

Quantifizierung von Glucosinolat- Abbauprodukten in verarbeiteten Lebensmitteln und humanen Matrices

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Chemie, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
Universität Hamburg

aus dem

Institut für Lebensmittelchemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Franziska Kupke

aus Hamburg

Hamburg

November 2022

1. Gutachter der Dissertation: Frau Prof. Dr. Agnes Weiß, Universität Hamburg
2. Gutachter der Dissertation: Herr Prof. Dr. Sascha Rohn, TU Berlin

Prüfungskommission:

1. Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Michael Steiger
2. stellvertretender Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Wolfgang Maison
3. Prüfer: Prof. Dr. Sascha Rohn

Tag der Disputation: 14.04.2023

Hamburg, den 02. Mai 2023

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertationsschrift wurden am Institut für Lebensmittelchemie, Hamburg School of Food Science, der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Sascha Rohn in der Zeit von Mai 2014 bis Februar 2017 angefertigt.

Hamburg, den 15. November 2022

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Verfassung dieser Arbeit ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Rohn für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen, für seine Unterstützung bei fachlichen Themen und das stets entgegengebrachte Vertrauen. Bei den Kollegen des Leibniz-Instituts für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren, des Programmbereiches QUALITY von Frau Prof. Dr. Monika Schreiner möchte ich mich für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials und des Knowhows, sowie für die spannenden Forschungsaufenthalte bedanken. Mein Dank gilt im Besonderen Frau Dr. Franziska Hanschen für die stets konstruktiven Diskussionen und Unterstützung bei allen Herausforderungen.

Ich danke auch dem gesamten Arbeitskreis Rohn für das freundschaftliche Miteinander und die gegenseitige moralische Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt dir, Michaela, für die vielen gemeinsam verbrachten Momente im Labor und abseits davon.

Danke an Christine Lefert, Nadja Koneberg, Sebastian Ring, Cem Emir und Annekathrin Tarnowski für eure tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit während eurer Bachelor- und Diplomarbeiten. Es war mir eine Freude euch zu arbeiten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich auf diesem Weg begleitet hat. Danke für eure Geduld, den Rückhalt und eure stets ermutigenden Worte.

I Inhaltsverzeichnis

PUBLIKATIONEN

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Kühn, C., Kupke, F., Baldermann, S., Klopsch, R., Lamy, E., Hornemann, S., Pfeiffer, A.F.H., Schreiner, M., Hanschen, F.S., Rohn, *Diverse Excretion Pathways of Benzyl Glucosinolate in Humans after Consumption of Nasturtium (Tropaeolum majus. L.) – A Pilot Study.* Molecular Nutrition & Food Research, 2018. **62**: 1800588.

Hanschen, F.S., Kaufmann, M., Kupke, F., Hackl, T., Kroh, L.W., Rohn, S., Schreiner, M., *Brassica vegetables as sources of epithionitriles: Novel secondary products formed during cooking.* Food Chemistry, 2018, **245**: 564-569.

Kupke, F., Herz, C., Hanschen, F.S., Platz, S., Odongo, G.A., Helmig, S., Bartolomé Rodríguez, M.M., Schreiner, M., Rohn, S., Lamy, E., *Cytotoxic and genotoxic potential of food-borne nitriles in a liver in vitro model.* Scientific Reports, 2016. **6**: 37631.

Hanschen, F.S., Herz, C., Schlotz, N., Kupke, F., Bartolomé Rodríguez, M.M., Schreiner, M., Rohn, S., Lamy, E., *The Brassica epithionitrile 1-cyano-2,3-epithiopropene triggers cell death in human liver cancer cells in vitro.* Molecular Nutrition & Food Research, 2015. **59**: 2178-2189.

Vorträge

Kühn, C., Kupke, F., Hanschen, F.S., Schreiner, M., Rohn, S., *Pharmakokinetik von Glucosinolaten – Ein Fass ohne Boden?* Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 07.-08. März 2018, Hannover.

Kühn, C., Kupke, F., Herz, C., Schlotz, N., Baldermann, S., Hornemann, S., Pfeiffer, A.F.H., Lamy, E., Schreiner, M., Hanschen, F.S., Rohn, S., *Pharmacokinetics of glucosinolates – a bottomless pit?* 4th International Glucosinolate Conference, 17.-20. September 2017, Berlin.

Kühn, C., Kupke, F., Hanschen, F.S., Schreiner, M., Rohn, S., *Pharmakokinetik von Glucosinolaten – Ein Fass ohne Boden?* 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 25.-27. September 2017, Würzburg.

Kupke, F., Baldermann, S., Tarnowski, A., Schreiner, M., Rohn, S., Hanschen, F.S., *Identifizierung von flüchtigen Glucosinolat-Abbauprodukten in der Atemluft nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse,* Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 27.-28. Februar 2017, Hamburg.

Hanschen, F.S., Herz, C., Schlotz, N., Kupke, F., Schreiner, M., Rohn, S., Lamy, E., *Epithionitrile – enzymatische Hydrolyseprodukte von Brassica-Glucosinolaten – sind bioaktive Verbindungen.* 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16. September 2015, Karlsruhe.

Hanschen, F.S., Herz, C., Schlotz, N., Kupke, F., Schreiner, M., Rohn, S., Lamy, E., *Enzymatic degradation of Brassica glucosinolates and bioactivity of epithionitriles formed.* 3rd International Glucosinolate Conference “Glucosinolates and beyond”, 12.-15. Oktober 2014, Wageningen, NL.

I Inhaltsverzeichnis

Poster

Kühn, C., Spöttel, J., Kupke, F., Baldermann, S., Klopsch, R., Lamy, E., Hornemann, S., Pfeiffer, A.F.H., Schreiner, M., Hanschen, F.S., Rohn, S., *Excretion Pathways of Benzyl Glucosinolate in Humans after Consumption of Indian cress (Tropaeolum majus L.)*. 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 17.-19. September 2018, Berlin.

Kupke, F., Tarnowski, A., Baldermann, S., Lamy, E., Hornemann, S., Pfeiffer, A.F.H., Schreiner, M., Rohn, S., Hanschen, F.S., *Analyse von flüchtigen Glucosinolat-Abbauprodukten in der Atemluft nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse*. 52. Vortragsstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V. (DGQ) zum Thema „Sekundäre Pflanzenstoffe – Rohstoffe, Verarbeitung und biologische Wirksamkeiten“, 26.-27. März 2018, Gießen.

Kupke, F., Tarnowski, A., Baldermann, S., Hornemann, S., Lamy, E., Schreiner, M., Pfeiffer, A.F.H., Rohn, S., Hanschen, F.S., *Identification and quantification of glucosinolate derived VOCs after consumption of nasturtium (Tropaeolum majus L.), exhaled from the respiratory tract*, 55. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE), 07.-09. März 2018, Hohenheim.

Kühn, C., Kupke, F., Hanschen, F.S., Schreiner, M., Rohn, S., *Pharmakokinetik von Glucosinolaten – Ein Fass ohne Boden?* Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 07.-08. März 2018, Hannover.

Kupke, F., Baldermann, S., Lamy, E., Tarnowski, A., Schreiner, M., Rohn, S., Hanschen, F.S., *Analyse flüchtiger Glucosinolat-Abbauprodukte in der Atemluft nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse*. 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 25.-27. September 2017, Würzburg.

Kupke, F., Baldermann, S., Lamy, E., Tarnowski, A., Schreiner, M., Rohn, S., Hanschen, F.S., *Identification and quantification of glucosinolate derived VOCs after consumption of nasturtium (Tropaeolum majus L.), exhaled from the respiratory tract*. 4th International Glucosinolate Conference, 17.-20. September 2017, Berlin.

Kupke, F., Baldermann, S., Tarnowski, A., Schreiner, M., Rohn, S., Hanschen, F.S., *Identifizierung von flüchtigen Glucosinolat-Abbauprodukten in der Atemluft nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse*, 2017. Jahrestagung des Regionalverbandes Nordost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 21. März 2017, Potsdam.

Kupke, F., Baldermann, S., Tarnowski, A., Schreiner, M., Rohn, S., Hanschen, F.S., *Identifizierung von flüchtigen Glucosinolat-Abbauprodukten in der Atemluft nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse*. Jahrestagung des Regionalverbandes Nordost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, März 2017, Berlin.

Kupke, F., Platz, S., Herz, C., Hanschen, F.S., Schreiner, M., Rohn, S., Lamy, E., *Cytotoxic potential of nitriles resulting from glucosinolate degradation in a human in vitro model*, 3rd International Glucosinolate Conference “Glucosinolates and beyond”, 12.-15. Oktober 2014, Wageningen, NL.

Hanschen, F.S., Herz, C., Schlotz, N., Kupke, F., Schreiner, M., Rohn, S., Lamy, E., *Enzymatic degradation of Brassica glucosinolates and bioactivity of epithionitriles formed*. 3rd International Glucosinolate Conference “Glucosinolates and beyond”, 12.-15. Oktober 2014, Wageningen, NL.

I Inhaltsverzeichnis

Kupke, F., Platz, S., Herz, C., Hanschen, F.S., Schreiner, M., Rohn, S., Lamy, E., *Untersuchung der Bioaktivität von natürlich vorkommenden Nitrilen im humanen in-vitro Modell*. Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft „Food Science meets Authority“, 24.-25. März 2014, Hamburg.

Kupke, F., Platz, S., Herz, C., Hanschen, F.S., Schreiner, M., Rohn, S., Lamy, E., *Untersuchung der Bioaktivität von natürlich vorkommenden Nitrilen im humanen in vitro Modell*. 51. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE), 12.-14. März 2014, Paderborn.

Kupke, F., Platz, S., Herz, C., Hanschen, F.S., Schreiner, M., Rohn, S., Lamy, E., *Untersuchung der Bioaktivität von natürlich vorkommenden Nitrilen im humanen in-vitro Modell*, 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16.-18. September 2013, Braunschweig.

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	IV
II Abbildungsverzeichnis	VI
III Tabellenverzeichnis	X
IV Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Kurzfassung.....	1
2 Abstract	3
3 Einleitung.....	5
4 Theoretische Grundlagen	6
4.1 Glucosinolate.....	6
4.2 Abbauprodukte von Glucosinolaten	7
4.2.1 Bioverfügbarkeit von Glucosinolaten und Bildung der Abbauprodukte	8
4.2.2 Metabolismus der Abbauprodukte	10
4.2.3 Reaktivität und physiologische Wirkung der Abbauprodukte	11
4.3 Einfluss der Verarbeitung von Lebensmitteln auf Glucosinolate und deren Abbauprodukte ..	12
4.4 Analytik von Glucosinolaten und deren Abbauprodukten.....	13
4.4.1 Analytik von Glucosinolaten.....	13
4.4.2 Analytik der Abbauprodukte von Glucosinolaten	14
4.5 Analytik der Abbauprodukte in humanen Matrices	15
5 Zielsetzung der Arbeit	18
6 Experimenteller Teil	20
6.1 Probenaufarbeitung	20
6.1.1 Pflanzenmaterial.....	20
6.1.2 Urin und Blutplasma.....	23
6.2 Identifizierung und Quantifizierung von Glucosinolat-Abbauprodukten mittels GC-MS	23
6.3 Identifizierung und Quantifizierung von Glucosinolaten mittels ESI-LC-MS/MS	29
6.4 Identifizierung und Quantifizierung von Ascorbigen mittels ESI-LC-MS/MS	33
6.5 Synthese von Epithionitrilen	35
6.6 Synthese von Ascorbigen A	37
7 Ergebnisse und Diskussion	40
7.1 Quantifizierung von Glucosinolat-Abbauprodukten aus rohem Pflanzenmaterial.....	40

I Inhaltsverzeichnis

7.1.1	Methodenoptimierung und -validierung.....	40
7.1.2	Analysenpräzision.....	42
7.1.3	Methodenpräzision	43
7.1.4	Richtigkeit.....	44
7.1.5	Linearität	47
7.1.6	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	54
7.1.7	Erweiterung der Methode um Analyten der Gruppe der Epithionitrile.....	56
7.2	Prozessbegleitende Analyse ausgewählter Glucosinolate und deren Abbauprodukten in Fermentationsmodellen verschiedener <i>Brassica</i> -Gemüse.	58
7.2.1	Fermentation ausgewählter <i>Brassica</i> -Gemüse	58
7.2.2	Identifizierung und Quantifizierung von Glucosinolaten	62
7.2.3	Identifizierung und Quantifizierung von Glucosinolat-Abbauprodukten.....	66
7.2.4	Fermentation von Brokkoli.....	71
7.2.5	Fermentation von Rotkohl	77
7.2.6	Fermentation von Spitzkohl	82
7.2.7	Fermentation von Chinakohl	84
7.2.8	Ascorbigen – Reaktionsprodukt aus dem Abbau von Glucobrassicin	88
7.2.9	Zusammenfassung der Ergebnisse des Fermentationsexperiments.....	96
7.3	Analyse von Glucosinolat-Abbauprodukten in humanen Matrices	98
7.3.1	Methodenentwicklung der Probenahme und Aufarbeitung der Atemluft	99
7.3.2	Methodenentwicklung zur Aufarbeitung von Plasma- und Urinproben.....	103
7.3.3	Aufbau und Hintergrundinformationen der Humanstudie	105
7.3.4	Ergebnisse und Diskussion der Humanstudie	109
8	Zusammenfassung.....	120
9	Summary.....	124
10	Schlussfolgerungen.....	128
11	Conclusions.....	131
12	Literatur	134
13	Anhang.....	141

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: strukturelles Grundgerüst und Abbau des Glucosinolates Glucotropaeolin zum Benzylisothiocyanat (Benzyl-ITC).	6
Abbildung 2: Biosynthese von Glucosinolaten: I Kettenverlängerung der <i>Precursor</i> -Aminosäure, II Bildung der Glucoseeinheit, III Modifizierung der Seitenkette (nach Belitz et al., 2008, [18]).	7
Abbildung 3: Abbauprodukte des enzymatischen Abbaus von Glucosinolaten (nach Bones und Rossiter, 1996, [23]).	8
Abbildung 4: Lossen-Umlagerung von Glucosinolaten zu ITC [15].	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mercaptursäure-Stoffwechselwegs.	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Kapnogramms. Phase I: Totvolumen der Atemluft, Phase II: Mix aus Alveolarluft und Totvolumen der Atemluft, Phase III: Alveolarluft, PCO ₂ : Darstellung der CO ₂ -Endkonzentration im Atem [63].	16
Abbildung 7: HPLC-Gradient zur Trennung intakter GSL.	32
Abbildung 8: HPLC-Gradient zur Trennung von Ascorbigen A von Matrixbestandteilen.	34
Abbildung 9: Reaktionsmechanismus der Synthese von 1-Cyano-2,3-Epithioprop.	35
Abbildung 10: Reaktionsmechanismus der Synthese von 1-Cyano-3,4-Epithiobutan.	36
Abbildung 11: Reaktionsmechanismus der Synthese von Ascorbigen A und B (nach Kiss et al., 1966).	38
Abbildung 12: HPLC-Gradient zur Reinheitsbestimmung von Ascorbigen A.	39
Abbildung 13: Vergleich der Chromatogramme des Multistandards (grau: <i>purge flow</i> von 70 mL/min, rot: <i>purge flow</i> von 10 mL/min). Die Erhöhung des <i>purge flow</i> führt zu einer verbesserten Signalintensität.	41
Abbildung 14: Vergleich der Chromatogramme von Senfproben (rot) und Brokkoliprobe (schwarz).	46
Abbildung 15: Kalibriergeraden und Vertrauensbänder (rot) der fünf ITC nach Ausschluss von Ausreißern und Linearer Regression.	51
Abbildung 16: Wahrscheinliche Struktur eines Polymers aus CETP-Monomeren.	57
Abbildung 17: Kalibriergeraden und Vertrauensbänder (rot) der beiden EPT nach Linearer Regression.	58
Abbildung 18: Rohes Probenmaterial, von links oben nach rechts unten: Brokkoli, Rotkohl, Spitzkohl, Chinakohl.	59
Abbildung 19: Fermentationsansätze. A: Brokkoli, B: Rotkohl, C: Spitzkohl, D: Chinakohl.	61
Abbildung 20: Chromatogramm des Multistandards der neun ausgewählten GSL, Konzentration 100 µmol/L.	63

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 21: Vergleich des Massenspektrums des Signals der Probe (links) mit dem eines Matrixpeaks (rechts). Die gespiegelten in Schwarz dargestellten m/z-Werte entstammen dem analysierten Standard des 2-Phenylethyl-ITC.....	69
Abbildung 22: Vergleich des Massenspektrums des Signals der Probe (links) mit dem eines Matrixpeaks (rechts). Die gespiegelten in Schwarz dargestellten m/z-Werte entstammen dem Standard des 4-Pentenyl-ITC.	70
Abbildung 23: Vergleich des Massenspektrums des Signals der Probe (links) mit dem eines Matrixpeaks (rechts). Die gespiegelten in Schwarz dargestellten m/z-Werte entstammen dem Standard des 3-Hydroxymethylindol.	70
Abbildung 24: Gehalte an Glucoiberin, Glucoraphanin und Glucobrassicin [mg/100 g FM] in rohem Brokkoli.....	71
Abbildung 25: Prozentuale Gehalte der GSL Glucoiberin, Glucoraphanin und Glucobrassicin des Brokkoliferments von T1_0 bis T13, bezogen auf den GSL-Gehalt an T1_0.	72
Abbildung 26: Gehalte der Abbauprodukte Indol-3-acetonitril, Erucin, 3-Butenyl-ITC und Iberin [mg/100 g FM] im Brokkoliferment zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten während der Fermentation.....	74
Abbildung 27: Gehalte an Sulforaphan [mg/100 g FM] im Pflanzenmaterial des Brokkolis und der umgebenden Fermentationsflüssigkeit zu allen Zeitpunkten der Probenahme.....	76
Abbildung 28: Gehalte an Indol-3-acetonitril [mg/100 g FM] im Pflanzenmaterial des Brokkolis und der umgebenden Fermentationsflüssigkeit zu allen Zeitpunkten der Probenahme.....	76
Abbildung 29: Gehalte an Glucoiberin, Progoitrin, Sinigrin, Glucoraphanin und Glucobrassicin [mg/100 g FM] in rohem Rotkohl.....	77
Abbildung 30: Prozentuale Gehalte der GSL Glucoiberin, Progoitrin, Sinigrin, Glucoraphanin und Glucobrassicin des Rotkohlferments von T1_0 bis T13, bezogen auf den GSL-Gehalt an T1_0.	78
Abbildung 31: Gehalte der Abbauprodukte Erucin, Iberin, Allyl-ITC und Indol-3-acetonitril [mg/100 g FM] im Rotkohlferment zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten während der Fermentation.	80
Abbildung 32: Gehalte an Sulforaphan [mg/100 g FM] im Pflanzenmaterial des Rotkohls und der umgebenden Fermentationsflüssigkeit zu allen Zeitpunkten der Probenahme.....	81
Abbildung 33: Gehalte an Glucoiberin, Sinigrin und Glucobrassicin [mg/100 g FM] in rohem Spitzkohl.	82
Abbildung 34: Prozentuale Gehalte der GSL Glucoiberin, Sinigrin und Glucobrassicin des Spitzkohlferments von T1_0 bis T13, bezogen auf den GSL-Gehalt an T1_0.....	83
Abbildung 35: Gehalte an Progoitrin, Glucobrassicinapin, Glucobrassicin und Gluconasturtiin [mg/100 g FM] in rohem Chinakohl.	85

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 36: Prozentuale Gehalte der GSL Progoitrin, Glucobrassicinapin, Glucobrassicin und Gluconasturtiin des Chinakohlferments von T1_0 bis T13, bezogen auf den GSL-Gehalt an T1_0.	85
Abbildung 37: Gehalte der Abbauprodukte 2-Phenylethyl-ITC, Indol-3-acetonitril und 3-Phenylpropionitril [mg/100 g FM] im Chinakohlferment zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten während der Fermentation.	86
Abbildung 38: Gehalte an 3-Phenylpropionitril [mg/100 g FM] im Pflanzenmaterial des Chinakohls und der umgebenden Fermentationsflüssigkeit zu allen Zeitpunkten der Probenahme.	88
Abbildung 39: ¹ H-NMR-Spektrum des synthetisierten Produktes zur Charakterisierung als Ascorbigen, gemessen bei 400 MHz in Deuteriumoxid.	90
Abbildung 40: ¹³ C-NMR-Spektrum des synthetisierten Produktes zur Charakterisierung als Ascorbigen, gemessen bei 400 MHz in Deuteriumoxid.	90
Abbildung 41: Ascorbigen A-Gehalte [mg/100 g FM] im Verlauf der Fermentationen.	94
Abbildung 42: Vergleich der verschiedenen Sorbenzien der SPME in der Atemanalyse.	101
Abbildung 43: Probenahmegefäß für die Atemluft.	102
Abbildung 44: Überführung der Analyten in der Atemluft aus dem Probengefäß auf den Twister am Auslass der des Probengefäßes.	103
Abbildung 45: Chromatogramm des Multistandards, Fällung der Proteine aus dem Blutplasma mittels 10 %iger TCA.	104
Abbildung 46: mögliche Metabolisierungs- und Exkretionswege von GSL und ihren Abbauprodukten im menschlichen Organismus nach [115].	106
Abbildung 47: mit Kapuzinerkresse angereichertes Weizenmischbrot zum Verzehr im Rahmen der Pilotstudie zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus humanen Matrices.	107
Abbildung 48: Suspension aus 10 g gefriergetrockneter Kapuzinerkresse zum Verzehr im Rahmen der Pilotstudie zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus humanen Matrices.	108
Abbildung 49: zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in Atemluft der Probandinnen nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse in Form von einer Suspension (A) bzw. eines angereicherten Brotes (B).	111
Abbildung 50: zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Benzyl-ITC im Urin der Probandinnen nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse in Form von einer Suspension (A) bzw. eines angereicherten Brotes (B).	112
Abbildung 51: Prozentuale Verteilung der Analyten im angereicherten Brot und der Kapuzinerkresse-Suspension.	113
Abbildung 52: Vergleichende Darstellung des Analytenprofils bei unterschiedlicher Verarbeitung von Kapuzinerkresse.	114
Abbildung 53: ¹ H-NMR (400 MHz, D ₂ O).	152

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 54: ^{13}C -NMR (400 MHz, D_2O).	152
Abbildung 55: HSQC-Experiment.	153
Abbildung 56: COSY-Experiment.	153
Abbildung 57: HMBC-Experiment.	154
Abbildung 58: Proteinfällung mit TCA: Chromatogramm des Multistandards im SIM-Modus - nach Proteinfällung mit links 100 μL und rechts 50 μL 5%iger TCA.....	154
Abbildung 59: Proteinfällung mit Acetonitril: Chromatogramm des Multistandards im SIM-Modus	155

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung einiger gängiger Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse von GSL nach [58].....	14
Tabelle 2: Auflistung einiger gängiger Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse von GSL-Abbauprodukten und deren Reaktionsprodukten nach [58].....	14
Tabelle 3: Übersicht über die Aufnahmekolumina der Eluate zur Analyse der GSL.	22
Tabelle 4: Auflistung der Referenzsubstanzen und synthetisierten Standards[68].....	24
Tabelle 5: Parameter der GC-MS-Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus Pflanzenmaterial.....	25
Tabelle 6: Parameter der GC-MS-Methode zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus Urin und Blutplasma.....	26
Tabelle 7: GC-Parameter der SBSE-TD-GC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril aus Atemluft.....	27
Tabelle 8: MS-Parameter der SBSE-TD-GC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril aus Atemluft.....	28
Tabelle 9: Ansatzschema der 9 ausgewählten GSL-Stammlösungen.....	29
Tabelle 10: Mittels <i>automatic compound optimization</i> optimierte Parameter der ESI-Quelle für die HPLC-ESI-MS/MS Kopplung zur Analyse von intakten GSL.	30
Tabelle 11: Optimierte Parameter für die GSL-Fragmentationen im MRM Modus.....	31
Tabelle 12: HPLC Gradientenprogramm zur chromatographischen Trennung von intakten GSL.....	32
Tabelle 13: Mittels <i>automatic compound optimization</i> optimierte Parameter der ESI-Quelle für die HPLC-ESI-MS/MS Kopplung zur Analyse von Ascorbigen A.....	33
Tabelle 14: Optimierte Parameter für die Ascorbigen A-Fragmentationen im MRM Modus.....	33
Tabelle 15: HPLC Gradientenprogramm zur chromatographischen Trennung von Ascorbigen A.....	34
Tabelle 16: HPLC Gradientenprogramm zur Reinheitsbestimmung von Ascorbigen A.	39
Tabelle 17: Pipettierschema des Multistandards zur Methodenoptimierung und -validierung der GC-MS-Methode zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus rohem Pflanzenmaterial.....	40
Tabelle 18: Ergebnisse der Untersuchung der Analysenpräzision.	43
Tabelle 19: Ergebnisse der Untersuchung der Methodenpräzision.....	44
Tabelle 20: Wiederfindungsraten der drei ausgewählten <i>Brassica</i> -Gemüse.....	45
Tabelle 21: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression.....	48
Tabelle 22: Zusammenfassung der Parameter der quadratischen Regression.....	49
Tabelle 23: Zusammenfassung des Vergleichs von PG mit dem tabellierten Wert des F-Tests.	50
Tabelle 24: als Ausreißer verdächtige Kalibrierniveaus und deren berechnete Prüfgröße.....	52

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 25: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression nach Eliminierung der Ausreißer.	52
Tabelle 26: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression zur Bestimmung der Nachweisgrenze.	54
Tabelle 27: Übersicht der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der untersuchten ITC.....	55
Tabelle 28: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der Linearität der Methode nach Erweiterung um die Gruppe der Epithionitrile.....	57
Tabelle 29: Eingesetzte Mengen an Rohmaterial der Vertreter der <i>Brassicaceae</i> zur Fermentation. .	60
Tabelle 30: Veränderung der pH-Werte im Verlauf der Fermentation.....	61
Tabelle 31: Regressionsgeraden der Kalibrierung der GSL mittels ESI-LC-MS/MS.	64
Tabelle 32: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Glucosinolate.	65
Tabelle 33: Zusammenfassung der Gehalte der in den vier Gemüsen quantifizierten GSL-Gehalte sowie deren jeweiliger Gesamt-GSL-Gehalt in $\mu\text{mol}/100\text{ g FM}$ vor der Fermentation.....	65
Tabelle 34: Regressionsgeraden der Kalibrierung der GSL-Abbauprodukte mittels GC-MS.....	66
Tabelle 35: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der noch nicht in Abschnitt 7.1.6 aufgeführten GSL-Abbauprodukte.	67
Tabelle 36: Identifizierte GSL-Abbauprodukte mit Match-Faktoren und Retentionszeiten.	68
Tabelle 37: Gehalte an GSL-Abbauprodukt im Pflanzenmaterial des Brokkoliferments zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenahmen in $\text{mg}/100\text{ g FM}$	74
Tabelle 38: Gehalte an GSL-Abbauprodukt im Pflanzenmaterial des Rotkohlferments zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenahmen in $\text{mg}/100\text{ g FM}$	80
Tabelle 39: Gehalte an GSL-Abbauprodukt im Pflanzenmaterial des Chinakohlferments zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenahmen in $\mu\text{mol}/100\text{ g FM}$	86
Tabelle 40: Daten des ^1H -Spektrums des synthetisierten Ascorbigen A.....	89
Tabelle 41: Daten des ^{13}C -Spektrums des synthetisierten Ascorbigen A.....	91
Tabelle 42: Auswertung der Reinheitsanalyse der Signale des Ascorbigen A-Standards und der Blindprobe bei 280 nm.	92
Tabelle 43: Regressionsgerade der Kalibrierung von Ascorbigen A mittels ESI-LC-MS/MS.....	93
Tabelle 44: Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Ascorbigen A.	93
Tabelle 45: Gehalte an Ascorbigen im Pflanzenmaterial der fermentierten Gemüse zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenahmen in $\mu\text{mol}/100\text{ g FM}$	93
Tabelle 46: Charakteristika der Teilnehmerinnen der Interventionsstudie.....	107
Tabelle 47: Absolute Mengen an Glucotropaeolin, Benzyl-ITC und Phenylacetonitril, die von den Probandinnen in der Pilotstudie aufgenommen wurden.	108

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 48: Schema zur Beprobung von Blut, Urin und Atemluft nach Verzehr von Kapuzinerkresse bzw. einem mit Kapuzinerkresse angereicherten Weizenmischbrot.	109
Tabelle 49: Verzeichnis der verwendeten Materialien.	141
Tabelle 50: Verzeichnis der verwendeten Geräte.	142
Tabelle 51: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien mit GHS Piktogrammen und H- und P-Sätzen.	144
Tabelle 52: Methodenpräzision anhand der Senfmatrix.	147

IV Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AS	Aminosäure
µg	Mikrogramm
µM	mikromol pro Liter
ACN	Acetonitril
CETB	1-Cyano-3,4-epithiobutan
CETP	1-Cyano-2,3-epithiopropen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CUA	<i>Counts under Area</i>
DCM	Dichlormethan
DEAE	Diethylaminoethyl
demin.	demineralisiert
Desulfo-GSL	desulfatiertes Glucosinolat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
DVB	Divinylbenzen
Dwell t	<i>Dwell time</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPT	Epithionitril
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i>
ESP	<i>Epithiospecifier Protein</i>
g	Gramm
GB	Glucobrassicin
GBC	Glucobrassicinapin
GC	<i>Gaschromatography</i>
GI	Glucoiberin
GN	Gluconapin
GNT	Gluconasturtiin
GR	Glucoraphanin
GSH	Glutathion
GSL	Glucosinolat
GST	Glutathion-S-Transferase
GT	Glucotropaeolin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ISTD	interner Standard
ITC	<i>Isothiocyanat</i>
L	Liter
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mg	Milligramm
MRM	Multi Reaction Monitoring
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem-Mass Spectrometry</i>

IV Abkürzungsverzeichnis

NFP	<i>Nitrilforming Protein</i>
NIR	Nahinfrarotspektroskopie
OTT	<i>Open Tubular Trap</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
PG	Progoitrin
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
RP	<i>Reversed Phase</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SBSE	<i>Stir-Bar-Sorptive-Extraction</i>
SG	Sinigrin
SPE	<i>Solid-Phase-Extraction</i>
SPME	<i>Solid-Phase-Micro-Extraction</i>
TD	Thermodesorption
TFP	<i>Thiocyanatforming Protein</i>
TM	Trockenmasse
u.a.	und andere
VOC	<i>volatile organic compounds</i>
XRF	Röntgenfluoreszenzspektroskopie

1 Kurzfassung

Glucosinolate (GSL) und ihre bioaktiven Abbauprodukte stellen ein breites Forschungsfeld dar. Die hauptsächlichen Abbauprodukte sind Isothiocyanate (ITC) und Nitrile. Vor allem die ITC und ihre Wirkungen auf *Target*-Moleküle stehen im Mittelpunkt der Forschung. Zu einem umfassenden Verständnis für ihre Wirkweise im Organismus gehört auch, die Einflussfaktoren der Bildung und Bioverfügbarkeit von ITC und Nitrilen zu kennen sowie deren Wege zu potentiellen Wirkorten oder ihrer Ausscheidung aufzudecken. Die vorliegende Arbeit soll eine analytische Herangehensweise entwickeln, um dieser Fragestellung nachgehen zu können.

Daher wurde eine GC-MS Methode zur Quantifizierung der Abbauprodukte teilvalidiert und um die Gruppe der Epithionitrile erweitert. Zur Analyse komplexerer Proben wurde eine geeignete Probenaufarbeitung für verschiedene humane Matrizes (Atemluft, Urin und Blutplasma) entwickelt und die GSL mittels ESI-LC-MS/MS und ihre Abbauprodukte aus den Matrizes Pflanzenmaterial, Fermentationsflüssigkeit, Blutplasma, Urin und Atemluft mittels GC-MS bzw. letztere mittels SBSE-TD-GC-MS/MS analysiert. Die Untersuchungen des Pflanzenmaterials und seiner Fermentationsflüssigkeit diente der Fragestellung, ob und wie die Bildung von GSL-Abbauprodukten oder Folgeprodukten von der Verarbeitung durch Fermentation beeinflusst wird. Letztere humane Matrizes wurden im Rahmen einer Interventionsstudie beprobt. Ziel dieser Studie war es, einen Überblick über die verschiedenen Metabolisierungswege von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril im humanen Organismus nach dem Verzehr von stark und gering prozessierter Kapuzinerkresse zu erhalten. Hierfür wurde eine analytische Vorgehensweise entwickelt, um auch die Atemluft zu analysieren. So sollten ihre Bioverfügbarkeit und Reaktionsweise im humanen Organismus besser verstanden werden.

Nach erfolgreicher Teilvalidierung und Erweiterung der GC-MS-Methode, wurden die vier Kreuzblütler (*Brassicaceae*) Rotkohl, Brokkoli, Spitzkohl und Chinakohl in einem Fermentationsexperiment prozessbegleitend auf GSL und ihre Abbau- und Reaktionsprodukte analysiert. Die durch Hydrolyse der GSL gebildeten ITC erreichten zu Beginn die höchsten Konzentrationen und nahmen im Verlauf der Fermentation größtenteils ab. Daneben wurde der Übergang der GSL bzw. der daraus resultierenden Abbauprodukte aus dem Pflanzenmaterial in die umgebende Flüssigkeit gezeigt. Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Glucobrassicin und dem Gehalt des, aus 3-Hydroxymethylindol (Abbauprodukt von Glucobrassicin) und Ascorbinsäure gebildeten, Ascorbigen A in rohem Kohl festgestellt. Je höher die Glucobrassicin-Gehalte in den rohen *Brassicaceae* waren, desto höher waren die Ascorbigen-Gehalte im entsprechenden Pflanzenmaterial. Zusammenfassend hatte der Fermentationsprozess insgesamt keine großen Auswirkungen auf die Bildung der bioaktiven ITC. Aufgrund dessen, und um in einem komplexeren Experiment auf einfachem zu verarbeitendem

1 Kurzfassung

Gemüse zugreifen zu können, wurde die humane Interventionsstudie mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse in einer Suspension mit Wasser bzw. in einem Weizenmischbrot eingebacken durchgeführt. Die Studie demonstrierte, dass neben den bereits bekannten Mercaptursäuren die Ausscheidung von nicht-konjugiertem Benzyl-ITC und Phenylacetonitril über den Urin ebenso erfolgt wie über die Atemluft. Bei letzterem wurden je nach Verzehrart und Probandin unterschiedliche Konzentrationsverläufe der Analyten beobachtet. Nach Verzehr eines mit Kapuzinerkresse angereicherten Brotes erfolgte die hauptsächliche Ausscheidung von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in der ersten Stunde nach dem Verzehr, mit maximalen Konzentrationen von Benzyl-ITC mit 13,04 nmol/L und von Phenylacetonitril mit 0,21 nmol/L. Ein individueller Verlauf der Konzentrationen zeigte sich hingegen in der Gruppe, die eine Suspension aus Kapuzinerkresse und Wasser verzehrte. Maximale Konzentrationen wurden zwischen 10 min und 24 h nach dem Verzehr analysiert. Diese lagen bei Benzyl-ITC bei 5,89 nmol/L und bei Phenylacetonitril bei 15,66 nmol/L. Nach Betrachtung aller untersuchten Ausscheidungswege, konnten die Beobachtungen bisheriger Studien bestätigt werden, dass die dominante Ausscheidung von ITCs über den Urin erfolgt und die Ausscheidung über die Atemluft nur eine untergeordnete Rolle spielt.

