**:149-155
- TERNES W, TÄUFEL A, TUNGER L, ZOBEL M (Hrsg.) (2005) Lexikon der Lebensmittel und der Lebensmittelchemie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- TESORIERE L, BUTERA D, GENTILE C, LIVREA MA (2007) Bioactive Components of Caper (*Capparis spinosa* L.) from Sicily and Antioxidant Effects in a Red Meat Simulated Gastric Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 8465-8471
- TIAN Q, ROSSELOT RA, SCHWARTZ SJ (2005) Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **343**: 93-99
- TIERENS KF, THOMMA BP, BROUWER M, SCHMIDT J, KISTNER K, PORZEL A, MAUCH-MANI B, CAMMUE BP, BROEKAERT WF (2001) Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiology* **125**: 1688-1699
- TRAKA M, MITHEN R (2009) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews* **8**: 269-282
- TRONCOSO R, ESPINOZA C, SÁNCHEZ-ESTRADA A, TIZNADO ME, GARCÍA HS (2005) Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Research International* **38**: 701-708

-
- TROYER JK, STEPHENSON KK, FAHEY JW (2001) Analysis of glucosinolates from broccoli and other cruciferous vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **919**(2): 299-304
- TSAO R, YU Q, POTTER J, CHIBA M (2002) Direct and Simultaneous Analysis of Sinigrin and Allyl Isothiocyanate in Mustard Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 4749-4753
- VALGIMIGLI L, IORI R (2009) Antioxidant and Pro-Oxidant Capacities of ITCs. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **50**: 222-237
- VALLEJO F, TOMAS-BARBERAN FA, GARCIA-VIGUERA C (2002) Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. *European Journal of Food Research and Technology* **215**: 310-316
- VALLEJO F, TOMÁS-BARBERÁN F, GARCÍA-VIGUERA C (2003) Health-Promoting Compounds in Broccoli as Influenced by Refrigerated Transport and Retail Sale Period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 3029-3034
- VAN DOORN HE, VAN DER KRUK GC, VAN HOLST GJ, RAAIJMAKERS-RUIJS, POSTMA E, GROENEWEG B, JONGEN WHF (1998) The Glucosinolates Sinigrin and Progoitrin are Important Determinants for Taste Preference and Bitterness of Brussels Sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78**: 30-38
- VAN EYLEN D, OEY I, HENDRICKX M, VAN LOEY A (2008) Behavior of mustard seed (*Sinapis alba* L.) myrosinase during temperature/pressure treatments: a case study on enzyme activity and stability. *European Food Research and Technology* **226**: 545-553
- VAN POPPEL G, VERHOEVEN DTH, VERHAGEN H, GOLDBOHM RA (1999) Brassica Vegetables and Cancer Prevention. *Advances in Nutrition and Cancer* **2**: 159-168
- VAUGHN SF, BERHOW MA (2005) Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products* **21**: 193-202
- VERHOEVEN DTH, VERHAGEN H, GOLDBOHM RA, VAN DEN BRANDT PA, VAN POPPEL (1997) A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions* **103**: 79-129
- VERMEULEN M, ZWANENBURG B, CHITTENDEN GJF, VERHAGEN H (2003) Synthesis of isothiocyanate-derived mercapturic acids. *European Journal of Medicinal Chemistry* **38**: 729-737

-
- VERMEULEN M, VAN DEN BERG R, FREIDIG AP, VAN BLADEREN PJ, VAES WHJ (2006) Association between Consumption of Cruciferous Vegetables and Condiments and Excretion in Urine of Isothiocyanate Mercapturic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 5350-5358
- VOLDEN J, WICKLUND T, VERKERK R, DEKKER M (2008) Kinetics of Changes in Glucosinolate Concentrations during Long-Term Cooking of White Cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* f. *alba*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 2068-2073
- WADE KL, GARRARD IJ, FAHEY JW (2007) Improved hydrophilic interaction chromatography method for the identification and quantification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A* **1154**: 469-472
- WARTON B, MATTHIESSEN JN, SHACKLETON MA (2001) Glucosinolate Content and Isothiocyanate Evolution - Two Measures of the Biofumigation Potential of Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 5244-5250
- WATZL B (2001) Glucosinolate. *Ernährungs-Umschau* **48**: 330-333
- WATZL B, LEITZMANN C (1995) Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart
- WEST L, TSUI I, HAAS G (2002) Single column approach for the liquid chromatographic separation of polar and non-polar glucosinolates from broccoli sprouts and seeds. *Journal of Chromatography A* **966**: 227-232
- WEST LG, MEYER KA, BALCH BA, ROSSI FJ, SCHULTZ MR, HAAS GW (2004) Glucoraphanin and 4-Hydroxyglucobrassicin contents in seeds of 59 cultivars of Broccoli, Raab, Kohlrabi, Radish, Cauliflower, Brussels sprouts, Kale and Cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 916-926
- WITTSTOCK U, HALKIER BA (2002) Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science* **7**: 263-270
- WONG GYC, BRADLOW L, SEPKOVIC D, MEHL S, MAILMAN J, OSBORNE MP (1997) Dose-Ranging Study of Indole-3-Carbinol for Breast Cancer Prevention. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* **28/29**: 111-116
- YE L, DINKOVA-KOSTOVA AT, WADE KL, ZHANG Y, SHAPIRO TA, TALALAY P (2002) Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clinica Chimica Acta* **316**: 43-53
- YEN GC, WEI QK (1993) Myrosinase activity and total glucosinolate content of cruciferous vegetables, and some properties of cabbage myrosinase in Taiwan. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **61**: 471-475
- ZHANG Y, TALALAY P (1994) Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Research (Supplement)* **54**: 1976-1981

-
- ZHANG Y, TALALAY P (1998) Mechanism of Differential Potencies of Isothiocyanates as Inducers of Anticarcinogenic Phase 2 Enzymes. *Cancer Research* **58**: 4612-4639
- ZHANG Y, WADE KL, PRESTERA T, TALALAY P (1996) Quantitative Determination of Isothiocyanates, Dithiocarbamates, Carbon Disulfide, and Related Thiocarbonyl Compounds by Cyclocondensation with 1,2-Benzenedithiol. *Analytical Biochemistry* **239**: 160-167
- ZHAO H, LIN J, BARTON GROSSMAN H, HERNANDEZ LM, DINNEY CP, WU X (2007) Dietary isothiocyanates, GSTM1, GSTT1, NAT2 polymorphisms and bladder cancer risk. *International Journal of Cancer* **120**: 2208-2213
- ZHAO F, EVANS EJ, BILSBORROW PE, SYERS K (1994) Influence of Nitrogen and Sulphur on the Glucosinolate Profile of Rapeseed (*Brassica napus* L) *Journal of the Science of Food and Agriculture* **64**: 295-304
- ZRYBKO CL, FUKUDA EK, ROSEN RT (1997) Determination of glucosinolates in domestic and wild mustard by high-performance liquid chromatography with confirmation by electrospray mass spectrometry and photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A* **767**: 43-52

Anhang

A: Statistische Kennzahlen, Formeln und Aufreinigungsschemata

Arithmetrischer Mittelwert (MW)

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

\bar{x} = Mittel aller x_i

x_i = Einzelwerte

n = Anzahl

Standardabweichung (SD)

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Relative Standardabweichung (RSD)

$$RSD = \frac{s \times 100\%}{\bar{x}}$$

s = Standardabweichung

Berechnung der Retentionsindizes nach Kováts (KI)

Zur Berechnung der Retentionsindizes wurden die relativen Retentionszeiten (t') der in Abbildung A-1 dargestellten Reihe homologer Alkane (C10 – C28) bestimmt.

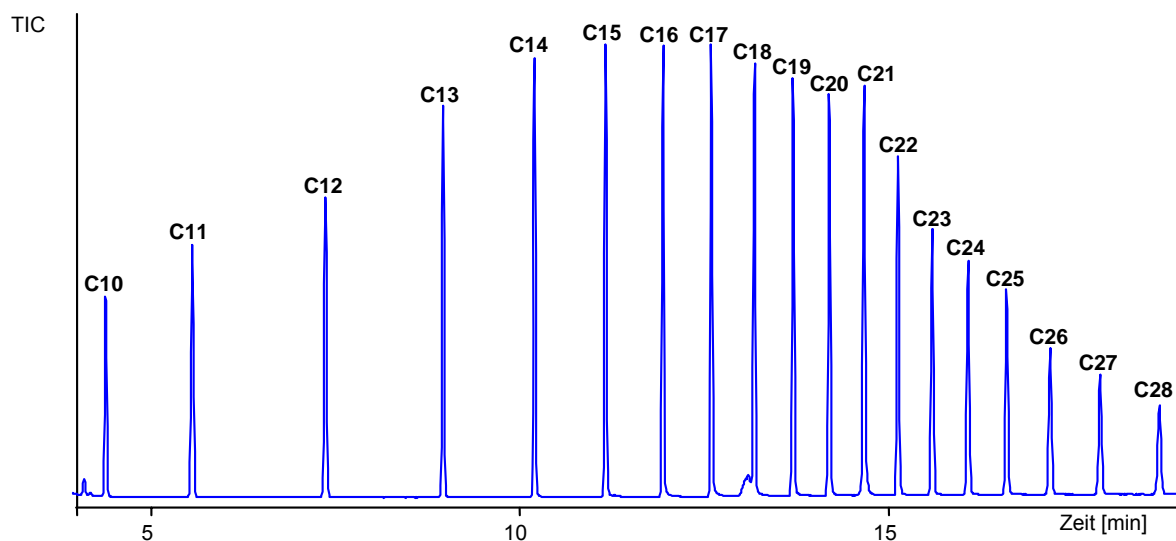


Abb. A-1 Alkanreihe zur Bestimmung der Retentionsindizes nach Kováts (KI)

Daraus wurden nach folgender Formel die Kováts-Indizes (KI) der ITC-Standards ermittelt:

$$KI = 100 \cdot N + 100 \cdot n \frac{\log_{t' A} - \log_{t' N}}{\log_{t' N+n} - \log_{t' N}}$$

- N Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyt eluiert
 n Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans
 A Analyt
 t' relative Retentionszeit = Retentionszeit – Totzeit

Berechnung der ITC-Gehalte über internen Standard

Unter Zuhilfenahme des Responsefaktors des Standards (RF_{STD}), des in jeder Einzelmessung ermittelten Responsefaktors des detektierten ITCs einer Probe (RF_{Probe}), der Einwaagemenge und der zugesetzten Menge des internen Standards (Methyl-ITC) konnten die Gehalte der ITCs in den analysierten Proben nach folgender Formel berechnet werden:

$$mg \text{ ITC}/100g = \frac{\frac{\text{Menge Methyl-ITC}}{RF_{STD}} \times RF_{Probe}}{\text{Einwaage (g)}}$$

RF_{STD} Responsefaktor Standard

RF_{Probe} Responsefaktor Probe

Die Bestimmung der Responsefaktoren (RF) folgte der Gleichung:

$$RF = A_{ITC} / A_{I.S.}$$

RF Responsefaktor (Korrekturfaktor)

