

1 Einleitung

Bratwurst und Tafelspitz, Sushi und Königsberger Klopse: diese beliebten Gerichte sind untrennbar verbunden mit dem Aroma von Senf und Meerrettich, Wasabi und Kapern. Die Herkunft der Substanzen, die den charakteristischen Geruch und Geschmack dieser vier Gewürzpflanzen erzeugen, ist identisch: Es sind Produkte des enzymatischen Abbaus von Glucosinolaten.

Glucosinolate kommen in Pflanzen gemeinsam mit dem als Myrosinase bezeichneten Enzym Thioglucosid-Glucohydrolase (EC 3.2.1.147) vor. Das Enzym und sein Substrat sind in der intakten Pflanze jedoch räumlich voneinander getrennt. Sobald die Zellstruktur des Pflanzenmaterials zerstört wird, setzt in Anwesenheit von Wasser die enzymatische Hydrolyse der Glucosinolate ein.

Die hierbei entstehenden, vielfältigen Abbauprodukte charakterisieren nicht nur die oben genannten Gewürze, sondern tragen auch zum Aroma vieler Gemüse-Sorten aus der Gattung *Brassica*, wie Weiße Rüben, Steckrüben, Rosenkohl, Blumenkohl, Kohlrabi, Weiß- und Rotkohl, bei.

Neben diesen Sinneseindrücken rufen die Hydrolyseprodukte jedoch auch weitere biologische Effekte hervor. In Pflanzen üben sie Verteidigungs- oder Speicherfunktionen aus; für Mensch und Tier können sie sowohl gesundheitsfördernd als auch -schädlich (antinutritiv) sein.

Pflanzen aus der Gattung *Brassica* wurden bereits in der Antike kultiviert, zu dieser Zeit jedoch vor allem als Heilmittel und weniger wegen ihres Nutzens als Lebensmittel. Bekannt waren wahrscheinlich verschiedene Kohlformen und vermutlich auch Kohlrabi und Brokkoli. Bereits CATO DER ÄLTERE (234-149 v. Chr.) brachte in seinem Werk „De agri cultura“ den Begriff „brassica“ mit Heilmitteln in Verbindung (29,55).

Heute weiß man beispielsweise, dass antibiotische Wirkungen glucosinolathaltiger Gewächse auf die enzymatischen Abbauprodukte von Glucosinolaten zurückzuführen sind. Benzylisothiocyanat, ein Hydrolyseprodukt des Glucotropäolins (Benzylglucosinolat), besitzt ein breites antimikrobielles Wirkungsspektrum. Glucotropäolin kommt u.a. in Kapuzinerkresse vor, die daher in der Phytotherapie zur Behandlung von Infektionen des Urogenitaltraktes eingesetzt werden kann.

Epidemiologische Studien brachten in den letzten Jahren den erhöhten Verzehr von glucosinolathaltigen *Brassica*-Gemüsen mit einem niedrigeren Risiko für das Auftreten verschiedener Krebsarten in Verbindung. Glucoraphanin (4-Methylsulfinylbutylglucosinolat) ist die in Brokkoli enthaltene Vorstufe des Isothiocyanats Sulforaphan. Diese Substanz wird zu den 40 potentesten krebshemmenden Substanzen gezählt. Seitdem ist das Interesse vor allem der Wissenschaft, aber auch von Erzeugern und Verbrauchern allgemein, an der Aufklärung der Zusammenhänge zwischen dem Glucosinolatgehalt und der Wirkung auf die Gesundheit gestiegen.

Angesichts der vielversprechenden anticancerogenen Effekte treten potentielle gesundheitsschädigende Wirkungen von Glucosinolaten und ihren Hydrolyseprodukten etwas in den Hintergrund. Die Effekte der Hydrolyseprodukte auf Organismen sind jedoch bei weitem nicht nur positiv. Das bekannteste Beispiel ist Progoitrin (2-Hydroxy-3-butenylglucosinolat), ein Bestandteil von Rapssaat. Bei der enzymatischen Hydrolyse entsteht daraus das kropffördernde Goitrin (5-Vinyloxazolidin-2-thion). Um dennoch die Nutzung von Rapsmehl als Viehfutter zu ermöglichen, wurden glucosinolatarme Rapssorten (00-Raps) gezüchtet. Andere Hydrolyseprodukte wirken akut toxisch, sind haut- und schleimhautreizend, üben negative Einflüsse auf Morphologie und Funktion verschiedener Organe aus, sind embryotoxisch oder fördern unter Umständen sogar die Cancerogenese.