2 Abstract

Glucosinolates (GSL) and their bioactive degradation products represent a broad field of research. The main degradation products are isothiocyanates (ITC) and nitriles. In particular, ITCs and their effects on target molecules are the focus of research. A comprehensive understanding of their mode of action in the organism also includes knowing the factors influencing the formation and bioavailability of ITCs and nitriles, as well as uncovering their pathways to potential sites of action or their excretion. The present study aims to develop an analytical approach to address these questions.

Therefore, a GC-MS method for the quantification of the degradation products was partially validated and extended to include the group of epithionitriles. For the analysis of more complex samples, a suitable sample preparation was developed for different human matrices (respiratory air, urine and blood plasma) and the GSL were analysed by means of ESI-LC-MS/MS and its degradation products from the matrices plant material, fermentation liquid, blood plasma and urine by means of GC-MS and respiratory air by means of SBSE-TD-GC-MS/MS. The investigations of the plant material and its fermentation liquid were aimed at the question whether and how the formation of GSL degradation products or secondary products is influenced by the processing step of fermentation. The latter human matrices were sampled in an intervention study. The aim of this study was to obtain an overview of the different metabolism pathways of benzyl-ITC and phenylacetonitrile in the human organism after the consumption of highly and low-processed nasturtium. For this purpose, an analytical approach was developed to also analyse the breath. In this way, its bioavailability and mode of reaction in the human organism should be better understood.

After successful partial validation and extension of the GC-MS method, the four cruciferous plants (*Brassicaceae*) red cabbage, broccoli, pointed cabbage and Chinese cabbage were analysed for GSL and their degradation and reaction products in a fermentation experiment during the process. The ITCs formed by hydrolysis of the GSL reached the highest concentrations at the beginning and decreased for the most part in the course of the fermentation. In addition, the transfer of the GSL or the resulting degradation products from the plant material into the surrounding liquid was shown. A correlation was found between the content of glucobrassicin and the content of ascorbigen A, formed from 3-Hydroxymethylindole (degradation product of glucobrassicin) and ascorbic acid, in raw cabbage. The higher the glucobrassicin contents in the raw *Brassicaceae*, the higher the ascorbigen A contents in the corresponding plant material. In summary, the fermentation process did not have a major overall impact on the formation of bioactive ITC. Due to this, and in order to be able to access a more easily processed vegetable in a more complex experiment, the human intervention study was conducted with freeze-dried nasturtium in a suspension with water or baked into a wheat mix bread. The study

2 Abstract

demonstrated that, in addition to the already known mercapturic acids, the excretion of non-conjugated benzyl-ITC and phenylacetonitrile occurs via the urine as well as via the respiratory air. In the latter case, different concentration courses of the analytes were observed depending on the type of consumption and the test person. After consumption of the enriched bread, the main excretion of Benzyl-ITC and phenylacetonitrile occurred in the first hour after consumption, with maximum concentrations of benzyl-ITC at 13.04 nmol/L and of phenylacetonitrile at 0.21 nmol/L. An individual course of the concentrations, however, was shown in the group that consumed a nasturtium suspension. Maximum concentrations were analysed between 10 min and 24 h after consumption. These were 5.89 nmol/L for benzyl-ITC and 15.66 nmol/L for phenylacetonitrile. After considering all examined excretion pathways, the observations of previous studies could be confirmed that the dominant excretion of ITCs occurs via the urine and excretion via the respiratory air only plays a subordinate role.

3 Einleitung

Pflanzen produzieren neben Verbindungen des Primärstoffwechsels wie Proteinen, Kohlenhydraten und Fetten eine Vielzahl von chemisch diversen Verbindungen, die nicht Bestandteil des Primärstoffwechsels sind [1]. Diese Verbindungen werden allgemein als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe bezeichnet und üben vielfältige Funktionen in der Pflanze aus. Als Beispiele sind Abwehrfunktionen gegen Mikroorganismen und Fraßfeinde (u.a. Cytotoxizität von Allylthiocyanat im Senf) oder die Anlockung von Insekten zur Bestäubung (u.a. Farbe von Anthocyanen in Blüten) zu nennen. Der Begriff sekundärer Pflanzeninhaltsstoff zeigt an, dass diese Verbindungen nicht primär im Stoffwechsel zur Lebenserhaltung der Pflanze notwendig sind. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind jeweils charakteristisch für bestimmte Arten, Gattungen oder Familien [2]. In der Regel kommen sie nicht im Zellplasma vor, sondern in spezialisierten Zellen oder Organellen dieser Zellen.

Laut dem Ernährungsbericht der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) aus dem Jahr 2008, sind etwa 100.000 verschiedene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe bekannt, von denen rund 5.000 bis 10.000 in der menschlichen Nahrung vorkommen [3]. Die aus Vorläuferverbindungen des Primärstoffwechsels synthetisierten Verbindungen werden in drei Hauptgruppen unterteilt: Terpene, phenolische Verbindungen und stickstoffhaltige sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Ein Vertreter letzterer Gruppe sind die Glucosinolate.

Über verschiedene Kohlarten, Senf, Kresse oder Raps nehmen wir diese Glucosinolate zu uns. Sie haben wichtige Funktionen in der Pflanze. Ihre Abbauprodukte geben den Pflanzen ihren charakteristischen Geschmack. Nicht nur der Geschmack ist für den Menschen von Bedeutung. Die Bioaktivität von Glucosinolaten und im Besonderen ihrer Abbauprodukte ist ein breites Forschungsfeld. Sie gelten als antibakteriell, antikanzerogen und nehmen Einfluss auf den Phase-II-Metabolismus [4-7].

Ihre Identifizierung und vor allem Quantifizierung in den Lebensmitteln ist von Bedeutung für die Untersuchung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen im Menschen. Vielfach wird hierbei jedoch die Bioverfügbarkeit dieser Substanzen im menschlichen Organismus nicht ausschöpfend betrachtet. Humane Matrices wie Blut oder Urin sind anderen flüssigen Matrices in ihrer Probenahme und Probenvorbereitung ähnlich. Die Analytik von Gasproben wie unserer Atemluft stellt hierbei eine besonders große Herausforderung dar.

Die komplexen Prozesse im pflanzlichen und menschlichen Organismus werden in dieser Arbeit näher betrachtet. Ebenso wird auf die Herausforderungen und Lösungen bei der Analytik von Glucosinolaten und deren Abbauprodukten eingegangen.

4 Theoretische Grundlagen

4.1 Glucosinolate

Glucosinolate (GSL) werden im Sekundärstoffwechsel von Pflanzen innerhalb der Familie der Kreuzblütler (*Brassicaceae*) aus Aminosäuren gebildet. Vertreter dieser Familie sind alle Arten von Kresse oder Kohl, Meerrettich und Senf. Sie bedingen den typischen scharfen Geschmack und Geruch dieser Gemüsearten. GSL und deren Abbauprodukte dienen den Pflanzen als Fraßschutz und als Schutz gegen Pathogene. Für einige Insekten sind diese Verbindungen sogar tödlich [8, 9].

In einer Pflanze sind etwa 2 bis 4 verschiedene GSL vorherrschend, deren Verteilung in den einzelnen Kompartimenten (Wurzeln, Stängel, Blätter) sowie deren jeweilige Gehalte (1-10 % der Trockenmasse (TM)) sich mit dem Entwicklungsstand der Pflanze ändern. Zum Beispiel sind im Samen meist höhere Gehalte zu finden als in den Sprossen [10, 11].

Chemisch sind diese Verbindungen β -D-Thioglucosid-(Z)-N-hydroximosulfate, deren gemeinsames Merkmal das Grundgerüst ist. Dieses besteht aus einer Glucoseeinheit (Glucon), einer aus Aminosäuren gebildeten Seitenkette (Aglucon) sowie einer Sulfat-Gruppe (Abbildung 1) [12].

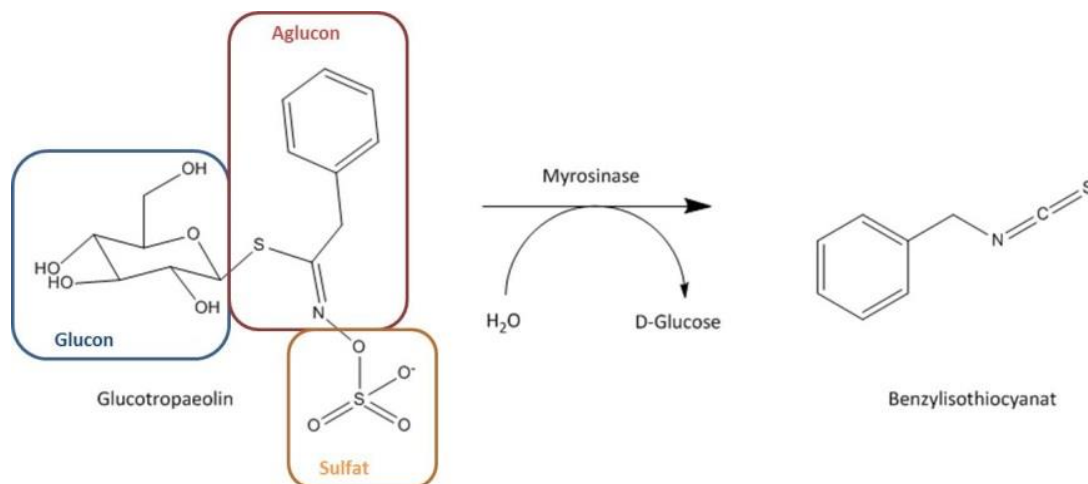


Abbildung 1: strukturelles Grundgerüst und Abbau des Glucosinolates Glucotropaeolin zum Benzylisothiocyanat (Benzyl-ITC).

Die fast 200 identifizierten Verbindungen unterscheiden sich in ihrem Aglucon, welches eine Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- oder Indol-Struktur aufweisen kann [13]. Die unterschiedlichen Seitenketten entstammen der Biosynthese der GSL aus Aminosäuren (AS). Es werden aliphatische, indolische und aromatische GSL unterschieden. Hierbei leiten sich aliphatische GSL hauptsächlich von Methionin, Alanin, Leucin, Isoleucin und Valin ab. Indolische GSL werden vom Tryptophan und aromatische GSL meist von Phenylalanin oder Tyrosin abgeleitet [14, 15]. Die Biosynthese der GSL mit ihren beteiligten Enzymsystemen ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

4 Theoretische Grundlagen

Basierend auf Untersuchungen der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* mittels ^{14}C -Isotopenmarkierung, wurde ein möglicher Verlauf der GSL-Biosynthese konstruiert. Nach diesem Verlauf kann sie grob in drei Schritte eingeteilt werden. Zu Beginn wird eine *Precursor-AS* verlängert, anschließend das GSL-Grundgerüst gebildet und in einem dritten Schritt erfolgt die Modifikation der GSL-Seitenkette. Das Schema der GSL-Biosynthese ist in Abbildung 2 genauer dargestellt [14, 16, 17]. Nach der Synthese der Verbindungen erfolgt der Transport zu den Speicherzentren der Pflanze.

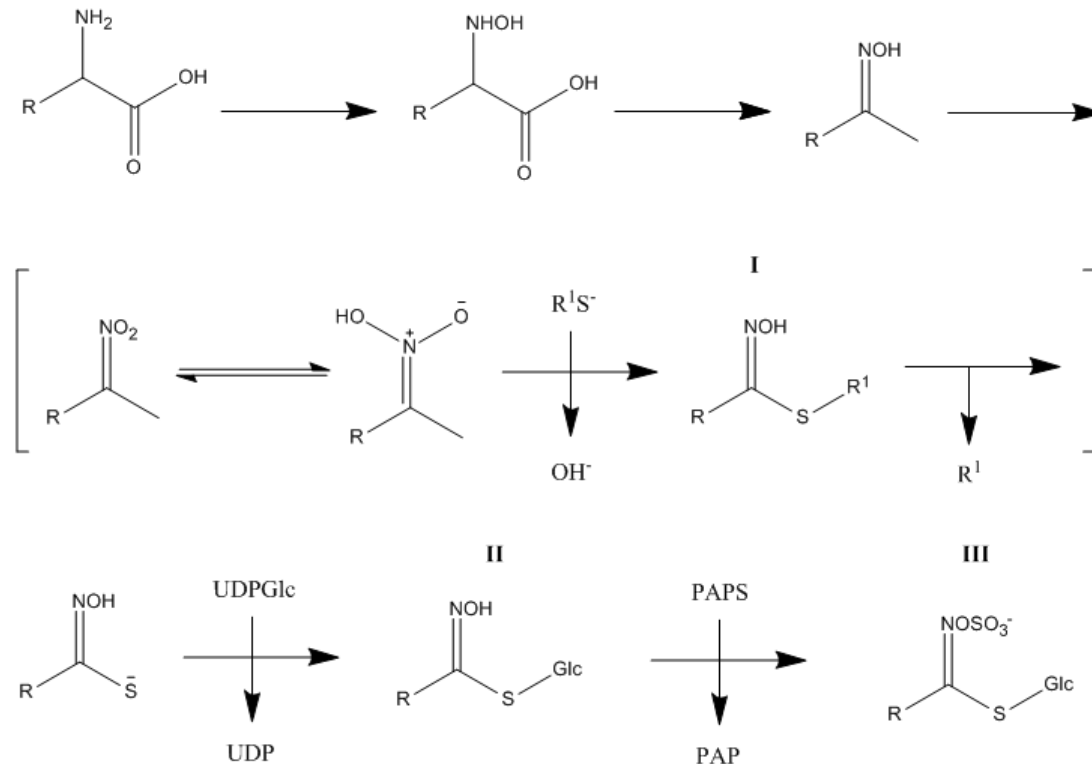


Abbildung 2: Biosynthese von Glucosinolaten: I Kettenerweiterung der *Precursor-Aminosäure*, II Bildung der Glucoseeinheit, III Modifizierung der Seitenkette (nach Belitz et al., 2008, [18]).

4.2 Abbauprodukte von Glucosinolaten

Die GSL werden in den Vakuolen der Pflanzenzellen gespeichert [12]. Durch Zerstörung des Pflanzengewebes, beispielsweise durch mechanische oder thermische Prozesse, treten sie in Kontakt mit dem in Myrosinzellen (Ideoblasten) gespeicherten Enzym Myrosinase (β -D-Thioglucosidase). Sie werden in dem sogenannten Myrosinase-Glucosinolat-System hydrolysiert [19, 20]. Als Abbauprodukte entstehen Isothiocyanate (ITC), Thiocyanate, Nitrile und Epithionitrile (EPT) [14, 21, 22] (Abbildung 3).

4 Theoretische Grundlagen

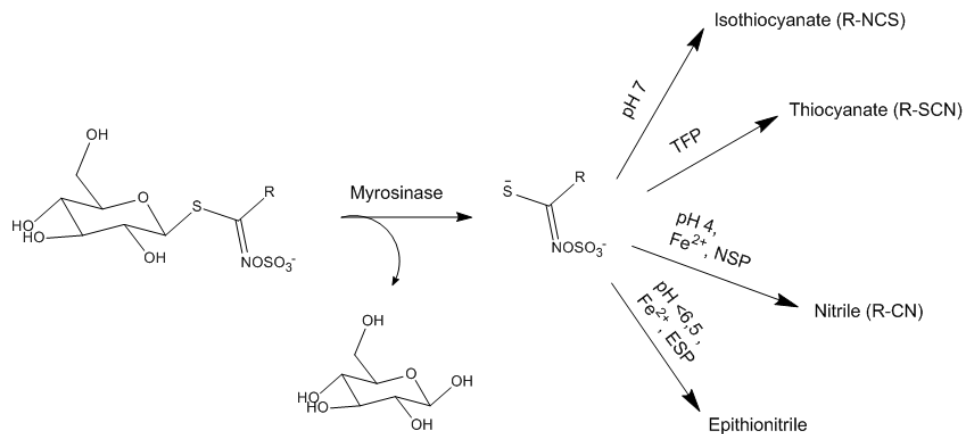


Abbildung 3: Abbauprodukte des enzymatischen Abbaus von Glucosinolaten (nach Bones und Rossiter, 1996, [23]).

Einige dieser teilweise sehr reaktiven Abbauprodukte führen zu einer Vielzahl von Reaktionsprodukten. Das Phytohormon Indol-3-Essigsäure ist eines dieser Reaktionsprodukte, welches aus dem Hydrolyseprodukt von indolischen GSL gebildet wird und dem Pflanzenwachstum dient [23]. Intakte GSL sind nicht bioaktiv, ihre Hydrolyseprodukte hingegen haben konzentrationsabhängig unterschiedliche Wirkungen. Diese reichen von nematoziden, bakteriziden und fungiziden Wirkungen bis zu estrogenartigen und antikanzerogenen Eigenschaften [24].

Im Hinblick auf die vielfältigen Wirkungen von GSL-Abbauprodukten sind die Bioverfügbarkeit der GSL als deren Vorstufen, die Bedingungen bei der Hydrolyse zu den Abbauprodukten und deren anschließender Metabolismus ein wichtiges Forschungsfeld.

4.2.1 Bioverfügbarkeit von Glucosinolaten und Bildung der Abbauprodukte

Nach Forbes und Erdman (1983) [25] wird der Begriff der Bioverfügbarkeit definiert als Anteil eines Nährstoffes, der über physiologische Stoffwechselwege verdaut, resorbiert und metabolisiert wird.

Für GSL stellen innerhalb der menschlichen Ernährung die verschiedenen Kohl- und Kressearten die Hauptzufuhrquellen dar. Nach Schätzungen des Ernährungsberichtes der DGE aus dem Jahr 2012 liegt die tägliche Zufuhr an GSL mit gemischter Kost und ohne Supplemente bei 15 mg/Tag [3, 26]. Zudem wird bei Zufuhr aus erhitzten Lebensmitteln ihre Bioverfügbarkeit im Menschen mit >15% als hoch eingestuft [3, 26].

Neben den bereits genannten leicht flüchtigen und bedeutsamen ITC, entstehen durch Hydrolyse der GSL Thiocyanate, Nitrile, EPT und Oxazolidine als primäre Abbauprodukte [27]. Bei der enzymatischen Hydrolyse von GSL katalysiert die Myrosinase die Abspaltung des Glucos. Unter Freisetzung von Glucose und Wasser entsteht ein instabiles Thiohydroximat-O-Sulfonat, welches unter Abspaltung von Sulfat je nach vorliegenden Reaktionsbedingungen zu unterschiedlichen Verbindungen zerfällt (Abbildung 3). Zur Entstehung der für den Schärfeeindruck (z.B. in Senf) oder die Bitterkeit (z.B. in

4 Theoretische Grundlagen

Rosenkohl) verantwortlichen ITC (auch Senfölglycoside genannt) [24], führt eine Lossen-Umlagerung des Thiohydroximat-O-Sulfonates [15]. Dieses ist in Abbildung 4 dargestellt. Das pH-Optimum des Reaktionsmediums für die Bildung von ITC liegt bei einem Wert von 6 - 7 [11].

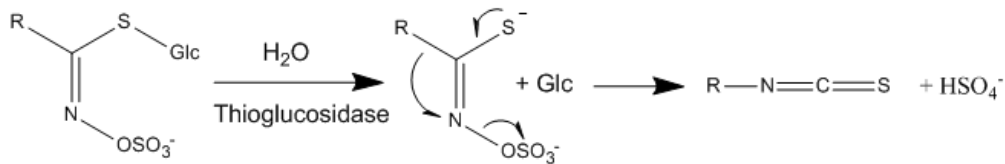


Abbildung 4: Lossen-Umlagerung von Glucosinolaten zu ITC [15].

Die Bildung von Nitrilen und EPT wird durch pH-Werte kleiner 5 und die Anwesenheit von Eisen-Ionen und dem *Epithiospecifiser Protein* (ESP) oder dem *Nitrileforming Protein* (NFP) begünstigt [23]. Der genaue Mechanismus der Katalyse bei der Nitril-Bildung, beziehungsweise EPT-Bildung (bei Agluconen mit endständigen Alkylgruppen), durch das ESP ist noch nicht bekannt. Untersuchungen von Foo et al. (2000) zeigten, dass das Substrat des ESP das instabile Thiohydroximat ist, welches mit Hilfe von Eisen(II)-Ionen ein Intermediat zwischen dem Thiohydroximat und dem ESP bildet [22, 28]. Die Bildung von Thiocyanaten ist ebenfalls noch nicht genau erforscht. Es gibt verschiedene Hypothesen. Zum Beispiel kann nach dem Abbau zum ITC, dieses durch eine Isomerase zum Thiocyanat isomerisiert werden. Eine weitere Hypothese ist, dass das Thiohydroximat-O-Sulfonat bei Anwesenheit des sogenannten *Thiocyanatforming Protein* (TFP) zum Thiocyanat abgebaut wird [29, 30]. Der Abbau der indolischen GSL in der Pflanze wird hauptsächlich durch physikalischen Stress verursacht, beispielsweise Einwirkungen durch äußere, biotische und abiotische Faktoren [11]. So wird aus dem indolischen GSL Glucobrassicin ein instabiles ITC gebildet, welches weiter zum Alkohol 3-Hydroxymethylindol abgebaut wird [11].

Innerhalb der Familie der *Brassicaceae* unterscheiden sich je nach Pflanzenart die Myrosinasen in ihren Bedingungen für eine maximale Enzymaktivität und dem bevorzugten Substrat. Die aus Meerrettich (*Armoracia rusticana*) isolierte Myrosinase hat ihr Temperaturoptimum im Bereich 37 - 45 °C. In weißer Senfesaat liegt dieses beispielsweise erst bei bis zu 60 °C [31]. Neben den pflanzeigenen Myrosinasen können GSL auch durch bakterielle Myrosinasen hydrolysiert werden [32]. Diese kommen unter anderem im Mikrobiom des Menschen vor.

Die ITC und die Nitrile entstehen neben der enzymatischen Hydrolyse auch durch den thermischen Abbau der Glucosinolaten [22, 33]. Gegenstand einer im Jahr 2012 durchgeführten Studie war die Untersuchung des thermischen Abbaus von schwefelhaltigen aliphatischen Glucosinolaten, einerseits bei einer trockenen Erhitzung und andererseits bei Erhitzung in wässriger Lösung [34]. Als dominante

Abbauprodukte entstanden Nitrile. Die Studie zeigte, dass die Nitrile verhältnismäßig stabile Substanzen sind. Sehr starke Bedingungen wie hohe Temperaturen und starke, saure oder basische Lösungen sind nötig, um sie zu Carbonsäuren zu hydrolysieren. Im Kontrast dazu sind die ITC thermolabil und werden in wässriger Lösung schon bei physiologischen Temperaturen zu flüchtigen Verbindungen abgebaut [34]. Diese werden nach dem Verzehr im Organismus resorbiert, metabolisiert und auf verschiedenen Wegen ausgeschieden.

4.2.2 Metabolismus der Abbauprodukte

Anders als bei Vitaminen existieren im Körper keine spezifischen Mechanismen für die Resorption und den Metabolismus von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Diese Substanzen werden ähnlich wie Xenobiotika metabolisiert und ausgeschieden [35]. Die GSL werden mit der Nahrung aufgenommen und unter den jeweiligen Bedingungen zu ihren Abbauprodukten hydrolysiert. Diese können dem Fremdstoffmetabolismus zugeführt und aus dem Körper ausgeschieden werden. Der Verlauf des Metabolismus der ITC wurde im Gegensatz zu dem der Nitrile bereits umfassend untersucht. In Abbildung 5 ist dieser als Mercaptursäure-Stoffwechselweg bezeichnete Verlauf schematisch dargestellt. Die Aufnahme der ITC in den Blutkreislauf beginnt bereits im oberen Mundraum. Der erste Schritt stellt die Konjugation an das Tripeptid Glutathion (GSH) dar. In weiteren Folgeschritten dieses Weges werden die Konjugate zu den entsprechenden Mercaptursäuren (ITC-NAC) abgebaut und über den Urin ausgeschieden [36]. Aufgrund ihrer Struktur werden Mercaptursäuren auch den Dithiocarbamaten (DTC) zugeordnet.

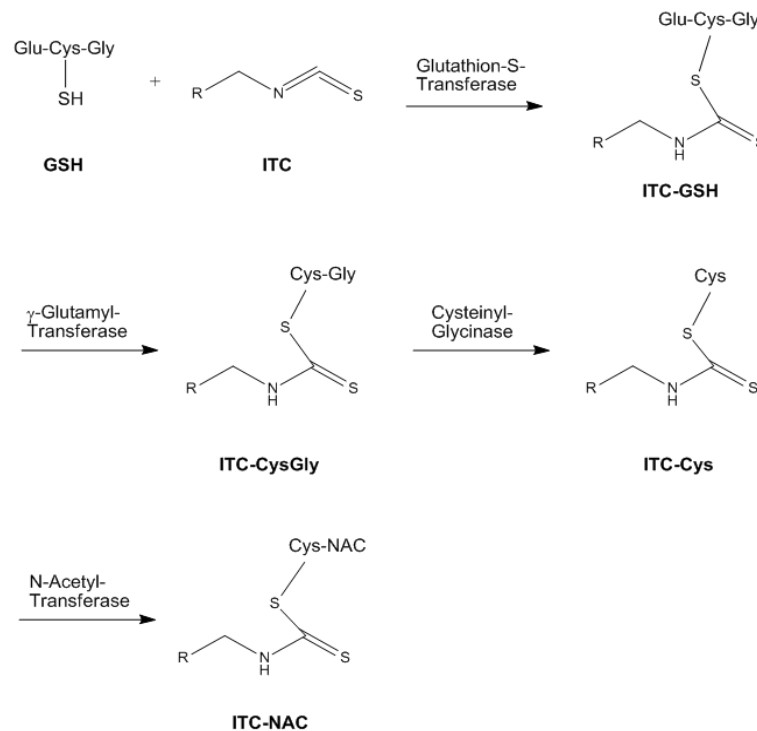


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mercaptursäure-Stoffwechselwegs.

Die hohe Reaktivität einiger GSL-Abbauprodukte kann neben dem weiteren Abbau zu Mercaptursäuren auch zu anderen Reaktionsprodukten führen.

4.2.3 Reaktivität und physiologische Wirkung der Abbauprodukte

Besitzt das Aglucon eines GSL strukturelle Besonderheiten wie Doppelbindungen oder spezielle funktionelle Gruppen, so können beim Zerfall des Thiohydroximat-O-Sulfonats Folgereaktionen auftreten. Diese führen zu den bereits genannten Reaktionsprodukten von ITC. Besitzt der Alkyl-Rest eines ITC eine β -Hydroxy-Gruppe, wie es bei dem aus dem GSL Progoitrin gebildeten 2-hydroxy-3-butenyl-ITC der Fall ist, wird unter Ringbildung ein 2-Oxazolidinthio-Derivat gebildet. Das so gebildete Goitrin hemmt die Iodierung im menschlichen Organismus und damit die Bildung des Schilddrüsenhormons Thyroxin [37]. Somit wirken einige GSL wie das Progoitrin, Glucobrassicin oder Sinalbin goitrogen, vergrößern also die Schilddrüse. Die goitrogene Wirkung der beiden letztgenannten Verbindungen geht auf das Freisetzen von Thiocyanat-Ionen zurück, die die Aufnahme von Iod im Körper reduzieren [38]. ITC können weitere Reaktionen mit Hydroxyverbindungen zu Thiourethanen oder Aminen zu Thioharnstoffen eingehen. Durch die Hydrolyse von ITC werden Kohlenstoffdioxid (CO_2), Amine und Schwefelwasserstoff gebildet [16].

Epidemiologische Studien zum Einfluss der Ernährung auf die Tumorbildung beim Menschen zeigen, dass eine hohe Aufnahme von *Brassicaceae* wie Brokkoli oder anderer Kohlarten zu einem verringerten Auftreten von malignen Tumoren führen kann [39]. Die Effekte reichen von akuter Toxizität der Abbauprodukte über antikanzerogene, entzündungshemmende Wirkungen bis hin zu hormonartigen Eigenschaften [40]. Die Datenlage zur physiologischen Wirkung von ITC ist sehr umfassend. Andere Abbauprodukte wie Nitrile und EPT wurden bisher nur sehr mangelhaft auf ihre Bioaktivität untersucht. Einige ITC zeigen eine tumorprotektive Wirkung, die auf die Beeinflussung der Enzymaktivität im Phase-I- und Phase-II-Stoffwechsel zurückgeführt wird.

Phase-II-Enzyme katalysieren Konjugationsreaktionen von polaren, körpereigenen Molekülen mit lipophilen Fremdstoffen, wodurch die Wasserlöslichkeit und damit auch die Ausscheidung von körperfremden Stoffen gesteigert werden. Deshalb werden den ITC antikanzerogene und chemopräventive Eigenschaften zugeschrieben [23, 41]. Das aus dem Abbau von Glucoraphanin (z.B. in Brokkoli) stammende Sulforaphan induziert beispielsweise nach einer Studie aus dem Jahr 2001 die Phase-II-Enzyme Chinonreduktase und Glutathion-S-Transferase (GST) [42]. Des Weiteren wurde in dieser Studie berichtet, dass das ebenfalls gebildete Sulforaphannitril eine deutlich geringere Bioaktivität aufweist. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2001 wurde eine mit dem Sulforaphan vergleichbare Aktivierung von Phase-II-Enzymen durch das Nitril Crambene in Kombination mit 3-Hydroxymethylindol ermittelt. [43, 44]. Studien zeigten, dass das aus 3-Hydroxymethylindol und Ascorbinsäure gebildete Ascobigen auf die Enzyme des Phase-I- und Phase-II-Stoffwechsels einwirkt

4 Theoretische Grundlagen

[45]. Somit wird diesem Reaktionsprodukt von GSL-Abbauprodukten ebenfalls eine antikanzerogene Wirkung zugesprochen. Weiterhin können ITC wie Sulforaphan, Iberin und Phenylethyl-ITC modulierend auf den Zellzyklus wirken. Unter Anderem induzieren sie den kontrollierten Zelltod Apoptose und hemmen die Proliferation [7, 11].

Die Abbauprodukte von GSL können auch negative Wirkungen auf den Organismus ausüben. So zeigen beispielsweise EPT eine toxische Wirkung [46]. Diese kann auf Alkylierungsreaktionen durch die Epithiogruppe zurückzuführen sein [47]. Das 1-Cyano-3,4-Epithiobutan (CETB) führte nach Untersuchungen von Dietz et al. (1991) zu einer Verminderung der Gewichtszunahme und der Nahrungsaufnahme bei Ratten [48]. In neueren Studien konnte CETB in Rosenkohl, Rotkohl und Pak Choi nachgewiesen werden [49].

Über die Bioaktivität von Nitrilen ist bisher nur wenig bekannt. Einer Studie aus dem Jahr 1982 zufolge, resultiert die konzentrationsabhängige Toxizität der Nitrile aus der Freisetzung von Cyanid [50]. Allerdings liegen die Konzentrationen, bei denen die Nitrile ihre Wirkung erzielen, außerhalb des ernährungsrelevanten Bereiches [42]. Zur besseren Beurteilung der physiologischen Wirkungen der Abbauprodukte in der menschlichen Ernährung, ist ihre Stabilität und Verfügbarkeit in verarbeiteten Lebensmitteln ein weiterer wichtiger Forschungspunkt.

4.3 Einfluss der Verarbeitung von Lebensmitteln auf Glucosinolate und deren Abbauprodukte

Die meisten als Lebensmittel verzehrten *Brassicaceae* wie Brokkoli, Weißkohl oder Rosenkohl, werden nicht roh verzehrt, sondern gekocht, fermentiert oder blanchiert. Solche Verarbeitungsprozesse können den Gehalt an GSL signifikant senken. Dies geschieht beispielsweise durch Auslaugen in Kochwasser oder die enzymatische Hydrolyse durch Zerschneiden der Gemüse [51, 52].

Wie bereits in Kapitel 4.2 erläutert, entstehen Nitrile als Abbauprodukte aus dem thermischen Abbau der GSL. Der Erhitzungsprozess hat verschiedene Auswirkungen auf das Pflanzenmaterial. Zunächst wird die Enzymaktivität erhöht und somit steigt der Abbau der GSL an. Dominante Abbauprodukte sind hierbei die Nitrile, da diese im Vergleich zu den ITC hitzestabiler sind [15, 34]. Bei Temperaturen höher als 70 °C wird die pflanzeigene Myrosinase inaktiviert. Aufgrund der fast vollständigen Inhibierung des enzymatischen Abbaus werden die GSL thermisch induziert chemisch abgebaut [53]. Bei einer Nasserhitzung, beispielsweise in kochendem Wasser, kann eine Auslaugung der GSL und deren Abbauprodukten in das Wasser erfolgen. Somit sinkt der GSL-Gesamtgehalt [34]. Die Methode des Dampfgarens kann diesen Effekt verringern [54]. Das in der Pflanze aus 3-Hydroxymethylindol und L-Ascorbinsäure gebildete Ascorbigen A ist hitzelabil und setzt Ascorbinsäure frei. Aus diesem Grund hat gekochter Kohl einen höheren Anteil an L-Ascorbinsäure als das jeweilige Rohgemüse [55].

4 Theoretische Grundlagen

Bei milchsaurer Fermentation von *Brassicaceae* erfolgt gegensätzlich zur Erhitzung keine Inaktivierung der pflanzeigenen Myrosinase. Die milchsäure Fermentation wird in Deutschland üblicherweise bei der Herstellung von Sauerkraut aus Weißkohl verwendet oder bei der Herstellung von Kimchi im koreanischen Raum. Der Abbau der GSL erfolgt bei der Fermentation auf zwei verschiedenen Wegen. Zum einen findet der enzymatische Abbau durch die pflanzeigene Myrosinase statt, initiiert durch Aufweichen oder Zerreißen der Zellwände. Zum anderen werden GSL durch den mikrobiellen Abbau durch Mikroorganismen mit Myrosinase-ähnlichen Enzymen hydrolysiert [56, 57]. Die durch die Fermentation erfolgte pH-Wert-Senkung begünstigt die Bildung von Ascorbigen A.

Zur Analyse der GSL und ihrer gebildeten Abbauprodukte in den verarbeiteten Lebensmitteln steht eine Reihe unterschiedlichster Methoden zur Verfügung. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

4.4 Analytik von Glucosinolaten und deren Abbauprodukten

Um die in Kapitel 4.2 aufgeführten biologischen Wirkungen in Bezug auf die verzehrten Lebensmittel besser beurteilen zu können, ist eine fundierte Analytik der GSL und deren Abbau- und Reaktionsprodukten unabdingbar.

4.4.1 Analytik von Glucosinolaten

Es gibt verschiedene Herangehensweisen um GSL zu analysieren (Tabelle 1). Zum einen kann ein Gesamtgehalt an GSL ermittelt und zum anderen die Identifikation und Quantifizierung einzelner GSL durchgeführt werden. Die gängige Methode GSL zu analysieren ist, sie enzymatisch zu Desulfoglucosinolaten (Desulfo-GSL) umzuwandeln, von Matrixbestandteilen zu trennen und anschließend mittels *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) zu identifizieren und zu quantifizieren. Die GSL können auch intakt mittels RP-HPLC analysiert werden. Die Desulfatierung bringt den Vorteil, dass die Desulfo-GSL aufgrund ihrer weniger polaren Eigenschaften besser mittels RP-HPLC aufzutrennen sind als intakte GSL. Nachteil dieser Methode ist allerdings der erhöhte Zeitaufwand durch die enzymatische Desulfatierung der GSL und ihre nicht reversible Veränderung [58]. Die Analytik der intakten GSL hat den Vorteil, dass die Funktionalität aufgrund einer Derivatisierung nicht eingeschränkt oder verloren gegangen ist. Allerdings ist die vollständige Trennung mittels RP-HPLC nicht gewährleistet. Mittels der Methode der *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (RP-HPLC-MS/MS) im *Multi Reaction Monitoring Modus* (MRM-Modus) muss keine vollständige Trennung der GSL zur Identifizierung und Quantifizierung gewährleistet sein, da nach spezifischen *precursor*-Ionen der GSL und deren Fragmenten selektiert wird.