A_{ITC} Peakfläche des identifizierten Isothiocyanat

$A_{I.S.}$ Peakfläche des Internen Standards

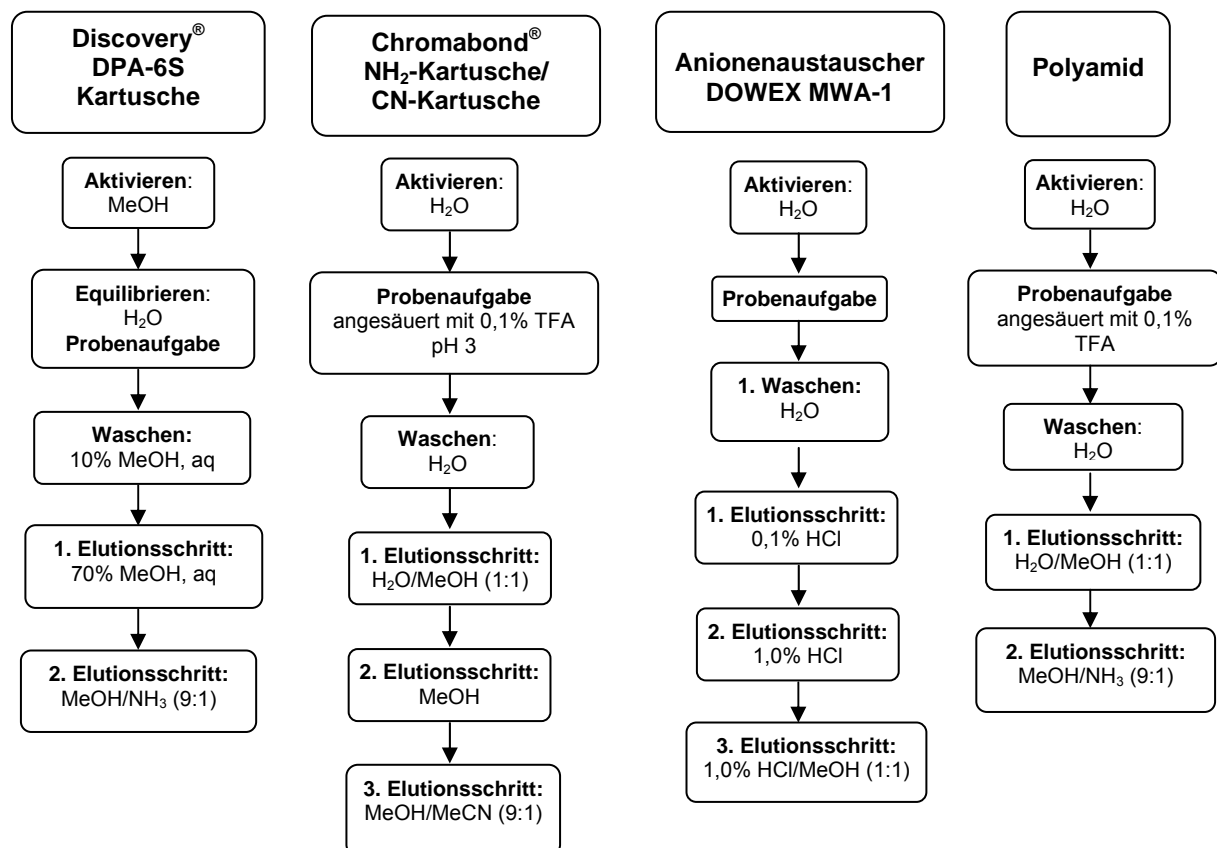
Im Folgenden (Tab. A-1) sind die zur Berechnung der ITC berechneten Responsefaktoren der ITC-Referenzsubstanzen sowie die relative Standardabweichung der Messungen dargestellt.

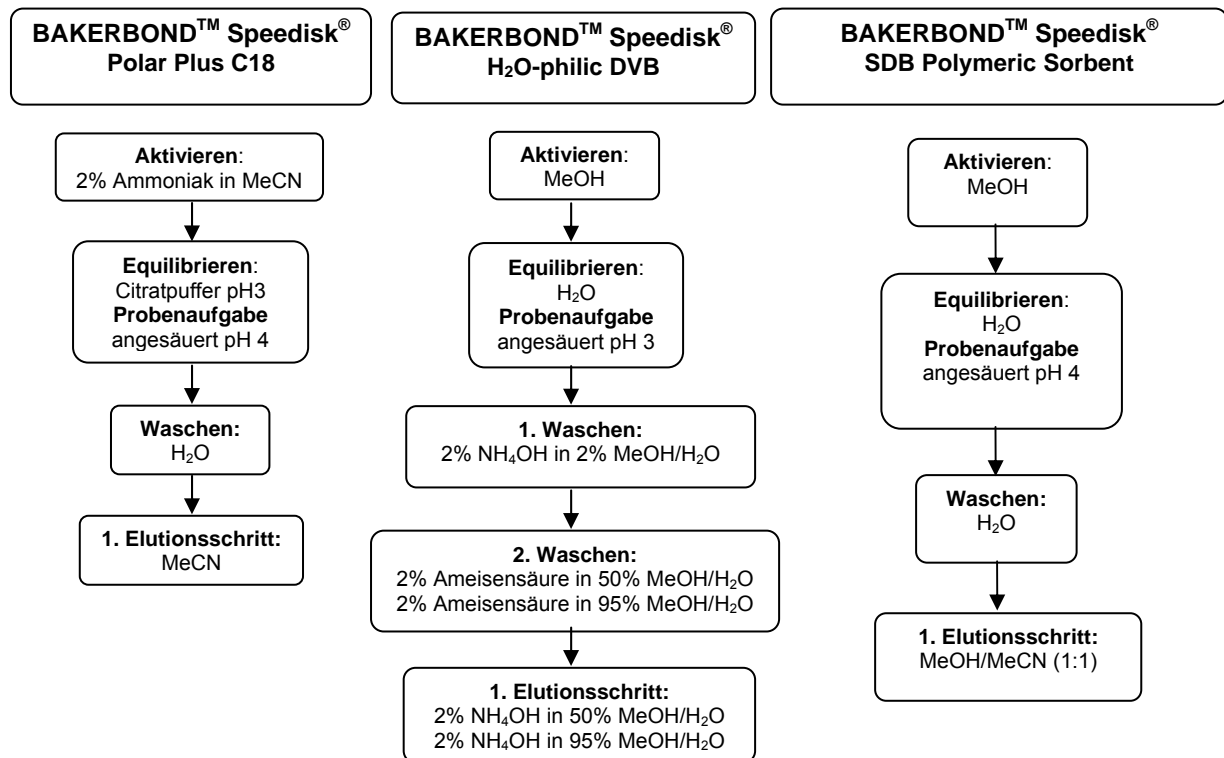
Tab. A-1 Gemittelte Responsefaktoren (RF) verwendeter ITCs und ihre relative Standardabweichung (RSD) berechnet aus acht Einzelmessungen

Isothiocyanat	RF	RSD
Methyl-ITC	1,000	0,000
Ethyl-ITC	1,253	1,351
Allyl-ITC	0,576	1,812
Sulforaphan	0,048	3,418
Phenyl-ITC	1,869	1,386
Benzyl-ITC	1,955	1,561
Methylthiobutyl-ITC	1,426	1,569
Phenylethyl-ITC	2,250	1,500
Methylthiopentenyl-ITC	0,956	1,154
Methylsulfonylpropyl-ITC	0,776	2,350
Sulforaphen	1,178	2,852

Fließschemata Probenaufreinigung

Im Folgenden sind die im Rahmen einer Optimierung der Probenaufreinigung eingesetzten Festphasen dargestellt, die auf ihr Vermögen, die zum Einsatz in der HPLC bestimmten GSL-haltigen Rohextrakte vorzureinigen, getestet wurden.





B: Chromatogramme und Massenspektren

Zusätzliche Chromatogramme HPLC

Kressen und Sprossen

Die Abbildungen stehen für die nicht im Ergebnisteil abgebildeten Chromatogramme der Kresse- und Sprossenproben. Hierbei wurden nicht aufgereinigte lyophilisierte Proben gewählt, da sich die Extrakte der übrigen Aufarbeitungen zwar in den Peakflächen der entsprechenden GSL unterscheiden, nicht jedoch in den Chromatogrammen insgesamt. Proben, die keine GSL enthielten, sind hierbei nicht abgebildet.

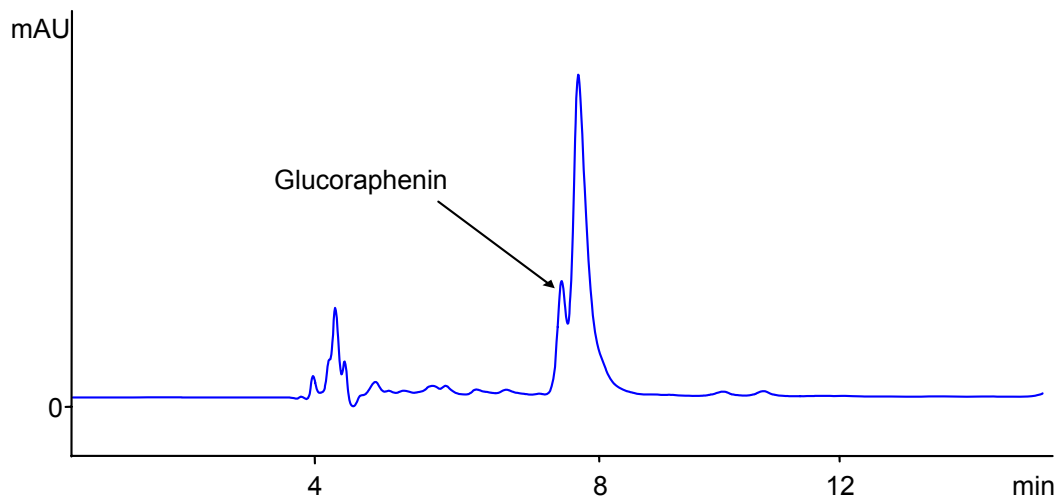


Abb. B-1 Chromatogramm eines Probenextraktes von Rettichsprössen (SP6) detektiert mittels HPLC (Methode 1)

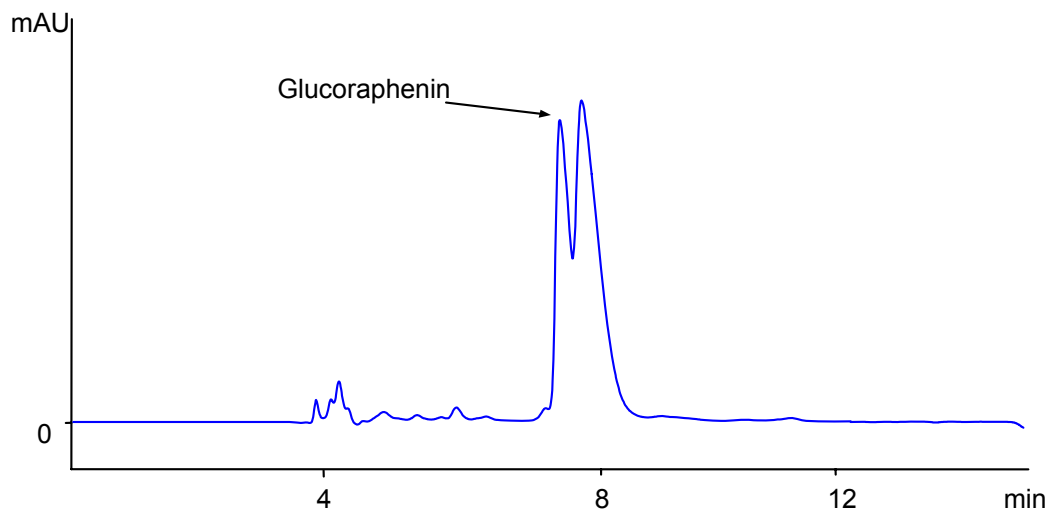


Abb. B-2 Chromatogramm eines Probenextraktes von Sangosprossen (SP8) detektiert mittels HPLC (Methode 1)