Wurden Glucosinolate wie Progoitrin früher als „natürliche Gifte“ angesehen und ihr Gehalt durch Züchtung minimiert, so wird dagegen heutzutage versucht, Glucosinolate in bestimmten Pflanzen, zum Beispiel das 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat in Brokkoli, durch Züchtung oder genetische Manipulation anzureichern und so das anticancerogene Potential dieser Nahrungspflanzen zu erhöhen.

Das Wissen über die Wirkung von Glucosinolaten und ihren Hydrolyseprodukten auf Organismen weist bis heute Lücken auf und muss daher weiter erforscht werden. Außerdem müssen glucosinolathaltige Lebensmittel, Arzneimittel und Futtermittel sowie der Einsatz von Glucosinolaten als Biozide überprüft werden. Für diese Zwecke sind adäquate Analysenmethoden notwendig. Diese sollten sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage ermöglichen.

Aus Sicht des Analytikers vereinen die Glucosinolate bei verhältnismäßig kleiner Molekülgröße eine Vielzahl von interessanten Strukturmerkmalen auf sich. Sie enthalten in jedem Molekül unter anderem Schwefel, Stickstoff und eine Glucoseeinheit. Diese verleiht den Glucosinolaten gemeinsam mit der anionischen Sulfatgruppe ihren hydrophilen

Charakter. Durch die C=N-Doppelbindung können alle Glucosinolate im UV bei einer Wellenlänge von $\lambda = 235$ nm detektiert werden. Nicht zuletzt stellen diese Moleküle Substrate für Enzyme, insbesondere für die glucosinolat-spezifische Myrosinase, aber z.B. auch für Sulfatase dar. Dem Analytiker eröffnet sich ein großes Spektrum an Möglichkeiten, so dass nahezu jede im Bereich der Lebensmittelanalytik bestehende Analysenmethode auch auf Glucosinolate und/oder deren Abbauprodukte Anwendung finden kann. Es gibt folglich zahlreiche Applikationen aus dem Bereich der Chromatographie und Elektrophorese, diverse Derivatisierungsoptionen sowie vielfältige Detektionsvarianten.

Da das Enzym Myrosinase spezifisch Glucosinolate hydrolysiert, eignet es sich in idealer Weise für den Einsatz in einer Biosensor-Methode. Biosensoren sind definiert als Kopplung aus einer biologischen Komponente und einem Signalwandler (Transducer). Sie werden vor allem aufgrund ihrer Spezifität, Sensitivität und meist auch schnellen Reaktion geschätzt. Der bekannteste Biosensor erfasst den Glucosegehalt im Blut. Durch stetige Verbesserungen vor allem in der Handhabung steht er Diabetikern mittlerweile zur relativ bequemen Eigenkontrolle des Blutglucosespiegels zur Verfügung. Der Marktanteil von Sensoren zur Diabeteskontrolle beträgt etwa 90 % des Biosensor-Marktes (182). Daher befasst sich auch heute noch ein Großteil der Biosensor-Forschung mit der Glucose-Analytik.

Kopplungen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Biosensoren nutzen häufig gruppenspezifische Enzyme wie Aminosäure-Oxidasen, Aldehyd-Dehydrogenasen oder Galactose-Oxidasen. An einer HPLC-Säule werden zunächst die einander ähnlichen Substrate chromatographisch getrennt. Anschließend werden sie online durch die immobilisierten Enzyme umgesetzt. In einem zum Analyten äquimolaren Verhältnis entstehen im Zuge der enzymatischen Reaktion oxidierbare Substanzen wie Wasserstoffperoxid oder NADH, die elektrochemisch erfasst werden.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer HPLC/Biosensor-Kopplung zur Analytik von Glucosinolaten. Diese sollten nach einer HPLC-Trennung durch Myrosinase hydrolysiert und die als Zwischenprodukt entstehende Glucose durch einen Glucoseoxidase-Reaktor zu detektierbarem Wasserstoffperoxid umgesetzt werden. Neben der Trennung von Glucosinolaten sollte die HPLC-Methode auch eine Abtrennung eventuell im Pflanzenmaterial vorliegender endogener Glucose ermöglichen. Eine solche online-HPLC/Biosensor-Kopplung zur Glucosinolat-Analytik wurde bisher noch nicht beschrieben.