4 Theoretische Grundlagen

Tabelle 1: Auflistung einiger gängiger Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse von GSL nach [58].

Analysiertes Produkt	Methode
Gesamt-GSL-Gehalt	Palladiumchlorid- bzw. Thymol-Assays Enzymatische Glucose- und Sulfat-Assays Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Nahinfrarotreflexionsspektroskopie (NIR)
Intakte GSL	RP-HPLC-MS Thermospray HPLC-MS/MS hochauflösende Kapillarelektrophorese Kapillare Gaschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS) Gaschromatographie gekoppelte Tandem Massenspektrometrie (GC-MS/MS)
Desulfo-GSL	RP-HPLC Röntgenfluoreszenzspektroskopie (XRF)

4.4.2 Analytik der Abbauprodukte von Glucosinolaten

Eine Vielzahl an GSL-Abbauprodukten ist flüchtig und kann ohne vorherige Derivatisierung identifiziert und quantifiziert werden. Für die Analyse der flüchtigen Abbauprodukte (z.B. ITC, Nitrile, u.a.) eignet sich die Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit Massenspektrometrie (MS). Die Kopplung mit der Massenspektrometrie ermöglicht eine Identifizierung und strukturelle Charakterisierung [59]. Die nicht flüchtigen Reaktionsprodukte der GSL-Abbauprodukte wie ihre Metabolite (Mercaptursäuren), Addukte mit Proteinen oder Aminen sowie das Ascorbigen lassen sich mittels der RP-HPLC-MS/MS identifizieren und quantifizieren [60]. Eine Auflistung der gängigen Methoden zur Analytik der GSL-Abbauprodukte und deren Reaktionsprodukten ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung einiger gängiger Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse von GSL-Abbauprodukten und deren Reaktionsprodukten nach [58].

Analysiertes Produkt	Methode
Abbauprodukte (ITC, Nitrile, u.a.)	GC, GC-MS, GC-MS/MS
Reaktionsprodukte (Ascorbigen, Mercaptursäuren der Abbauprodukte)	RP-HPLC, RP-HPLC-MS/MS

4.5 Analytik der Abbauprodukte in humanen Matrices

Zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von GSL und deren Abbauprodukten im menschlichen Organismus ist es notwendig deren Gehalte in humanen Matrices wie Urin, Plasma oder der Atemluft zu bestimmen. Des Weiteren kann die Analyse von humanen Matrices Aufschluss darüber geben, wie die GSL und ihre Abbauprodukte metabolisiert werden. Ebenso können ihre Wirkorte genauer identifiziert werden. Es gibt verschiedene Methoden die Abbauprodukte, im speziellen die ITC und deren Metaboliten, aus Urin oder Plasma zu extrahieren und zu analysieren. Zum einen können die ITC mit organischen Lösungsmitteln wie Hexan extrahiert, mit Ammoniak zu Thioharnstoffverbindungen derivatisiert und mittels RP-HPLC-MS/MS analysiert werden [61]. Zum anderen werden ihre Metaboliten, die Mercaptursäuren, nach der Extraktion und Aufreinigung mittels RP-HPLC-MS/MS analysiert [62].

Eine bisher in der GSL-Forschung noch vernachlässigte humane Matrix ist die Atemluft. Die Untersuchung der Atemluft ist jedoch kein neues Forschungsgebiet. Der Fokus bisheriger Forschungen, vor allem klinischer Art, liegt in der Identifizierung von Markersubstanzen zur nicht-invasiven Diagnostik von komplexen Krankheiten wie Lungen- oder Brustkrebs [63].

Die Atemluft setzt sich aus der Expirationsluft und der Alveolarluft zusammen. Die Expirationsluft entspricht der Zusammensetzung der Atmosphäre. Lediglich der Gehalt an CO₂ ist erhöht. Dieser Teil kann auch gemeinhin als das Totvolumen der Atemluft (engl. *dead-space-air*) bezeichnet werden. An den funktionellen Elementen der Lunge, den Alveolen, findet ein reger Stoffaustausch zwischen dem Blut und der umgebenden Luft statt. Dieser dient hauptsächlich dem Austausch von Sauerstoff und CO₂. Flüchtige organische Substanzen (englisch: *volatile organic compounds – VOCs*) gelangen ebenfalls hauptsächlich über das Blut in die Alveolen und von dort aus in die Atemluft. Sie ermöglichen so das Monitoring verschiedener Prozesse im Körper. Beispielsweise ist eine typische Markersubstanz bei Diabetes Mellitus der Acetongeruch des Atems. Bei entzündlichen Krankheiten ist eine erhöhte Konzentration von Ethan und Pentan in der Atemluft nachgewiesen worden [63]. Die Atemluftanalyse wurde jedoch aufgrund von technischen Problemen in der Probenahme und Analyse und dem Fehlen einer Standardisierung in der klinischen Praxis noch nicht etabliert.

Für eine quantitative Analyse der Atemluft ist es notwendig, reproduzierbare Proben zu generieren, also eine Standardisierung der Probenahme zu erarbeiten. Es gibt bisher keine allgemein akzeptierten Verfahren dafür. Jedoch wurden bereits verschiedene Möglichkeiten der Standardisierung entwickelt. Wichtige Faktoren hierbei sind die Atemtechnik, die Art der Probensammlung und das Verhältnis zwischen Alveolar- und Expirationsluft. Zur Minimierung der Expirationsluft kann beim Ausatmen die zweite Hälfte des Atems beprobt werden. Die so erhaltene endexpiratorische Luft besteht größtenteils aus Alveolarluft und eignet sich somit zur Quantifizierung der in ihr enthaltenen VOCs.

4 Theoretische Grundlagen

Eine genauere Methode, um bei den Probenahmen nur Alveolarluft ohne eine Verdünnung durch die Expirationsluft zu gewinnen, ist die Messung des CO_2 -Gehaltes und der Temperatur des Atems. Die Verteilung des CO_2 -Gehaltes in der Atemluft ist schematisch in einem so genannten Kapnogramm (Abbildung 6) dargestellt. Dieses ist jedoch mit einem erhöhten apparativen Aufwand verbunden. Eine einfache Möglichkeit Atemluft zu sammeln, ist die Angleichung von Expirations- und Alveolarluft durch mehrmaliges Ein- und Ausatmen der Probe vor der Beprobung. Diese Methode ist jedoch nicht geeignet für eine Quantifizierung der in der Atemluft enthaltenen Analyten.

Neben der Standardisierung von Probenahmeprozessen, kann auch eine Normalisierung der Messdaten auf einen festgelegten Marker, eine reproduzierbare Analytik hervorrufen. Hierbei können die Konzentrationen der im Atem analysierten Verbindungen auf die Konzentration von ausgeatmetem CO_2 normalisiert werden, wie es bei der Analytik von Urin mit dem darin enthaltenen Creatinin bereits gängig ist [64].

Ein zweiter wichtiger Punkt in der Analytik von Atemluft ist die Wahl einer geeigneten Methode zum Sammeln und Konzentrieren der Proben. Dabei kann grob zwischen zwei Gruppen von Probenahmemethoden unterschieden werden. Zum einen erfolgt sie durch Abkühlen und Kondensieren des Gases und zum anderen durch die Adsorption an ein Adsorptionsmittel [64].

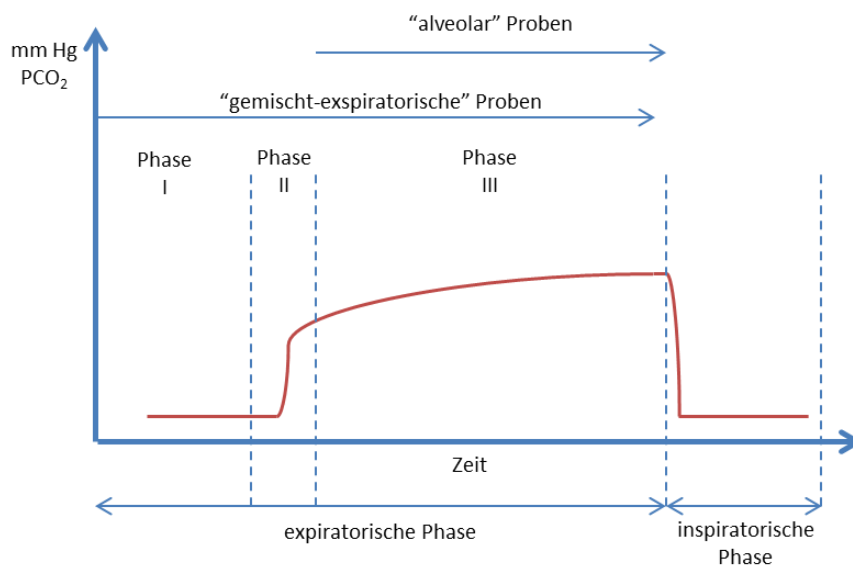


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Kapnogramms. Phase I: Totvolumen der Atemluft, Phase II: Mix aus Alveolarluft und Totvolumen der Atemluft, Phase III: Alveolarluft, PCO_2 : Darstellung der CO_2 -Endkonzentration im Atem [63].

Ein kritischer Punkt in der Analytik von Atemluft ist der hohe Anteil an Wasser im Atem, der die Konzentrierung, Separation und Detektion der Substanzen stark beeinflussen kann [63]. Eine Konzentrierung der Analyten aus der Probe ist notwendig, da die meisten Substanzen in

4 Theoretische Grundlagen

Konzentrationen in nanomolaren bis pikomolaren Bereichen liegen [63]. Ein typisches Adsorptionsmittel in der Gaschromatographie ist Tenax[®], ein 2,6-Diphenyl-p-phenylenoxidpolymer. Der Vorteil an Tenax[®] ist, dass es kein Wasser adsorbiert, sich somit auch für die Beprobung von Atemluft eignet. Weitere gängige Sorptionsmittel sind Polydimethylsiloxan (PDMS), Divinylbenzen (DVB) und Carboxen[®] [65]. Durch die Modifikation und Kombination dieser Verbindungen können unterschiedliche Substanzgruppen abgedeckt werden. Aktuell gibt es vielfältige Anwendungsformen von Adsorptions- bzw. Sorptionsmitteln. Sie sind kommerziell als klassische Säulen der Festphasenextraktion (*Solid Phase Extraction - SPE*), beschichtete Fasern (*Solid Phase Micro Extraction - SPME*) oder beschichtete magnetische Stäbchen (*Stir Bar Sorptive Extraction - SBSE*) erhältlich.

Die Lagerung der Atemproben kann, je nach den chemischen und physikalischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzgruppe, in Glas, Saran[®], Teflon[®] oder anderen inerten Materialien erfolgen. Die Lagerung von VOCs aus Urin auf Tenax[®] wurde in einer Studie aus dem Jahr 1972 über 27 Tage ohne Verlust untersucht [66].

Eine ideale Methode, um die verschiedenen Komponenten eines Gasgemisches wie der Atemluft zu analysieren, ist die Gaschromatographie. Die Kombination mit der Thermodesorption (TD) der adsorbierten Analyten ist hier von Vorteil, da in diesen Proben kein Wasser enthalten ist, welches die Auflösung vieler GC-Säulen verringert. Zudem hat die thermische Desorption gegenüber anderen Methoden den Vorteil, dass sie sehr sensitiv ist [67].

5 Zielsetzung der Arbeit

Die Charakterisierung von Nahrungsmittelpflanzen ist ein breites Forschungsfeld. Es umfasst u.a. die Analyse von Makro- und Mikronährstoffen bis hin zu speziellen Inhaltsstoffen, die sowohl für die Ernährung als auch für pharmakologische und toxikologische Fragestellungen eine wichtige Rolle spielen. Eine Gruppe dieser speziellen Inhaltsstoffe sind die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe.

In der Familie der *Brassicaceae* sind es im Besonderen die GSL, die aufgrund ihrer Funktionen in der Pflanze für die Forschung interessant sind. Daraus ergibt sich die Frage, ob die GSL, die über die Nahrung aufgenommen werden, auch für den menschlichen Organismus positive oder negative Effekte haben.

Die Reaktivität von GSL und deren flüchtiger Abbauprodukte wird intensiv untersucht. Ein erstes Herangehen ist die Identifizierung und Strukturaufklärung der Abbauprodukte der GSL im Pflanzenmaterial. Diese werden entweder daraus isoliert oder re-synthetisiert und auf spezifische Fragestellungen hin untersucht. Hierbei liegt meist der Fokus auf der reinen Substanz sowie ihrer Wirkungen, was nur einen Aspekt der Wirkungsanalyse betrachtet.

GSL werden je nach den zugrundeliegenden Bedingungen größtenteils zu den zwei Hauptabbauprodukten Isothiocyanate (ITC) und Nitrile abgebaut. ITC werden dabei im Organismus mittels Konjugation an Glutathion zu Mercaptursäuren umgewandelt und anschließend über den Urin ausgeschieden. Das Forschungsfeld der Nitrile ist bisher in diesem Hinblick ebenfalls nicht umfassend untersucht worden.

Größtenteils wird unsere Nahrung jedoch nicht roh verzehrt. Vielmehr wird sie z.B. durch Kochen, Braten oder Fermentieren vor dem Verzehr verarbeitet. In der vorliegenden Arbeit sollte daher unter anderem folgenden Fragen nachgegangen werden:

Wie reagieren GSL und ihre Abbauprodukte auf eine Verarbeitung der Pflanzenmaterialien?

Wird der Abbau der GSL durch bestimmte Verarbeitungsprozesse beschleunigt?

Führt die Reaktivität einzelner Abbauprodukte zu neuen Reaktionsprodukten?

Verändern sich die Abbauprodukte im Laufe der Prozessierung?

Wie hoch ist der Anteil an intakten GSL oder deren Abbauprodukten im verarbeiteten Lebensmittel?

Diese Fragen sollten durch die prozessbegleitende Untersuchung ausgewählter Analyten am Beispiel der Fermentation verschiedener *Brassicaceae* und im Rahmen einer humanen Interventionsstudie erfolgen.

5 Zielsetzung der Arbeit

Bevor eine solche umfassende Analyse erfolgen kann, muss untersucht werden, ob die zur Verfügung stehenden Methoden und Materialien für die angestrebte Analytik geeignet sind. Hierzu sollten bereits bekannte Methoden zur Probenahme und Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus verschiedenen pflanzlichen Matrices angewendet, optimiert und validiert werden. Die analytische Vorgehensweise der Probenahme und Quantifizierung aus verschiedenen humanen Matrices (Blutplasma, Urin und Atemluft) soll im Verlauf dieser Arbeit entwickelt werden.

In dieser Arbeit stellte sich auch die Frage, ob und wie die flüchtigen, aber eher unreaktiven Nitrile im Organismus metabolisiert werden. Es galt die Hypothese zu untersuchen, ob Nitrile nach der Resorption in der Blutbahn unverändert bis zu den Alveolen transportiert und dort über die Atemluft ausgeschieden werden. Hierzu sollten die Abbauprodukte aus humanen Matrices wie Urin, Blutplasma und Atemluft quantifiziert werden.

6 Experimenteller Teil

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Analysen verwendeten Geräte sind im Anhang A1 aufgeführt. Weiterhin sind im Gefahrstoffverzeichnis (Anhang A2) die verwendeten Chemikalien dargestellt. Im Folgenden soll auf die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials und der humanen Matrices, sowie auf die durchgeführten Methoden eingegangen werden.

6.1 Probenaufarbeitung

Dieser Abschnitt beschreibt die Aufarbeitung der unterschiedlichen Probenmaterialien zur Messung.

6.1.1 Pflanzenmaterial

Methodenvalidierung: Analytik der GSL-Abbauprodukte aus Pflanzenmaterial mittels GC-MS

Probenzerkleinerung

Die Probenzerkleinerung erfolgte mittels eines Vortex-Mixers mit Telleraufsatz. Die geernteten Sprossen wurden zunächst manuell mit einer Schere vorzerkleinert, anschließend mit zwei Stahlkugeln (\varnothing 1 mm) versetzt und 500 - 600 mg davon eingewogen. Zur Hydrolyse wurden 500 μ L demineralisiertes (demin.) Wasser zugesetzt. Nach einer zunächst 5-minütigen Zerkleinerung der Proben bei höchster Stufe waren noch intakte Blätter der Sprossen erkennbar. Die Verlängerung der Dauer auf zehn Minuten brachte den gewünschten Zerkleinerungsgrad.

Extraktion

Im Anschluss an die 30-minütige Hydrolyse der zerkleinerten Proben und quantitativen Überführung in Extraktionsgefäße, erfolgte die Zugabe des internen Standards (ISTD, Benzonitril). Für die spätere Aufarbeitung und Analyse von Pflanzenmaterial wurde ein interner Standard gewählt, der nicht natürlich in den Pflanzen enthalten ist. Dieser sollte zur Absicherung der Analytik neben den Analyten quantifiziert werden, um eventuelle Verluste bei der Aufarbeitung des Probenmaterials nachzuweisen. Dazu wurden sie zunächst mit je 100 μ L Gebrauchslösung des ISTD (1:10-Verdünnung der ISTD-Stammlösung von Benzonitril; $c=1,96$ mmol/L) und 2 mL Dichlormethan (DCM) versetzt. Die darauffolgende Extraktion der Proben erfolgte 30 Sekunden lang mit fünf Schwingungen pro Sekunde und anschließend noch einmal 30 Sekunden mit 42 Schwingungen pro Sekunde. Daran schloss eine 10-minütige Zentrifugation bei 3226 G und 5 °C an. Die untere, organische Phase konnte anschließend mit Hilfe einer Spritze entfernt werden. Zur Trocknung und Reinigung der organischen Phase wurde diese auf eine vorbereitete Säule gegeben. Als Säule kam eine mit Glaswolle und mit 2 g wasserfreiem Natriumsulfat befüllte Pasteurpipette zur Anwendung. Zur wässrigen Phase wurden erneut 2 mL DCM pipettiert. Wie oben beschrieben erfolgten die Extraktion und Trocknung. Die vereinten DCM-Extrakte

6 Experimenteller Teil

wurden unter Stickstoffstrom auf 300 µL reduziert und quantitativ in Injektionsfläschchen für die GC-MS-Analyse überführt. Bis zur Messung lagerten die Proben bei -20 °C.

Lebensmittelprozessierung: Fermentation – Analyse der GSL

Extraktion

Zur Extraktion für die Analytik der GSL mussten die entnommenen Fermente lyophilisiert werden. Nach der Zerkleinerung von jeweils 200 mg der gefriergetrockneten Proben im Mörser und Einwaage in ein 15 ml-Extraktionsgefäß, wurden diese mit 3 ml 70 %igem heißem Methanol versetzt und 10 min bei 800 rpm und 70 °C geschüttelt. Daraufhin zentrifugierten sie bei 3226 G und 20 °C für 5 min. In einem weiteren Extraktionsgefäß wurde der Überstand gesammelt. Es folgte die zweimalige Wiederholung dieses Vorgangs.

Aufreinigung der Probe mittels SPE

Die zur SPE benötigten Lösungen sind wie folgt angesetzt worden:

In Lösung gebracht wurden Ammoniumacetat (2 mol/L): 30,85 g Ammoniumacetat in 200 mL demin. Wasser und Ammoniumhydrogencarbonat (2 mol/L): 39,53 g Ammoniumhydrogencarbonat in 250 mL demin. Wasser. Für 30 min konditionierten Diethylaminoethyl (DEAE) Sephadex A-25 Suspension: 5 g DEAE Sephadex in 100 mL Ammoniumhydrogencarbonat (2 mol/L).

Mit Hilfe einer Festphasenextraktion durch ein Anionenaustauscherharz wurde störende Matrix von den mittels Methanol extrahierten GSL separiert. Zur Durchführung der SPE sind Säulen mit 2 ml einer mit 2 mol/L Ammoniumhydrogencarbonatlösung konditionierten DEAE Sephadex Suspension gefüllt worden. Anschließend wurde mit 2 ml demin. Wasser gewaschen, mit 1 ml Ammoniumacetatlösung (2 mol/L) gespült und erneut mit 1 ml demin. Wasser gewaschen. 2 ml einer 2 mol/L Ammoniumhydrogencarbonat aktivierten das Harz. Nach Zugabe des Probenextrakts auf das aktivierte Harz ist ein weiteres Mal mit 3 ml demin. Wasser gespült worden. Zur Elution der GSL wurden 3 ml einer 2 mol/L Ammoniumacetatlösung hinzu pipettiert. Aufgenommen wurde das Eluat nach Lyophilisation in demin. Wasser, anschließend in Injektionsfläschchen überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Das Aufnahmevolumen für die jeweiligen Fermente schwankte je nach Zeitpunkt der Probenahme und nach Sorte des verwendeten Pflanzenmaterials. In Tabelle 3 sind die jeweiligen Aufnahmevolumina aufgeführt.

6 Experimenteller Teil

Tabelle 3: Übersicht über die Aufnahmevolumina der Eluate zur Analyse der GSL.

Brokkoli		Rot-, Spitz-, und Chinakohl	
Entnahme (Tage_Stunden)	demin. Wasser [mL]	Entnahme (Tage_Stunden)	demin. Wasser [mL]
T1_0	10	T1_0	5
T1_1	10	T1_1	5
T1_2	9	T1_2	3
T3	6	T3	3
T6	6	T6	3
T13	6	T13	3
T20	6	T20	3

Der erste Entnahmezeitpunkt T1_0 (0 Tage, 0 Stunden) bildet den GSL-Gehalt des rohen Pflanzenmaterials ab. Es wurden jeweils 1 Stunde (T1_1) und 5 Stunden (T1_2) nach Beginn der Fermentation Proben entnommen. Hierbei ist noch von einem aeroben Milieu auszugehen und der Abbau der GSL durch die pflanzeigene Myrosinase findet statt. Im Verlauf der Fermentation wurden noch zu 4 weiteren Tagen Proben entnommen (nach 3 Tagen – T3, nach 6 Tagen – T6, nach 13 Tagen – T13 und nach 20 Tagen – T20).

Lebensmittelprozessierung: Fermentation – Analyse des Reaktionsproduktes Ascorbigen

Zur Bestimmung des Reaktionsproduktes Ascorbigen in den Proben wurden 300 mg der homogenisierten, gefriergetrockneten Proben mit 4 ml demin. Wasser, 1 g Natriumchlorid und 5 ml Aceton versetzt. Das Gemisch ist für eine Stunde bei 750 rpm und 20 °C geschüttelt und unter Stickstoffstrom auf 5 mL konzentriert worden. Das Konzentrat wurde zweimal mit je 4 ml Ethylacetat extrahiert und die gesammelten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Anschließend erfolgte die Reduktion des Filtrats unter Stickstoff bis zur Trockene. Der Rückstand wurde in einer Lösung aus Wasser und Acetonitril (ACN) (50:50, v:v) aufgenommen und bei -20 °C bis zur Messung gelagert.

Lebensmittelprozessierung: Fermentation – Analyse der GSL-Abbauprodukte

Zur prozessbegleitenden Analyse der GSL-Abbauprodukte des fermentierten Kohls sind zum einen das in Streifen geschnittene Pflanzenmaterial und zum anderen die sich im Fermentationsgefäß abgesetzte Flüssigkeit zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, homogenisiert, extrahiert und analysiert worden.

5 g Pflanzenmaterial (Nassgewicht) der festen Pflanzenproben wurden zur Analyse mit 5 ml demin. Wasser in einen Stahlbehälter mit Eisenkugel eingewogen und bei 30 Schwingungen pro Sekunde für 5 min mittels einer Kugelschwingmühle homogenisiert. Je 1 g (Nassgewicht) des jeweiligen homogenisierten Pflanzenmaterials und 1 ml der sich abgesetzten Flüssigkeit des im Fermentationsgefäß befindlichen Kohls sind danach in Extraktionsgefäße überführt worden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zur Aufarbeitung des Pflanzenmaterials zur Methodvalidierung der Analytik der GSL-Abbauprodukte aus Pflanzenmaterial mittels GC-MS.

6.1.2 Urin und Blutplasma

Nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse (charakteristisches GSL: Glucotropaeolin) erfolgte die Bestimmung des Gehalts der GSL-Abbauprodukte Benzyl-ITC und Benzyl-CN in Urin und Blutplasma. Hierzu wurden zu 150 µL des Urins bzw. Blutplasmas jeweils 100 µL ISTD-Gebrauchslösung (1:10-Verdünnung der ISTD-Stammlösung von Benzonitril; $c=1,96$ mmol/L) hinzugegeben und mit 300 µL (Urin) bzw. 600 µL (Blutplasma) Acetonitril zur Fällung der Proteine versetzt. Das Extraktionsgemisch ist bei 4 °C fünf Minuten bei 15322 G zentrifugiert worden. Der wässrige Überstand wurde von der organischen proteinhaltigen Phase abgetrennt und mit 150 µL DCM versetzt. Anschließend erfolgte die Extraktion der Lösung für 2 Minuten bei 42 Schwingungen pro Sekunde. Danach wurde erneut bei 4 °C für fünf Minuten bei 15322 G zentrifugiert. Die organische Phase ist mittels einer Spritze entnommen und über einer Säule gefüllt mit Natriumsulfat getrocknet worden. Es gab zwei Wiederholungen dieses Extraktionsschrittes. Die gesammelten und getrockneten Lösungen wurden unter Stickstoffstrom auf 50 µL konzentriert und bis zur Messung mittels GC-MS bei -18 °C gelagert.

6.2 Identifizierung und Quantifizierung von Glucosinolat-Abbauprodukten mittels GC-MS

Die Identifizierung und Quantifizierung der flüchtigen GSL-Abbauprodukte erfolgten mittels GC-MS. Es wurden Methoden entwickelt, die sich sowohl für die Analyse von Pflanzenmaterial als auch für die Analyse von Humanproben (Blutplasma, Urin, Atemluft) eignen. Zur Identifizierung von GSL-Abbauprodukten in prozessierten Pflanzenproben wurde eine GC-MS Methode im *Scan* Modus eingesetzt (Tabelle 5). Die Quantifizierung der Abbauprodukte erfolgte anhand einer externen Kalibrierung mittels Referenzsubstanzen und selbst synthetisierter Standards (Tabelle 4). Die Analysen erfolgten mittels des GC 6890 an der Säule HP5-MS, gekoppelt mit einem MSD 5973 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

6 Experimenteller Teil

Tabelle 4: Auflistung der Referenzsubstanzen und synthetisierten Standards[68].

Referenz-substanz	CAS-Nummer	Molare Masse [g/mol]	Retentionszeit [min]	spez. Massenfragmente
Allyl-ITC	57-06-7	99,16	7,59	99 [M], 41 [M-NCS]
Phenyl-ITC	103-72-0	135,19	17,85	135 [M], 77 [M-NCS]
Benzyl-ITC	622-78-6	149,21	21,45	149 [M], 91 [M-NCS]
2-Phenylethyl-ITC	2257-09-2	163,24	23,40	163 [M], 105 [M-NCS], 91 [M-CH ₂ NCS]
5-(Methylthio)pentyl-ITC (Berteroin)	4430-42-6	175,31	24,12	175 [M], 129 [M-CH ₂ S], 61 [C ₂ H ₅ S] ⁻
Benzonitril	100-47-0	103,04	9,66	103 [M], 76 [M-HCN]
3-Butennitril (Allyl-CN)	109-75-1	67,09	5,71	67 [M], 41 [M-CN]
Phenylacetonitril (Benzyl-CN)	140-29-4	117,15	14,11	117 [M], 90 [M-CN]
3-(Methylsulphinyl)propyl-ITC (Iberin)	505-44-2	163,25	25,75	100 [M-CH ₂ SO], 72 [CH ₂ NCS],
4-(Methylsulfinyl)butyl-ITC (Sulforaphan)	4478-93-7	177,29	27,80	114 [M-CH ₃ SO], 63 [CH ₃ SO]
4-(Methylthio)butyl-ITC (Erucin)	4430-36-8	163,30	22,78	115 [M-CH ₃ SH], 72 [CH ₂ NCS], 61 [C ₂ H ₅ S]
3-Butenyl-ITC	3386-97-8	113,18	9,64	113 [M], 72 [CH ₂ NCS], 55 [M-NCS]
Indol-3-acetonitril	771-51-7	156,18	28,29	156 [M], 155 [M-H], 130 [M-CN]
1-Cyano-2,3-Epithiopropan (CETP)	58130-93-1	99,15	8,30	99 [M]
1-Cyano-3,4-Epithiobutan (CETB)	54096-45-6	113,18	9,70	113 [M]
4-Pentenyl-ITC	Pub Chem CID 87436	127,21	12,30	127 [M], 126, 41 (100%), 72 [CH ₂ NCS], 67
3-Phenylpropionitril (2-Phenylethyl-CN)	645-59-0	131,17	17,79	131 [M], 91 [M-CH ₂ CN]
3-Hydroxymethylindol	700-06-1	147,17	-	-

6 Experimenteller Teil

Tabelle 5: Parameter der GC-MS-Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus Pflanzenmaterial.

Autosampler (Gerstel MPS 2)	
Spritzenvolumen	10 µL
Injektionsvolumen	1,0 µL
Injektionsgeschwindigkeit	6000 µL/min
Injektor	
Probenaufgabe	<i>splitless</i>
Injektortemperatur	190 °C
<i>Purge flow</i>	68,9 mL/min
Trägergas	Helium
<i>Pressure</i>	104,2 kPa
<i>Total flow</i>	73,8 mL/min
GC - Flow	1,9 mL/min
Starttemperatur	35 °C für 3 min
<i>Ramp 1</i>	9 °C/min auf 90 °C für 2 min
<i>Ramp 2</i>	3 °C/min auf 110 °C
<i>Ramp 3</i>	9 °C/min auf 210 °C
<i>Ramp 4</i>	3 °C/min auf 223 °C
<i>Ramp 5</i>	9 °C/min auf 230 °C
Endtemperatur	35 °C/min auf 310 °C für 6 min
Kapillarsäule	
Spezifikation	HP5-MS; 30 m x 250 µm x 0,25 µm; 0-325 °C
MS	
Analysenmodus	<i>Scan</i>
Temperatur Quelle	230 °C
Temperatur Quadrupol	150 °C
<i>Solvent delay</i>	2,4 min

Zur Analyse der GSL-Abbauprodukte aus Blutplasma und Urin nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse wurde die GC-MS Methode auf die beiden zu erwartenden Abbauprodukte Benzyl-ITC und Benzyl-CN angepasst. Der Single-Ion-Monitoring (SIM) Modus (Tabelle 5) fand hierfür Verwendung. Die

6 Experimenteller Teil

Parameter des Autosamplers, Injektors, GCs und der Kapillarsäule sind identisch zu denen der Analyse der GSL-Abbauprodukte in Pflanzenmaterial.

Tabelle 6: Parameter der GC-MS-Methode zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus Urin und Blutplasma.

MS	
Analysenmodus	<i>SIM</i> Zone 1: Rt 5-12 min; m/z: 103 (ISTD Benzonitril, Rt 9,70 min) Zone 2: 12-17 min, m/z: 90, 117 (Benzyl-CN, Rt 14,1 min) Zone 3: 17-42,29 min, m/z: 91, 149 (Benzyl-ITC, Rt 21,3 min)
Temperatur Quelle	230 °C
Temperatur Quadrupol	150 °C
<i>Solvent delay</i>	5 min

Zur gaschromatographischen Analyse der Atemluft auf die GSL-Abbauprodukte Benzyl-ITC und Phenylacetonitril ist eine SBSE-TD-GC-MS/MS Methode entwickelt worden. Die Analysen erfolgten an einem GC 7890 B an der Säule HP5-MS, gekoppelt mit einem 7010 GC-MS Triple Quadrupole (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Zur thermischen Desorption wurde der TDU 2, sowie die Kühlfalle CIS 4 der Firma Gerstel (Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)) genutzt.

6 Experimenteller Teil

Tabelle 7: GC-Parameter der SBSE-TD-GC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril aus Atemluft.

Thermische Desorptionseinheit (TDU, Gerstel)	
Modus	<i>splitless</i>
Starttemperatur	25 °C
Endtemperatur	270 °C
Transffertemperatur	300 °C
Kühlfalle (Gerstel CIS 4)	
Starttemperatur	-100 °C
Equilibrationszeit	0,50 min
<i>Ramp 1</i>	12 °C/s
Endtemperatur	270 °C für 3 min
Injektor (Programmable Temperature Vaporization (PTV))	
Modus	<i>Solvent Vent</i>
<i>Purge flow to split vent</i>	15 mL/min
<i>Pressure</i>	65,5 kPa
<i>Total flow</i>	19,239 mL/min
Kapillarsäule	
Spezifikation	HP5-MS; 30 m x 250 µm x 0,25 µm; 0-325 °C
GC – Flow	1,24 mL/min
Starttemperatur	40 °C für 2 min
Ramp 1	5 °C/min auf 150 °C
Endtemperatur	15 °C/min auf 300 °C für 5 min
MSD Transfer Line	
Temperatur	300 °C

6 Experimenteller Teil

Tabelle 8: MS-Parameter der SBSE-TD-GC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril aus Atemluft.

MS						
Ionisationsart		EI (70 eV)				
Temperatur Quelle		230 °C				
Solvent delay		2 min				
Filament Stromstärke		100 µA				
Quadrupole		Q1		Q2		
Temperatur		150 °C		150 °C		
DC		5,8 V		-5,2 V		
<i>Post/Pre Filter</i>		5,8 V		-15,2 V		
Polarität		negativ			positiv	
Resolution	Einheit	Wide	Widest	Einheit	Wide	Widest
Mass Gain	-0,71	-0,82	-0,81	-2,24	-2,20	-2,37
Mass Offset	dynamic	-1,612	-1,164	dynamic	-1,659	-1,230
Width Gain	22,3	22,3	22,3	25,1	25,1	25,1
Width Offset	dynamic	-0,224	-0,744	dynamic	-0,169	-0,689
MRM Parameter	<i>Precursor Ion</i>	<i>Product Ion</i>		<i>Dwell time</i> [ms]	<i>Collision Energy CE</i> [V]	
Benzyl-ITC	149,3	92		10	35	
Benzyl-ITC	149,3	91,2		10	35	
Phenylacetonitril	117,0	111,8		10	35	
Phenylacetonitril	117,0	90,2		10	35	

6.3 Identifizierung und Quantifizierung von Glucosinolaten mittels ESI-LC-MS/MS

Für die Identifizierung und Quantifizierung von GSL in entsprechend GSL-haltigem Pflanzenmaterial ist eine LC-MS/MS Methode entwickelt worden. Es sollten neun GSL in einer Methode erfasst werden (Tabelle 9). Aufgrund ihrer hohen Selektivität kam hierfür die MRM-Methode zur Anwendung. Die Entwicklung der Methode erfolge an einem Triple-Quadrupol-MS (ABSciex, Framingham, MA, USA) mit einer *Electron Spray Ionisation* (ESI) im negativen Ionenmodus.

Die zu untersuchenden GSL wurden anhand der Literaturdaten für die vier zur Analyse ausgewählten *Brassica*-Gemüsen und deren kommerziellen Verfügbarkeit gewählt.

Tabelle 9: Ansatzschema der 9 ausgewählten GSL-Stammlösungen.