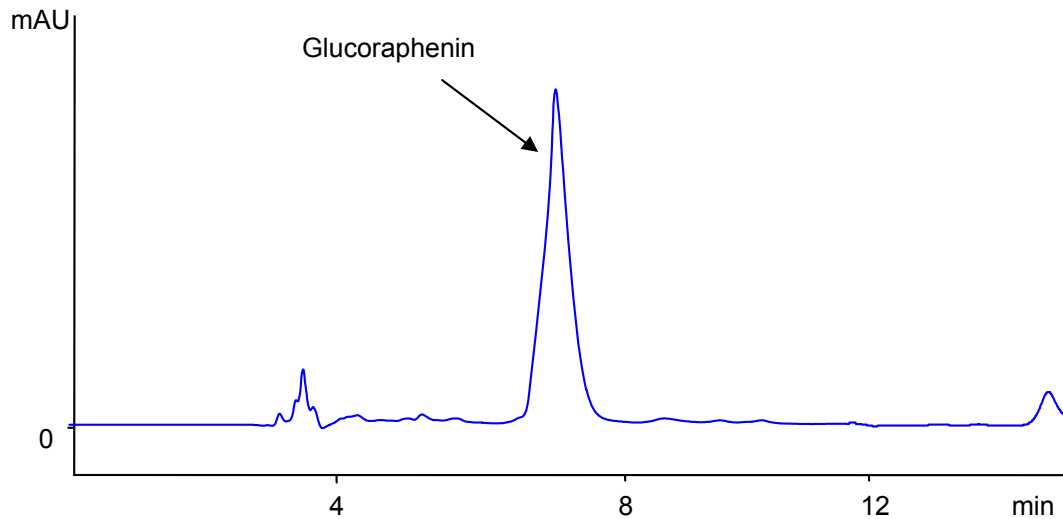


Abb. B-3 Chromatogramm eines Probenextraktes von Daikon Cress® (K6) detektiert mittels HPLC (Methode 1)

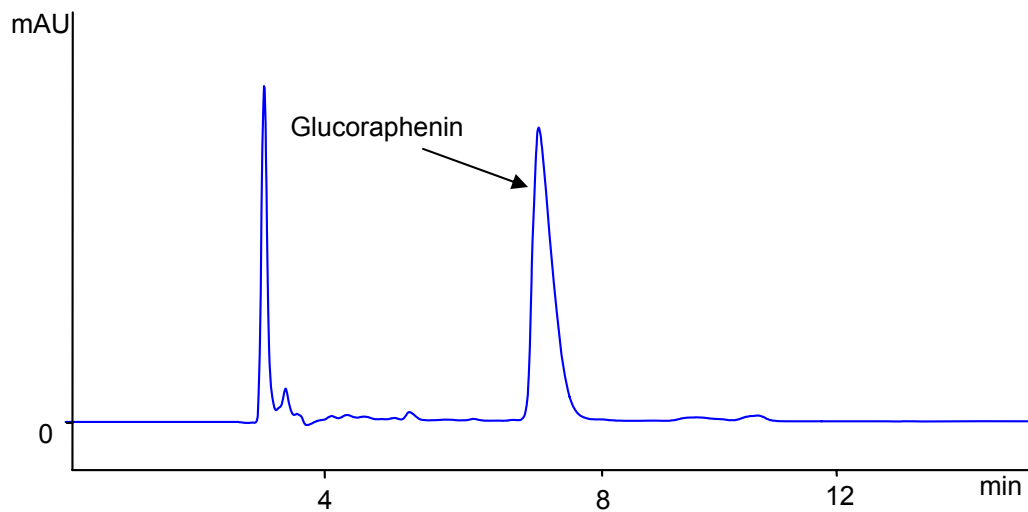


Abb. B-4 Chromatogramm eines Probenextraktes von Sakura Cress® (K9) detektiert mittels HPLC (Methode 1)

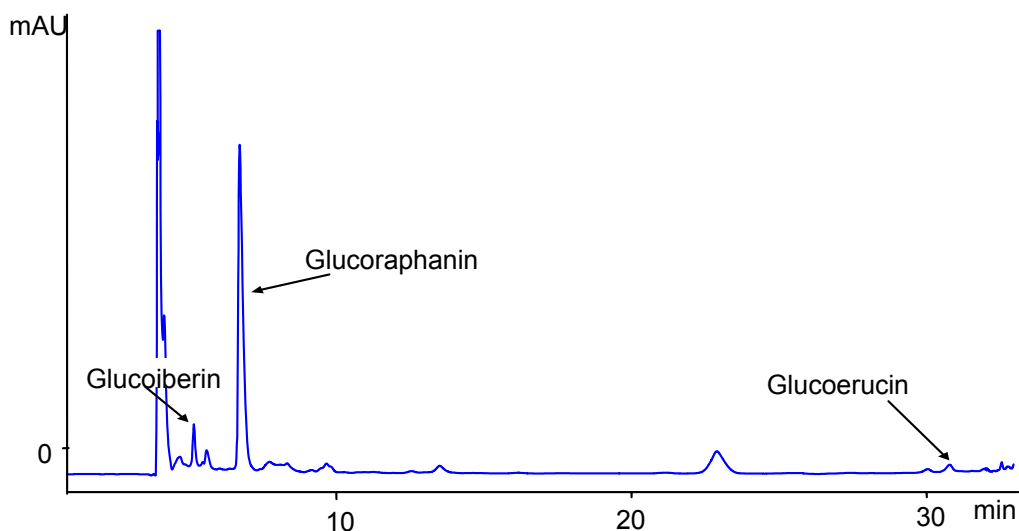


Abb. B-5 Chromatogramm eines Probenextraktes von BroccoCress® (K9) detektiert mittels HPLC (Methode 1)

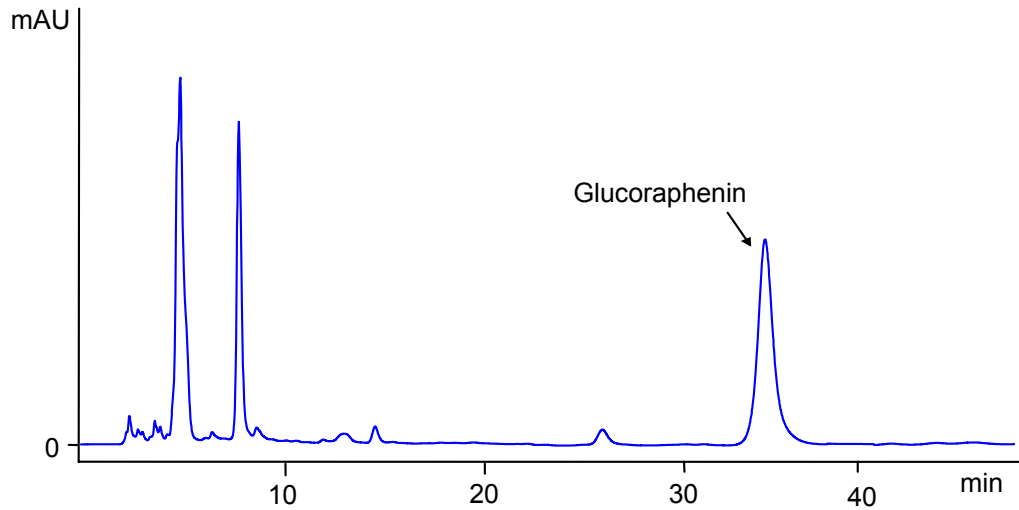


Abb. B-6 Chromatogramm eines Probenextraktes von Rettichsprössen (SP6) detektiert mittels HPLC (Methode 2)

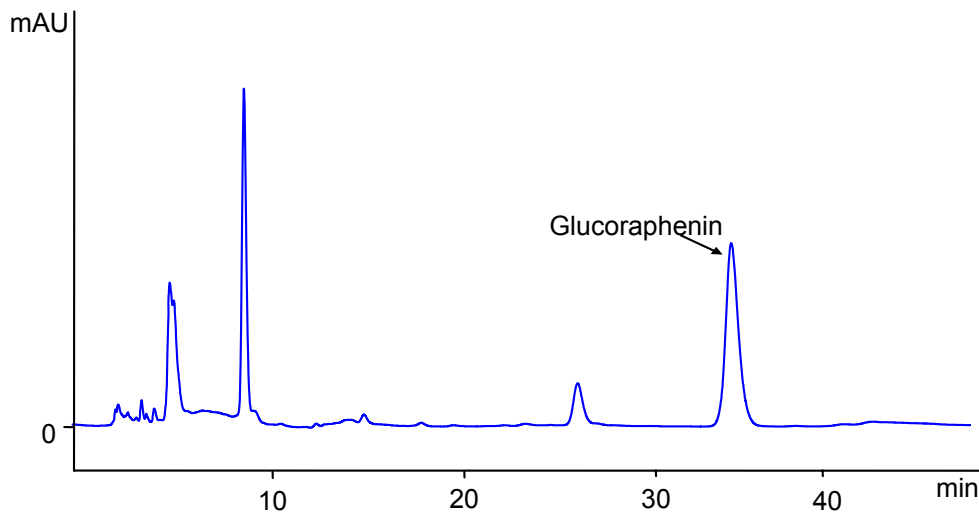


Abb. B-7 Chromatogramm eines Probenextraktes von Sangosprossen (SP8) detektiert mittels HPLC (Methode 2)

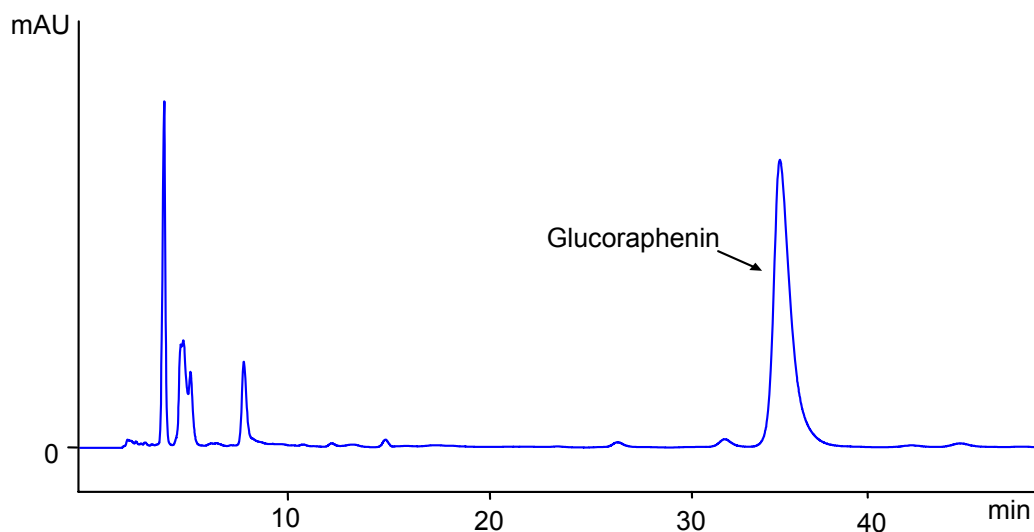


Abb. B-8 Chromatogramm eines Probenextraktes von Sakura Cress® (K9) detektiert mittels HPLC (Methode 2)