Im Rahmen einer Kooperation zur Entwicklung eines Phytotherapeutikums soll diese Methode langfristig die schnelle und zuverlässige Bestimmung des Glucotropäolingehaltes

von Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) ermöglichen. Daher wurde diese Pflanze neben den Standardsubstanzen als Substrat für die Methodenentwicklung eingesetzt.

Unter Berücksichtigung ausgewählter neuer Forschungsergebnisse werden zunächst das Glucosinolat/Myrosinase-System, insbesondere die zur Immobilisierung eingesetzte Myrosinase aus *S. alba*, und die Kapuzinerkresse beschrieben. Anschließend werden die bisherigen Analysenmethoden, die meist auf eine Quantifizierung von Hydrolyseprodukten abzielen, zusammenfassend dargestellt. Die Entwicklung der HPLC-Trennmethode sowie schließlich der HPLC/Biosensor-Kopplung wird ausführlich erläutert. Ergänzend wird eine neue Methode zur Probenvorbereitung von Kapuzinerkresse durch Festphasenextraktion dargestellt.

2 Kenntnisstand

2.1 Glucosinolate

Die gemeinsame Grundstruktur der Glucosinolate ist eine sulfonierte Oxim-Einheit, die am C-Atom mit β -Thioglucose und einer Seitenkette R substituiert ist (Abbildung 1). Dieser molekulare Aufbau der Glucosinolate ist seit 1956 abgesichert (50). Glucosinolate werden in aliphatische, aromatische und Indol-Glucosinolate eingeteilt, je nachdem, ob sich die Seitenkettenstruktur von aliphatischen (Methionin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin) oder aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin) oder Tryptophan ableitet (223). Einzelne Derivate sind am Glucose-Molekül mit Hydroxyzimtsäuren acyliert oder besitzen eine glykosylierte Seitenkette R (6). Bisher sind über 120 verschiedene Glucosinolate bekannt (52).

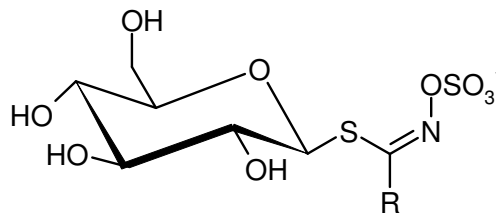


Abbildung 1: Grundstruktur von Glucosinolaten, R = Seitenkette.

Die räumliche Struktur von Glucosinolaten ist seit der Röntgenstrukturanalyse des Sinigrins (2-Propenylglucosinolat) bekannt (132). Sinigrin ist um die Doppelbindung herum nahezu planar. Glucosinolate sind bezüglich der C=N-Doppelbindung Z-Isomere (52,148).

Die Thioglucoseeinheit und die Sulfatgruppe begründen den hydrophilen Charakter der Glucosinolate: Die intakten Moleküle sind leicht wasserlöslich und nicht flüchtig. Die Seitenkette R kann jedoch sowohl lipophiler (n-Hexylglucosinolat) als auch hydrophiler (Rhamnose-Derivate) Natur sein, was bei der Extraktion und Analyse von Glucosinolatabbauprodukten berücksichtigt werden muss (52,148).

Die Sulfatgruppe verleiht den Glucosinolaten ihre anionische Struktur (136,148). Die Moleküle besitzen sehr niedrige pK_a -Werte, beispielsweise liegt der pK_a -Wert von Glucotropäolin bei -2 (148,188). Das Gegenion ist häufig Kalium. Auch kommerziell sind die

Glucosinolate zumeist als Kaliumsalze erhältlich. Im Gegensatz zu Tetramethylammoniumsalzen kristallisieren die Kaliumsalze jedoch nicht immer gut (188). Da das für diese Arbeit als Standardsubstanz benötigte Kaliumsalz des Glucotropäolins zeitweise jedoch nicht über den Chemikalienhandel bezogen werden konnte, wurde es in Anlehnung an eine Vorschrift von THIES aus den glucotropäolinreichen Samen der Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) isoliert (s. 5.2.1) (188).