GSL	Einwaage K-Salz [mg]	Masse reines GSL [mg]	Vol. demin. Wasser [mL]	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/L]
Glucotropaeolin (GT)*	7,2	6,57	10	408,43	1,609
Sinigrinhydrat (SG-hydrat)	6,8	5,87	10	358,37	1,637
Glucobrassicin (GB)	1,6	1,47	3	447,47	1,096
Glucoiberin (GI)	2,2	2,01	5	422,48	0,953
Glucoraphanin (GR)	3,0	2,75	5	436,51	1,262
Gluconapin (GN)	3,0	2,72	5	372,40	1,458
Progoitrin (PG)	4,8	4,36	10	388,40	1,123
Glucobrassicinapin (GBC)	0,9	0,82	2	386,43	1,058
Gluconasturtiin (GNT)	6,2	5,67	10	422,46	1,343

*zur eigenen Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, bei der Aufarbeitung hinzugegeben

Im ersten Schritt wurde das Fragmentmuster eines jeden einzelnen GSL ermittelt, indem Stammlösungen der Standards verdünnt (100 $\mu\text{mol/L}$) und mittels einer Spritzenpumpe (10 $\mu\text{L/min}$) über den Direkteinlass in die ESI-Quelle eingebracht wurden. Mittels der Software Analyst (Version 1.5.2) sind die jeweiligen *Precursor*-Ionen und die drei Fragmentionen mit der höchsten Intensität der GSL ermittelt worden. Jeder Standard wurde mit drei Fragmenten spezifisch charakterisiert, dem *Quantifier* (intensivstes Fragmention), dem *Qualifier 1* (zweitintensivstes Fragmention) und dem *Qualifier 2* (drittintensivstes Fragmention). Die Bestimmung der optimalen Parameter für die elektrische Spannung der Ionenoptiken und der Quadrupole erfolgte mittels *automatic compound optimization* (Tabelle 10).

6 Experimenteller Teil

Tabelle 11 zeigt die optimierten Parameter für die ausgewählten GSL-Fragmentationen. Die *Dwell time* (*Dwell t*) beschreibt hierbei die Messzeit eines Massenüberganges. Das Signal/Rausch-Verhältnis und somit die Genauigkeit wird größer je länger diese Zeit ist. Die *Dwell time* der jeweiligen *Quantifier* ist höher als die der beiden *Qualifier*, da hierüber die GSL quantifiziert werden.

Tabelle 10: Mittels *automatic compound optimization* optimierte Parameter der ESI-Quelle für die HPLC-ESI-MS/MS Kopplung zur Analyse von intakten GSL.

Parameter	Einstellung
Curtain Gas	10 PSI
Collision Gas	6 PSI
Ionenspray Spannung	-4500 V
Temperatur	450 °C
Ionenquelle Gas 1	30 PSI
Ionenquelle Gas 2	60 PSI
Interfaceheater	on

Vorgeschaltet zur massenspektrometrischen Analyse erfolgte die Auftrennung der GSL mittels HPLC über eine Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 150 mm) RP-Säule. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus demin. Wasser und Acetonitril entwickelt. Zur besseren Auflösung der Peaks wurden die Fließmittel mit 0,1 % Ameisensäure (*Formic Acid*, FA) angesäuert. In Tabelle 12 wird das Gradientenprogramm zur Trennung der intakten GSL aufgeführt.

6 Experimenteller Teil

Tabelle 11: Optimierte Parameter für die GSL-Fragmentionen im MRM Modus.

Substanz	Precursor [u]	Fragment [u]	Dwell t [msec]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
GBC	385.772	97.000	200	-46	-140	-8,5	-30	-30	-6
GBC ²	385.772	74.700	80	-46	-140	-8,5	-30	-54	-12
GBC ³	385.772	95.900	80	-46	-140	-8,5	-30	-74	-6
GB	446.720	97.000	200	-56	-350	-5	-16	-50	-6
GB ²	446.720	95.800	80	-56	-350	-5	-16	-80	-6
GB ³	446.720	75.000	80	-56	-350	-5	-16	-48	-6
GI	421.677	96.000	200	-1	-350	-7,5	-36	-74	-8
GI ²	421.677	74.600	80	-1	-350	-7,5	-36	-56	-6
GI ³	421.677	95.700	80	-1	-350	-7,5	-36	-28	-10
GN	371.639	74.700	200	-41	-120	-6,5	-20	-54	-10
GN ²	371.639	96.000	80	-41	-120	-6,5	-20	-46	-10
GN ³	371.639	96.700	80	-41	-120	-6,5	-20	-20	-6
GR	435.901	95.800	200	-46	-50	-8	-50	-88	-6
GR ²	435.901	97.000	80	-46	-50	-8	-50	-30	-6
GR ³	435.901	74.800	80	-46	-50	-8	-50	-62	-12
GT	407.782	95.700	200	-36	-330	-10	-18	-46	-10
GT ²	407.782	74.900	80	-36	-330	-10	-18	-58	-10
GT ³	407.782	96.700	80	-36	-330	-10	-18	-28	-18
PG	387.841	74.800	200	-31	-350	-5,5	-60	-40	-4
PG ²	387.841	96.500	80	-31	-350	-5,5	-60	-56	-16
PG ³	387.841	79.700	80	-31	-350	-5,5	-60	-118	-12
SG	357.634	75.100	200	-46	-60	-7	-78	-44	-4
SG ²	357.634	96.000	80	-46	-60	-7	-78	-64	-6
SG ³	357.634	97.000	80	-46	-60	-7	-78	-20	-10
GNT	421.868	95.800	200	-26	-320	-10,5	-22	-52	-6
GNT ²	421.868	74.900	80	-26	-320	-10,5	-22	-62	-4
GNT ³	421.868	96.800	80	-26	-320	-10,5	-22	-34	-8

¹ Quantifier, ² Qualifier 1, ³ Qualifier 2

6 Experimenteller Teil

Tabelle 12: HPLC Gradientenprogramm zur chromatographischen Trennung von intakten GSL.

Zeit [min]	Eluent A [%] (demin. Wasser + 0,1 % FA)	Eluent B [%] (ACN + 0,1 % FA)
0,00	99,0	1,0
2,00	99,0	1,0
23,00	67,0	33,0
25,00	67,0	33,0
26,00	10,0	90,0
30,00	10,0	90,0
31,00	99,0	1,0
36,00	99,0	1,0

Die graphische Auftragung des Gradienten ist in Abbildung 7 ersichtlich.

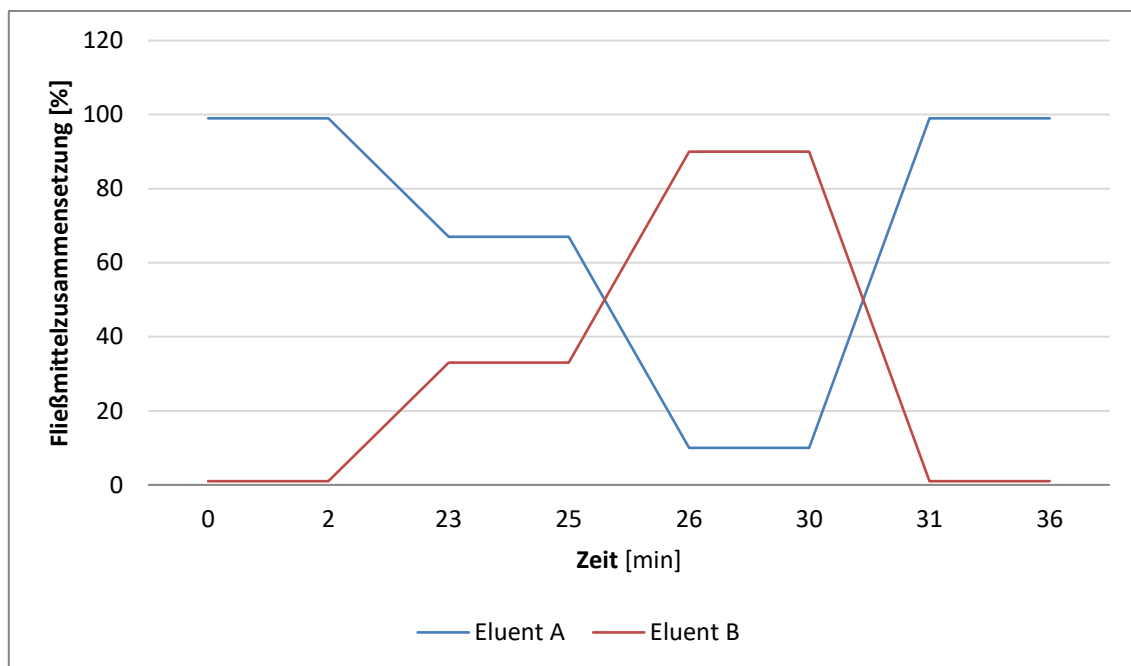


Abbildung 7: HPLC-Gradient zur Trennung intakter GSL.

Zur chromatographischen Trennung wurde ein Fluss von 0,3 mL/min bei einem Injektionsvolumen von 5 µL verwendet. Die Quantifizierung der in den Proben vorkommenden, ausgewählten GSL erfolgte über eine externe Kalibrierung mittels eines Multistandards kommerziell erhältlicher Referenzsubstanzen (Tabelle 9) in folgenden Konzentrationsniveaus: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 20; 40; 60; 80; 100 mmol/L.

6.4 Identifizierung und Quantifizierung von Ascorbigen mittels ESI-LC-MS/MS

Für die Quantifizierung des Ascorbigen A in prozessiertem Pflanzenmaterial ist eine ESI-LC-MS/MS Methode mit MRM-Modus entwickelt worden. Die Entwicklung der Methode erfolgte an einem Triple-Quadrupol-MS (ABSciex, Framingham, MA, USA) mit einer ESI Ionisation im positiven Ionenmodus. Zur Ermittlung des spezifischen Fragmentmusters von Ascorbigen A wurde zunächst eine Stammlösung (12,1 mg in 10 mL Methanol, 3,83 mmol/L) des synthetisierten Ascorbigen A per Direkteinlass im Massenspektrometer analysiert. Wie in Kapitel 6.4 beschrieben, wurden die *Precursor*-Ionen und Fragmentionen der höchsten Intensität bestimmt und die optimalen Parameter der massenspektrometrischen Analyse ermittelt. Die optimierten Parameter für die Analyse von Ascorbigen A mittels MRM-Modus sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 13: Mittels *automatic compound optimization* optimierte Parameter der ESI-Quelle für die HPLC-ESI-MS/MS Kopplung zur Analyse von Ascorbigen A.

Parameter	Einstellung
Curtain Gas	10 PSI
Collision Gas	6 PSI
Ionenspray Spannung	4500 V
Temperatur	450 °C
Ionenquelle Gas 1	30 PSI
Ionenquelle Gas 2	60 PSI
Interfaceheater	on

Tabelle 14: Optimierte Parameter für die Ascorbigen A-Fragmentionen im MRM Modus.

Substanz	Precursor [u]	Fragment [u]	Dwell t [msec]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
Ascorbigen	305.968	130.200	200	41	320	8	16	27	6
Ascorbigen ²	305.968	77.100	80	41	320	8	16	95	8
Ascorbigen ³	305.968	103.100	80	41	320	8	79	-74	4

Vor der massenspektrometrischen Analyse erfolgte eine chromatographische Trennung von Ascorbigen A von Matrixbestandteilen mittels einer Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 150 mm) RP-Säule. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus demin. Wasser und Acetonitril (ACN) genutzt. Zur besseren Auflösung der Peaks wurden die Fließmittel mit 0,1 % FA angesäuert. Der Fluss betrug

6 Experimenteller Teil

0,3 mL/min (Gradientenprogramm siehe Tabelle 15). Der Fließmittelgradient ist in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

Tabelle 15: HPLC Gradientenprogramm zur chromatographischen Trennung von Ascorbigen A.

Zeit [min]	Eluent A [%] (demin. Wasser + 0,1 % FA)	Eluent B [%] (ACN + 0,1 % FA)
0,00	99,0	1,0
2,00	99,0	1,0
10,00	10,0	90,0
13,00	10,0	90,0
14,00	99,0	1,0
20,00	99,0	1,0

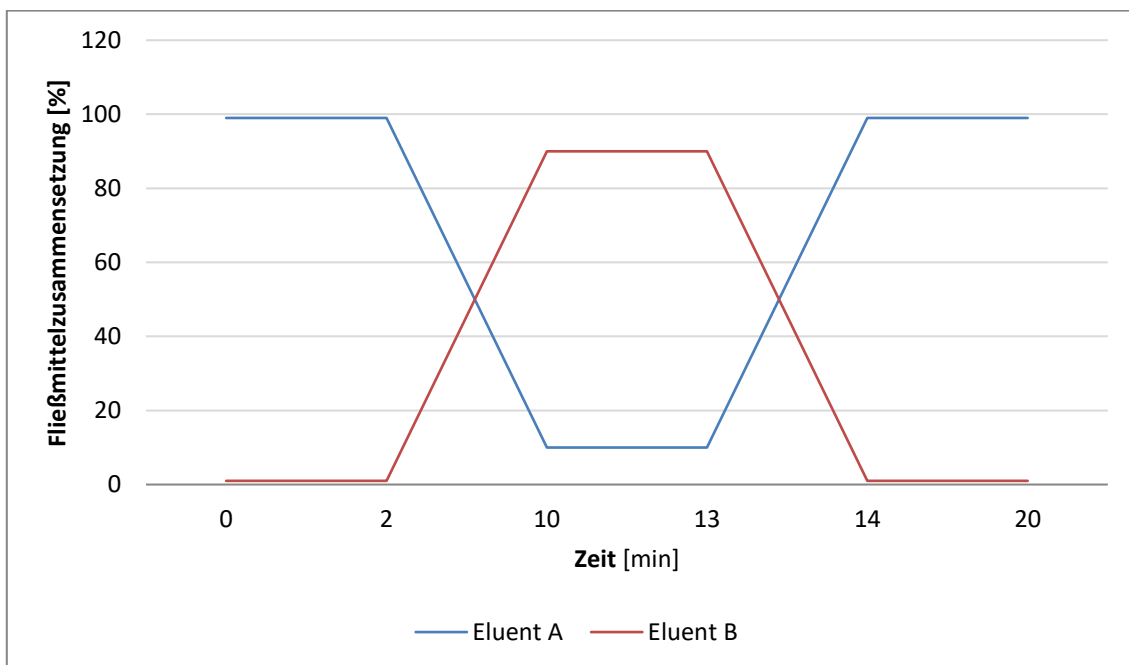


Abbildung 8: HPLC-Gradient zur Trennung von Ascorbigen A von Matrixbestandteilen.

Die Quantifizierung des Ascorbigen A in den Proben prozessierten Pflanzenmaterials erfolgte anhand einer externen Kalibrierung mit Hilfe eines synthetisierten Standards (siehe Kapitel 6.7 Synthese von Ascorbigen A). Unter Berücksichtigung der ermittelten Reinheit des synthetisierten Standards (siehe Kapitel 6.7) wurden folgende Konzentrationsniveaus aus der Stammlösung (3,83 mmol/L) für die externe Kalibrierung hergestellt: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180 und 200 µmol/L.

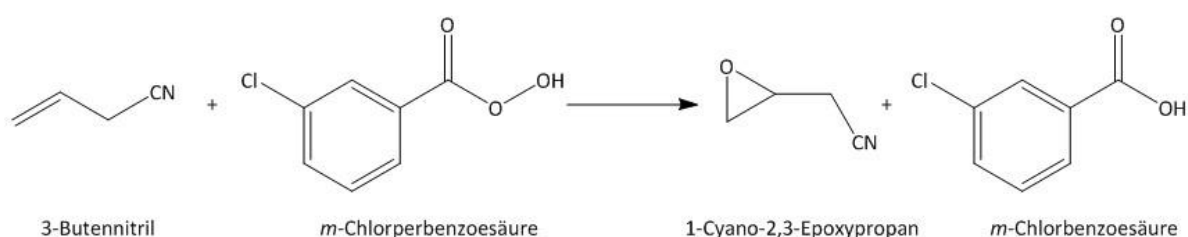
6.5 Synthese von Epithionitrilen

Die in Rotkohl und Pak Choi vorkommenden Epithionitrile CETP und CETB sind in Ermangelung der kommerziellen Verfügbarkeit, beziehungsweise geeigneter Extraktion aus dem Pflanzenmaterial eigenständig synthetisiert worden. Die jeweiligen Edukte (3-Butennitril und 4-Pentennitril) werden unter Zusatz des Oxidationsmittels *m*-Chlorperbenzoesäure in einer elektrophilen *cis*-Addition (*Prileschajew*-Reaktion) zu den Epoxiden umgesetzt [69], welche im Anschluss im sauren Milieu mit Thioharnstoff reagieren. Daraus entstehen die EPT. Diese sind Thiiranverbindungen mit dem für sie charakteristischen Thiiranring [70].

Synthese von 1-Cyano-2,3-Epithiopropen

Im Folgenden sind der Reaktionsmechanismus und die Durchführung der Synthese von 1-Cyano-2,3-Epithiopropen dargestellt (Abbildung 9).

1. Schritt: Oxidation des Alkennitrils zum Epoxynitril



2. Schritt: Reaktion mit Thioharnstoff zum Epithionitril

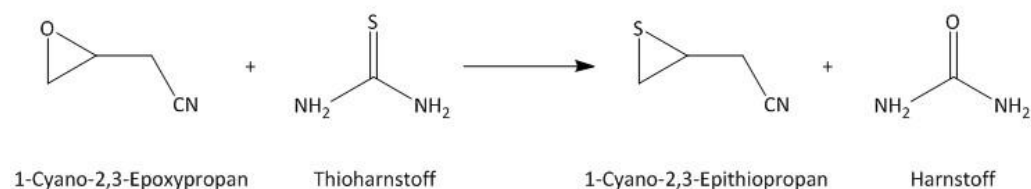


Abbildung 9: Reaktionsmechanismus der Synthese von 1-Cyano-2,3-Epithiopropen.

3-Butennitril (50,1 mmol) wurde langsam zu einer Lösung aus *m*-Chlorperbenzoesäure (66,5 mmol) in 50 mL absolutiertem DCM tropfenweise hinzugegeben und 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die als farbloser Feststoff ausgefallene *m*-Chlorbenzoesäure ist durch Filtration abgetrennt und mit DCM und kaltem Pentan gewaschen worden. Das Filtrat wurde zur Trockene reduziert, der erhaltene Feststoff in 100 mL einer Mischung aus DCM und Pentan (1:1; v:v) gelöst und das Lösungsmittel durch Destillation unter Vakuum entfernt worden.

Das gewonnene Zwischenprodukt 1-Cyano-2,3-Epoxypropan (38,7 mmol) ist in einem weiteren Schritt in 16 mL Aceton gelöst worden. Diese Lösung wurde zu einer Lösung aus Thioharnstoff (34,7 mmol) und Benzoesäure (35,0 mmol) in 22 mL Aceton gegeben. Bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bis

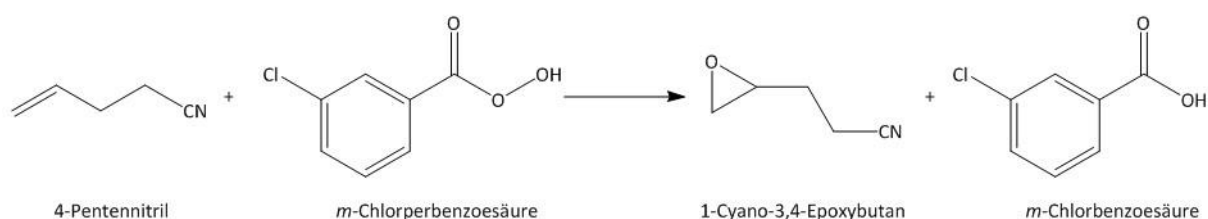
6 Experimenteller Teil

zum Ausfallen eines farblosen Niederschlages gerührt, welcher durch Filtration abgetrennt und in 166 mL einer Mischung aus Aceton und demin. Wasser (3:7; v:v) gelöst worden ist. Nach Zugabe von 2,5 mL einer Natriumcarbonat-Lösung (0,19 mol/L) wurde die Lösung dreimal mit Benzol extrahiert und nach Zugabe von 10 mg Hydrochinon zur Stabilisierung des EPT das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Die Ausbeute des CETP als eine zähflüssige gelbe Flüssigkeit lag bei 0,3 %.

Synthese von 1-Cyano-3,4-Epithiobutan

Der Reaktionsmechanismus der Synthese von 1-Cyano-3,4-Epithiobutan ist in Abbildung 10 dargestellt. Im Folgenden wird die Durchführung der Synthese geschildert.

1. Schritt: Oxidation des Alkennitrils zum Epoxynitril



2. Schritt: Reaktion mit Thioharnstoff zum Epithionitril

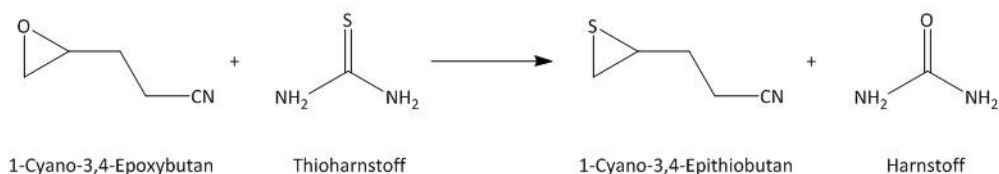


Abbildung 10: Reaktionsmechanismus der Synthese von 1-Cyano-3,4-Epithiobutan.

Das Edukt 4-Pentennitril (20,7 mmol) wurde mit 21 mL absolutiertem DCM unter Eiskühlung gerührt, eine Lösung aus *m*-Chlorperbenzoesäure (120 mmol) in 32 mL DCM langsam tropfenweise hinzugefügt und eine Stunde unter Rühren reagieren gelassen. Die Lösung ist anschließend für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt worden und reagierte nach dem Abkühlen weiter für 15 Stunden bei Raumtemperatur.

Es folgte die Abkühlung auf 5 °C bis sich die *m*-Chlorbenzoesäure als Niederschlag absetzte, welcher anschließend durch Filtration abgetrennt werden konnte. Um unerwünschte Begleitstoffe abzutrennen, wurde das Filtrat mit 10 mL einer Natriumbisulfit-Lösung (0,37 mol/L) und zweimal mit gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung (1, mol/L) extrahiert. Es folgte die Reduktion der organischen Phase, welche unter Vakuum entfernt wurde. Die erhaltene gelbe Flüssigkeit diente als Edukt einer weiteren Reaktion.

6 Experimenteller Teil

Das Zwischenprodukt 1-Cyano-3,4-Epoxybutan (15,5 mmol) ist bei Raumtemperatur unter Rühren tropfenweise zu einer Lösung aus Thioharnstoff (15,5 mmol) und Benzoesäure (15,5 mmol) in 16 mL Aceton gegeben worden. Der kristalline Feststoff wurde nach Rühren bei Raumtemperatur für 5 Stunden durch Filtration entfernt und in 32 mL einer Mischung aus Aceton und demin. Wasser-Lösung (3:7; v:v) gelöst. Nach Hinzugabe von 1,5 mL Natriumcarbonat-Lösung (0,19 mol/L), wurde anschließend die Lösung mit 20 mL Benzol extrahiert. Die wässrige Phase wurde in zwei Wiederholungen mit 0,5 mL Natriumcarbonat-Lösung (0,19 mol/L) versetzt und wieder mit Benzol extrahiert. Gewaschen mit demin. Wasser sind die vereinigten organischen Extrakte unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur reduziert worden. Die Ausbeute von 3,4 mmol des CETB (einer hellgelben Flüssigkeit) betrug 16,4 %.

6.6 Synthese von Ascorbigen A

Im Folgenden sind der Reaktionsmechanismus (Abbildung 11) und die Durchführung der Synthese von Ascorbigen und dessen 2-Epimer dargestellt. Durch die Reaktion von Ascorbinsäure mit 3-Hydroxymethylindol bilden sich nach Kiss et al. (1966) das natürlich vorkommende Ascorbigen A und das Ascorbigen B, welches ein 2-Epimer des Ascorbigen darstellt [71]. Der für die Synthese benötigte Zitronensäure-Phosphat-Puffer (nach McIlvaine, pH 4) wurde aus zwei Stammlösungen wie folgt hergestellt:

Für die Stammlösung A wurden 1,92 g wasserfreie Zitronensäure in 100 mL demin. Wasser gelöst. Als Stammlösung B sind 3,56 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat in 100 mL demin. Wasser gelöst worden. Der Zitronensäure-Phosphatpuffer wurde durch Mischen von 61,4 mL der Stammlösung A mit 38,6 mL der Stammlösung B hergestellt. Die Überprüfung des pH-Wertes von 4 erfolgte mittels eines pH-Meters.

Es wurden 220 mg (1,25 μ mol) L-Ascorbinsäure in 10 mL Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH 4) gelöst und 185 mg (1,26 μ mol) 3-Hydroxymethylindol hinzugegeben. Nach dem Rühren des Reaktionsgemisches für 1 Stunde unter Stickstoffatmosphäre erfolgte abschließend die Filtration. Durch das saure Medium wurde aus dem 3-Hydroxymethylindol durch Protonierung und anschließende Abspaltung von einem Molekül Wasser das Carbonium-immonium-Ion gebildet (II), welches mit dem L-Ascorbat (III b) zu den 2-Epimeren Ascorbigen A und Ascorbigen B reagierte.

Die 4-fache Wiederholung der Extraktion des Filtrates mit Diethylether führte zur Abtrennung von Ascorbigen B. Die organische Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase ist erneut mit Ethylacetat in 3-facher Wiederholung extrahiert worden. Es folgten die Trocknung der gesammelten Ethylacetat-Extrakte über Natriumsulfat und die Reduktion bei vermindertem Druck zur Trockene.

6 Experimenteller Teil

Es konnten 131 mg (0,43 μmol) eines weißen, kristallinen Feststoffes (Ascorbigen A) gewonnen werden. Die Ausbeute der Synthese des Produktes betrug 34,4 %.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Synthese wurde dieses weiße, kristalline Produkt in deuteriertem Wasser gelöst und mittels NMR (400 MHz) analysiert. Die Zuordnung der Signale erfolgte mittels $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY-, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC- und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC-Experimenten über das Programm Mestre-Nova 9.0.

Das weiße, kristalline Produkt der Synthese konnte eindeutig als Ascorbigen A identifiziert werden.

Die Bestimmung der Reinheit des synthetisierten Ascorbigen A-Standards wurde mittels RP-HPLC-DAD über eine Phenomenex Luna 100 Å C18 (5 μm , 150 x 3 mm) durchgeführt. Dazu sind 1,7 mg des Ascorbigen A in 1 mL Methanol gelöst und mittels RP-HPLC-DAD bei 280 nm analysiert worden. Die Zusammensetzung der Fließmittel erfolgte nach der Methode von Martinez-Villaluenga et al. (2009, siehe Tabelle 16; [72]). Analysiert wurde bei einer Flussrate von 0,7 mL/min bei einem Injektionsvolumen von 8 μL . Der Fließmittelgradient der RP-HPLC-DAD-Methode ist in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

Die Reinheit des synthetisierten Standards Ascorbigen A ist mit 96,7 % bestimmt worden.

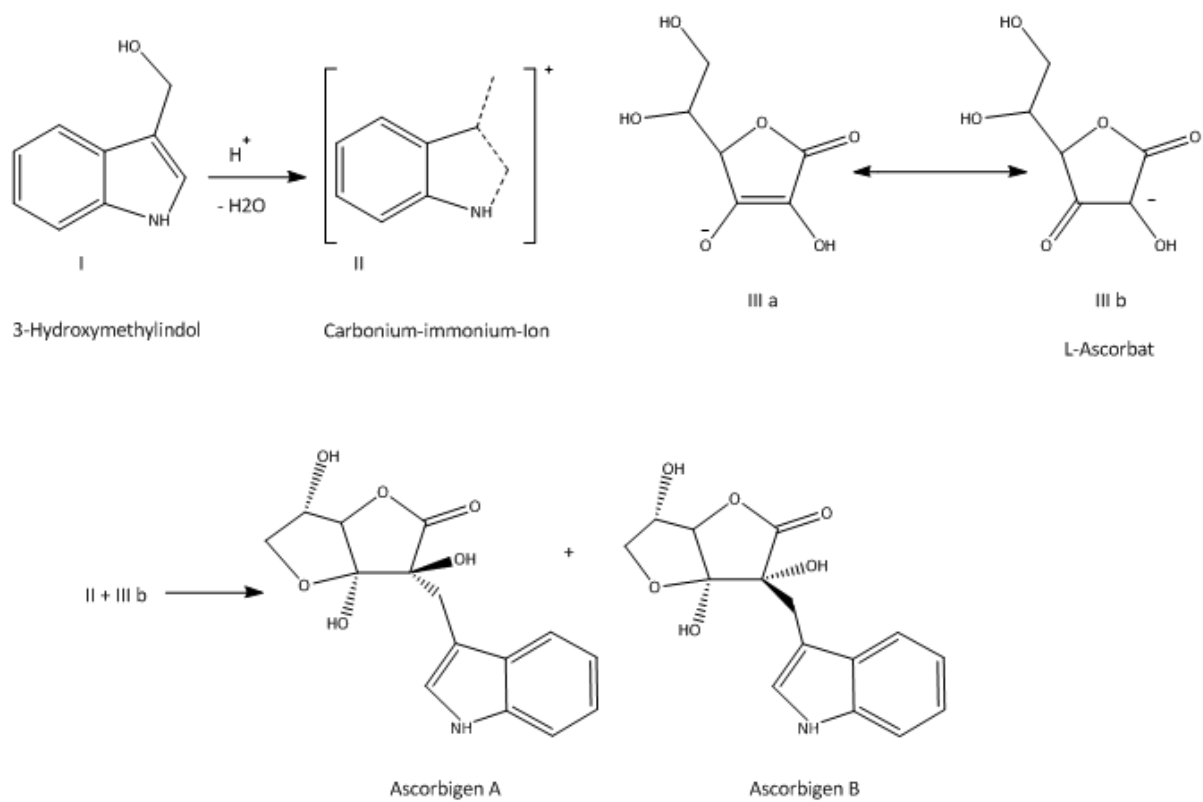


Abbildung 11: Reaktionsmechanismus der Synthese von Ascorbigen A und B (nach Kiss et al., 1966).

6 Experimenteller Teil

Tabelle 16: HPLC Gradientenprogramm zur Reinheitsbestimmung von Ascorbigen A.

Zeit [min]	Eluent A [%] (0,1 mol/L Ammonium-acetatpuffer (pH 5,7)/CAN (90:10; v:v))	Eluent B [%] (0,1 mol/L Ammonium-acetatpuffer (pH 5,7)/CAN (20:20; v:v))
0,00	100,0	0,0
2,00	100,0	0,0
27,00	0,0	100,0
32,00	0,0	100,0
37,00	100,0	0,0
42,00	100,0	0,0

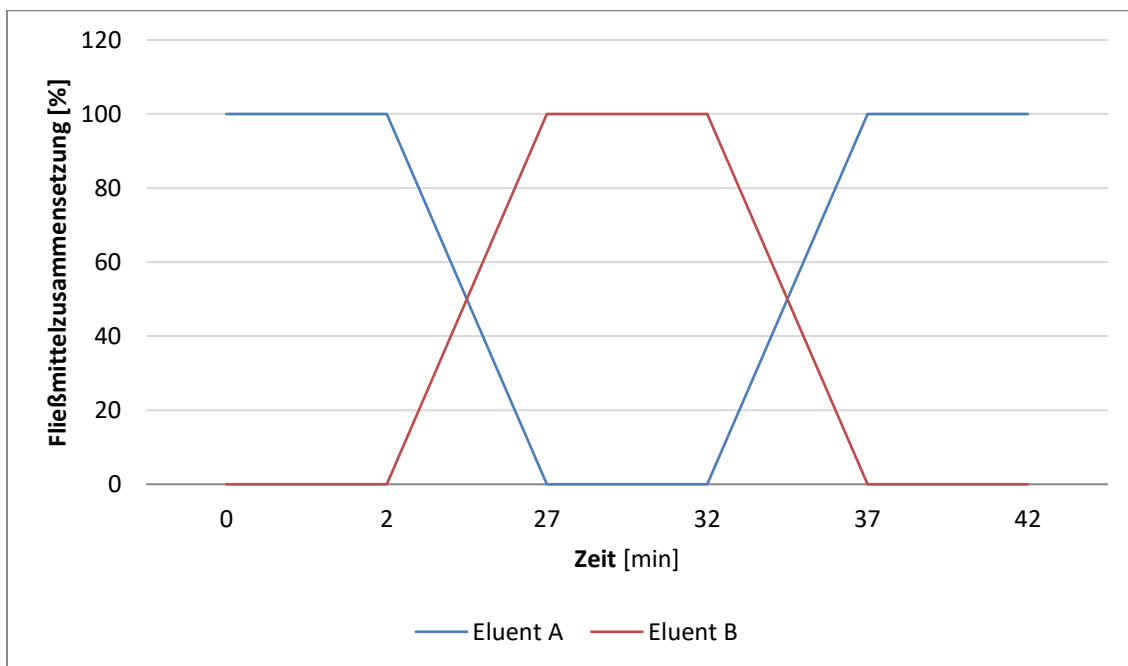


Abbildung 12: HPLC-Gradient zur Reinheitsbestimmung von Ascorbigen A.

7 Ergebnisse und Diskussion

GSL und ihre Abbauprodukte können wie bereits beschrieben, auf vielfältige Weise analysiert werden. Zu Beginn dieser Arbeit war es notwendig, geeignete Methoden für die entsprechenden Fragestellungen zu finden. Bei GSL-Abbauprodukten handelt es sich zumeist um flüchtige Verbindungen. Zur Identifizierung und Quantifizierung dieser flüchtigen Verbindungen wurde als geeignete Methode die GC, gekoppelt an die MS gewählt.

7.1 Quantifizierung von Glucosinolat-Abbauprodukten aus rohem Pflanzenmaterial

7.1.1 Methodenoptimierung und -validierung

Im Vorfeld der Analysen von Pflanzenmaterial wurde die GC-MS-Methode nach Wirzel et al. als Grundlage für die Anpassung an die Zielstellung optimiert und validiert [73]. Zweck dieser Methode sollte die Identifizierung und Quantifizierung von ITC und Nitrilen aufgrund einer selektiven chromatographischen Trennung sein. Hierfür wurde ein Multistandard von verschiedenen Referenzsubstanzen ausgewählt und im GC-MS analysiert (siehe Tabelle 17). Diese Substanzen sind in den Proben, die im späteren Verlauf der Experimente analysiert werden, überwiegend enthalten.

Tabelle 17: Pipettierschema des Multistandards zur Methodenoptimierung und -validierung der GC-MS-Methode zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus rohem Pflanzenmaterial.

Referenzsubstanz	Konz. Stammlösung [g/L]	Vol. Stammlösung [µL]	Konz. Multistandard I [mg/L]	Vol. Multistandard I [µL]	Konz. Multistandard II [mg/L]
Allyl-ITC	20,43	1000	2043	250	51,08
Phenyl-ITC	22,61	1000	2261	250	56,53
Benzyl-ITC	22,06	1000	2206	250	55,15
2-Phenylethyl-ITC	44,88	500	2244	250	56,10
5-(Methylthio)pentyl-ITC	15,00	333,3*	500	1000*	50,00

* Gebrauchslösung – aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge wurde das 5-(Methylthio)pentyl-ITC nicht in den Multistandard aufgenommen, sondern separat hinzugegeben.