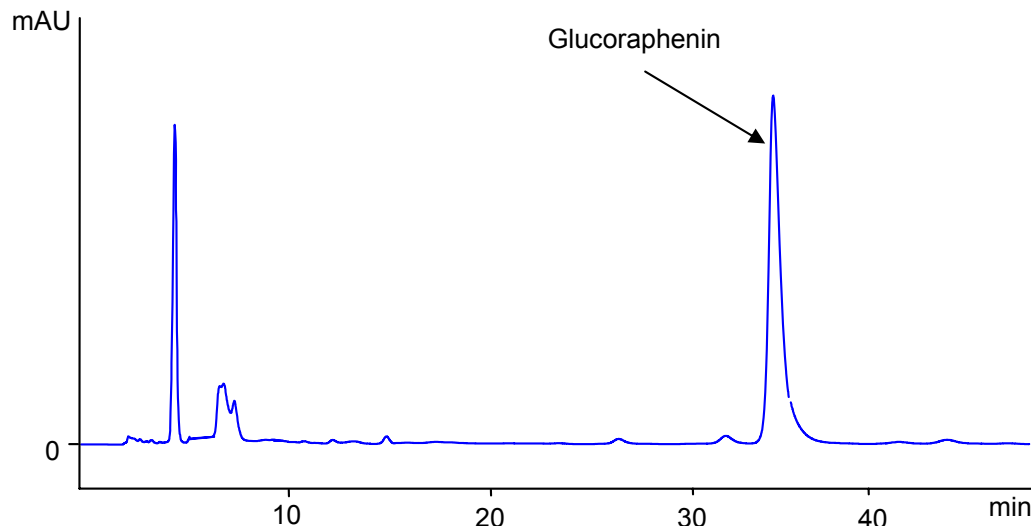


Abb. B-9 Chromatogramm eines Probenextraktes von Daikon Cress® (K6) detektiert mittels HPLC (Methode 2)

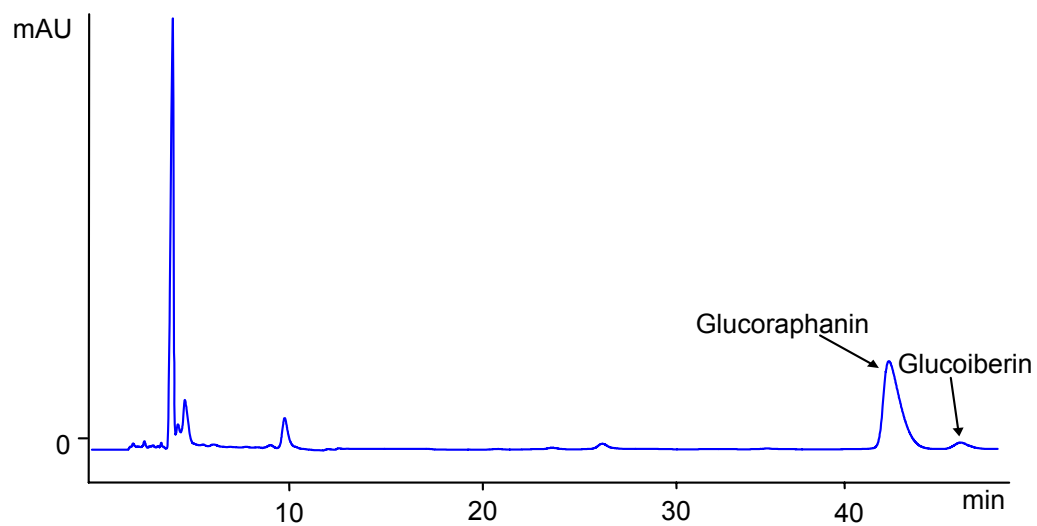


Abb. B-10 Chromatogramm eines Probenextraktes von BroccoCress® (K9) detektiert mittels HPLC (Methode 2)

Zusätzliche Chromatogramme GC

Kressen und Sprossen

Die Abbildungen stehen für die nicht im Ergebnisteil abgebildeten Chromatogramme der Kresse- und Sprossenproben. Proben, die keine GSL enthielten, sind hierbei nicht abgebildet.

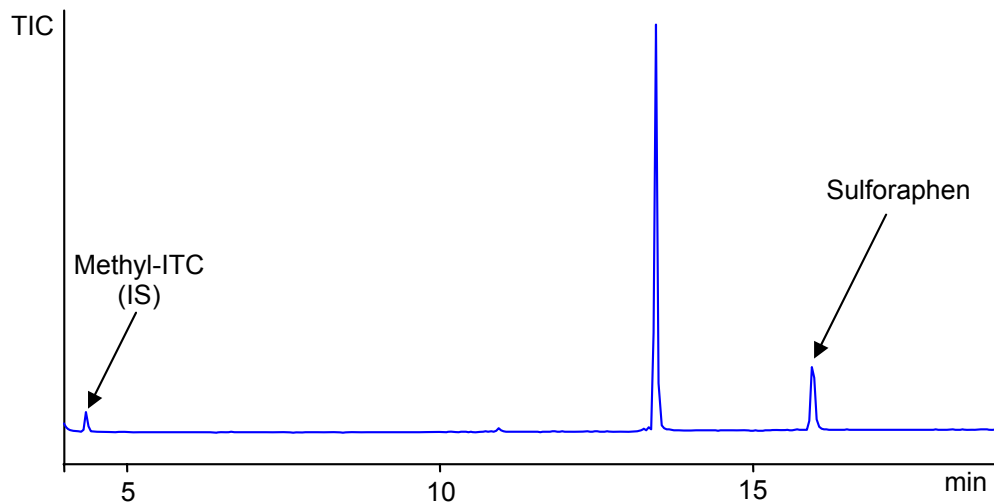


Abb. B-11 Chromatogramm eines Probenextraktes von Rettichsprössen (SP6) detektiert mittels GC-SIM-MS

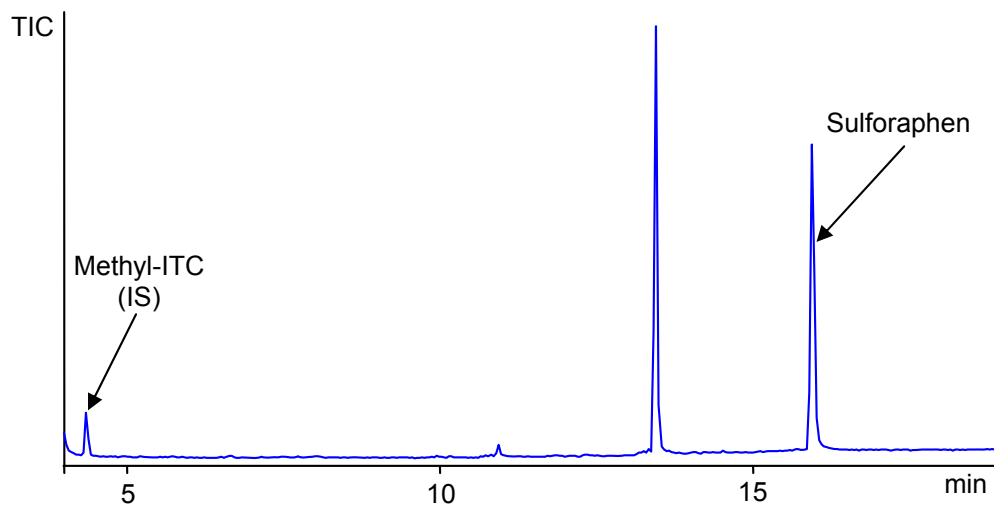


Abb. B-12 Chromatogramm eines Probenextraktes von Sangosprossen (SP8) detektiert mittels GC-SIM-MS

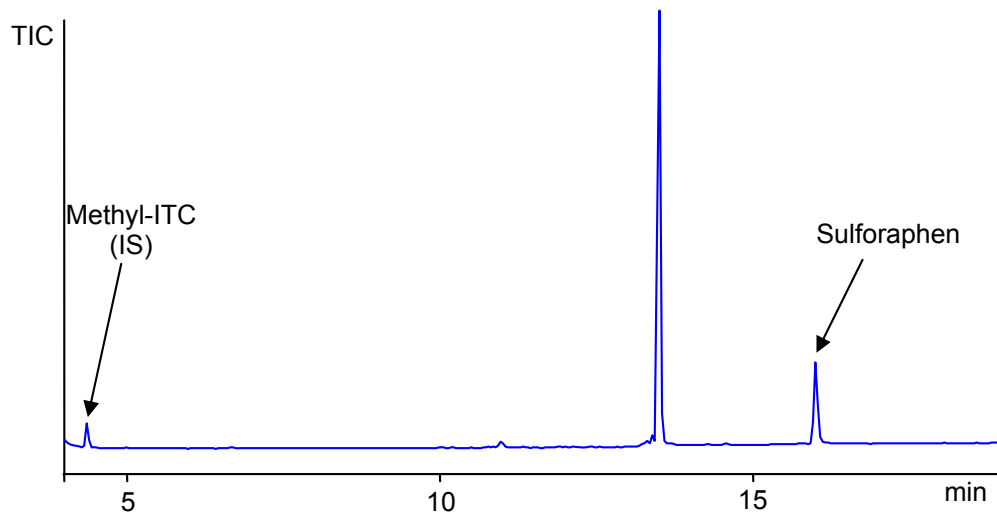


Abb. B-13 Chromatogramm eines Probenextraktes von Daikon Cress[®] (K6) detektiert mittels GC-SIM-MS

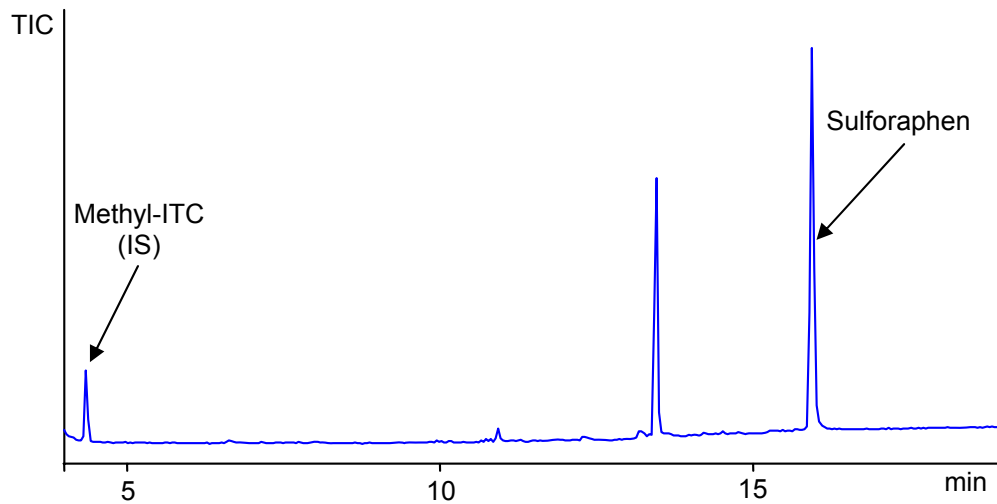


Abb. B-14 Chromatogramm eines Probenextraktes von Sakura Cress[®] (K9) detektiert mittels GC-SIM-MS