Glucosinolate sind optisch aktiv; so ist Glucotropäolin (Tetramethylammoniumsalz) linksdrehend mit einem Drehwert von $[\alpha]_D^{28} = -16,7^\circ$ (H₂O) (51,183).

Die Glucosinolate werden zwar als chemisch stabil beschrieben, zersetzen sich aber leicht in sauren und basischen Lösungen (50,67,148). Ein Erhitzen glucosinolathaltiger Proben auf 70-110 °C zur Inaktivierung endogener Myrosinase bei der Analysenvorbereitung wird als unkritisch bezüglich der thermischen Stabilität angesehen (73,136). Andererseits wird die Reduzierung des Glucosinolatgehalts beim Kochen von Weißkohl neben der Auslaugung in das Kochwasser auch auf thermischen Abbau zurückgeführt (216). Eindeutige Angaben zur thermischen Stabilität liegen nicht vor.

Das Vorkommen der Glucosinolate ist beschränkt auf Pflanzenfamilien in der Klasse der dikotyledonen Angiospermen. Sie sind insgesamt bisher in 16 Familien nachgewiesen worden (52). Bereits in den 70er Jahren wurde vorgeschlagen, 15 Familien unter der Ordnung Capparales zusammenzufassen (Akaniaceae, Bataceae, Brassicaceae, Bretschneideraceae, Capparaceae, Caricaceae, Gyrostemonaceae, Koeberliniaceae, Limnanthaceae, Moringaceae, Pentadiplandraceae, Resedaceae, Salvadoraceae, Tovariaceae und Tropaeolaceae) (168). Lediglich die Euphorbiaceae (Wolfsmilchgewächse) mit der glucosinolathaltigen Gattung *Drypetes* konnte aufgrund abweichender Merkmale nicht in diese Ordnung aufgenommen werden. RODMAN et al. bestätigten diese Einteilung durch neue phylogenetische Studien, bei denen die Datensätze von zwei Genen repräsentativer Pflanzen der 16 Familien kombiniert und auf die Verwandtschaftsverhältnisse bezogen ausgewertet wurde. Tatsächlich erwies sich die Gattung *Drypetes* als phylogenetischer Ausreißer (168). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass sich die Glucosinolat-Biosynthese unabhängig voneinander zweimal entwickelt haben muss und aus einem dieser Ursprünge die Mehrheit der heute der Ordnung Capparales zugeordneten glucosinolathaltigen Pflanzenfamilien hervorging.

In den mehr als 3000 Arten der Familie der Brassicaceae, mitunter auch als Cruciferae oder Kreuzblütler bezeichnet, sind Glucosinolate ubiquitär vertreten. Darüber hinaus wurden sie bisher in mehr als 500 Arten anderer Pflanzenfamilien nachgewiesen.

Während für einige Arten, wie die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) oder den Raps (*Brassica napus*), eine hohe Bandbreite von mehr als 20, teilweise über 30 Glucosinolaten beschrieben ist, liegen in den meisten *Brassica oleracea*-Arten wie Brokkoli, Blumenkohl und Rosenkohl nicht mehr als 5-6 Hauptglucosinolate vor (31,162). In anderen Pflanzen, wie der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*) oder der Papaya (*Carica papaya*), existiert sogar nur ein Glucosinolat, in diesen beiden Fällen das Glucotropäolin. Einen detaillierten Überblick auch über selten vorkommende Glucosinolate sowie ihre Verbreitung im Pflanzenreich geben FAHEY et al. (52). Das Vorkommen von Glucosinolaten in Nahrungspflanzen wurde ausführlich von FENWICK et al. erörtert (55).