Dabei wurden die spezifischen Massenfragmente und Retentionszeiten der entsprechenden Verbindungen ermittelt (siehe Abschnitt 6.2, Tabelle 4). Zur Optimierung der Methode wurde der Multistandard durch variieren der Aufheizraten und Haltezeiten der Temperatur im Säulenofen auf die optimale Trennung der Substanzen untersucht. Durch geringe Aufheizraten retendierten die ITC Benzyl-ITC, 2-Phenylethyl-ITC sowie das 5-(Methylthio)pentyl-ITC bis zu 5 min später als in der

7 Ergebnisse und Diskussion

Ausgangsmethode. Ihre Trennung wurde dadurch nicht wesentlich beeinflusst. Die Retentionszeit von Allyl-ITC blieb von allen Änderungen im Temperaturprogramm unberührt. Die Verschiebung der Retentionszeiten von Phenyl-ITC und dem ISTD war etwas geringer als die von Benzyl ITC, 2-Phenylethyl-ITC und 5-(Methylthio)pentyl-ITC. Das abschließend gewählte Temperaturprogramm ist charakterisiert durch eine ausreichende Trennung der Analyten bei kürzester Analysezeit. Dadurch steigt die Effizienz der Methode. Alle Analyten konnten störungsfrei simultan bestimmt und sowohl durch die Retentionszeit, als auch über ihr spezifisches Fragmentmuster eindeutig identifiziert werden.

Um niedrige Konzentrationen quantifizieren zu können, sollte das Nachweisvermögen der Methode durch die Erhöhung des *purge flow* des GC von 10 mL/min auf 70 mL/min gesteigert werden. Zunächst wurde der Multistandard mit dem geringeren *purge flow* injiziert und die Flächen der Analyten integriert. Anschließend erfolgte die Erhöhung des *purge flow* auf 70 mL/min und der Multistandard wurde erneut injiziert und integriert. Die Signalintensität sowie die Flächeneinheiten vervielfachten sich gegenüber dem geringeren *purge flow* (siehe Abbildung 13). Für alle weiteren Messungen wurde ein *purge flow* von 70 mL/min beibehalten und die so optimierte Methode anschließend validiert.

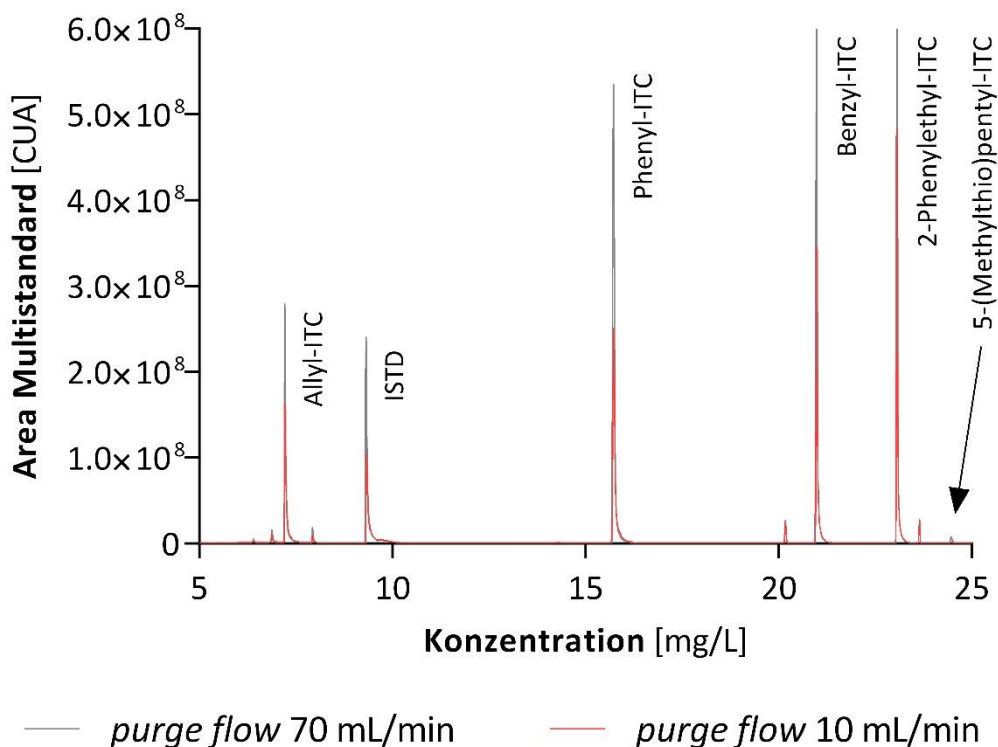


Abbildung 13: Vergleich der Chromatogramme des Multistandards (grau: *purge flow* von 70 mL/min, rot: *purge flow* von 10 mL/min). Die Erhöhung des *purge flow* führt zu einer verbesserten Signalintensität.

Unter dem Begriff „Validierung“ ist der Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode zu verstehen. Das heißt bei einer Methodvalidierung wird durch Untersuchungen und

Bereitstellung von Nachweisen die Bestätigung erhalten, dass die besonderen Anforderungen einer Methode für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden [74]. Hierbei werden Leistungsmerkmale in Bezug auf eine bestimmte Matrix, den Anwendungsbereich oder erwartete Qualitätsanforderungen überprüft. Es gibt drei verschiedene Validierungsarten. Je nach Ausgangslage kann eine *Full Validation* (bei einer Neuentwicklung einer Methode), eine *Partial Validation* (nach einer Modifizierung einer Analysenmethode) oder eine *Cross Validation* (zum Vergleich bestimmter Leistungsparameter verschiedener Methoden) angewendet werden. Die für diese Arbeit verwendeten Validierungsparameter sind die Präzision, die Richtigkeit, die Selektivität und Spezifität, die Robustheit und die Linearität der Analysenmethode. Hinzu kommt die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie die Untersuchung der Analysendaten auf Ausreißer. Die Gleichungen für die Validierung der Methode wurden Stavros Kromidas Validierung in der Analytik entnommen [74].

7.1.2 Analysenpräzision

Durch sechsmaliges Injizieren eines matrixfreien Multistandards wurde die Analysenpräzision bestimmt, also die Präzision mit der das gewählte Analysengerät (GC-MS) die Analyten bestimmt. Die relative Standardabweichung sollte dabei als Maß der Analysenpräzision nicht mehr als 3 % betragen. In Gleichungen 1 und Gleichung 2 wird die Berechnung der relativen Standardabweichung dargestellt.

$$\Sigma = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad \text{Gleichung 1}$$

$$\sigma_{\text{rel}} = \frac{\sigma \cdot 100}{\bar{x}} \% \quad \text{Gleichung 2}$$

Variable	Bedeutung
σ	Absolute Standardabweichung [CUA]
σ_{rel}	Relative Standardabweichung [%]
n	Anzahl der Mehrfachbestimmungen ($n = 6$)
\bar{x}	Mittelwert [CUA]
x_i	Einzelwert i [CUA]

Tabelle 18 fasst die Ergebnisse der Untersuchung der Analysenpräzision des Multistandards zusammen. Die relative Standardabweichung der Analyten betrug weniger als 3 % und entspricht daher den festgelegten Kriterien. Damit wurde das Analysengerät als geeignet für die Untersuchungen bestätigt.

In einem zweiten Schritt wurde die Präzision der Aufarbeitung berücksichtigt.

Tabelle 18: Ergebnisse der Untersuchung der Analysenpräzision.

Messung	ISTD	Allyl-ITC	Phenyl-ITC	Benzyl-ITC	2-Phenylethyl-ITC	5-(Methylthio)pentyl-ITC
1 [CUA]	34961058	25187369	67599057	76619668	58162994	704304
2 [CUA]	36474233	26085485	69246146	76911451	58128688	684031
3 [CUA]	37136134	26602862	70833774	78248559	59614946	697777
4 [CUA]	37048880	26789498	69696361	76678051	58251168	696418
5 [CUA]	37054872	26382170	70349460	78274179	59229302	710705
6 [CUA]	38247576	27494933	71318358	77758424	58485950	694195
\bar{x} [CUA ²]	36820458	26423720	69840526	77415055	58645508	697905
Σ [CUA]	1078952	769165	1328744	772031	626340	9091
σ_{rel} [%]	2,930	2,911	1,903	0,997	1,068	1,303

7.1.3 Methodenpräzision

Zur Bestimmung der Validierungsparameter Methodenpräzision und Richtigkeit der Methode wurden matrixreiche Pflanzenproben genutzt. Der Gehalt an GSL schwankt entlang der Entwicklungsstadien der Pflanze. Der höchste mittlere Gehalt liegt dabei in den Keimlingen vor.

Diesem entsprechend sind verschiedene *Brassica*-Sprossen gezogen worden. Untersucht wurden Keimsprossen von Brokkoli (*Brassica oleracea*), Daikon-Rettich (*Raphanus sativus*) und weißem Senf (*Sinapis alba*) von der Sperli GmbH (Everswinkel, Deutschland). Eine flache Schale wurde mit gewässerten Wattelagen ausgelegt und das gründlich mit Wasser gewaschene Saatgut anschließend auf der Watte verteilt. Die Wässerung Samen unter Tageslicht erfolgte dreimal täglich. Nach sieben Tagen sind Blätter und Stängel der Sprossen geerntet und zur Probenaufbereitung eingesetzt worden. Zur Erweiterung der Methode um die Analyten 1-Cyano-3,4-Epithiobutan (CETB) und 1-Cyano-2,3-Epithiopropyl (CETP), wurden nach oben genanntem Schema Sprossen von Rotkohl (*Brassica oleracea* var. *Captata* f. *rubra*) und Pak Choi (*Brassica rapa* ssp. *Chinensis*) von der Sperli GmbH (Everswinkel, Deutschland) gezogen.

Die Methodenpräzision ist durch viermalige Aufarbeitung und Extraktion (siehe Abschnitt 6.1.1) einer mit einer Standardlösung versetzten matrixhaltigen Probe untersucht worden. Dabei musste sichergestellt werden, dass die Matrix keinen der Analyten enthält. Aus diesem Grund wurde eine Probe ohne Standardaddition aufgearbeitet und ebenfalls analysiert. Die Auswahl als Matrix für diese Bestimmungen fiel auf Senfsprossen, da diese das ITC Allyl-ITC enthalten. Dieses ist sehr flüchtig und kann durch Schütteln und Belüften der Probe leicht entfernt werden.

Zur Umrechnung der Analytengehalte von der Kalibrierung (mg/L) auf die matrixreiche Probe (mg/kg), wurde ein Umrechnungsfaktor (siehe Gleichung 3) verwendet.

$$X_{\text{mg/kg}} = \frac{x_{\text{mg/L}} \cdot V \cdot 1000}{m_{\text{Probe}}}$$

Gleichung 3

Variable	Bedeutung
$X_{\text{mg/kg}}$	Analytgehalt bezogen auf die Einwaage der Matrix
$x_{\text{mg/L}}$	Analytgehalt ohne Berücksichtigung der Einwaage
V	Endvolumen der Probe (0,0003 L)
m_{Probe}	Einwaage der Probe

Die Ergebnisse der Methodenpräzision sind in Tabelle 19 und die ausführlichen Ergebnisse der Untersuchung in Tabelle 52 im Anhang A3-1 aufgeführt. Es wird deutlich, dass die Präzision über das Gesamtverfahren gegenüber der Präzision des Messgerätes abnimmt. Diese Abweichung kann auf die Probenvorbereitung zurückgeführt werden. Zwei Extraktionen und eine abschließende Konzentrierung der Proben durch Evaporation weisen ein hohes Fehlerpotenzial auf. Diese Schritte können zu etwaigen Verlusten und Ungleichmäßigkeiten der Ergebnisse geführt haben. Die berechnete relative Standardabweichung über das Gesamtverfahren beträgt weniger als 10 %. Die Methodenpräzision wurde damit als ausreichend bewertet.

Tabelle 19: Ergebnisse der Untersuchung der Methodenpräzision.

Parameter	Einwaage [g]	Allyl-ITC	Phenyl-ITC	Benzyl-ITC	2-Phenylethyl-ITC	5-(Methylthio)pentyl-ITC
undotiert [mg/kg]	0,5157	-	-	-	-	-
Messung 1 [mg/kg]	0,5914	18,27	23,17	23,02	25,76	25,23
Messung 2 [mg/kg]	0,5567	21,86	26,60	26,96	30,32	22,86
Messung 3 [mg/kg]	0,5682	21,48	27,01	27,04	31,19	24,57
Messung 4 [mg/kg]	0,5930	19,99	26,60	25,38	28,28	22,45
\bar{x} [mg/kg]	-	20,40	25,84	25,60	28,89	23,78
Σ [mg/kg]	-	1,634	1,791	1,883	2,413	1,334
σ_{rel} [%]	-	8,01	6,93	7,36	8,35	5,61

7.1.4 Richtigkeit

Neben der Präzision, mit der ein Ergebnis ermittelt werden kann, ist die Richtigkeit eines Ergebnisses von entscheidender Bedeutung. Als Maß für die Richtigkeit wurde in dieser Arbeit die Bestimmung der Wiederfindungsrate genutzt, also der Bestimmung ob ein Sollwert durch die Analyse einer Probe bestätigt wird. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden Sprossen von Brokkoli, Daikon-Rettich und Senf zu je acht Proben eingewogen, zerkleinert, hydrolysiert und je vier der Proben mit einer Standardlösung bekannter Konzentration ($c = 50 \text{ mg/L}$) aufgestockt. Die Konzentration der Standardlösung sollte als Sollkonzentration für die Berechnung dienen. Die vier Proben ohne Addition des Standards dienten als Vergleichsproben, da die ausgewählten ITC in den verwendeten Gemüsen

7 Ergebnisse und Diskussion

zum Teil enthalten sind. Die Wiederfindungsraten wurden anhand von Gleichung 4 berechnet. Zur Berücksichtigung der in den Matrices bereits enthaltenen Analyten musste bei Quantifizierung eines Analyten in den Vergleichsproben, die analysierte Konzentration aus den Einzelwerten gemittelt und zur Sollkonzentration addiert werden.

$$WFR = \frac{c_{ist} \cdot 100}{c_{soll}} \%$$

Gleichung 4

Variable	Bedeutung
c_{ist}	analysierter Gehalt der Proben [mg/kg]
c_{soll}	Sollgehalt der Proben [mg/kg]
WFR	Wiederfindungsrate [%]

Tabelle 20 fasst die Wiederfindungsraten der analysierten *Brassica*-Gemüse zusammen.

Tabelle 20: Wiederfindungsraten der drei ausgewählten *Brassica*-Gemüse.

Material	Allyl-ITC [%]	Phenyl-ITC [%]	Benzyl-ITC [%]	2-Phenylethyl-ITC [%]	5-(Methylthio)pentyl-ITC [%]
Brokkoli	104,8	101,70	104,00	108,60	94,60
Daikon-Rettich	80,40	91,70	88,20	93,77	92,53
Senf	76,73	87,90	89,21	98,94	91,53

Wiederfindungsraten werden je nach Bereich häufig in Abhängigkeit der Aufgabenstellung bewertet. Die Anforderungen an diesen Validierungsparameter sind in der Pharmazie beispielsweise strenger als in der Umweltanalytik [75]. Im Umwelt- und Gesundheitsschutz akzeptierte Wiederfindungsraten liegen bei 70 – 120 %. Diese Anforderungen werden auch dieser Arbeit zugrunde gelegt. Bei Betrachtung der in Tabelle 20 aufgeführten Wiederfindungsraten gilt die Richtigkeit unter diesen Gesichtspunkten als nachgewiesen. Bei nachgewiesener Richtigkeit kann nach Gottwald [75] die Spezifität sowie die Selektivität der Methode vorausgesetzt werden. Gegenüber den Brokkolisprossen lagen die Wiederfindungsraten der Senfsprossen deutlich niedriger. Im Vergleich der Chromatogramme von Brokkoli und Senf wird zwar deutlich, dass das Chromatogramm von aufgearbeiteten Brokkolisprossen eine deutlich höhere Matrixlast aufweist (Abbildung 14), aber auch die zu analysierenden Abbauprodukte in größeren Mengen vorliegen. Dieses kann durch die Anzahl der Signale und deren höhere Intensität belegt werden. Der Peak des Allyl-ITC ist deutlich geringer gegenüber der mitdetektierten Matrix, wodurch die Integration der Peaks deutlich fehleranfälliger ist. Dieses zeigte sich schon in der unterschiedlichen relativen Standardabweichung zwischen Allyl-ITC und Benzyl-ITC (Tabelle 18).

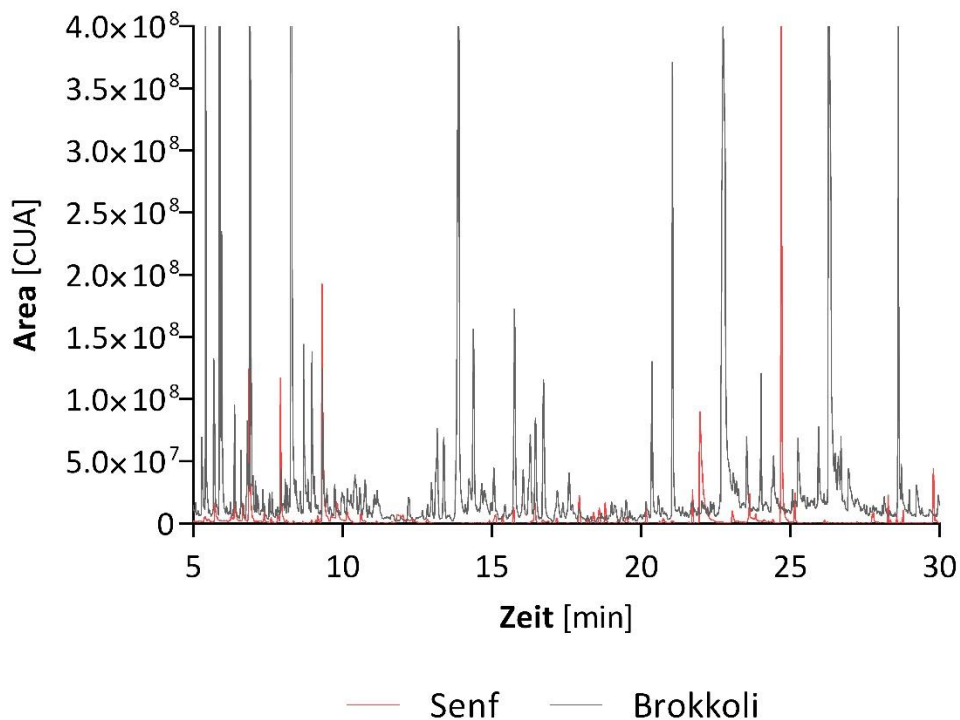


Abbildung 14: Vergleich der Chromatogramme von Senfproben (rot) und Brokkoliprobe (schwarz).

Eine Beeinflussung der Wiederfindungsrate durch Interaktion der Analyten und der Matrix ist wahrscheinlich. Hanschen et. Al. belegten in ihrer Studie zur Stabilität von ITC bereits, dass diese mit in der Probe enthaltenen Nucleophilen reagieren [15]. Aminosäuren, Peptide oder Proteine können als Nucleophile in Pflanzen in Betracht gezogen werden. Je mehr Matrix in der Probe enthalten ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ITC mit weiteren Nucleophilen reagieren. Die Reaktivität einer schwefelhaltigen Seitenkette der ITC ist dabei am höchsten [15]. Die niedrigen Wiederfindungsraten von Senf und Daikon-Rettich können dadurch erklärt werden. Eine Erniedrigung der Temperatur hat die Senkung der Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Erhöhung der Aktivierungsenergie zur Folge [76, 77]. Um Reaktionen mit den Nucleophilen in der Matrix entgegenzuwirken, wurden die aufgearbeiteten Proben bei -20 °C gelagert. Da das Analysengerät nicht über eine gekühlte Probenaufgabe verfügt, waren die Proben vom Start der Sequenz bis zur Messung der Raumtemperatur ausgesetzt. Die damit verbundene Verdampfung des Lösungsmittels Dichlormethan (Siedetemperatur: 40 °C) führt zu einer Konzentrierung der Probe. Dem entgegen zu wirken, wurde mit kurzen Sequenzen und der Optimierung der Analysenzeit (siehe Abschnitt Methodenoptimierung) gearbeitet.

7.1.5 Linearität

Die Linearität einer Methode ist essentiell für eine Quantifizierung von Analyten. Methodisch wird eine Reihe von äquidistanten Konzentrationsniveaus mit der entwickelten Methode analysiert und eine lineare Regression sowie eine quadratische Regression durchgeführt. Die Prüfung der Linearität einer Kalibrierung beruht dabei auf dem Vergleich der Anpassung der linearen Regression (Gleichung 5) beziehungsweise der Anpassung der quadratischen Regression (Gleichung 6) an die Messsignale. Dieses geschieht mit Hilfe des Anpassungstests nach MANDEL.

$$y = b \cdot x + a \quad \text{Gleichung 5}$$

$$y = n \cdot x^2 + b \cdot x + a \quad \text{Gleichung 6}$$

Um mit den erhaltenen Messdaten eine lineare bzw. eine quadratische Regression durchzuführen, ist es notwendig, zunächst einige Hilfsgrößen zu berechnen. Hierzu zählen die Mittelwerte der Kalibrierniveaus \bar{x} (Gleichung 7) und der Flächenwerte der Messsignale \bar{y} (Gleichung 8). Des Weiteren werden drei verschiedene Abweichungsquadrate bestimmt. Für Q_x (Gleichung 9) und Q_y (Gleichung 10) wird die Summe aus der quadrierten Differenz der Einzelwerte und des Mittelwertes gebildet. Gleichung 11 beschreibt die Berechnung des Abweichungsquadrates Q_{xy} . Dabei wird aus dem Produkt der Abweichungen der x- und y-Werte die Summe gebildet. Aus diesen Hilfsgrößen können abschließend die Steigung (b, Gleichung 12) und der Ordinatenabschnitt (a, Gleichung 13) der linearen Regression berechnet werden.

Die Ergebnisse der Hilfsgrößen sind im Anhang A3 unter A3-2 aufgeführt.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{Gleichung 7}$$

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad \text{Gleichung 8}$$

$$Q_x = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Gleichung 9}$$

$$Q_y = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad \text{Gleichung 10}$$

$$Q_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \quad \text{Gleichung 11}$$

$$b = \frac{Q_{xy}}{Q_x} \quad \text{Gleichung 12}$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x} \quad \text{Gleichung 13}$$

7 Ergebnisse und Diskussion

Variable	Bedeutung
\bar{x}	Arithmetisches Mittel der Konzentration [mg/L]
\bar{y}	Arithmetisches Mittel Messsignal [CUA]
x_i	Konzentration Kalibrierniveau i [mg/L]
y_i	Messsignal Kalibrierniveau i [CUA]
Q_x	Abweichungsquadrat der Konzentration [mg^2/L^2]
Q_y	Abweichungsquadrat des Messsignals [CUA^2]
Q_{xy}	Fehlerprodukt aus Gehalt und Messsignal [$\text{CUA} \cdot \text{mg/L}$]
b	Steigung der linearen Regression [$\text{CUA} \cdot \text{L/mg}$]
a	Messsignal der Kalibrierung bei der Konzentration 0 mg/L [CUA]

Die Güte der Kalibrierung wird durch die Verfahrensstandardabweichung und den Verfahrensvariationskoeffizienten der Analyten bestimmt. Die Berechnung erfolgte mit den im Folgenden aufgeführten Gleichungen. Die zur Berechnung benötigten Variablen wurden im vorigen Abschnitt erläutert. Tabelle 21 fasst die Parameter der linearen Regression der durchgeführten Kalibrierung zusammen.

$$s_y = \sqrt{\frac{Q_y - b \cdot Q_{xy}}{N-2}} \quad \text{Gleichung 14}$$

$$s_{x0} = \frac{s_y}{b} \quad \text{Gleichung 15}$$

$$\vartheta_k = \frac{s_{x0} \cdot 100}{\bar{x}} \% \quad \text{Gleichung 16}$$

Variable	Bedeutung
s_y	Reststreuung [CUA]
s_{x0}	Verfahrensstandardabweichung [mg/L]
ϑ_k	Verfahrensvariationskoeffizient [%]

Tabelle 21: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression.

Parameter	Allyl-ITC	Phenyl-ITC	Benzyl-ITC	2-Phenylethyl-ITC	5-(Methylthio)pentyl-ITC
b [CUA·L/mg]	158447,7	378609,5	429451,4	336499,7	41776,06
a [CUA]	-445710,6	-1302756	-1615414	-527475,9	-95032,20
s_y [CUA]	340463,5	1108133	1454492	1249848	48211,97
s_{x0} [mg/L]	2,15	2,93	3,39	3,71	1,15
ϑ_k [%]	3,96	4,87	5,78	6,23	4,35

Für die Berechnung der quadratischen Regression werden ebenfalls Hilfsgrößen benötigt, welche im Folgenden aufgeführt werden. Die Konzentration der Kalibrierniveaus wird quadriert (x^2), mit Exponenten drei (x^3) und vier (x^4) potenziert und die Messsignale quadriert (y^2). Des Weiteren wird das

7 Ergebnisse und Diskussion

Produkt aus der Konzentration und dem Messsignal, sowie das Produkt aus quadrierter Konzentration und Messsignal benötigt.

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad \text{Gleichung 17}$$

$$Q_{xy} = \sum (x_i \cdot y_i) - \left[\frac{\sum y_i \cdot \sum x_i}{N} \right] \quad \text{Gleichung 18}$$

$$Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left[\frac{\sum x_i \cdot \sum x_i^2}{N} \right] \quad \text{Gleichung 19}$$

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \left[\frac{(\sum x_i^2)^2}{N} \right] \quad \text{Gleichung 20}$$

$$Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 \cdot y_i) - \left[\frac{\sum x_i^2 \cdot \sum y_i}{N} \right] \quad \text{Gleichung 21}$$

$$n = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} \cdot Q_{x^4}} \quad \text{Gleichung 22}$$

$$b = \frac{Q_{xy} - n \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}} \quad \text{Gleichung 23}$$

$$a = \frac{[\sum y_i - b \cdot \sum x_i - n \cdot \sum x_i^2]}{N} \quad \text{Gleichung 24}$$

Variable	Bedeutung
x_i	Konzentration Kalibrierniveau i [mg/L]
y_i	Messsignal Kalibrierniveau i [CUA]
Q_{xx}	Abweichungsquadrat der Konzentration [mg ² /L ²]
Q_{xy}	Fehlerprodukt aus Gehalt und Messsignal [CUA · mg/L]
Q_{x^3}	Konzentration der Kalibrierniveaus potenziert mit 3 [mg ³ /L ³]
Q_{x^4}	Konzentration der Kalibrierniveaus potenziert mit 4 [mg ⁴ /L ⁴]
Q_{x^2y}	Produkt aus Messsignal und quadr. Konzentration [CUA · mg ² /L ²]
N	Anzahl der Kalibrierniveaus
n	Regressionsparameter der Steigung der quadr. Regression [CUA · L ² /mg ²]
b	Regressionsparameter [CUA · L/mg]
a	Regressionsparameter [CUA]

Die Parameter der quadratischen Regression sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 22) zusammengefasst.

Tabelle 22: Zusammenfassung der Parameter der quadratischen Regression.

Parameter	Allyl-ITC	Phenyl-ITC	Benzyl-ITC	2-Phenylethyl-ITC	5-(Methylthio)pentyl-ITC
n [CUA·L ² /mg ²]	-102,9	-263,9	-456,7	-618,3	-134,1
b [CUA·L/mg]	169620	410298	482957	410179	48896
a [CUA]	-666093	-1994567	-2755072	-2123815	-163786
s_y [CUA]	353418,	1152746	1488407	1178171	43819

7 Ergebnisse und Diskussion

Für die Berechnung des Anpassungstests nach MANDEL wird ein weiterer Parameter benötigt, die Reststreuung der quadratischen Regression. Diese wird nach Gleichung 25 berechnet.

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{N-p}} \quad \text{Gleichung 25}$$

Variable	Bedeutung
s_y	Reststreuung [CUA]
y_i	Messsignal [CUA]
\hat{y}	Messsignal berechnet über die quadr. Regression [CUA]
p	Anzahl der Konstanten des Funktionsmodells (hier $p = 3$)
N	Anzahl der Kalibrierniveaus (hier 10)

Mittels der im vorigen Teil berechneten Hilfsgrößen, wird der Anpassungstest nach MANDEL durchgeführt (Gleichungen 26 und 27).

$$\Delta s^2 = ((N - 2) \cdot s_{y \text{ lin}}^2) - ((N - 3) \cdot s_{y \text{ quad}}^2) \quad \text{Gleichung 26}$$

$$PG = \frac{\Delta s^2}{s_{y \text{ quad}}^2} \quad \text{Gleichung 27}$$

Variable	Bedeutung
Δs^2	Differenz der Abweichungsvarianzen
$s_{y \text{ lin}}^2$	quadrierte Reststreuung der linearen Regression [CUA ²]
$s_{y \text{ quad}}^2$	quadrierte Reststreuung der quadratischen Regression [CUA ²]
N	Anzahl der Kalibrierniveaus (hier 10)
PG	Prüfgröße (für F-Test (mit $f_1 = 1$ und $f_2 = 7$, $\alpha = 1 \%$))

Die Prüfgrößen der ITCs wurden mit dem tabellierten Wert für den F-Test mit zweiseitiger Fragestellung ($VG = 12,25$) verglichen. Die nach Gleichung 26 berechneten Varianzdifferenzen der fünf ITC sind in Tabelle 23 aufgeführt. Ist der tabellierte Vergleichswert größer als die berechnete Prüfgröße, so stellt die quadratische Regression keine signifikant bessere Anpassung als die lineare Regression dar. In Folge dessen ist die lineare Funktion bestätigt und wird für die weitere Validierung verwendet [75, 78]. Die Berechnungen zeigten, dass die quadratische Funktion keine signifikant bessere Beschreibung der Kalibrierfunktionen der ITC darstellt.

Tabelle 23: Zusammenfassung des Vergleichs von PG mit dem tabellierten Wert des F-Tests.

Parameter	Allyl-ITC	Phenyl-ITC	Benzyl-ITC	2-Phenylethyl-ITC	5-(Methylthio)pentyl-ITC
Δs^2 [CUA ²]	$5,2989 \cdot 10^{10}$	$5,2191 \cdot 10^{11}$	$1,4169 \cdot 10^{12}$	$2,7804 \cdot 10^{12}$	$5,1543 \cdot 10^{10}$
PG	0,42	0,39	0,64	2,00	2,68
tab. Wert F-Test	12,25				
Regression	linear	linear	linear	linear	Linear

7 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden sind die graphischen Auftragungen der Datenpaare und der linearen Regression der fünf ITC dargestellt.

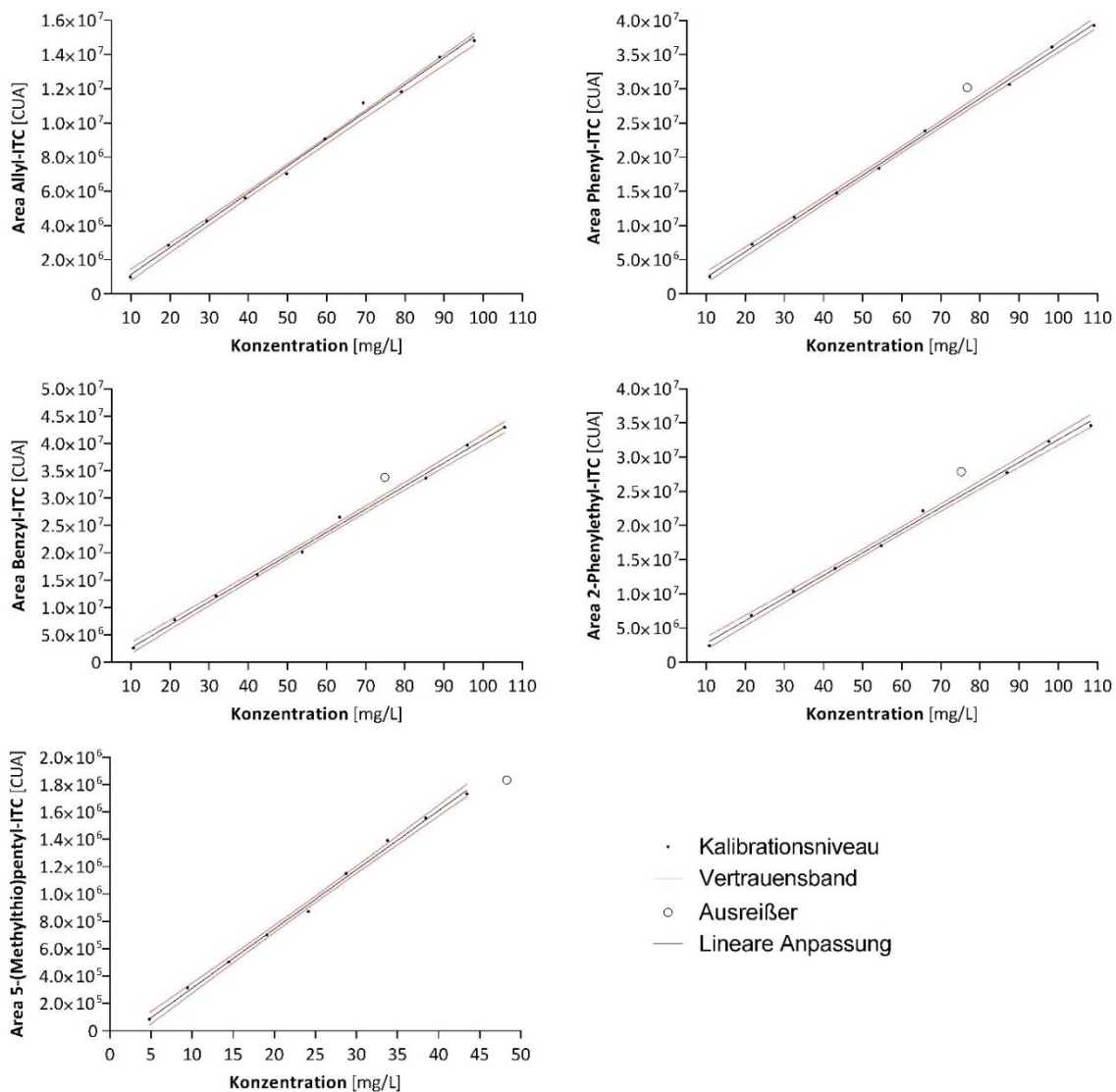


Abbildung 15: Kalibriergeraden und Vertrauensbänder (rot) der fünf ITC nach Ausschluss von Ausreißern und Linearer Regression.

Ein Vergleich der Datenpaare der Kalibrierung mit der Regressionsgeraden zeigt, dass vereinzelte Datenpaare eine relativ hohe Abweichung zur Geraden haben (Abbildung 15, gekennzeichnet mit (o)). Dieses hohe Residuum deutet auf Ausreißer in der Kalibrierung hin. Aus diesem Grund wurden diese ausgewählten Datenpaare einem Residuen-Ausreißertest unterzogen.

$$PG = \frac{[(N-2) \cdot s_{y_{10 Dp}}^2 - (N-3) \cdot s_{y_{9 Dp}}^2]}{s_{y_{9 Dp}}^2}$$

Gleichung 28

7 Ergebnisse und Diskussion

Variable	Bedeutung
$S_{y\ 10\ Dp}^2$	quadrierte Reststreuung der linearen Regression mit 10 Datenpaaren [CUA ²]
$S_{y\ 9\ Dp}^2$	quadrierte Reststreuung der linearen Regression mit 9 Datenpaaren [CUA ²]
N	Anzahl der Kalibrierniveaus (hier 10)
PG	Prüfgröße (für F-Test (mit $f_1 = 1$ und $f_2 = 8$, $\alpha = 1\%$))

Das als Ausreißer verdächtige Kalibrierniveau ist aus dem Datensatz entfernt und die quadrierte Reststreuung neu berechnet worden. Die quadrierte Reststreuung der linearen Regression mit dem vollständigen Datensatz und die quadrierte Reststreuung der linearen Regression ohne den Ausreißer wurde in Gleichung 28 eingesetzt und die Prüfgröße PG berechnet. Der Vergleichswert wurde dem zweiseitigen F-Test ($f_1=1$ und $f_2=8$, $\alpha=1\%$ bei $N=10$) entnommen. Die Hypothese gilt als bestätigt, dass das Wertepaar ein Ausreißer der linearen Regression ist, wenn die Prüfgröße größer als der tabellierte Wert des F-Tests ist. Das Datenpaar ist dann unter Kennzeichnung zu eliminieren. Tabelle 24 zeigt die als Ausreißer verdächtigten Kalibrierniveaus.