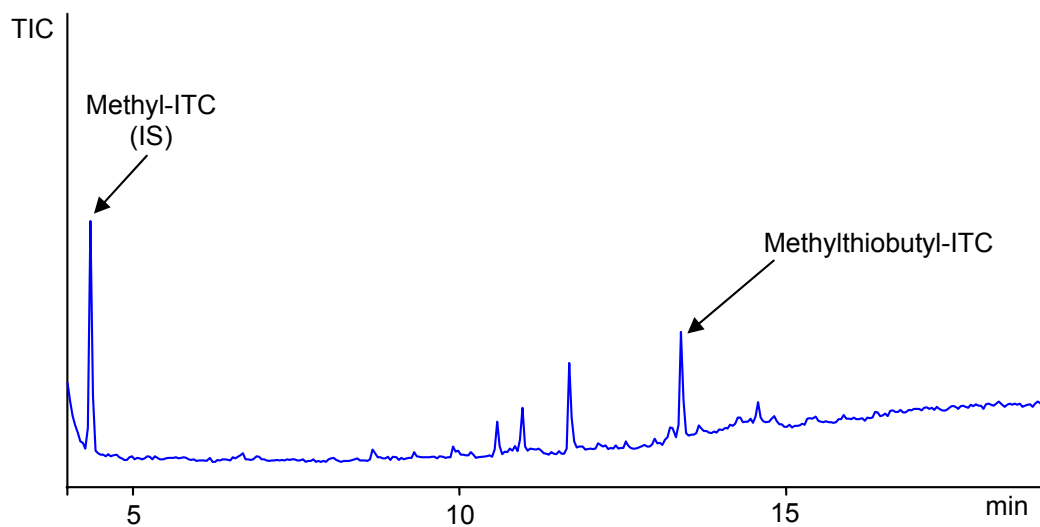


Abb. B-15 Chromatogramm eines Probenextraktes von BroccoCress[®] (K9) detektiert mittels GC-SIM-MS

Rettich und Radieschen

Die Abbildung einer Radieschenprobe steht für die nicht im Ergebnisteil abgebildeten Chromatogramme dieser Gattung; die übrigen Rettich- und Radieschenextrakte lieferten entsprechende Chromatogramme.

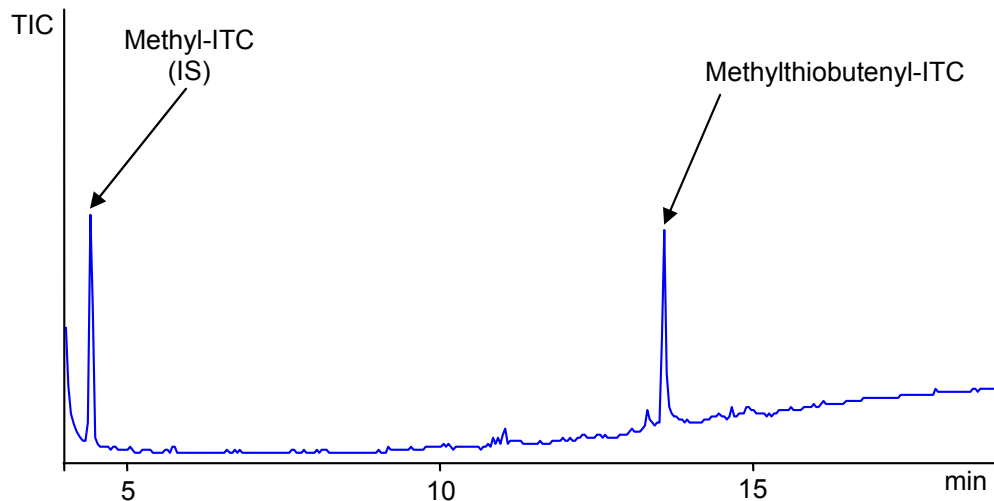


Abb. B-16 Chromatogramm eines Probenextraktes von Radieschen (RA1) detektiert mittels GC-SIM-MS

Senf, Meerrettich und Wasabi

Die Abbildungen stehen für die nicht im Ergebnisteil abgebildeten Chromatogramme der Probenextrakte von Senf, Meerrettich und Wasabi. Hierbei wurden lediglich Proben berücksichtigt, die in Prozessierung und Beschaffenheit von den dort bereits dargestellten Proben abweichen.

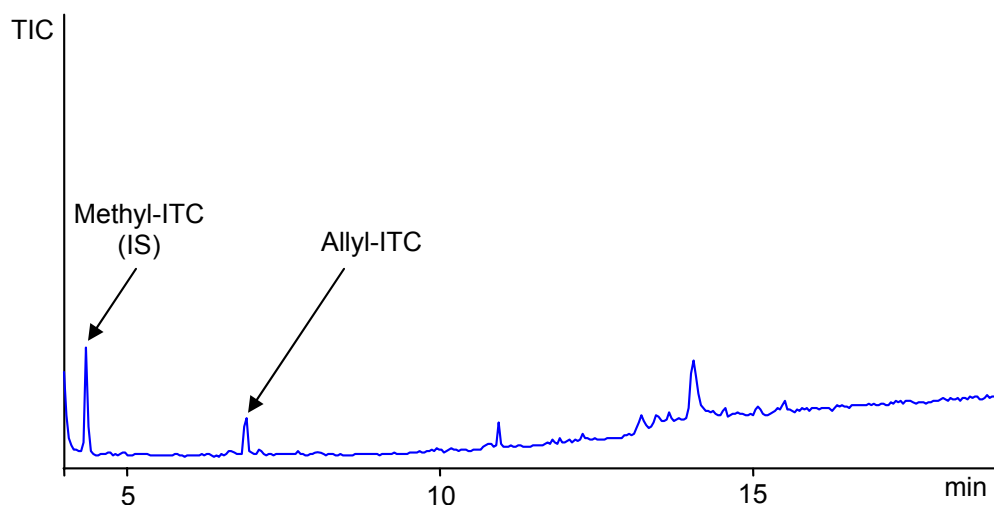


Abb. B-17 Chromatogramm eines Probenextraktes von Süßem Senf (S4) detektiert mittels GC-SIM-MS

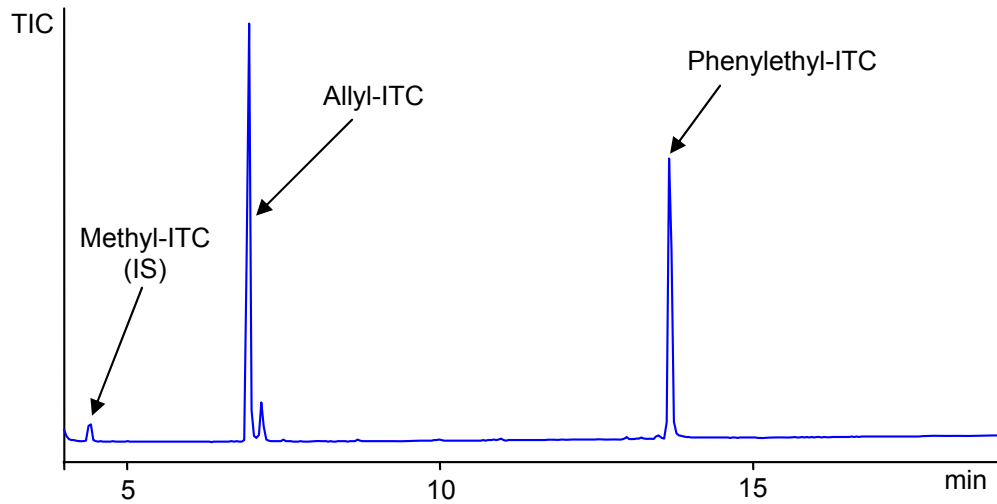


Abb. B-18 Chromatogramm eines Probenextraktes von frischem Meerrettich (M5) detektiert mittels GC-SIM-MS

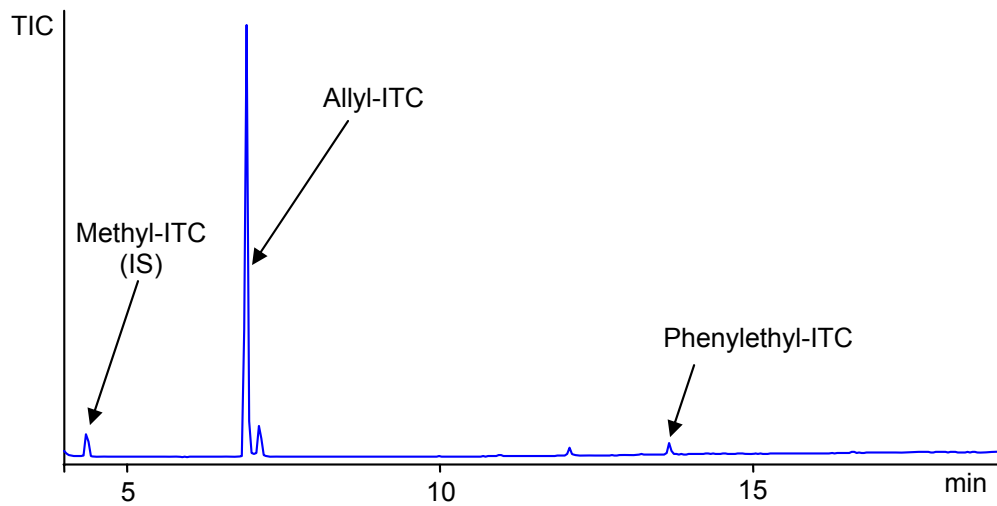


Abb. B-19 Chromatogramm eines Probenextraktes von Wasabipaste (W2) detektiert mittels GC-SIM-MS

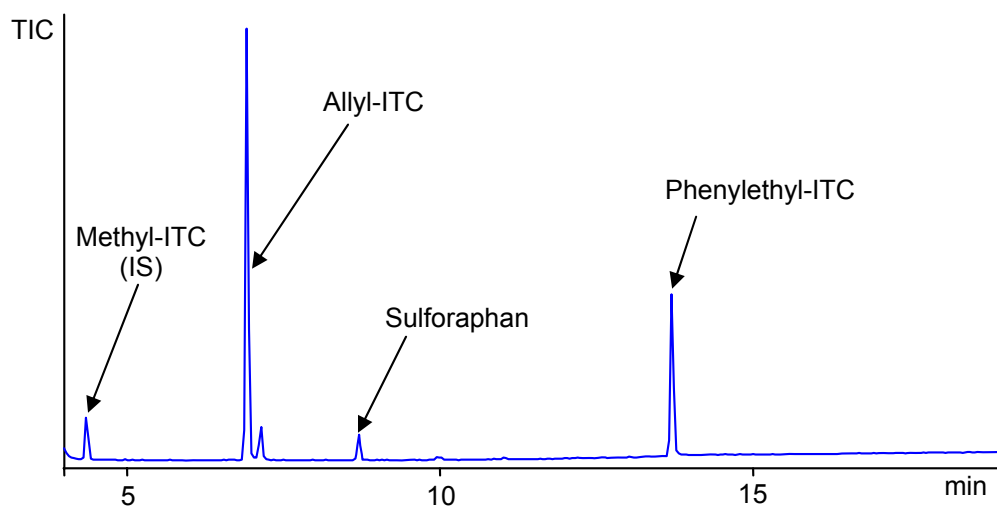


Abb. B-20 Chromatogramm eines Probenextraktes von Wasabipulver (W4) detektiert mittels GC-SIM-MS