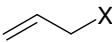
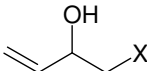
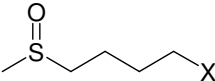
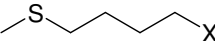
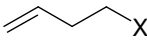
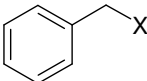
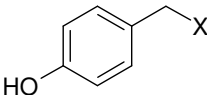
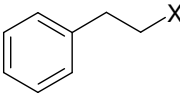
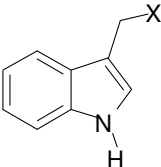
Die Trivialnamen von Glucosinolaten stehen oft in Bezug zu der Pflanze, in der sie erstmals nachgewiesen wurden. So leiten sich die Bezeichnungen **Sinigrin** (2-Propenyl- oder auch Allylglucosinolat) und **Sinalbin** (4-Hydroxybenzylglucosinolat) von *Sinapis alba* und *Brassica nigra*, dem Weißen und Schwarzen Senf, ab, aus dem sie als erste Glucosinolate um 1830 isoliert wurden (136). Benzylglucosinolat wird entsprechend als Glucotropäolin nach der Kapuzinerkresse *Tropaeolum majus* bezeichnet. Glucobrassicin (3-Indolylmethylglucosinolat) bezieht sich auf „*Brassica*“. Die größer werdende Anzahl an Glucosinolaten führte zwar zu der Übereinkunft, den systematischen Seitenketten-Namen vor die Endung „-glucosinolat“ zu stellen (136). Im weiteren Verlauf der Arbeit werden jedoch zumeist die Trivialnamen der Glucosinolate verwendet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über Strukturen und Bezeichnungen ausgewählter Glucosinolate.

Glucosinolate kommen in allen Pflanzenteilen vor. Das Glucosinolatmuster sowie der Gehalt variieren unter Einfluss zahlreicher Faktoren wie Genotyp, Gewebe, Zustand und Entwicklungsstadium der Pflanze, landwirtschaftliche Praxis (z.B. Düngung), Bodenart, klimatische Bedingungen, Jahreszeit und Schädlingsangriffe (30,85,148). In vegetativem Gewebe findet man Gehalte bis zu 5 mg/g Frischgewicht. In Samen liegen generell die höchsten Konzentrationen mit z.T. bis zu 100 mg/g Trockengewicht vor, daher dienen diese auch als Substrat zur Gewinnung von Glucosinolaten (140,162,183,188).

McNAUGHTON und MARKS stellten eine kritische Übersicht bisher veröffentlichter Daten zu Glucosinolatgehalten in *Brassica*-Gemüsen zusammen (137). Betrachtet man die Variationsbreiten der Glucosinolatbestimmungen, so liegt der maximale berichtete Glucosinolatgehalt durchschnittlich um den Faktor 5,8 höher als das ermittelte Minimum. Brokkoli beispielsweise enthielt im Durchschnitt 62 mg Glucosinolate pro 100 g, die

einzelnen Ergebnisse variierten im Bereich 19-128 mg/100 g. Die höchsten Glucosinolatgehalte wurden für Gartenkresse (*L. sativum*) mit 389 mg/100 g beschrieben.

Tabelle 1: Struktur und Bezeichnung ausgewählter Glucosinolate, X = Bindungsposition an Glucosinolatstruktur (Abbildung 1).

Trivialname	Semisystematischer Name	Struktur der Seitenkette	Vorkommen (Auswahl)
Aliphatische Glucosinolate			
Sinigrin	2-Propenylglucosinolat		Senf, Rosenkohl
	Allylglucosinolat		
Progoitrin	2(R)-2-Hydroxy-3-butenylglucosinolat		Raps, Rosenkohl
Glucoraphanin	4-(Methylsulfinyl)butylglucosinolat		Brokkoli
Glucoerucin	4-(Methylthio)butylglucosinolat		Rauke
Gluconapin	3-Butenylglucosinolat		Senf, Meerrettich, Kohlarten
Aromatische Glucosinolate			
Glucotropäolin	Benzylglucosinolat		Kapuzinerkresse, Papaya
Sinalbin	4-Hydroxybenzylglucosinolat		Weißer Senf
Gluconasturtiin	2-Phenylethylglucosinolat		Brunnenkresse
Indolglucosinolat			
Glucobrassicin	3-Indolylmethylglucosinolat		Kohl, Raps

Die Art und die Menge der noch vorhandenen Glucosinolate und die Myrosinase-Aktivität in Lebensmitteln hängen auf komplexe Weise mit der Produktionskette zusammen (140).