Tabelle 24: als Ausreißer verdächtige Kalibrierniveaus und deren berechnete Prüfgröße.

Substanz	Kalibrierniveau	Konzentration [mg/L]	Messsignal [CUA]	PG	Ausreißer
Allyl-ITC	7	69,04	11176925	9,552	Nein
Phenyl-ITC	7	76,41	30179043	22,14	Ja
Benzyl-ITC	7	74,55	33821725	26,75	Ja
2-Phenylethyl-ITC	7	75,83	27892122	23,78	Ja
5-(Methylthio)pentyl-ITC	10	48,28	1833975	12,20	Ja

Die vier als Ausreißer identifizierten Datenpaare wurden aus dem Datenkollektiv entfernt und die Parameter der linearen Regression neu berechnet (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression nach Eliminierung der Ausreißer.

Parameter	Allyl-ITC	Phenyl-ITC	Benzyl-ITC	2-Phenylethyl-ITC	5-(Methylthio)pentyl-ITC
b [CUA·L/mg]	158448	373737	422758	330918	43294,4
a [CUA]	-445711	-1302691	-1615414	-527502	-121913,1
s_y [CUA]	340463	580600	708139	637150	31119,1
s_{x0} [mg/L]	2,15	1,55	1,68	1,93	0,72
ϑ_k [%]	3,96	2,67	2,95	3,33	2,98
r	0,99771	0,99911	0,99892	0,99862	0,99871

7 Ergebnisse und Diskussion

Jeder Messwert einer Probe ist mit einem Kalibrierfehler (Reststreuung s_y) behaftet, der statistisch bewertet werden kann. Der Gesamtfehler eines Messwertes ergibt sich dann aus dem Kalibrier- und dem Messfehler. Aus dem Fehlerfortpflanzungsgesetz folgt, dass die Regressionsgerade zwischen zwei Vertrauensbändern liegt [75, 79], die auch als Prognoseintervalle bezeichnet werden. Die oberen und unteren Vertrauensbänder der Regressionsgleichungen wurden nach Gleichung 29 berechnet.

$$\hat{x}_{u,o} = \frac{y-a}{b} \pm \frac{s_y \cdot t}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(y-\bar{y})^2}{b^2 \cdot Q_x}} \quad \text{Gleichung 29}$$

Variable	Bedeutung
y	Messsignal [CUA]
\bar{y}	Mittelwert der Messsignale der Kalibrierung [CUA]
N	Anzahl der Kalibrierniveaus (Allyl-ITC: 10)*
\hat{N}	Anzahl der Mehrfachbestimmungen (hier 1)
b	Steigung der Regressionsgeraden [CUA·L/mg]
a	Achsenabschnitt [CUA]
s_y	Reststreuung der Kalibrierung [CUA]
t	Wert aus t-Tabelle (f=N-2, $\alpha=5\%$; hier 2,31)
\hat{x}_o	Konzentration oberhalb des Kalibrierniveaus [mg/L]
\hat{x}_u	Konzentration unterhalb des Kalibrierniveaus [mg/L]
Q_x	Abweichungsquadrat der Konzentrationen der Kalibrierung [(mg/L) ²]

* für Phenyl-ITC, Benzyl-ITC, Phenylethyl-ITC und 5-(Methylthio)pentyl-ITC ist N=9 (t=2,36)

Diese zwei neuen Konzentrationswerte eines Messsignals, jeweils eines oberhalb und eines unterhalb der Kalibrierkonzentration werden für jedes Kalibrierniveau berechnet und anschließend gegen die Messsignale aufgetragen. Daraus resultieren das obere und das untere Vertrauensband (siehe Abbildung 15). Je schmaler die Vertrauensbänder sind, desto besser ist die Güte der Kalibrierung.

Ein weiteres Kriterium für die Güte der Kalibrierung ist der Korrelationskoeffizient r (Gleichung 30) [80, 81]. Dieser Koeffizient vergleicht die Gesamtstreuung des Verfahrens mit der Streuung der Punkte der Regressionsgeraden.

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{Gleichung 30}$$

Variable	Bedeutung
y	Messsignal [CUA]
\bar{y}	Mittelwert der Messsignale der Kalibrierung [CUA]
x	Konzentration [mg/L]
\bar{x}	Mittelwert der Konzentration der Kalibrierung [mg/L]
r	Korrelationskoeffizient

7.1.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zu der Validierung einer Methode gehört die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ebenso wie die Überprüfung dieser Methode auf einen linearen Arbeitsbereich. Die Nachweisgrenze kann als eine qualitative Aussage über die kleinste nachweisbare Menge einer Substanz definiert werden (DIN 32625, [82]). Bei der Mehrfachmessung einer Probe mit der Konzentration der Nachweisgrenze wird die Substanz mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % signifikant vom Leerwert unterschieden [75, 83]. Je nach Anwendungsbereich können verschiedene Methoden zur Bestimmung der Nachweisgrenze genutzt werden. Dazu gehören neben der Blindwert-Methode [79] und der Methode über das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis [74] die hier angewendete Methode über eine weitere Kalibrierung mit Kalibrierstandards im unteren Konzentrationsniveau ($c = 0 - 12 \text{ mg/L}$). Für die Berechnung der Nachweisgrenze (Gleichung 31) wird, wie schon in der Berechnung der linearen Regression, die Verfahrensstandardabweichung benötigt. Hierfür wurden die Parameter der linearen Regression für die Kalibrierung im unteren Konzentrationsbereich ermittelt (Tabelle 26).

Es ist auffällig, dass die Verfahrensvariationskoeffizienten (ϑ_k) der Kalibrierung mit einem Bereich zwischen 4 – 8 % relativ hoch sind. Gewöhnlich sind Werte kleiner 3 % anzustreben. Die hohen Abweichungen konnten nicht durch ausreißende Wertepaare erklärt werden. Der bereits beschriebene Ausreißertest ergab keine Ausreißer.

Eine mögliche Erklärung ist eine geringere Empfindlichkeit der Methode bei Analysen im Bereich der Nachweisgrenze. Der Verfahrensvariationskoeffizient ist ein relatives Maß für die Präzision, der abhängig ist von der Verfahrensstandardabweichung und den Mittelwerten der Kalibrierung. Die Steigung einer Kalibriergeraden bringt die Empfindlichkeit einer Methode zum Ausdruck. Eine flache Steigung, also eine geringere Empfindlichkeit, erhöht den Wert der Verfahrensstandardabweichung und beeinflusst damit auch den Verfahrensvariationskoeffizienten.

Tabelle 26: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression zur Bestimmung der Nachweisgrenze.

Parameter	Allyl-ITC	Phenyl-ITC	Benzyl-ITC	2-Phenylethyl-ITC	5-(Methylthio)pentyl-ITC
b [CUA·L/mg]	153936	357754	431586	339755	29554,7
a [CUA]	-95043	-205714	-270543	-140772	-45752,5
s_y [CUA]	65924	141943	143235	92332	11139
s_{x0} [mg/L]	0,428	0,397	0,332	0,272	0,377
ϑ_k [%]	7,89	6,61	6,25	4,56	7,10
r	0,99098	0,99366	0,99432	0,99696	0,99122

7 Ergebnisse und Diskussion

$$x_N = s_{x0} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad \text{Gleichung 31}$$

$$x_{BG} = 3 \cdot x_N \quad \text{Gleichung 32}$$

Variable	Bedeutung
x_N	Nachweisgrenze [mg/L]
x_{BG}	Bestimmungsgrenze [mg/L]
N	Anzahl der Kalibrierniveaus (hier 10)
\hat{N}	Anzahl der Mehrfachbestimmungen (hier 1)
s_{x0}	Verfahrensstandardabweichung [mg/L]
t	Wert aus t-Tabelle ($f=N-2$; $\alpha=10\%$; hier 1,86)
\bar{x}^2	Quadrierter Mittelwert der Kalibrierkonzentrationen [(mg/L) ²]
Q_x	Abweichungsquadrat der Konzentrationen der Kalibrierung [(mg/L) ²]

Die Bestimmungsgrenze wird in der Regel als die dreifache Konzentration der Nachweisgrenze betrachtet. Zur Einfachheit der Berechnung der Bestimmungsgrenze wird somit die Nachweisgrenze mit drei multipliziert (siehe Gleichung 32). Die berechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der jeweiligen ITC sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Übersicht der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der untersuchten ITC.

Parameter	Allyl-ITC	Phenyl-ITC	Benzyl-ITC	2-Phenylethyl-ITC	5-(Methylthio)pentyl-ITC
x_N [mg/L]	0,9648	0,8937	0,7476	0,6122	0,8557
x_{BG} [mg/L]	2,89	2,68	0,24	1,84	2,57

In der dargestellten Validierung wurde die Methode zur Quantifizierung von ITC aus Pflanzenmatrizes auf ihre Präzision, Richtigkeit und Linearität untersucht.

Für alle Analyten konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und den Messsignalen bewiesen werden. Die daraus resultierenden Verfahrensstandardabweichungen und Verfahrensvariationskoeffizienten entsprachen den Anforderungen. Bei der Analyse der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen konnte ebenfalls ein linearer Zusammenhang im unteren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Der Nachweis über die Richtigkeit der Methode wurde über die Bestimmung von Wiederfindungsraten in den drei *Brassica*-Gemüsen Brokkoli, Daikon-Rettich und weißem Senf erbracht. Dabei ist deutlich geworden, dass sich die prozentuale Wiederfindungsrate reziprok zur Komplexität der Probenmatrix verhält. Die Präzision des Gesamtverfahrens konnte mit der relativen Standardabweichung kleiner 10 % nachgewiesen werden.

Die beschriebenen Validierungsparameter entsprechen den geforderten Kriterien und können als erfolgreich durchgeführt bewertet werden. Es konnte belegt werden, dass die Validierung der GC/MS-Methode zur Quantifizierung von ITC in *Brassica*-Gewächsen erfolgreich war.

7.1.7 Erweiterung der Methode um Analyten der Gruppe der Epithionitrile

Zur Erweiterung der Methode zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten um die Gruppe der EPT, wurde die Methode mit den beiden Vertretern 1-Cyano-3,4-Epithiobutan (CETB) und 1-Cyano-2,3-Epithiopropen (CETP) teilvalidiert. Geprüft wurde auf Linearität und Richtigkeit.

Das Vorkommen sowie die Wirkung dieser beiden EPT ist bereits in verschiedenen Studien untersucht worden [46, 48, 84]. Relevante Vorkommen von CETB hatten Hanschen et al. (2015) [84] in einer Studie in Rosenkohl, Pak Choi und Rotkohl nachgewiesen. Diese Studie belegte zudem auch das Vorkommen von CETP in den Gemüsen Blumenkohl, Wirsing und Weißkohl. Zur Untersuchung der Richtigkeit wurde in der vorliegenden Arbeit auf Sprossen von Rotkohl und Pak Choi zurückgegriffen. Aus Mangel an kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen, wurden die beiden Analyten nach Synthesvorschriften von Shofran et al. (1998) sowie Lüthy und Benn (1980) [47, 85] hergestellt. Die ausführliche Beschreibung der Synthesen ist dem Kapitel 6.6 dieser Arbeit zu entnehmen. Die Reinheit des CETP wurde als unzureichend beobachtet. Grund hierfür kann die unzureichende Abtrennung der Edukte der Synthese sein. Ebenfalls Einfluss auf die Reinheit des Produktes kann eine ungenaue Temperaturkontrolle bei der Synthese haben. Ein letzter zu nennender Einflussfaktor ist eine unzureichende Erfahrung des Experimentators. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das CETP aus genannten Gründen von Frau Dr. Franziska S. Hanschen (Leibniz-Institut Großbeeren e.V, Großbeeren) bezogen.

Beide Produkte waren viskose Flüssigkeiten von hellgelber Farbe. Im Verlauf der Lagerung der Analyten bei -20 °C oder bei der starken Erhitzung dieser, verdunkelte sich die Färbung des CETP gegenüber dem CETB. EPT sind sehr reaktive Verbindungen. Die Veränderung der Farbe des CETP kann darauf zurückzuführen sein, dass es weitaus instabiler ist als das um eine Methylgruppe längere CETB und damit schneller polymerisiert. Diese Polymerisation wurde bereits nachgewiesen [86, 87]. Sie erfolgt nach einem Mechanismus, der ähnlich dem der Polymerisierung von Epoxiden ist. Es wird daher die Hypothese aufgestellt, dass Polymere von EPT die Struktur von Polythioethern aufweisen. In folgender Abbildung ist die wahrscheinliche Struktur des Polymers des CETP dargestellt.

7 Ergebnisse und Diskussion

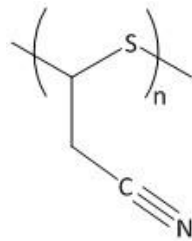


Abbildung 16: Wahrscheinliche Struktur eines Polymers aus CETP-Monomeren.

Die stärkere Neigung des CETP zur Polymerisation ist auf die kürzere Kettenlänge des an dem Ring befindlichen Restes mit anschließendem CN-Substituenten zurückzuführen. Die Auswirkung des -I-Effektes der CN-Gruppe bewirkt eine stärkere Neigung zur Ringöffnung [88], was dementsprechend in einem höheren Polymerisierungsgrad resultiert.

Aus den synthetisierten Verbindungen wurden Konzentrationsniveaus in DCM für eine Kalibrierung hergestellt. Anhand derer wurde der lineare Arbeitsbereich der Methode nach oben beschriebenem Verfahren überprüft. Die Kalibrierung erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 7 – 133 mg/L für CETP und 9 – 171 mg/L für CETB. Die Ergebnisse der Linearen und Quadratischen Regression sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der Linearität der Methode nach Erweiterung um die Gruppe der Epithionitrile.

Parameter	CETP	CETB
Linear		
b [CUA·L/mg]	58627	31560
a [CUA]	-469589	-415089
s_y [CUA]	142755	163396
s_{x0} [mg/L]	0,0353	0,0603
ϑ_k [%]	0,0458	0,0609
r	0,99648	0,99044
Quadratisch		
n [CUA·L ² /mg ²]	-12,99	0,5939
b [CUA·L/mg]	60627	31443
a [CUA]	-529636	-410551
s_y [CUA]	153110	176483
Anpassungstest nach MANDEL		
PG	0,0852	0,0004
Vergleichswert	13,75	

7 Ergebnisse und Diskussion

Die für den Anpassungstest nach MANDEL berechneten PG sind kleiner als der tabellarische Vergleichswert des zweiseitigen F-Tests ($f_1=1$ und $f_2=6$, $\alpha=1\%$ bei $N=9$). Die Lineare Regression ist somit die bessere Beschreibung der Kalibrierfunktion (siehe Abbildung 17). Die Linearität der beiden Verbindungen in dem gemessenen Konzentrationsbereich ist somit bewiesen.

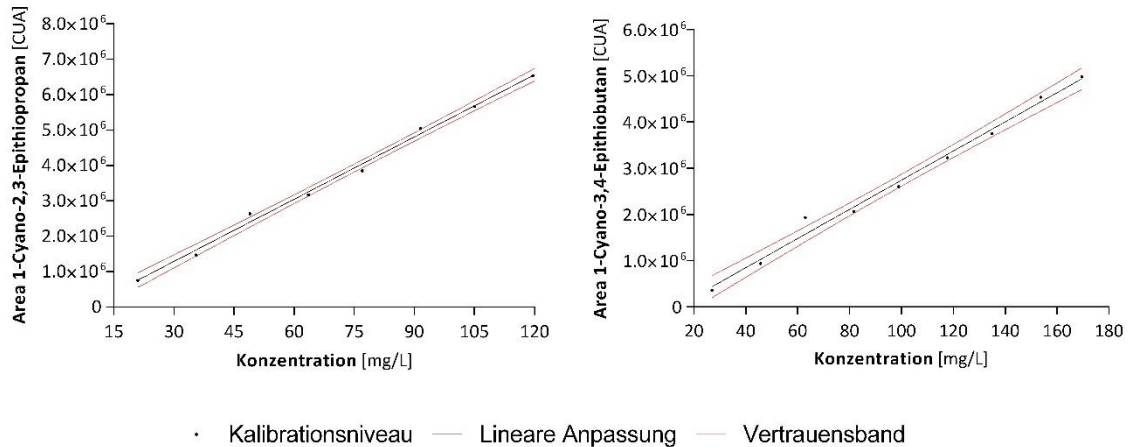


Abbildung 17: Kalibriergeraden und Vertrauensbänder (rot) der beiden EPT nach Linearer Regression.

7.2 Prozessbegleitende Analyse ausgewählter Glucosinolate und deren Abbauprodukten in Fermentationsmodellen verschiedener *Brassica*-Gemüse.

Das chemische Verhalten der GSL bei Verarbeitungsprozessen in Lebensmitteln ist aufgrund ihrer je nach Reaktionsbedingungen großen Vielfalt von bioaktiven Abbauprodukten von großem Interesse. Zur Untersuchung des Einflusses der Prozessierung auf GSL-haltige Lebensmittel wurde Pflanzenmaterial verwendet, wie es unter üblichen Bedingungen verzehrt wird.

7.2.1 Fermentation ausgewählter *Brassica*-Gemüse

Die verwendeten Gemüse (Abbildung 18) waren Brokkoli (*Brassica oleracea* convar. *Botrytis* var. *Italica*, Italien), Rotkohl (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *capitata* f. *rubra*, Deutschland), Spitzkohl (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba* subv. *Conica*, Deutschland) und Chinakohl (*Brassica rapa* subsp. *Pekinensis*, Deutschland). Vom Lebensmittelhandel Alnatura (Hauptsitz: Bickenbach, Deutschland) wurden der Brokkoli, der Rotkohl und der Spitzkohl in Bio-Qualität und von EDEKA (Hauptsitz: Hamburg, Deutschland) der Chinakohl bezogen.

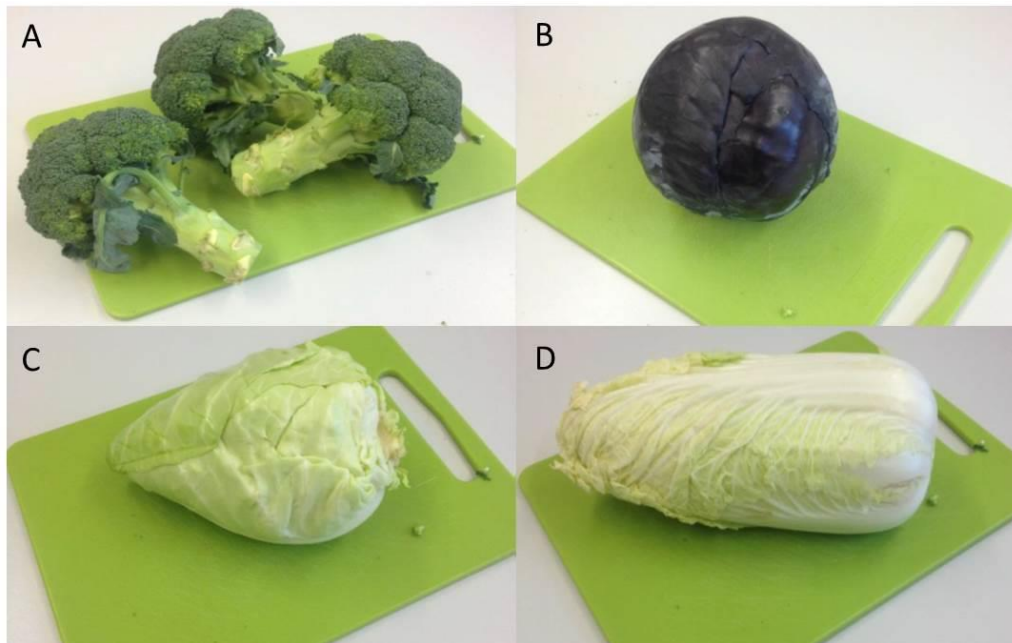


Abbildung 18: Rohes Probenmaterial, von links oben nach rechts unten: Brokkoli, Rotkohl, Spitzkohl, Chinakohl.

Brokkoli ist aufgrund seiner hohen Vitamin C von 840 mg/kg im frischen Pflanzenmaterial und seiner hohen Gehalte an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen als Gemüse besonders interessant für seine Konsumenten [45, 89, 90]. Vor allem dem durch die Hydrolyse des GSL Glucoraphanin (GR) entstehenden Sulforaphan werden positive gesundheitliche Wirkungen zugeschrieben. Als zweites Gemüse wurde der Rotkohl gewählt. Die Blätter dieses Kohls werden als Blaukraut oder Rotkraut sowohl roh als auch gekocht verzehrt. Die namensgebende Farbe des Krautes hat ihre Ursache in der Zubereitung mit säurehaltigen Zutaten. Auch milchsauer fermentiert kann Rotkohl zubereitet werden. Als weitere Kohlart wurde der Spitzkohl gewählt. Dieser ist eine Untervarietät des Weißkohls und wird wie dieser vorwiegend zu Sauerkraut verarbeitet oder roh als Salat verzehrt. Die dritte Kohlart in dieser Arbeit war der Chinakohl. Verzehrt werden hier sowohl die dickeren Blattansätze als auch die Blätter. Fermentiert dient er als Hauptbestandteil des koreanischen Nationalgerichts Kimchi [91], wird aber auch roh oder gekocht verzehrt.

Als Modell aus den oben aufgeführten verschiedenen Arten der Verarbeitung wurde die Fermentation gewählt. Diese Form der Prozessierung erfolgt hier nach dem Prinzip der Milchsäuregärung.

Durch spontane Milchsäuregärung in geschlossenen Gefäßen wird der pH-Wert erniedrigt, CO₂ produziert und dadurch das Wachstum von schädlichen, säureempfindlichen und aeroben Mikroorganismen gehemmt. Die Zugabe von 1 – 10 % Salz vor der Fermentation wirkt zusätzlich konservierend. Die jeweiligen Eigenschaften des fermentierenden Pflanzenmaterials hängen vom Salzgehalt und der während der Fermentation herrschenden Temperatur ab. Diese Faktoren

7 Ergebnisse und Diskussion

bestimmen, welche Mikroorganismen während des Prozesses dominieren. Dies bestimmt auch welche Substanzen produziert werden [91].

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Fermentation die oben aufgeführten vier Vertreter der *Brassicaceae* (Brokkoli, Rotkohl, Spitzkohl und Chinakohl) wie folgt behandelt:

Von einem Kopf Brokkoli wurden die Röschen abgetrennt, diese in ein 1 L-Einweckglas gegeben, anschließend mit 370 ml einer 2 %igen Natriumchlorid-Lösung übergossen und durch ein Tongewicht beschwert, sodass die aus dem Kohl austretende Flüssigkeit die Oberfläche des Pflanzenmaterials dauerhaft bedeckte. Das Glas ist mit einem Bügelverschluss verschlossen und dunkel bei 20 °C gelagert worden.

Die Behandlung der beiden Gemüse Rotkohl und Spitzkohl erfolgten analog zueinander. Ein Kohlkopf wurde geviertelt, vom Spross befreit, das übrige Pflanzenmaterial in ca. 0,5 cm breite Streifen geschnitten, mit Natriumchlorid (1,5 % im Pflanzenmaterial) vermischt und dann mit den Händen leicht ausgepresst, so dass Flüssigkeit aus dem Kohl austrat. Der Kohl und die ausgetretene Flüssigkeit wurden in ein 1 L-Einweckglas gegeben, noch einmal ausgepresst und mit 100 ml einer 1,5 %igen Natriumchlorid-Lösung übergossen. Zur Beschwerung wurde ein Tongewicht hinzugegeben, so dass die aus dem Kohl austretende Flüssigkeit die Oberfläche des Pflanzenmaterials bedeckte. Das Glas ist mit einem Bügelverschluss verschlossen und dunkel bei 20 °C gelagert worden.

Ein Kopf Chinakohl wurde geviertelt und vom Spross befreit, das übrige Pflanzenmaterial wurde in ca. 2 cm breite Streifen geschnitten, mit Natriumchlorid (1,5 % im Pflanzenmaterial) vermischt und dann mit den Händen leicht ausgepresst, so dass Flüssigkeit aus dem Kohl austrat. Der Kohl und die ausgetretene Flüssigkeit wurden in ein 1 L-Einweckglas gegeben, unter die ausgetretene Flüssigkeit gedrückt und mit einem Tongewicht beschwert, so dass die aus dem Kohl austretende Flüssigkeit die Oberfläche des Pflanzenmaterials dauerhaft bedeckte. Das Glas wurde mit einem Bügelverschluss verschlossen und dunkel bei 20 °C gelagert.

Die zur Fermentation eingesetzten Mengen an Rohmaterial sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Eingesetzte Mengen an Rohmaterial der Vertreter der *Brassicaceae* zur Fermentation.

<i>Brassicaceae</i>	Menge im Fermentationsansatz [g]
Brokkoli	175
Rotkohl	660
Spitzkohl	588
Chinakohl	914

7 Ergebnisse und Diskussion

Die Ansätze der Fermentation sind in Abbildung 19 dargestellt und wurden für 27 Tage wie oben beschrieben gelagert.



Abbildung 19: Fermentationsansätze. A: Brokkoli, B: Rotkohl, C: Spitzkohl, D: Chinakohl.

Die Fermente und die Fermentationsflüssigkeit wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Fermentation entnommen und analysiert (siehe hierzu Kapitel 6.1.1 Probenaufarbeitung des Pflanzenmaterials, S.20f).

Um die Aktivität der Milchsäurefermentation abschätzen zu können und zur Bestimmung der Reaktionsbedingungen sind zu jedem Tag der Probennahmen und an Tag 27 die pH-Werte der Fermentationsflüssigkeiten der Kohlansätze bestimmt worden. Tabelle 30 listet die jeweiligen Werte auf.

Tabelle 30: Veränderung der pH-Werte im Verlauf der Fermentation.

Zeitpunkt der Probenahme	pH-Werte			
	Brokkoli	Rotkohl	Spitzkohl	Chinakohl
T1_1	6,90	6,81	6,85	6,82
T3	5,77	5,08	5,23	4,73
T6	5,20	3,47	3,43	3,23
T13	5,01	3,28	3,34	3,19
T20	3,93	3,76	3,76	3,21
T27	3,81	3,72	3,77	3,22

Bereits kurz nach Beginn der Fermentationen wurden visuell erste Veränderungen in den Ansätzen deutlich, die auf eine erfolgreiche Initiierung des Fermentationsprozesses schließen ließen. Ab dem dritten Tag der Fermentation ist beim Öffnen der Gläser zur Probenahme durch aufsteigende Gasbläschen an der Oberfläche des Pflanzenmaterials der Austritt von Gasen beobachtet worden. Das Pflanzenmaterial von Rotkohl, Spitzkohl und Chinakohl wurde durch die Gasbildung leicht nach oben gedrückt. Ab Tag 20 verringerten sich die pH-Werte der Fermentationsflüssigkeiten nicht mehr markant. Zudem konnte keine weitere Gasbildung beobachtet werden. Das ließ darauf schließen, dass der Fermentationsprozess beendet bzw. nur noch eine sehr geringe Aktivität aufwies. Beim Vergleich der pH-Wert-Verläufe der verschiedenen Ansätze konnte Aktivität der Milchsäurebakterien abgeschätzt werden. Die geringste Aktivität zeigte sich im Brokkoli-Ansatz (pH = 5,01, Tag 13), die stärkste Aktivität im Chinakohl-Ansatz (pH = 3,19, Tag 13). Der Fermentationsverlauf von Rotkohl und Spitzkohl war sich mit pH-Werten von 3,28 und 3,34 an Tag 13 sehr ähnlich. Die stark unterschiedlichen Prozessverläufe von Brokkoli und Chinakohl könnten auf die grundlegend sehr unterschiedliche Beschaffenheit des Pflanzenmaterials der beiden Gemüse zurückzuführen sein.

Die in den rohen Gemüsen enthaltenen GSL sind limitierend für die möglichen, sich bildenden Abbauprodukte während der Fermentation. Die Abbauraten dieser im Verlauf des Prozesses sind ebenfalls interessant, da sie Rückschlüsse auf die sich im Fermentationsprozess neu bildenden Abbauprodukte ermöglichen. Bereits die sehr unterschiedlichen pH-Wert-Verläufe der beiden *Brassica*-Gewächse Brokkoli und Chinakohl deuten auf einen unterschiedlichen Verlauf des Abbauprozesses dieser hin.

7.2.2 Identifizierung und Quantifizierung von Glucosinolaten

Die Identifizierung und Quantifizierung der GSL in den prozessierten Gemüsen und deren Fermentationsflüssigkeiten erfolgte anhand von Referenzsubstanzen und ESI-LC-MS/MS-Analyse.

Das Chromatogramm eines Multistandards der neun betrachteten GSL (siehe Abschnitt 6.4, Tabelle 9) mit einer Konzentration von 100 µmol/L ist in Abbildung 20 dargestellt.

Die einzelnen Verbindungen des Multistandards wurden nach der in Abschnitt 6.4 erläuterten Methode analysiert und lagen basisliniengetrennt vor. Anhand des Vergleichs der Retentionszeiten und der jeweils spezifischen Fragmentationen (siehe Abschnitt 6.4, Tabelle 11) konnten die GSL in den Fermentationsproben eindeutig identifiziert werden.

Durch eine externe Kalibrierung wurden die GSL in den Fermentationsproben quantifiziert. Da keine geeignete Matrix zur Verfügung stand, konnte die Kalibrierung nicht matrixunterstützt durchgeführt werden. Mögliche Matrixeffekte wurden jedoch als gering eingeschätzt. Grund hierfür ist, dass in Vorbereitung der Proben zur Analyse eine Matrixabtrennung durch Bindung der GSL an einem

7 Ergebnisse und Diskussion

Ionentauscher erfolgte. Zudem weist das MRM eine sehr hohe Selektivität auf. Zur Verbesserung der Genauigkeit der Quantifizierung in den Proben wurden zwei Kalibrierreihen erstellt. Bei Analyten, deren Flächenintegrale über dem des 6. Kalibrierniveaus lagen, ist zur Berechnung des Gehaltes die Regressionsgerade 1 des Konzentrationsbereichs von minimal 0,0036 bis maximal 134,24 mg/L verwendet worden. Bei Flächenintegralen darunter wurde die Regressionsgerade 2 mit einem Konzentrationsbereich von minimal 0,0036 bis maximal 2,11 mg/L herangezogen. Die Regressionsgeraden sind in Tabelle 31 aufgeführt. Durch Umstellen der Geradengleichung konnten die Konzentrationen der Analyten in den Extrakten der Fermentationsproben der Gemüse berechnet werden. Die in 100 g gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial (TM = trockenes Material) enthaltenen Konzentrationen der Analyten wurden nach folgender Gleichung berechnet.

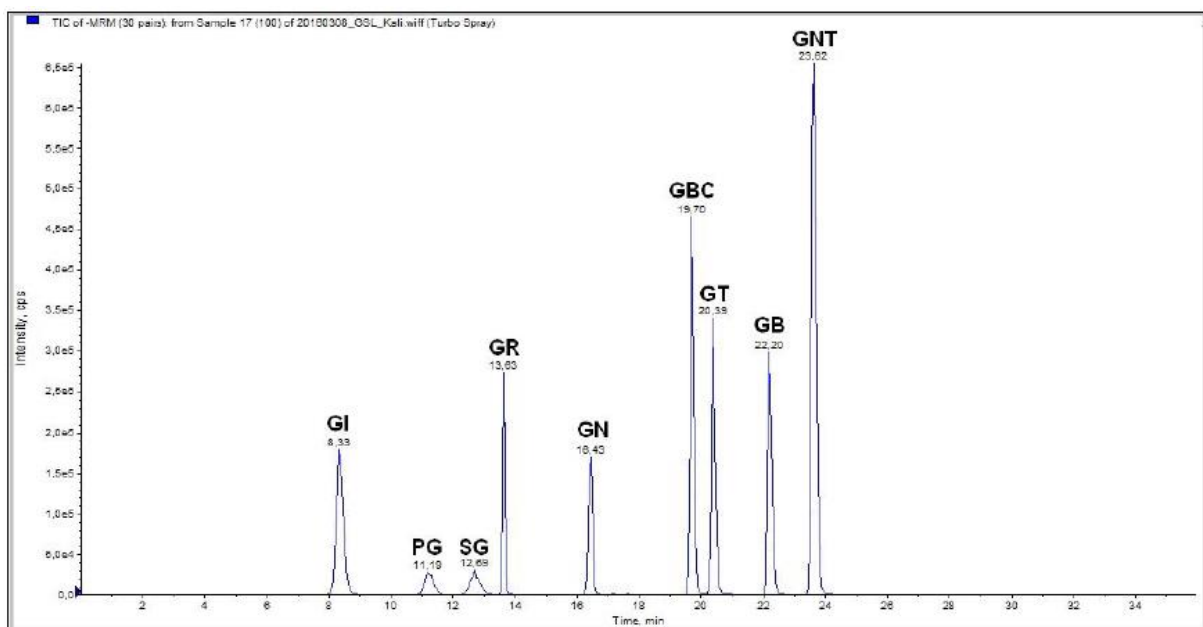


Abbildung 20: Chromatogramm des Multistandards der neun ausgewählten GSL, Konzentration 100 µmol/L.

$$c = \frac{x \cdot v_a}{E} \cdot 100$$

Gleichung 33

Variable	Bedeutung
c	Gehalt an Analyt in gefriergetrocknetem Material [mg/100 g TM]
V _a	Volumen in der Probenaufarbeitung [L]
x	Konzentration des Analyten im Probenextrakt [mg/L]
E	Einwaage der Probe IST [g]

Die Umrechnung der auf das gefriergetrocknete Material bezogenen Gehalte der Analyten auf das frische Pflanzenmaterial (FM = frisches Material) erfolgte über das TM/FM-Verhältnis. Vor und nach

7 Ergebnisse und Diskussion

der Gefriertrocknung wurde von den Proben das Gewicht bestimmt. Das daraus resultierende Verhältnis ist auf die errechneten Gehalte der GSL (bezogen auf TM) gerechnet worden, um den Gehalt an Analyten bezogen auf das frische Material zu erhalten. Eine Übersicht über die Einwaagen ist in Anhang A3 (A3-3) verzeichnet. Ebenfalls im Anhang A3 (A3-3) sind die Messwerte der Kalibrierungen 1 und 2 der jeweiligen GSL sowie die Messwerte der Proben aufgeführt.

Tabelle 31: Regressionsgeraden der Kalibrierung der GSL mittels ESI-LC-MS/MS.