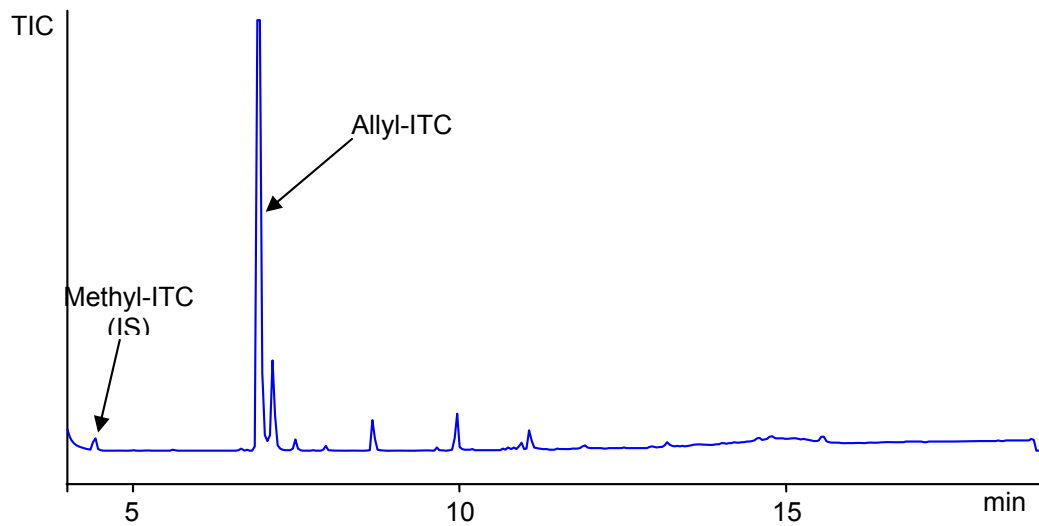


Abb. B-21 Chromatogramm eines Probenextraktes von Wasabi-Erdnüssen (W5) detektiert mittels GC-SIM-MS

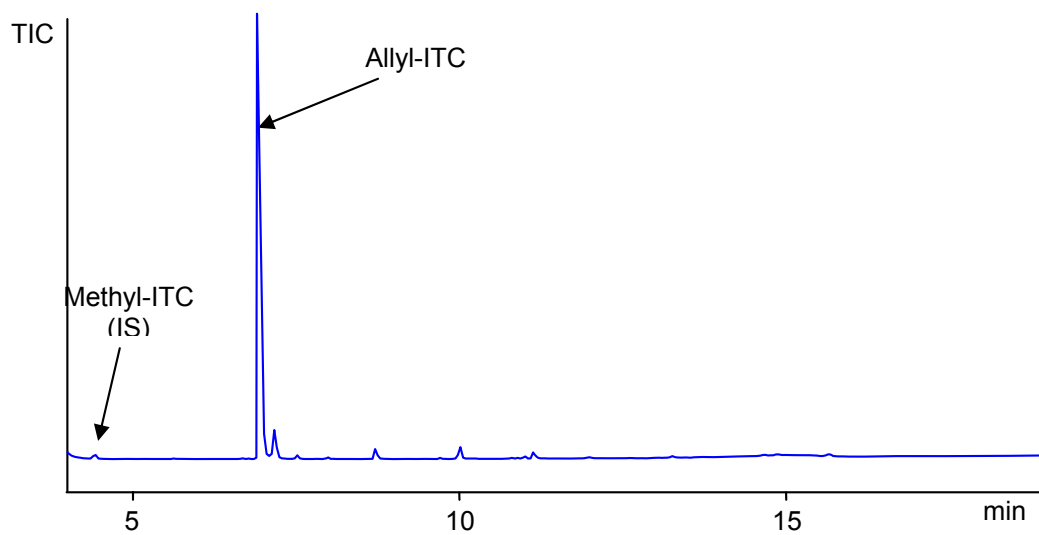


Abb. B-22 Chromatogramm eines Probenextraktes von Wasabi-Chips (W6) detektiert mittels GC-SIM-MS

Massenspektren HPLC

Die Abbildungen B-23 bis B-36 zeigen die mittels Kopplung von HPLC (Methode 2) und MS gewonnen Massenspektren der Glucosinolat-Einzelstandards; Methodenparameter vgl. Kapitel 4.3.2 und Kapitel 4.3.3

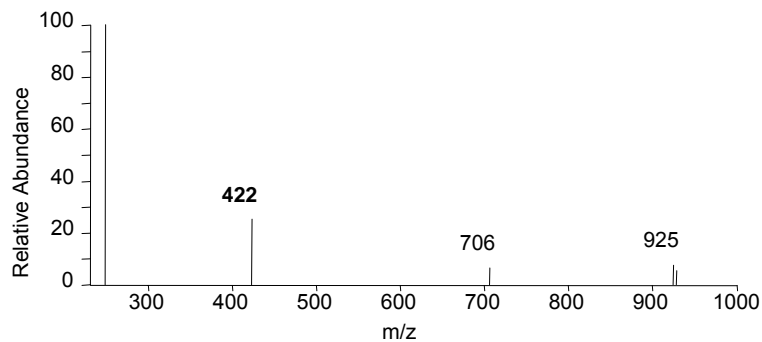


Abb. B-23 Massenspektrum von Glucoiberin

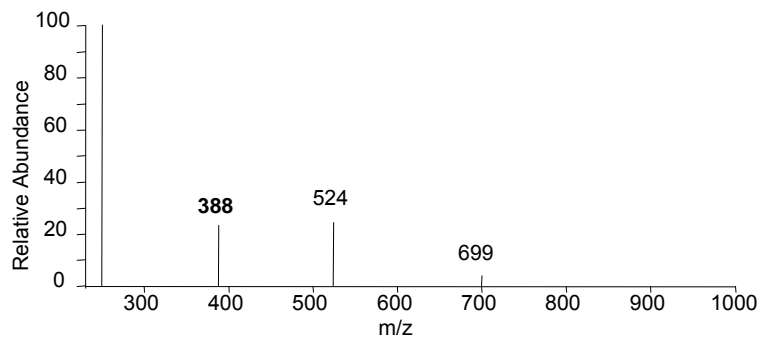


Abb. B-24 Massenspektrum von Progoitrin

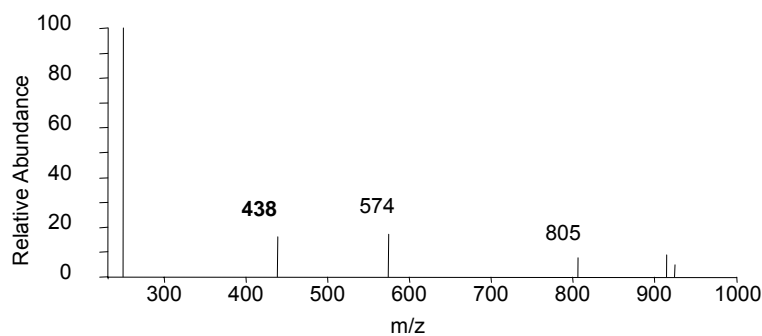
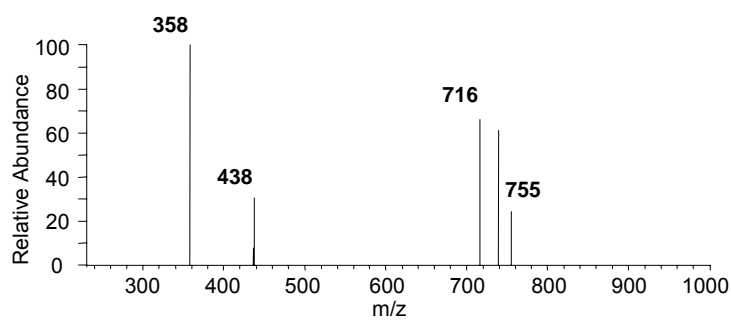
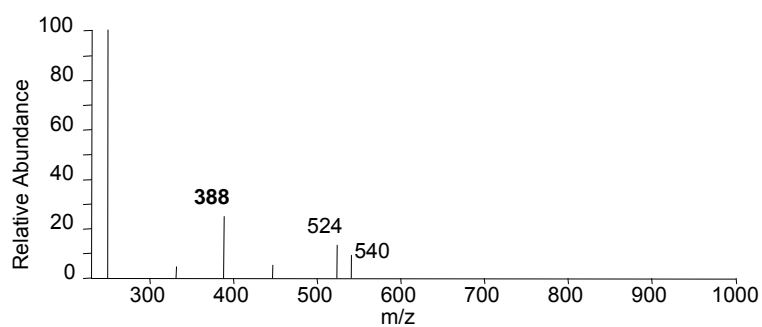
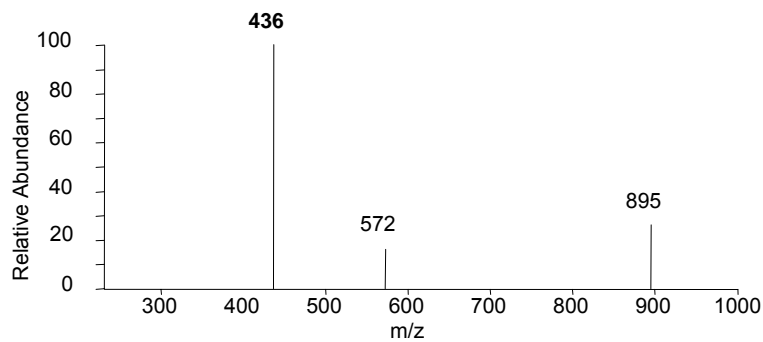
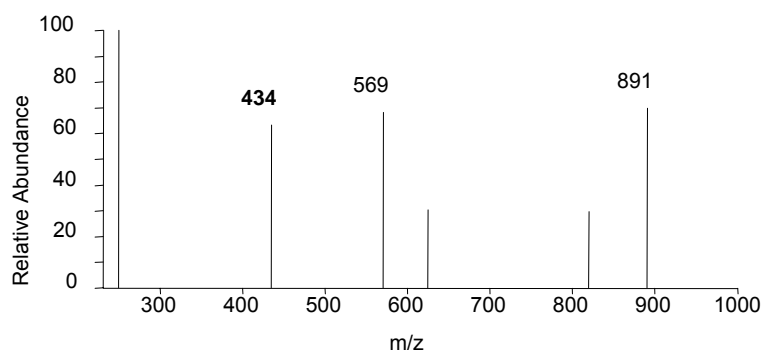


Abb. B-25 Massenspektrum von Glucocheirolin

**Abb. B-26** Massenspektrum von Sinigrin**Abb. B-27** Massenspektrum von Epiprogoitrin**Abb. B-28** Massenspektrum von Glucoraphanin**Abb. B-29** Massenspektrum von Glucoraphenin

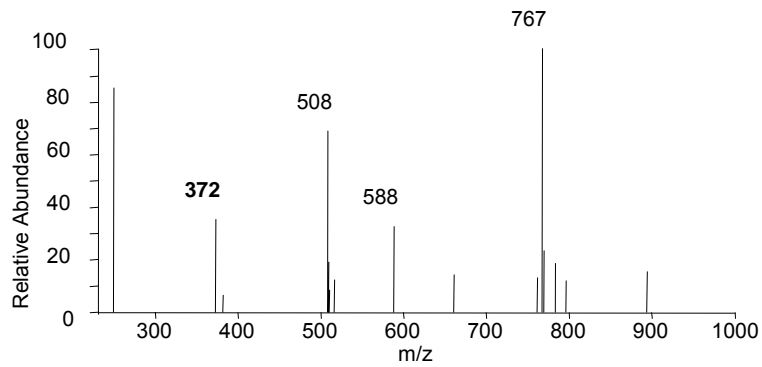


Abb. B-30 Massenspektrum von Gluconapin

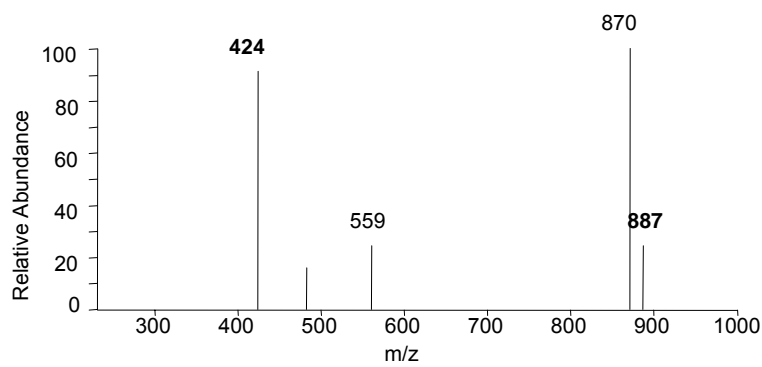


Abb. B-31 Massenspektrum von Sinalbin

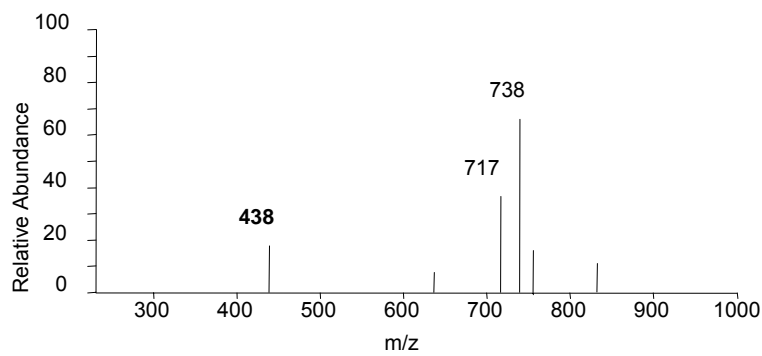


Abb. B-32 Massenspektrum von Glucosibarin

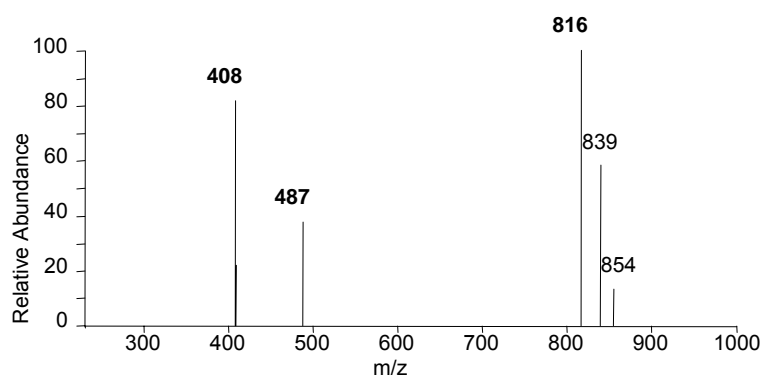


Abb. B-33 Massenspektrum von Glucotropaeolin

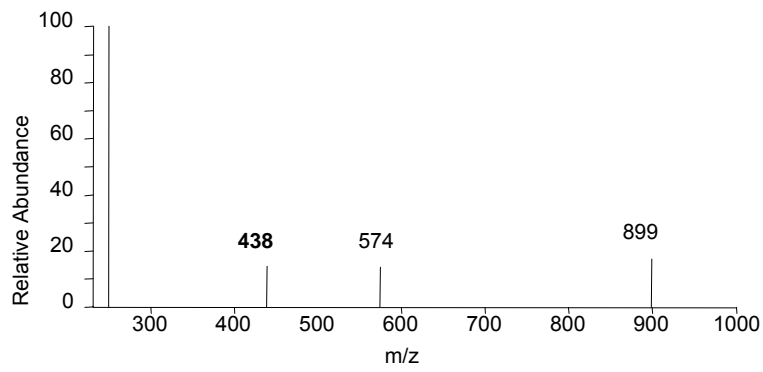


Abb. B-34 Massenspektrum von Glucobarbarin

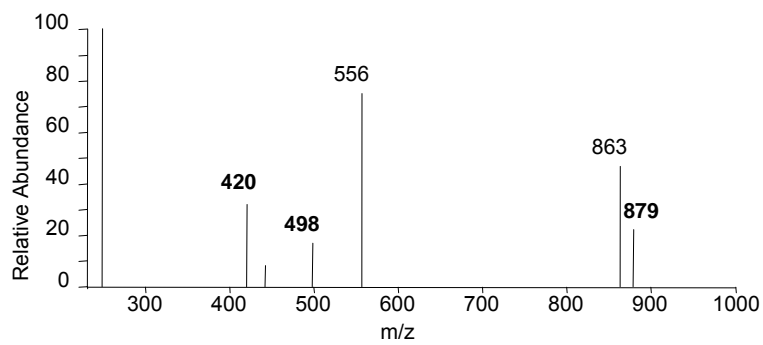


Abb. B-35 Massenspektrum von Glucoerucin

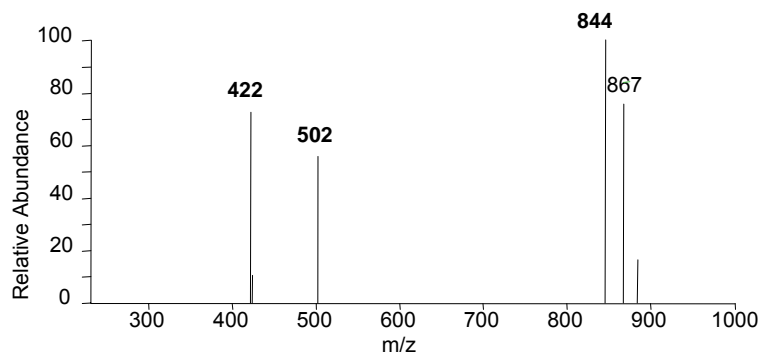


Abb. B-36 Massenspektrum von Gluconasturtiin

Massenspektren GC

Nachfolgende Abbildungen B-37 bis B-47 zeigen die Massenspektren der Isothiocyanat-Einzelstandards, detektiert mittels Kopplung von GC und MS; Methodenparameter vgl. Kapitel 5.2

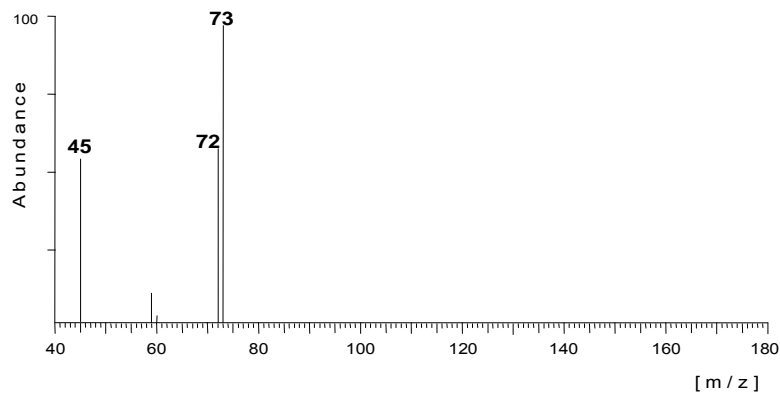


Abb. B-37 Massenspektrum von Methyl-ITC

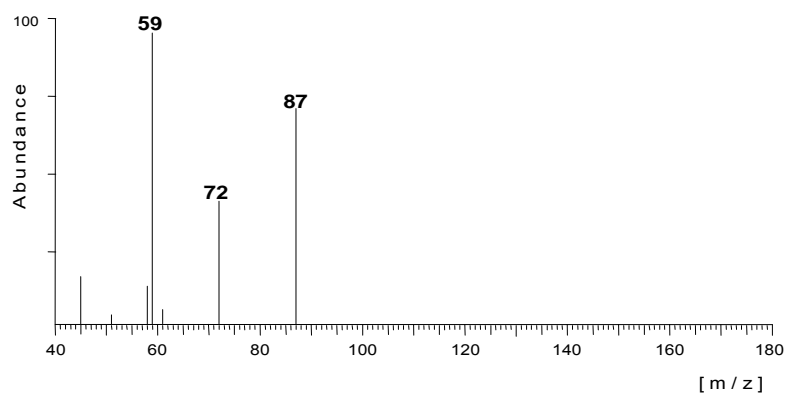


Abb. B-38 Massenspektrum von Ethyl-ITC

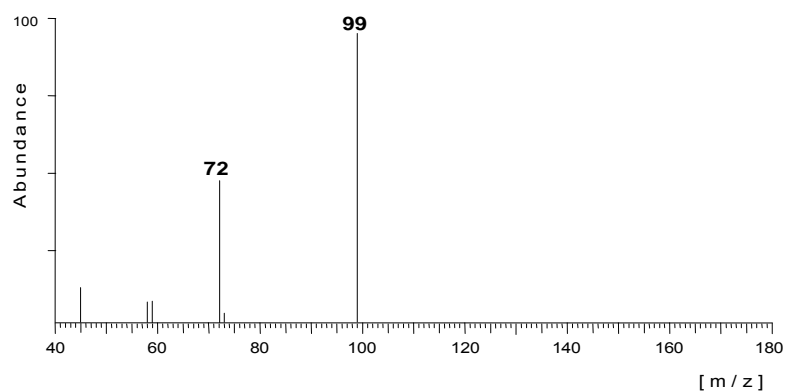
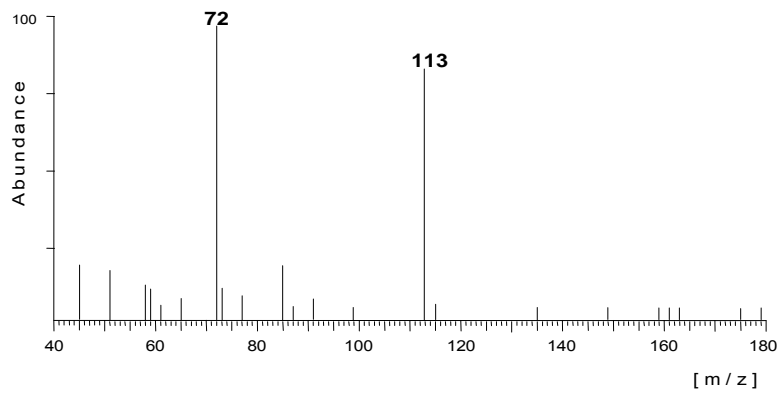
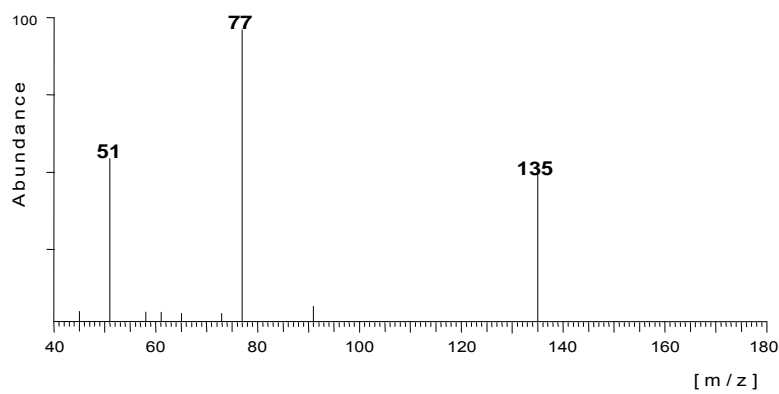
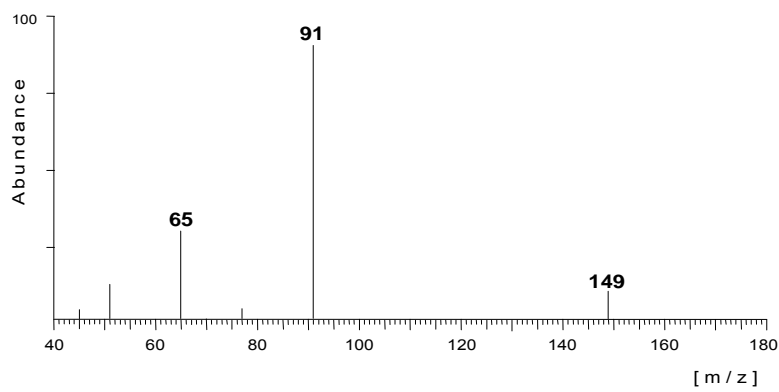
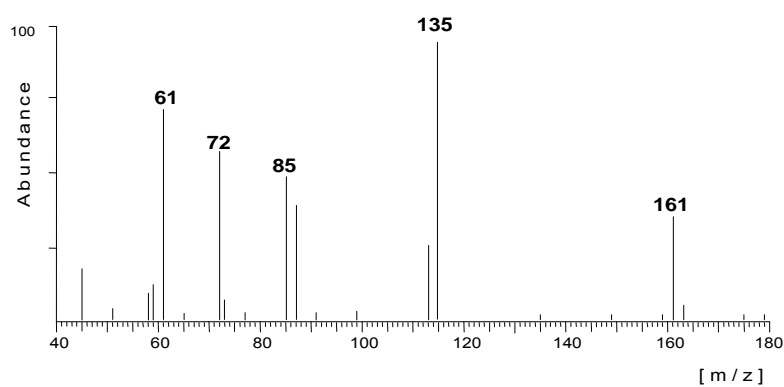