GSL	Regressionsgerade 1 (Bestimmtheitsmaß)	Regressionsgerade 2 (Bestimmtheitsmaß)
Glucosamin (GI)	$y = 101957x + 3759,7$ (0,9970)	$y = 12174,7x - 371,46$ (0,9956)
Progoitrin (PG)	$y = 8236,13x + 3631,9$ (0,9927)	$y = 10577,7x - 305,37$ (0,9973)
Sinigrin (SG)	$y = 5977,14x + 3080,8$ (0,9954)	$y = 7265,00x + 151,47$ (0,9988)
Glucoraphanin (GR)	$y = 14498,8x + 597,4$ (0,9913)	$y = 16027,8x + 131,39$ (0,9996)
Gluconapin (GN)	$y = 19988,9x + 11312$ (0,9860)	$y = 28882,7x - 1910,8$ (0,9814)
Glucobrassicinapin	$y = 38413,6x + 23709$ (0,9946)	$y = 51179,5x + 422,52$ (0,9998)
Glucobrassicin (GB)	$y = 24497,7x + 22635$ (0,9941)	$y = 33439,6x - 21,505$ (1,0000)
Gluconasturtiin (GNT)	$y = 34027,5x + 25002$ (0,9911)	$y = 48915,9x - 1164,2$ (0,9971)

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyten wurden mittels der Blindwert-Methode bestimmt. Hierbei werden unabhängig hergestellte Blindproben sowie eine Kalibrierreihe gemessen und die Nachweisgrenze daraus mit folgender Gleichung berechnet [79].

$$x_N = \frac{s_r \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n}}}{b}$$

Gleichung 34

Variable	Bedeutung
x_N	Nachweisgrenze [mg/L]
x_{BG}	Bestimmungsgrenze [mg/L]
N	Anzahl der Parallelbestimmungen (1)
n	Anzahl der unabhängig hergestellten Blindproben (10)
s_r	Standardabweichung der Leerwerte [CUA]
t	Wert aus einseitiger t-Tabelle ($f=n-1$; $\alpha=1\%$; hier 2,821)
b	Steigung der linearen Regression der NWG Kalibrierung [CUA · L/mg]

Der noch messbare Konzentrationsunterschied wird durch die Empfindlichkeit der Kalibrierung, also die Steigung der Regressionsgeraden angezeigt. Je steiler diese ist, desto empfindlicher ist die Methode. Die Bestimmungsgrenze kann analog zur bereits beschriebenen Kalibrier-Methode (siehe Abschnitt 7.1.6) als das Dreifache der Nachweisgrenze berechnet werden (siehe Abschnitt 7.1.6, Gleichung 32).

Die für die ausgewählten GSL errechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 32 aufgeführt.

7 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 32: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Glucosinolate.

Analyt	Nachweisgrenze [mg/L]	Bestimmungsgrenze [mg/L]
GI	0,0095	0,029
PG	0,0028	0,0084
SG	0,0032	0,0095
GR	0,0018	0,0055
GN	0,0058	0,018
GBC	0,0021	0,0062
GB	0,0012	0,0037
GNT	0,0012	0,0036

Die höchste Nachweisgrenze der analysierten GSL wies Glucoiberin mit 0,0095 mg/L, die niedrigsten mit 0,0012 mg/L wiesen Glucobrassicin und Gluconasturtiin auf. Die Nachweisgrenzen richten sich bei der Blindwert-Methode nach dem für den jeweiligen Analyten bestimmten Grundrauschen. Je höher das Grundrauschen ist, desto höher ist die für diesen Analyten bestimmte Nachweisgrenze. Ebenfalls einen Einfluss auf die Nachweisgrenze haben die unterschiedlichen Ionisierbarkeiten der Analyten. Je besser ein Analyt ionisierbar ist, desto niedriger ist dessen Nachweisgrenze.

Die in den verschiedenen Proben identifizierten und quantifizierten GSL sowie der Gesamtgehalt an GSL jeder Pflanzenmatrix zum Zeitpunkt T1_0 sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 33: Zusammenfassung der Gehalte der in den vier Gemüsen quantifizierten GSL-Gehalte sowie deren jeweiliger Gesamt-GSL-Gehalt in $\mu\text{mol}/100\text{ g FM}$ vor der Fermentation.

Analyt	Brokkoli	Rotkohl	Spitzkohl	Chinakohl
GI	1,03 \pm 0,15	1,37 \pm 0,25	1,57 \pm 0,09	0 \pm 0
PG	0,02 \pm 0	1,59 \pm 0,17	0,18 \pm 0,02	1,49 \pm 0,15
SG	unter x_{BG}	2,53 \pm 0,12	2,16 \pm 0,15	unter x_N
GR	13,86 \pm 1,79	2,18 \pm 0,22	0,1 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01
GN	0,03 \pm 0	0,36 \pm 0,02	0,03 \pm 0	0,05 \pm 0
GBC	unter x_N	unter x_N	unter x_N	0,75 \pm 0,04
GB	2,94 \pm 0,2	1,29 \pm 0,09	0,38 \pm 0,09	0,19 \pm 0,02
GNT	unter x_N	0,05 \pm 0,01	unter x_N	0,39 \pm 0,04
Gesamtgehalt an GSL*	17,88 \pm 1,81	9,37 \pm 0,4	4,42 \pm 0,2	2,89 \pm 0,16

x_N – Nachweisgrenze, x_{BG} – Bestimmungsgrenze; * als Summe aller ermittelten Gehalte der ausgewählten, zu analysierenden GSL im Pflanzenmaterial

Für alle vier Fermentationsansätze konnte in den Pflanzenproben wie in der Literatur beschrieben ein stetiger Abbau der jeweils identifizierten Glucosinolate beobachtet werden [92]. Ab dem Probenahmezeitpunkt T13 wurden in allen vier Kohlfermenten nur noch geringe Mengen beziehungsweise in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze analysiert.

Parallel zum GSL-Gehalt wurden in den vier Fermentationsansätzen die Abbauprodukte der acht ausgewählten GSL analysiert.

7.2.3 Identifizierung und Quantifizierung von Glucosinolat-Abbauprodukten

Die Identifizierung der GSL-Abbauprodukte erfolgte anhand der spezifischen Fragmentmuster unter Zuhilfenahme kommerziell erworbener Referenzsubstanzen. Diese wurden wie in Abschnitt 6.3 beschrieben mittels GC-MS analysiert. Zur eigenen Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist Benzyl-ITC als ISTD den Proben zu Beginn der Aufarbeitung zugegeben worden. Vor der Verwendung des ISTD wurden je eine Probe des zu analysierenden Pflanzenmaterials mit Benzyl-ITC versetzt und gegen eine undotierte Probe gemessen. Dies diente der Bestätigung das kein Benzyl-ITC in den zu analysierenden Proben enthalten war. Da in den Proben kein dem Benzyl-ITC zuzuordnendes Signal gefunden wurde, konnte dieses als ISTD zur Kontrolle der Aufarbeitung hinzugefügt werden.

Das aus dem Abbau von Glucobrassicin resultierende 3-Hydroxymethylindol konnte mittels GC-MS nicht analysiert werden. Ein Vergleich des Massenspektrums des mittels GC-MS analysierten Standards mit Massenspektren aus der Literatur zeigte eine Dimerisierung zu 3,3'-Diindolylmethan auf. Diese wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die thermische Belastung während der GC-Analyse hervorgerufen [93].

Die Quantifizierung der GSL-Abbauprodukte erfolgte durch eine externe matrixfreie Kalibrierung. Es wurden Stammlösungen der erworbenen Standards in DCM hergestellt (siehe Abschnitt 6.3) und diese vor der Analyse mittels GC-MS zu den entsprechenden Kalibrierreihen verdünnt. Je nach den in den Proben enthaltenen Konzentrationen der Analyten sind Kalibrierniveaus im Bereich von 0,1 mg/L bis 100 mg/L hergestellt worden. Für Sulforaphan wurde der Kalibrierbereich 50 – 2100 mg/L gewählt. Aus den erhaltenen Daten wurden Regressionsgeraden erstellt (siehe Tabelle 34).

Tabelle 34: Regressionsgeraden der Kalibrierung der GSL-Abbauprodukte mittels GC-MS.

GSL	Regressionsgerade	Bestimmtheitsmaß
Allyl-ITC	$y = 188626x - 568848$	0,9959
Allyl-CN	$y = 112773x + 239354$	0,9977
3-Hydroxymethylindol	$y = 225944x - 2426259$	0,9845
3-(Methylsulfinyl)propyl-ITC (Iberin)	$y = 99728x - 1489262$	0,9851
4-(Methylsulfinyl)butyl-ITC (Sulforaphan)	$y = 151001x - 19496265$	0,9601
4-(Methylthio)butyl-ITC (Erucin)	$y = 303497x - 2815686$	0,9908
3-Butenyl-ITC	$y = 463714x - 5555672$	0,9860
Phenylethyl-ITC	$y = 603188x - 3002973$	0,9901
3-Phenylpropionitril	$y = 365513x + 195020$	0,9940
5-Hexennitril	$y = 105653x + 148746$	0,9960
4-Pentennitril	$y = 100907x + 290392$	0,9952

7 Ergebnisse und Diskussion

Durch Umstellen der Geradengleichung konnten die Konzentrationen der Analyten in den Extrakten der Fermentationsproben der Gemüse berechnet werden. Die in 100 g gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial (TM = trockenes Material) enthaltenen Konzentrationen der Analyten wurden nach folgender Gleichung berechnet.

$$G = \frac{x \cdot v_a}{E} \cdot 100 \cdot F$$

Gleichung 35

Variable	Bedeutung
G	Gehalt an Analyt in der Probe [mg/100 g FM]
x	Konzentration an Analyt im Probenextrakt [mg/L]
E	Probeneinwaage (FM) [g]
v _a	Aufgefülltes Volumen in der Probenaufarbeitung [L]
F	Faktor der Verdünnung des Probenmaterials. Resultierend aus dem entnommenen, nicht homogenisierten Pflanzenmaterial und der Wasserzugabe bei der Aufarbeitung

Die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die noch nicht in Abschnitt 7.1.6 validierten GSL-Abbauprodukte sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 35: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der noch nicht in Abschnitt 7.1.6 aufgeführten GSL-Abbauprodukte.

Analyt	Nachweisgrenze [mg/L]	Bestimmungsgrenze [mg/L]
3-Butennitril	0,55	1,65
3-Hydroxymethylindol	6,09	18,27
3-(Methylsulfinyl)propyl-ITC (Iberin)	24,50	73,49
4-(Methylsulfinyl)butyl-ITC (Sulforaphan)	28,37	85,10
4-(Methylthio)butyl-ITC (Erucin)	7,58	22,74
3-Butenyl-ITC	12,45	37,35
3-Phenylpropionitril	0,039	0,12
5-Hexennitril	2,66	7,99
4-Pentennitril	1,95	5,84

Sulforaphan wies die höchste Nachweisgrenze (28,37 mg/L) und 3-Phenylpropionitril die niedrigste Nachweisgrenze (0,039 mg/L) auf. Die starken Schwankungen können auf die unterschiedlich starke Fokussierung der Analyten im chromatographischen System zurückzuführen sein. Ein weiterer Einflussfaktor in der Bestimmung der Nachweisgrenze ist die Ionisierbarkeit des Analyten. Je besser diese ist, desto geringer ist die Nachweisgrenze. Das 3-Phenylpropionitril kann daher aufgrund dessen Wechselwirkung mit der stationären Phase im gewählten Temperaturprogramm oder einer leichteren Ionisierbarkeit besser fokussiert worden sein als das Sulforaphan. Für eine schlechtere Fokussierung des Sulforaphans im Vergleich mit den anderen Analyten sprechen auch die deutlich breiteren Peaks in den Chromatogrammen.

7 Ergebnisse und Diskussion

Durch die mechanische Einwirkung auf die *Brassica*-Gewächse bei der Herstellung der Fermentationsansätze, des dabei einhergehenden enzymatischen Abbaus der GSL und durch das Absinken der pH-Werte während der Fermentation wurden in Übereinstimmung mit der Literatur sowohl ITC als auch sich bildende Nitrile detektiert [94]. Unter sauren Bedingungen, wie sie im Prozess einer Milchsäurefermentation mitunter vorliegen, wurden Nitrile in der Literatur als bevorzugte Abbauprodukte genannt [11]. Die Bildung von Thiocyanaten, Epithionitrilen und Oxazolidinen ist ebenso möglich. Die Bestimmung der aus den GSL resultierenden Abbauprodukte in den Fermentationsansätzen erfolgte aus dem verarbeiteten Zustand zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb von 20 Tagen während der Fermentation. Zu den Probenahmen sind Proben der Fermentationsflüssigkeit und des Pflanzenmaterials entnommen worden. Die Proben des Pflanzenmaterials wurden zur Hydrolyse der GSL durch die pflanzeigenen Myrosinase homogenisiert, nach der in Abschnitt 6.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet und anschließend mittels GC-MS analysiert.

Die GSL-Abbauprodukte, die im Verlauf der Fermentation der verschiedenen Gemüse identifiziert und quantifiziert wurden sind in Tabelle 36 mit ihren Retentionszeiten und Match-Faktoren aufgelistet. Der Match-Faktor gibt die Übereinstimmung der m/z-Werte und relativen Intensitäten der Signale einer Probe mit den Massenspektren des Standards der Datenbank an und wird in 0-100 % ausgedrückt.

Tabelle 36: Identifizierte GSL-Abbauprodukte mit Match-Faktoren und Retentionszeiten.

Abbauprodukt	Retentionszeit [min]	Match-Faktor [%]	Probenbezeichnung*
Brokkoli			
3-Butenyl-ITC	9,64	99,74	T1_1; 3
Erucin	22,78	85,25	T1_1; 3
Iberin	25,76	72,22	T1_2; 3
Sulforaphan	27,80	71,53	T1_2; 3
3-Hydroxymethylindol	38,29	98,06	T20; 1
Rotkohl			
Allyl-ITC	7,59	96,47	T3; 1
3-Butenyl-ITC	9,63	99,21	T3; 1
Erucin	22,75	85,01	T6; 3
Iberin	25,75	71,06	T3; 1
Sulforaphan	27,73	71,55	T3; 1
Chinakohl			
4-Pentenyl-ITC	12,30	68,50	T1_1; 1
3-Phenylpropionitril	17,79	98,89	T1_1; 1
2-Phenylethyl-ITC	23,40	48,48	T1_1; 1
3-Hydroxymethylindol	28,32	49,64	T1_1; 1

* Bezeichnung der Probe aus der die angegebenen Werte der identifizierten Abbauprodukte bestimmt wurden (Zeitpunkt der Probenahme; Nr. der Parallelbestimmung)

7 Ergebnisse und Diskussion

Bei Match-Faktoren unter 70 % sind die Signale der Massenspektren genauer betrachtet worden.

Im Chinakohl wurde 2-Phenylethyl-ITC mit einem Match-Faktor von 48,48 % identifiziert. Dieses ITC wird aus dem Abbau des Gluconasturtiins gebildet. Bei der Analyse der GSL im Chinakohl wurde diese Verbindung identifiziert, ein Vorkommen des 2-Phenylethyl-ITC in den Proben des Chinakohls wurde daher als sehr wahrscheinlich eingeschätzt. Das Signal der Probe mit einer Retentionszeit von 23,40 min ist mit dem der Standardsubstanz (23,42 min) und einem Matrixpeak mit ähnlicher Retentionszeit verglichen worden. Diese ist in Abbildung 21 dargestellt.

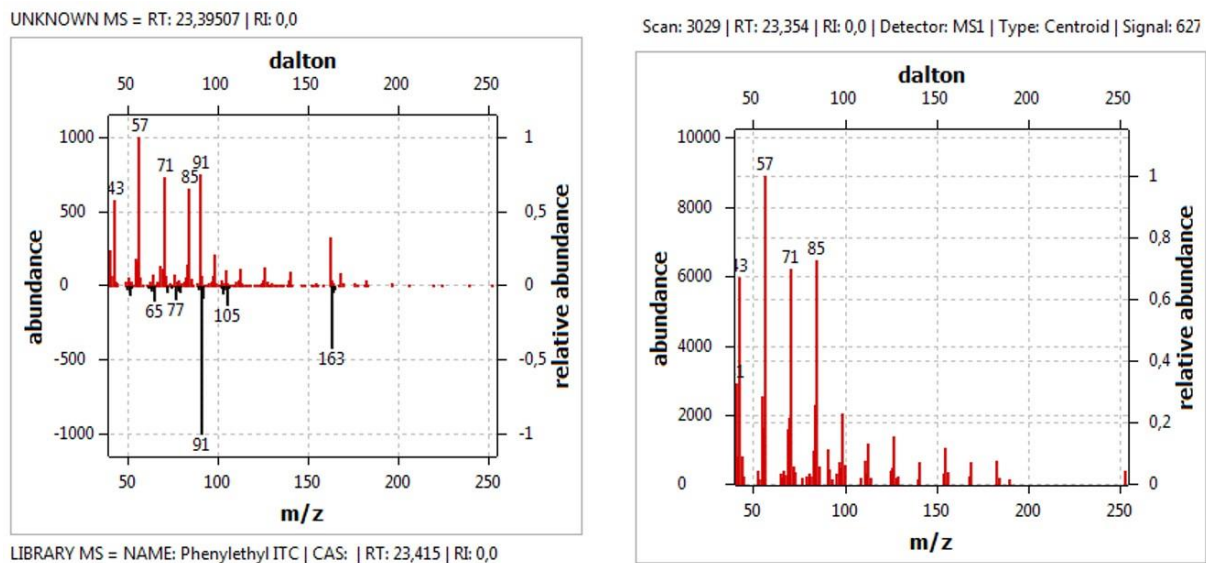


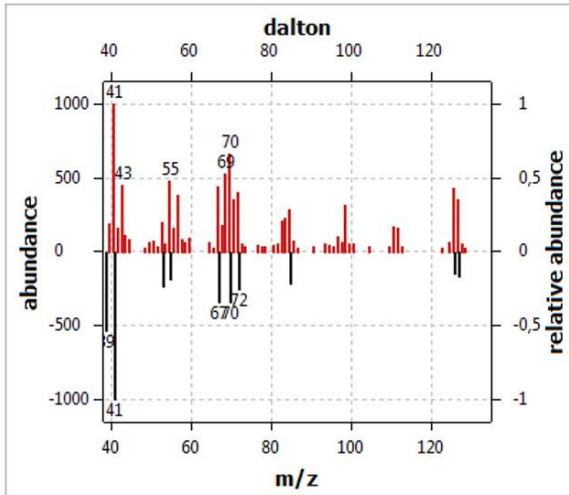
Abbildung 21: Vergleich des Massenspektrums des Signals der Probe (links) mit dem eines Matrixpeaks (rechts). Die gespiegelten in Schwarz dargestellten m/z-Werte entstammen dem analysierten Standard des 2-Phenylethyl-ITC.

Das Molekülion mit dem m/z-Wert 163 und die für 2-Phenylethyl-ITC charakteristischen Fragmente von m/z 105, 91, 77 und 65 in der Probe stimmen mit denen des Standards überein. Weitere m/z-Werte wie 85, 71, 57 oder 43 wurden der Matrix zugewiesen. Da das entsprechende Signal sowohl in Retentionszeit als auch anhand der charakteristischen Fragmentierung eindeutig mit der analysierten Standardsubstanz übereinstimmt, konnte die Identifizierung des 2-Phenylethyl-ITC im Chinakohl bestätigt werden.

Zur eindeutigen Identifizierung von 4-Pentenyl-ITC (Match-Faktor: 68,50 %) wurde das gleiche Verfahren angewandt. Das Massenspektrum des Signals der Probe (12,30 min) wurde mit einem Matrixpeak ähnlicher Retentionszeit und dem in der NORMAN Mass Bank enthaltenen Spektrum der Standardsubstanz 4-Pentenyl-ITC [95] verglichen (siehe Abbildung 22). Es wurden alle charakteristischen Fragmente des Literatur-Massenspektrums im Spektrum des Probensignals in ähnlichen Verteilungen wiedergefunden.

7 Ergebnisse und Diskussion

UNKNOWN MS = RT: 12,29703 | RI: 0,0



LIBRARY MS = NAME: 4-Pentenyl-ITC | CAS: | RT: 12,3 | RI: 0,0

Scan: 1412 | RT: 12,214 | RI: 0,0 | Detector: MS1 | Type: Centroid | Signal: 896

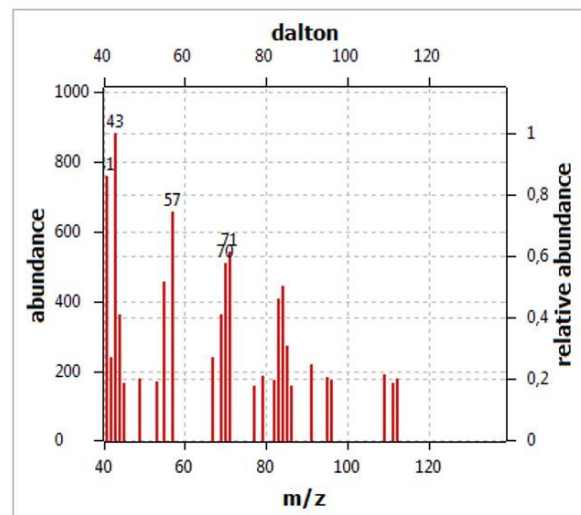
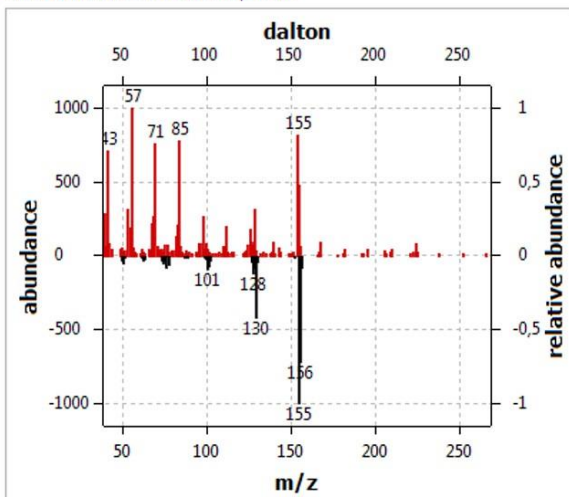


Abbildung 22: Vergleich des Massenspektrums des Signals der Probe (links) mit dem eines Matrixpeaks (rechts). Die gespiegelten in Schwarz dargestellten m/z -Werte entstammen dem Standard des 4-Pentenyl-ITC.

Als drittes Signal mit einem Match-Faktor von unter 70 % wurde im Chinakohlferment 3-Hydroxymethylindol (Match-Faktor: 49,64 %) identifiziert. Das Massenspektrum des Signals der Probe mit einer Retentionszeit von 28,32 min ist mit dem der Standardsubstanz (28,31 min) und dem eines Matrixpeaks ähnlicher Retentionszeit verglichen worden (siehe Abbildung 23).

UNKNOWN MS = RT: 28,32063 | RI: 0,0



LIBRARY MS = NAME: IBACN | CAS: | RT: 28,307 | RI: 0,0

Scan: 3745 | RT: 28,286 | RI: 0,0 | Detector: MS1 | Type: Centroid | Signal: 825

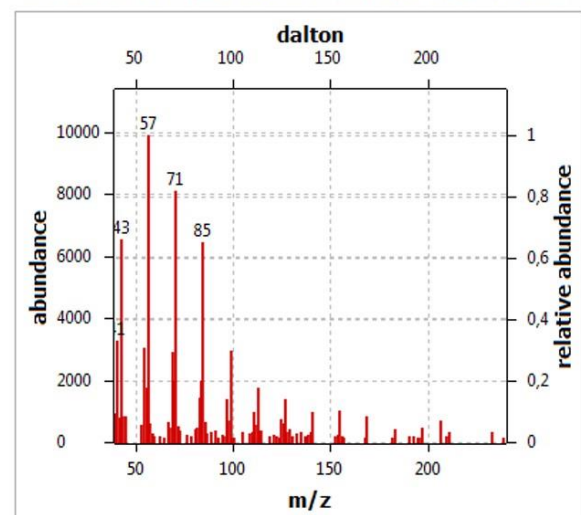


Abbildung 23: Vergleich des Massenspektrums des Signals der Probe (links) mit dem eines Matrixpeaks (rechts). Die gespiegelten in Schwarz dargestellten m/z -Werte entstammen dem Standard des 3-Hydroxymethylindol.

Zu erkennen ist eine Übereinstimmung des Molekülions ($m/z = 156$) und der Fragmente von $m/z 130$ und 101 in ähnlichen Verteilungen der relativen Häufigkeiten der Ionen. Die weiteren m/z -Werte des

Signals der Probe (unter anderem 85, 71, 57, 43) sind der Matrix zugewiesen worden. Da das entsprechende Signal sowohl in Retentionszeit als auch anhand der charakteristischen Fragmentierung eindeutig mit der analysierten Standardsubstanz übereinstimmt, wurde auch hier die Identifizierung des 3-Hydroxymethylindols bestätigt.

Im Folgenden werden die in den vier *Brassica*-Gewächsen identifizierten und im Verlauf der Fermentation quantifizierten GSL und deren Abbauprodukte diskutiert. Ausgangspunkt der Untersuchung des Fermentationsprozesses bildete die Analyse von frischem Pflanzenmaterial. Im Folgenden wird auf die GSL und Abbauprodukte eingegangen, die einen größeren Anteil am Gesamtgehalt an GSL im jeweiligen Gemüse haben. Prozentuale Veränderungen der Gehalte zwischen den Zeitpunkten der Probenahme beziehen sich, wenn nicht anders genannt, auf den Wert zum Zeitpunkt T1_0 (frisches, unfermentiertes Pflanzenmaterial). Die analysierten GSL und ihre entsprechenden Abbauprodukte sind in den Graphiken in ähnlichen Farben dargestellt um eine bessere Übersicht über die verschiedenen Analyten und ihre Herkunft zu haben.

7.2.4 Fermentation von Brokkoli

Glucosinolate

In den Brokkoliröschen wurde der höchste Gesamt-GSL-Gehalt aller vier untersuchten Gemüse mit 18,88 mg/100 g FM quantifiziert. Von den ausgewählten zu analysierenden GSL wurden die aliphatischen GSL Gluconapin, Glucoiberin, Glucoraphanin, Progoitrin und Sinigrin, das indolische GSL Glucobrassicin und das aromatische GSL Gluconasturtiin identifiziert. Der Gehalt des Sinigrin lag unter der Bestimmungsgrenze. Somit konnte kein valider Wert für dieses GSL bestimmt werden. Im Folgenden wird auf die GSL mit dem höchsten Gehalt (Glucoiberin, Glucoraphanin und Glucobrassicin) eingegangen. Abbildung 24 stellt die Konzentrationen dieser drei Verbindungen graphisch dar.

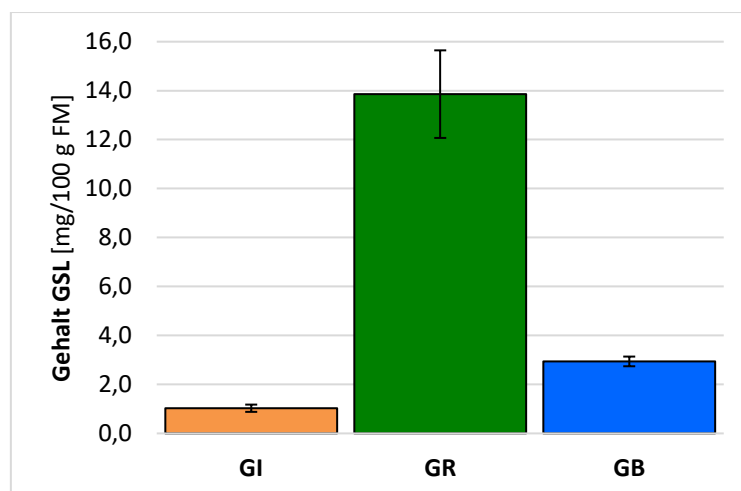


Abbildung 24: Gehalte an Glucoiberin, Glucoraphanin und Glucobrassicin [mg/100 g FM] in rohem Brokkoli.

7 Ergebnisse und Diskussion

Das aliphatische Methylsulfinyl-GSL Glucoraphanin ist das GSL mit dem höchsten analysierten Gehalt in rohem Brokkoli. In 100 g frischem Material wurden im Rahmen dieser Arbeit 13,86 mg quantifiziert. Dieser Gehalt ist vergleichbar mit den 2004 von Schonhof et al. veröffentlichten Glucoraphanin-Gehalten von 15,02 – 90,87 $\mu\text{mol}/100\text{ g FM}$ (entspricht 6,57 – 39,75 mg/100 g FM). Glucoiberin (analysiert: 1,03 mg/100 g FM) und Glucobrassicin (analysiert: 2,94 mg/100 g FM) wurden ebenfalls in verschiedenen Brokkoliarten zu 0,63 – 8,94 $\mu\text{mol}/100\text{ g FM}$ (Glucoiberin, entspricht 0,27 – 3,79 mg/100 g FM) und 12,71 – 270,1 g/100 g FM (Glucobrassicin, entspricht 5,69 – 120,86 mg/100 g FM) quantifiziert [90]. Im Verlauf der Fermentation verringerten sich die Konzentrationen an Glucoiberin, Glucobrassicin und Glucoraphanin bis zu Tag 13 (unterhalb der Nachweisgrenze) kontinuierlich. Die prozentualen Gehalte der GSL des Brokkoliferments (bezogen auf den Gehalt an T1_0) zu den verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation sind in Abbildung 25 veranschaulicht.

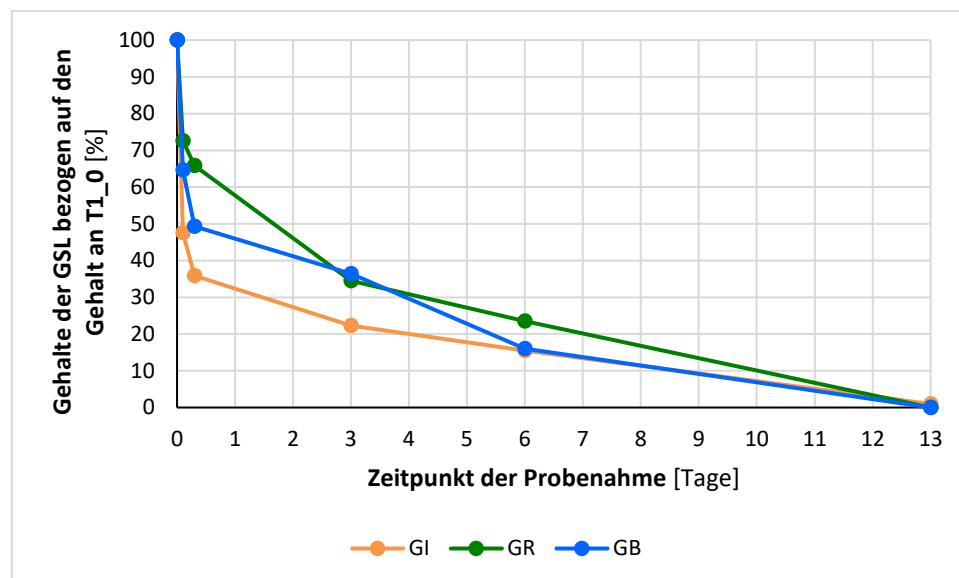


Abbildung 25: Prozentuale Gehalte der GSL Glucoiberin, Glucoraphanin und Glucobrassicin des Brokkoliferments von T1_0 bis T13, bezogen auf den GSL-Gehalt an T1_0.

Aus dieser Abbildung geht ein rapider Abfall der GSL-Gehalte während der Fermentation hervor. Dieses ist besonders deutlich nach der ersten Stunde des Experiments zu beobachten. Die Konzentration des Glucoraphanins sinkt um rund 27 % von 13,86 mg/100 g FM auf 10,06 mg/100 g FM. Die höchste Reduktion der Konzentration (51,96 %) wurde bei dem Methylsulfinyl-GSL Glucoiberin beobachtet. Die rasche Verminderung der Konzentrationen innerhalb der ersten Stunde der Fermentation sind auf die Verarbeitung des Pflanzenmaterials zum Fermentationsansatz zurückzuführen. Durch die Beschädigung der Zellstrukturen durch mechanische Einwirkung kann das pflanzeigene Enzym Myrosinase in Kontakt mit den GSL getreten sein. Dieses Enzym hydrolysiert die GSL wie in Abschnitt 4.2 zu einer Vielzahl von Abbauprodukten. Durch Zugabe von Natriumchlorid erhöht sich aufgrund des

dadurch entstehenden Konzentrationsgefälles der osmotische Druck und es tritt vermehrt Zellsaft aus dem Inneren an die Oberfläche. Dieses kann den Abbau der GSL begünstigt haben indem es durch das Austreten des Zellsaftes den Kontakt der Myrosinase mit ihrem Substrat erleichtert hat. Die Verringerung der Konzentrationen der GSL im Pflanzenmaterial kann ebenfalls durch den Austritt der Flüssigkeit aus dem Pflanzenmaterial erklärt werden, da auch GSL in die Fermentationsflüssigkeit ausgetreten sein können und sich dadurch die Konzentration im Pflanzenmaterial selbst verringert hat. Dieses wurde 2005 bereits durch Vicas et al. Beobachtet [96]. Die Reduzierung des Glucoraphanin-Gehaltes innerhalb von 4 Stunden vom Zeitpunkt T1_1 zu T1_2 um 6,72 % auf 9,13 mg/100 g FM kann ebenfalls durch den erläuterten enzymatischen Abbau der GSL und dem Austritt der GSL aus dem Pflanzenmaterial begründet werden. Im weiteren Verlauf der Fermentation nahmen die Konzentrationen stetig weiter ab, jedoch in kleineren Mengen bezogen auf das gleiche Zeitintervall. Innerhalb von 3 Tagen (von T1_2 auf T3) sank der Gehalt an Glucoraphanin um 31,44 %. Im gleichen Zeitintervall von T3 auf T6 sank der Gehalt nur um 10,92 %. Ein Grund für die stärker auftretenden Effekte zu Beginn der Fermentation könnte in der höheren Konzentration der durch das mechanische Einwirken herausgelösten GSL liegen. Ebenso ist der Konzentrationsunterschied zwischen der zugegebenen Salzlösung und dem Pflanzenmaterial zu Beginn am Größten und somit auch das Bestreben zum Konzentrationsausgleich zwischen der Flüssigkeit und dem Pflanzenmaterial. Dies führte zu einem vermehrten Flüssigkeitsaustritt. Ab Tag 13 der Fermentation lagen die GSL im Pflanzenmaterial nur noch in geringen Konzentrationen bzw. unterhalb der Nachweisgrenze vor. Martinez-Villaluenga et al. machten 2009 ähnliche Beobachtungen nach 7 Tagen der Milchsäurefermentation von [72]. Bezogen auf den Gesamt-GSL-Gehalt zu Beginn der Fermentation konnte am Probenahmezeitpunkt T6 noch ein Anteil von 22,27 % an GSL analysiert werden. Dabei wies Brokkoli nach 6 Tagen Fermentation den höchsten Gehalt an GSL im Vergleich mit den drei anderen analysierten Gemüsen Rotkohl (5,56 %), Spitzkohl (1,94 %) und Chinakohl (1,14 %) auf. Bei der Herstellung des Fermentationsansatzes wurden nur die Brokkoliröschen abgetrennt und nicht, wie bei den anderen Ansätzen, das Pflanzenmaterial klein geschnitten. Daher wurden geringere Einflüsse des enzymatischen Abbaus erwartet als bei den anderen Gemüsen.

Glucosinolat-Abbauprodukte

Im Verlauf der Fermentation konnten die Abbauprodukte Sulforaphan (aus dem Abbau von Glucoraphanin), Iberin (aus Glucoiberin), 3-Butenyl-ITC (aus Gluconapin) und Indol-3-acetonitril (ebenfalls aus dem Abbau von Glucoraphanin) identifiziert und quantifiziert werden. Ebenfalls nachgewiesen wurde das ITC Erucin. Dieses resultiert aus dem Abbau des GSL Glucoerucin, welches nicht Bestandteil dieser Untersuchung war. Tabelle 37 fasst die während der Fermentation quantifizierten GSL-Abbauprodukte zusammen. In der graphischen Darstellung des

7 Ergebnisse und Diskussion

Fermentationsverlaufs (siehe Abbildung 26) wurde das Sulforaphan zur besseren Anschaulichkeit ausgeschlossen.