Abb. B-39 Massenspektrum von Allyl-ITC

**Abb. B-40** Massenspektrum von Sulforaphan**Abb. B-41** Massenspektrum von Phenyl-ITC**Abb. B-42** Massenspektrum von Benzyl-ITC**Abb. B-43** Massenspektrum von Methylthiobutyl-ITC

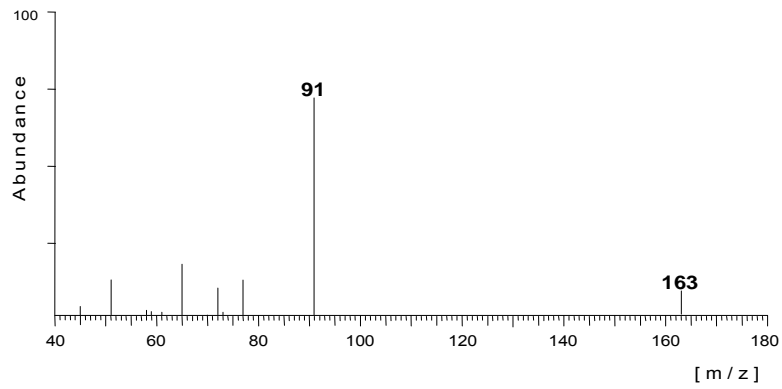


Abb. B-44 Massenspektrum von Phenylethyl-ITC

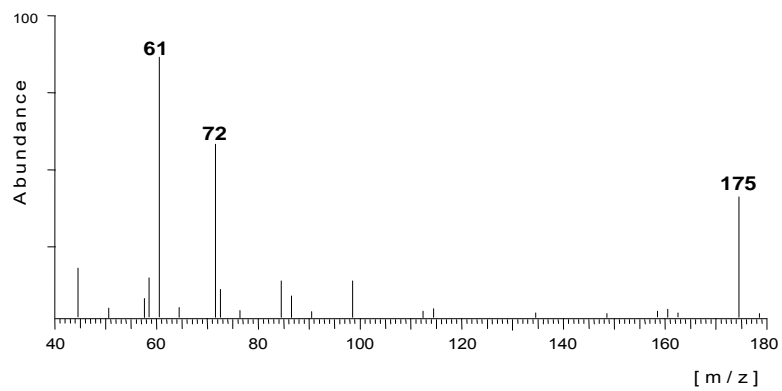


Abb. B-45 Massenspektrum von Methylthiopenteny-ITC

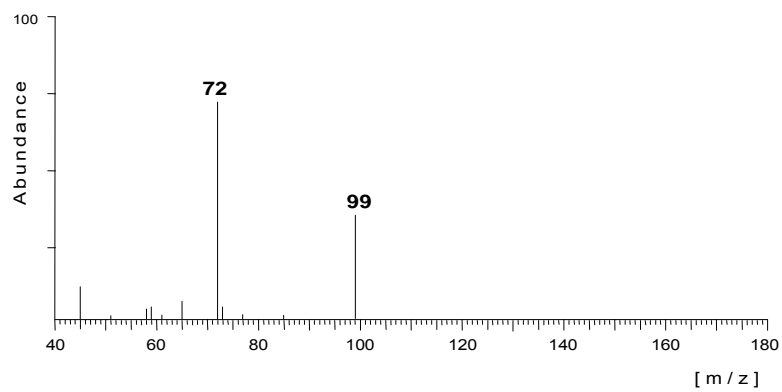


Abb. B-46 Massenspektrum von Methylsulfonylpropyl-ITC

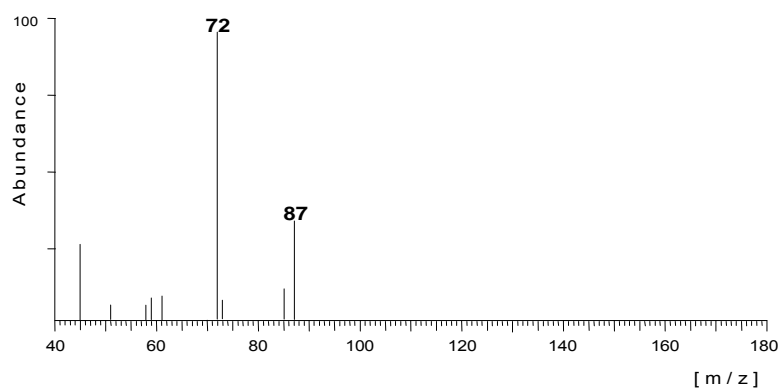


Abb. B-47 Massenspektrum von Sulforaphen

Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation

**Analyse von Glucosinolaten und Isothiocyanaten mittels
Flüssigkeitschromatographie- bzw. Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Gießen, den 09. Juni 2010

Kerstin Kübler

Danksagung

Herrn Prof. Brückner danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und seine stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Herzlich danken möchte auch Herrn Prof. Zorn für die Übernahme der Zweitbetreuung und der daraus folgenden Möglichkeit, am Fachbereich 08 zu promovieren.

Mein Dank gilt weiterhin der Arbeitsgruppe Mersch-Sundermann und im Speziellen Herrn Dr. Stahl für die gute Zusammenarbeit und wertvollen Tipps im Bereich der Isothiocyanatanalytik.

Danken möchte ich außerdem Prof. Mühling und seinen Mitarbeitern für Bereitstellung eines Teiles der Proben und für eine gute Zusammenarbeit.

Zudem danke ich dem 'Innovationsfond der Justus Liebig-Universität Gießen' für die anfängliche finanzielle Förderung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ralf Pätzold und Herrn Dr. Jochen Kirschbaum für deren stete Hilfsbereitschaft und fachlich kompetente Unterstützung.

Zudem danke ich meinem Mitdoktoranden Christoph Theis für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, und hier im Speziellen meinen Master- bzw. Bachelorstudentinnen Bettina Fröhling, Karolin Spundflasche und Sophia Wombacher, sowie der Arbeitsgruppe Wenzel möchte ich für die gute Zusammenarbeit und ein hervorragendes Arbeitsklima danken.

Zum Schluss danke ich ganz herzlich meiner Familie und meinen Freunden, die mit viel Geduld und ihrer ganzen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Publikationen

2010

PÄTZOLD R, KÜBLER K (2010) Determination of Isothiocyanates and Intact Glucosinolates in Foodstuff Using GC-MS and HPLC-MS. (*Accepted abstract, 28th ISC Valencia*)

KÜBLER K, ANDZINSKI L, PÄTZOLD R (2010) Bestimmung von *Monascus*-Pigmenten in fermentiertem Reismehl. *Lebensmittelchemie* **64** (*im Druck*)

FEURING S, KÜBLER K, PÄTZOLD R (2010) Isolation und Aktivität von Myrosinase aus Meerrettich. *Lebensmittelchemie* **64** (*im Druck*)

KÜBLER K, FRÖHLING B, PÄTZOLD R (2010) Detektion von intakten Glucosinolaten in Kressen, Sprossen und *Moringa spp.* mittels HPLC-MS. *Lebensmittelchemie* **64(1)**: 13-15

KÜBLER K, BRÜCKNER H, PÄTZOLD R (2010) Determination of Intact Glucosinolates by High Performance Liquid Chromatography-Mass-Spectrometry (HPLC-MS). (*Akzeptierter Kongressbeitrag 27th ISC Münster, Paper in Vorbereitung für Journal of Agricultural and Food Chemistry*)

2009

GERENDAS J, PODESTAT J, STAHL T, KÜBLER K, BRÜCKNER H, MERSCH-SUNDERMANN V, MÜHLING KH (2009) Interactive Effects of Sulfur and Nitrogen Supply on the Concentration of Sinigrin and Allyl Isothiocyanate in Indian Mustard (*Brassica juncea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57(9)**: 3837-3844.

KÜBLER K, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2009) Vergleich der Gehalte von intakten Glucosinolaten in unterschiedlich behandelten Rucolaproben. *Lebensmittelchemie* **63(1)**: 19

2008

KÜBLER K, STAHL T, BREUNING S, MERSCH-SUNDERMANN V, MÜHLING KH, BRÜCKNER H (2008) Bestimmung von Thioglucosinolaten und Isothiocyanaten in Kohlrabi. *Lebensmittelchemie* **62**: 19

KÜBLER K, KIRSCHBAUM J, BRÜCKNER H (2008) Charakterisierung von intakten Glucosinolaten mittels HPLC/ESI-MS. *Lebensmittelchemie* **62**: 19-20

2006

KÜBLER K, WENZEL M, HANSELKO M, KIRSCHBAUM J, BRÜCKNER H (2006)
HPLC-MS Analyse von Farbkomponenten in *Monascus* spp.
Lebensmittelchemie **60**: 15-16

WENZEL M, KÜBLER K, KIRSCHBAUM J, BRÜCKNER H (2006) Bestimmung von
Aminosäureisomeren und des Mycotoxins Citrinin in *Monascus*-Extrakten.
Lebensmittelchemie **60**: 16-17