Tabelle 37: Gehalte an GSL-Abbauprodukt im Pflanzenmaterial des Brokkoliferments zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenahmen in mg/100 g FM.

GSL-Abbauprodukt	Zeitpunkt der Probenahme					
	T1_1	T1_2	T3	T6	T13	T20
Erucin	0,90 ± 0,10	0,85 ± 0,07	1,19 ± 0,21	0,89 ± 0,02	u. X _{BG}	0,63 ± 0,03
Iberin	3,80 ± 0,67	4,67 ± 0,57	6,11 ± 0,48	2,15 ± 0,18	u. X _{BG}	u. X _{BG}
Sulforaphan	43,48 ± 10,62	65,5 ± 7,35	81,27 ± 5,05	21,77 ± 0,93	8,60 ± 0,44	8,33 ± 0,50
Indol-3-acetonitril	1,33 ± 0,38	1,24 ± 0,13	2,42 ± 0,14	2,02 ± 0,22	2,26 ± 0,09	3,75 ± 0,60
3-Butenyl-ITC	2,17 ± 0,17	2,11 ± 0,17	2,22 ± 0,15	1,21 ± 0,04	u. X _{BG}	u. X _{BG}

u. X_{BG} – unterhalb der Bestimmungsgrenze des Analyten

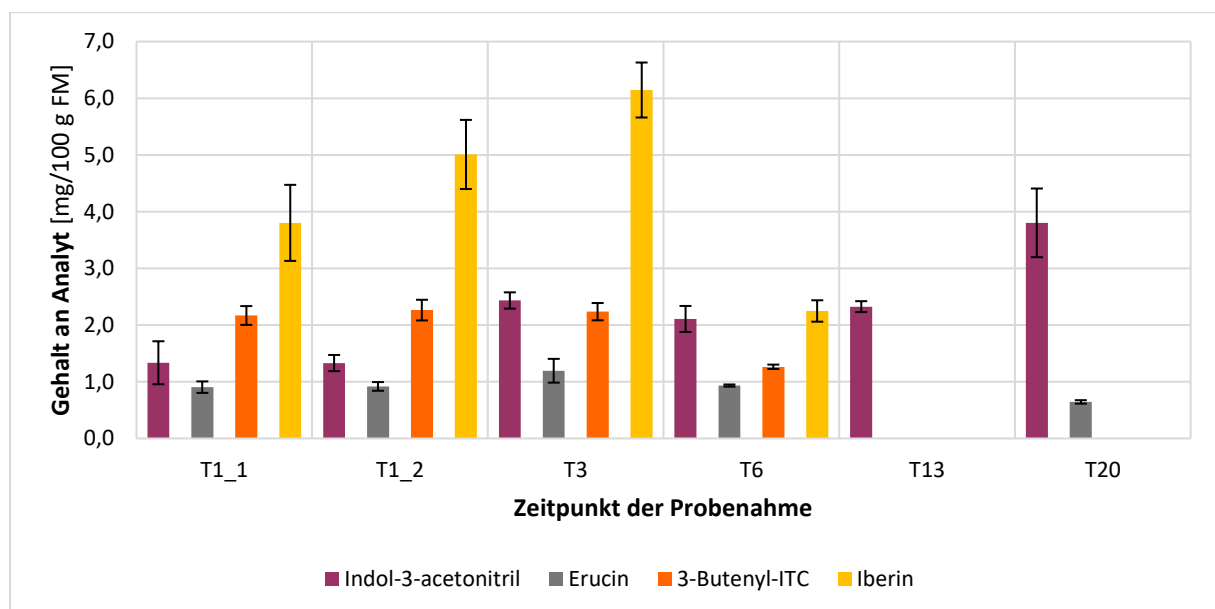


Abbildung 26: Gehalte der Abbauprodukte Indol-3-acetonitril, Erucin, 3-Butenyl-ITC und Iberin [mg/100 g FM] im Brokkoliferment zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten während der Fermentation.

Bei allen Fermentationsansätzen waren hohe Gehalte der Abbauprodukte im Vergleich zu den analysierten Gehalten ihrer jeweiligen GSL auffällig. Es wurde erwartet, dass der Gehalt des jeweiligen gefundenen GSL gleich oder höher der Konzentration der daraus resultierenden Abbauprodukte zu jedem Zeitpunkt der Probenahme ist. Beispielsweise ist Glucoiberin in rohem Brokkoli mit einem Gehalt von $1,03 \pm 0,15$ mg/100 g FM quantifiziert worden. Eine Stunde nach Beginn der Fermentation wurde für das Abbauprodukt Iberin ein Wert von $3,80 \pm 0,67$ mg/100 g FM bestimmt. Ursächlich hierfür können Verluste an GSL bei der Aufarbeitung sein. Ebenfalls können eine nicht vollständige

7 Ergebnisse und Diskussion

Extraktion der GSL aus dem Pflanzenmaterial oder eine nicht vollständig gehemmte Aktivität der pflanzeigenen Myrosinase während der Aufarbeitung Einfluss auf diese Resultate haben.

Die höchste Konzentration der jeweiligen Analyten aus der GSL-Bestimmung bzw. der GSL-Abbauprodukte Bestimmung wiesen das Glucoraphanin und sein daraus gebildetes Abbauprodukt Sulforaphan ($81,27 \pm 5,05$ mg/100 g FM an T3) auf. Beginnend von dem Probenahmezeitpunkt T1_1 bis T3 stiegen die Gehalte der ITC im Pflanzenmaterial an. Erucin, Iberin und Sulforaphan erreichten dabei die höchsten Gehalte. Die Identifizierung und Quantifizierung des Erucins im Brokkoli weisen auf das Vorkommen seines parentalen GSL Glucoerucin hin. Dieses GSL wurde in der Vorbereitung des Experiments nicht berücksichtigt, da in der Literatur keine bis nur in Spuren vorkommende Glucoerucin-Gehalte in Brokkoli beschrieben worden sind [90]. Daher kann vermutet werden, dass das Erucin aus der Reduktion von Sulforaphan entstand. Dieses hatten bereits Harris und Jeffery 2008 in humanen Krebszellen beschrieben [6].

Zu Beginn des Experiments wurde die Hypothese formuliert, dass die Bildung der Abbauprodukte zeitlich leicht verzögert im Fermentationsprozess beginnt und mit Abnahme der GSL-Gehalte ansteigt. Diese Hypothese konnte durch die Ergebnisse im Verlauf der Fermentation bestätigt werden. Ab dem Probenahmezeitpunkt T3 wurde das pH-Optimum für die Bildung von ITC von pH 7-6 mit einem pH von 5,77 unterschritten (siehe Tabelle 30, Seite 61) [11]. Infolge dessen können ab T3 geringere Mengen an ITC gebildet worden sein. Dieses wurde ebenfalls in den Ergebnissen deutlich. Zum Zeitpunkt T20 lagen die Gehalte an 3-Butenyl-ITC und Iberin unter den jeweiligen Nachweisgrenzen. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch für Erucin und Sulforaphan die geringsten Gehalte im Verlauf der Fermentation bestimmt.

Da während der Fermentation aufsteigende Gase nicht gesammelt und beprobt worden sind, kann es aufgrund der Flüchtigkeit der ITC zu einer Abnahme der Gehalte während der Fermentation gekommen sein.

Das aus Glucobrassicin entstehende Nitril Indol-3-acetonitril erreichte am Probenahmezeitpunkt T20 seinen höchsten Gehalt von $3,75 \pm 0,60$ mg/100 g FM. Im Vergleich dazu lag der Gehalt an T1 bei $1,33 \pm 0,38$ mg/100 g FM. Der im späteren Verlauf der Fermentation abgesunkene pH-Wert hin zum optimalen Bereich für die Nitrilbildung kann die Bildung des Indol-3-acetonitril zu diesem Zeitpunkt begünstigt haben.

Der Übergang von GSL und deren Abbauprodukten in die umgebende Flüssigkeit bei Verarbeitungsprozessen wie Kochen oder Fermentieren von GSL-haltigem Gemüse führt zu geringeren GSL- und Abbauproduktmengen im Pflanzenmaterial. Bei der Fermentation können die in die Flüssigkeit übergegangenen GSL mit der ebenfalls aus dem Pflanzenmaterial ausgetretenen Myrosinase in Kontakt treten und hydrolysiert werden [97]. Die dabei entstehenden Abbauprodukte

7 Ergebnisse und Diskussion

und deren Gehalte wurden im Rahmen dieser Arbeit durch die Analyse der Fermentationsflüssigkeit untersucht.

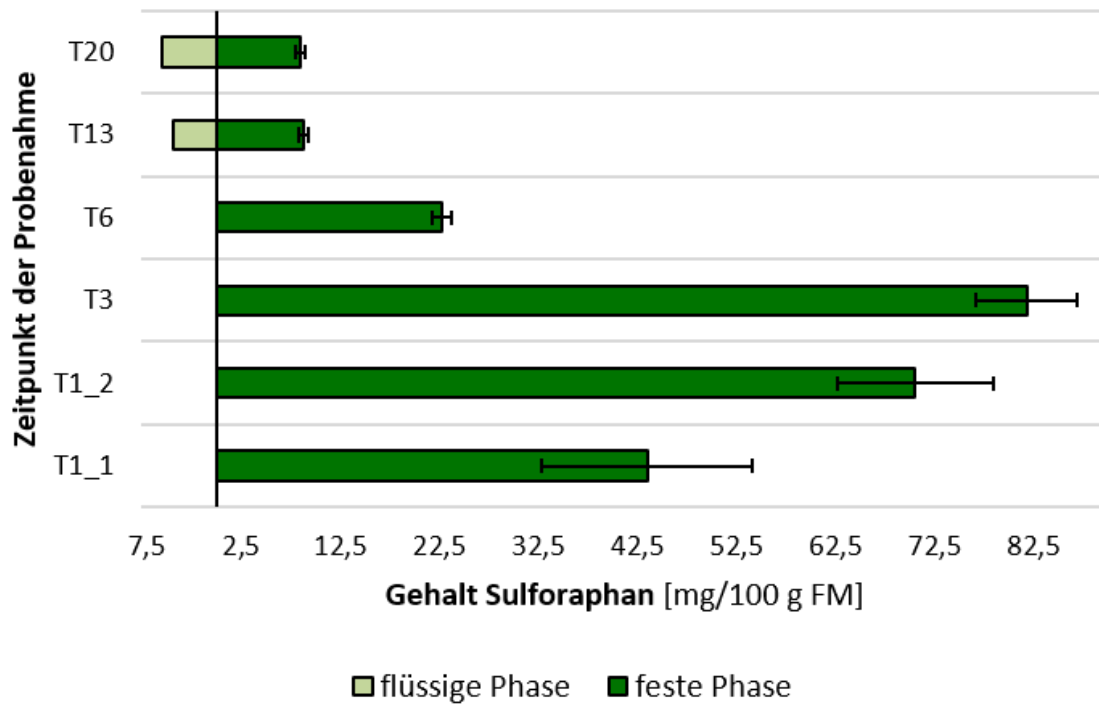


Abbildung 27: Gehalte an Sulforaphan [mg/100 g FM] im Pflanzenmaterial des Brokkolis und der umgebenden Fermentationsflüssigkeit zu allen Zeitpunkten der Probenahme.

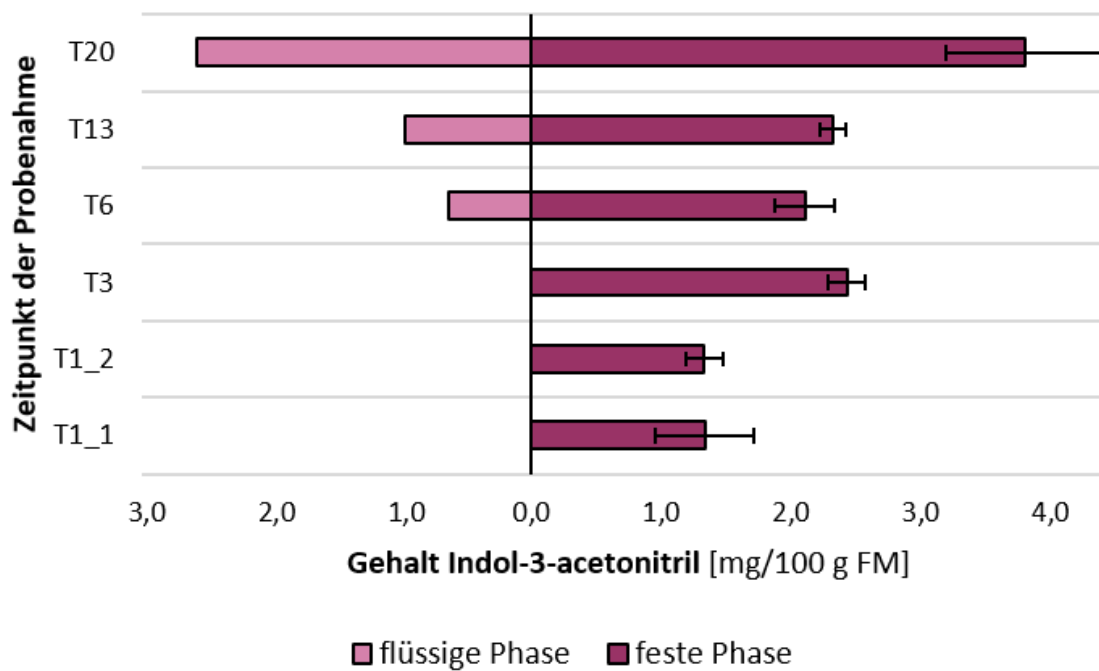


Abbildung 28: Gehalte an Indol-3-acetonitril [mg/100 g FM] im Pflanzenmaterial des Brokkolis und der umgebenden Fermentationsflüssigkeit zu allen Zeitpunkten der Probenahme.

Nur für Erucin (T13), Sulforaphan (T13, T20) und Indol-3-acetonitril wurden in der Flüssigkeit Konzentrationen über der Bestimmungsgrenze analysiert. Ab T13 konnte bei Sulforaphan (siehe Abbildung 27) bzw. ab T6 bei Indol-3-acetonitril (siehe Abbildung 28) ein Anstieg der Gehalte in der flüssigen Phase der Proben beobachtet werden. An Tag 20 wurden in der Fermentationsflüssigkeit 67,74 % des im festen Pflanzenmaterial bestimmten Gehaltes an Indol-3-acetonitril quantifiziert. Somit konnte der Übergang der GSL Glucobrassicin und Glucoraphanin sowie ihrer Abbauprodukte anhand letzterer nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass sowohl die Hydrolyse des, aus dem Pflanzenmaterial in die flüssige Phase übergegangenen Glucobrassicin, als auch der Übergang des im Pflanzenmaterial durch Myrosinase gebildeten Abbauprodukts in die umliegende Flüssigkeit zu den gefundenen Gehalten des Abbauprodukts geführt haben.

7.2.5 Fermentation von Rotkohl

Glucosinolate

Der Rotkohl wies von den vier für die Studie verwendeten Gemüsen die größte Vielfalt an GSL auf. Sieben der acht ausgewählten Verbindungen wurden mit Gehalten über der Nachweisgrenze quantifiziert.

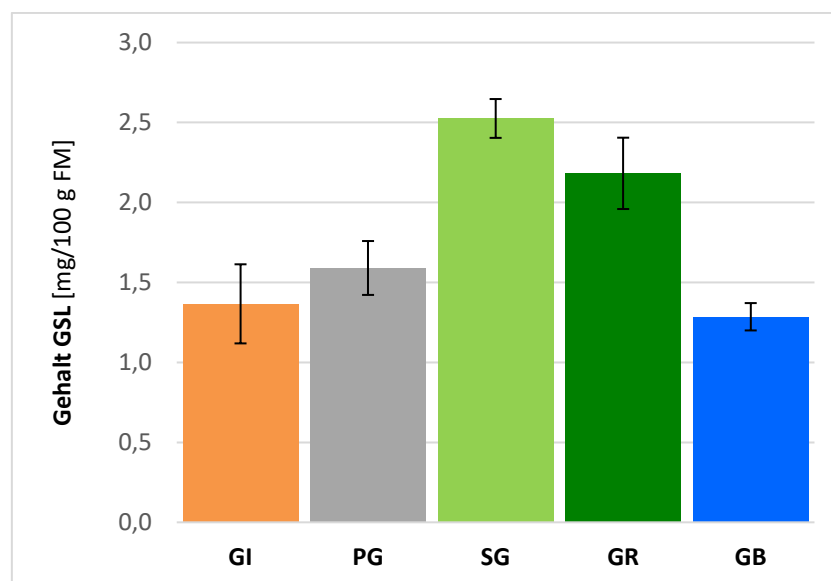


Abbildung 29: Gehalte an Glucoiberin, Progoitrin, Sinigrin, Glucoraphanin und Glucobrassicin [mg/100 g FM] in rohem Rotkohl.

Sinigrin wies dabei den höchsten Gehalt mit $2,53 \pm 0,12$ mg/100 g FM (im rohen Pflanzenmaterial) auf (siehe Abbildung 29). Interessant war hierbei, dass Volden et al. (2008) in Rotkohl einen Gehalt von $40,4 \mu\text{mol}/100 \text{ g FM}$ (entspricht $16,1 \text{ mg}/100 \text{ g FM}$) und Glucoraphanin als GSL mit dem höchsten Gehalt in Rotkohl angegeben haben [52]. Die Ausbildung von GSL und deren Vielfalt ist sehr stark abhängig von Faktoren wie der Sorte der Pflanze, dem Wachstumsstadium und Kompartimenten der

7 Ergebnisse und Diskussion

Pflanze, sowie äußeren Faktoren während des Wachstums[10]. Auch die Lagerungsbedingungen der Proben bis zur Analyse sind wichtige Parameter in der Betrachtung der Gehalte an GSL. In der Arbeit von Volden et al. wurden Rotkohlsamen in 96-Well Plates ausgesät, nach 28 Tagen im Gewächshaus (bei 20 °C/Tag, 18 °C/Nacht, 16 Stunden Licht) vereinzelt und auf einem Testfeld angepflanzt. Dort wurden sie nach 128 Tagen geerntet und bei 0 – 1 °C und 98 % relativer Luftfeuchtigkeit gelagert. Gegenüber den kontrollierten Lagerbedingungen in der Arbeit von Volden et al. ist in der vorliegenden Arbeit keine Kontrolle der Lagerbedingungen möglich gewesen. Dies könnte auch den von der Studie aus 2008 stark abweichenden Gehalt an Sinigrin in dem untersuchten Rotkohl erklären. Der Gesamt-GSL-Gehalt wurde mit $9,37 \pm 0,4$ mg/100 g FM bestimmt. Die niedrigeren pH-Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation im Vergleich zum Brokkoliferment deuteten darauf hin, dass eventuelle Auswirkungen des Fermentationsprozesses schneller sichtbar werden. Ein weiterer Unterschied zum Brokkoli ist der Fermentationsansatz selbst. Zur Fermentation des Brokkolis wurde deutlich mehr Wasser verwendet, als beim Rotkohlsatz. Der Effekt des Auslaugens der GSL könnte dadurch weniger stark ausgeprägt gewesen sein, als es beim Brokkoli der Fall war. Dennoch verringerten sich die Gehalte der GSL von Zeitpunkt T1_0 zu T1_2 signifikant zum späteren Fermentationsverlauf (siehe Abbildung 30).

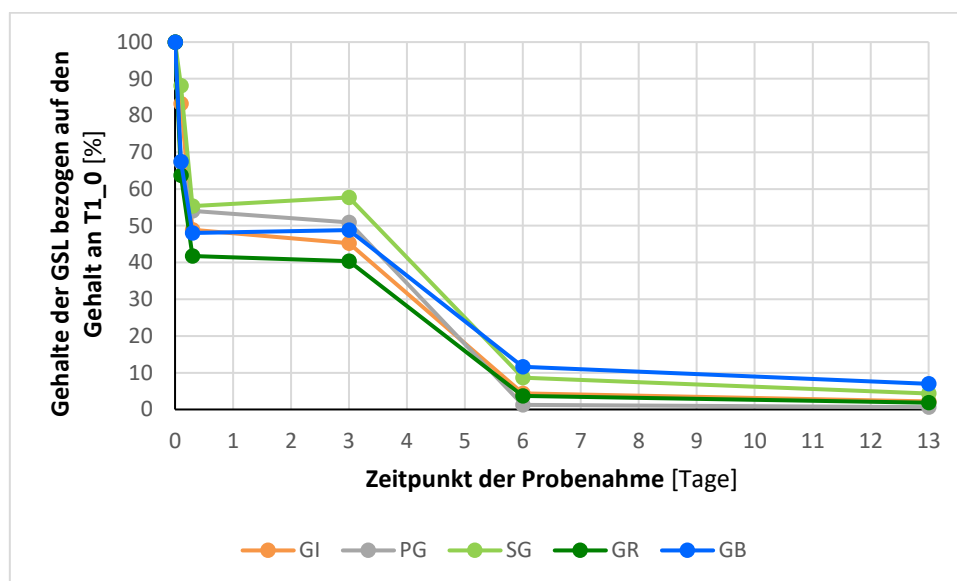


Abbildung 30: Prozentuale Gehalte der GSL Glucoiberin, Progoitrin, Sinigrin, Glucoraphanin und Glucobrassicin des Rotkohlfenments von T1_0 bis T13, bezogen auf den GSL-Gehalt an T1_0.

Sinigrin wurde durch die mechanische Einwirkung und den darauffolgenden Abbau weniger stark beeinflusst als die GSL Progoitrin, Glucoiberin, Glucoraphanin und Glucobrassicin, folgte sonst aber dem gleichen Schema. Studien von Botti et al. (1995) beschäftigten sich unter anderem mit der Affinität der Myrosinase mit verschiedenen Substraten (GSL und strukturell ähnliche Glykoside). Dabei zeigte sich ebenfalls keine Diskriminierung zwischen GSL, deren Abbauraten ähnlich waren [98].

7 Ergebnisse und Diskussion

Der Gehalt an Sinigrin sank von T1_0 auf T1_1 um 11,36 %, der Gehalt an Glucoraphanin um 36,51 %. Dies kann auf die von Winde (2011) gezeigte Substratspezifität der Myrosinase oder auf die Wechselwirkung der Analyten mit der Matrix zurückzuführen sein [99]. Ein GSL, das besser aus dem Pflanzenmaterial in die umgebende Flüssigkeit austritt, kann besser hydrolysiert werden, als eines, das stark mit der Matrix wechselwirkt und als Substrat nicht zur Verfügung steht. Innerhalb von drei Tagen (von T1_2 auf T3) nahmen die Gehalte der GSL nur minimal ab. Bei Sinigrin konnte sogar ein leichter Anstieg des Gehaltes um 2,24 % beobachtet werden. Da der enzymatische Abbau von GSL nicht reversibel ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Stärke des enzymatischen Abbaus im Probenmaterial je nach Zerkleinerungsgrad schwankt und somit ein höherer Gehalt analysiert werden konnte. Des Weiteren könnte der zunehmende Abbau des Pflanzenmaterials während der Fermentation die Wechselwirkung des Sinigrins mit der Pflanzenmatrix verringert haben, wodurch sich dieses besser daraus extrahieren ließ. Von T3 auf T6 konnte bei allen analysierten GSL ein stärkerer Abfall des Gehaltes im Pflanzenmaterial detektiert werden, als im gleichen Zeitintervall von T1_2 auf T3. Der Gehalt an Sinigrin fiel hierbei um 48,55 % auf $1,46 \pm 0,18$ mg/100 g FM. Dieses Konzentrationsgefälle kann beispielsweise durch den starken Abfall des pH-Wertes des Ferments von pH 5,08 (T3) auf pH 3,47 (T6) ausgelöst worden sein. Ein verstärktes Auslaugen der GSL aus der sich abbauenden Pflanzenmatrix ist jedoch wahrscheinlicher, da Tiedink et al. 1991 in einer Studie eine hohe Stabilität von GSL unter sauren Bedingungen ($\text{pH} > 2$) bestätigen konnten [100].

Verglichen mit dem rohen Ausgangsmaterial wurde nach 6 Tagen ein Abfall des Gehaltes von Sinigrin von über 90 % beobachtet. Zum Probenahmezeitpunkt T13 wurde im Rotkohlferment nur noch eine geringe Aktivität des GSL-Abbaus mit minimalen Gehalten nahe der Nachweisgrenze beobachtet.

Glucosinolat-Abbauprodukte

Im Verlauf der Fermentation sind in Rotkohl die ITC Sulforaphan (aus Glucoraphanin), Iberin (aus Glucoiberin), Allyl-ITC (aus Sinigrin) und 3-Butenyl-ITC (aus Gluconapin) identifiziert und quantifiziert worden. Letzteres wurde zu allen Zeitpunkten der Probenahme in Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze analysiert. Zudem wurde hier ebenfalls das ITC Erucin identifiziert. Die analysierten Gehalte sind in Tabelle 38 aufgelistet und in Abbildung 31 graphisch veranschaulicht. Zur besseren Veranschaulichung wurde Sulforaphan in Abbildung 31 nicht aufgeführt. Die Gehalte von Sulforaphan sind in der Gegenüberstellung von Befunden in der Fermentationsflüssigkeit und dem Pflanzenmaterial in Abbildung 32 aufgetragen.

7 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 38: Gehalte an GSL-Abbauprodukt im Pflanzenmaterial des Rotkohlferments zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenahmen in mg/100 g FM.

GSL-Abbauprodukt	Zeitpunkt der Probenahme					
	T1_1	T1_2	T3	T6	T13	T20
Erucin	u. x_{NWG}	$0,76 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,05$	$0,85 \pm 0,17$	$0,74 \pm 0,11$	$0,79 \pm 0,08$
Iberin	$3,74 \pm 0,39$	$7,38 \pm 0,61$	$7,31 \pm 0,97$	$3,57 \pm 0,40$	$2,23 \pm 0,14$	u. x_{BG}
Sulforaphan	$8,10 \pm 0,46$	$11,10 \pm 1,50$	$11,55 \pm 0,78$	$8,52 \pm 0,32$	$7,62 \pm 0,28$	$8,15 \pm 0,36$
Allyl-ITC	u. x_{NWG}	$0,79 \pm 0,09$	$0,90 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,04$	$0,80 \pm 0,04$
3-Butenyl-ITC	$0,41 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,06$	$0,69 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,15$	$0,20 \pm 0,02$	u. x_{NWG}

u. x_{BG} – unterhalb der Bestimmungsgrenze des Analyten; u. x_{NWG} – unterhalb der Nachweisgrenze des Analyten

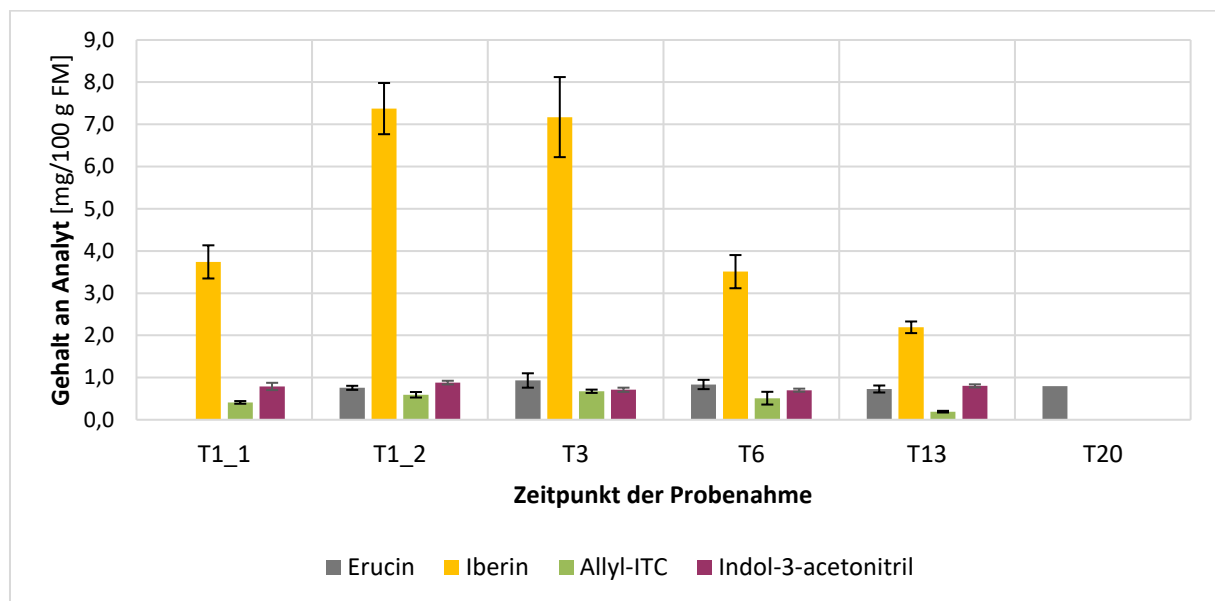


Abbildung 31: Gehalte der Abbauprodukte Erucin, Iberin, Allyl-ITC und Indol-3-acetonitril [mg/100 g FM] im Rotkohlferment zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten während der Fermentation.

Aus der obigen Abbildung ist, ebenso wie aus den Gehalten der Abbauprodukte im Brokkoliferment, ein Anstieg der ITC-Gehalte von Erucin, Sulforaphan und Allyl-ITC von T1_1 zu T3 zu beobachten. Dominierendes Abbauprodukt im Rotkohlferment war das Sulforaphan mit einem maximalen Gehalt von $11,55 \pm 0,79$ mg/100 g FM an T3, gefolgt von Iberin mit $7,38 \pm 0,61$ mg/100 g FM (T1_2). Erucin und Allyl-ITC wiesen zum Zeitpunkt T3 vergleichbare Gehalte von $0,95 \pm 0,05$ mg/100 g FM (Erucin) und $0,90 \pm 0,04$ mg/100 g FM (Allyl-ITC) auf.

Das vor allem in Senf für seinen Schärfeeindruck bekannte Allyl-ITC war somit nicht, wie aus der Verteilung der GSL im rohen Rotkohl vermutet wurde, das ITC mit dem höchsten Gehalt [18]. Das durch Ciska et al. (2004) identifizierte Goitrin (aus der Hydrolyse von Progoitrin) bei der Verarbeitung von Weißkohl wurde im Rotkohl nicht nachgewiesen. Zum Probenahmezeitpunkt T20 waren wie im oberen Abschnitt aufgeführt alle GSL zum größten Teil abgebaut beziehungsweise nicht mehr oberhalb der Nachweisgrenze detektierbar. Bei der Homogenisierung des Pflanzenmaterials im Zuge der

7 Ergebnisse und Diskussion

Aufarbeitung kann es somit zu keiner signifikanten Neubildung der Abbauprodukte gekommen sein. Die an T20 bestimmten GSL-Abbauprodukte resultierten daher aus den zu früheren Zeitpunkten abgelaufenen Hydrolysen. Der leichte Anstieg des Gehaltes von Sulforaphan von T13 ($7,62 \pm 0,28$ mg/100 g FM) auf T20 ($8,15 \pm 0,36$ mg/100 g FM) beruht dabei auf der teils inhomogenen Verteilung der Analyten innerhalb des Pflanzenmaterials. Im Verlauf der Fermentation wurde beobachtet, dass der Gehalt an Sulforaphan ab T6 stagnierte. Die minimalen Schwankungen im Gehalt sind auf die bereits mehrfach erwähnte Inhomogenität des Pflanzenmaterials und Ungenauigkeiten der Methode hinsichtlich der Aufarbeitung und der Messpräzision zurückzuführen.

Aufgrund der Flüchtigkeit der ITC kam es über den Zeitraum der Fermentation zu Verlusten dieser vermehrt von T1_1 bis T3 gebildeten Abbauprodukte in den Fermentationsansätzen. Vor allem die ITC von Sinigrin und Glucoiberin waren aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit stark betroffen [92]. Über der Bestimmungsgrenze liegende Konzentrationen an Sulforaphan wurden in den Proben der flüssigen Phase ab Probenahmezeitpunkt T3 analysiert. Eine vergleichende Darstellung der Gehalte an Sulforaphan in dem Pflanzenmaterial und der umgebenden Flüssigkeit ist in Abbildung 32 dargestellt. Somit wurde ein Übergang aus dem Pflanzenmaterial beziehungsweise eine Bildung von Sulforaphan aus Glucoraphanin in der Fermentationsflüssigkeit beobachtet.

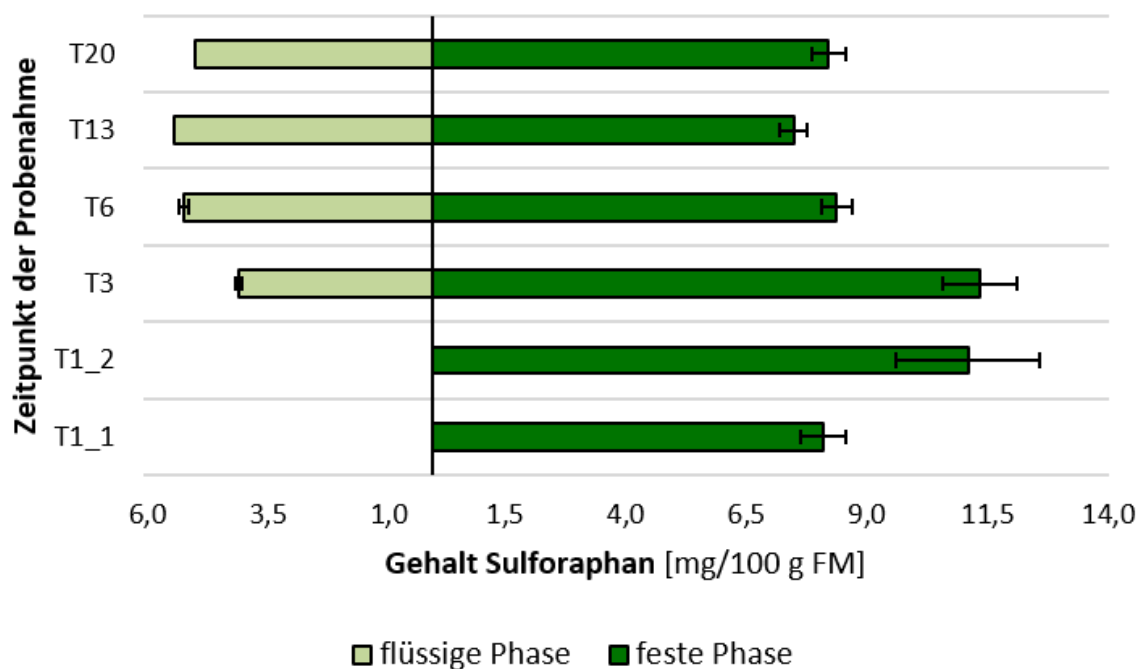


Abbildung 32: Gehalte an Sulforaphan [mg/100 g FM] im Pflanzenmaterial des Rotkohls und der umgebenden Fermentationsflüssigkeit zu allen Zeitpunkten der Probenahme.

7.2.6 Fermentation von Spitzkohl

Glucosinolate

Im Spitzkohl dominierten die aliphatischen GSL Glucoiberin und Sinigrin, sowie das indolische Glucobrassicin. Diese drei Verbindungen machten jeweils über 5 % des Gesamt-GSL-Gehaltes ($4,42 \pm 0,2$ mg/100 g FM) aus.

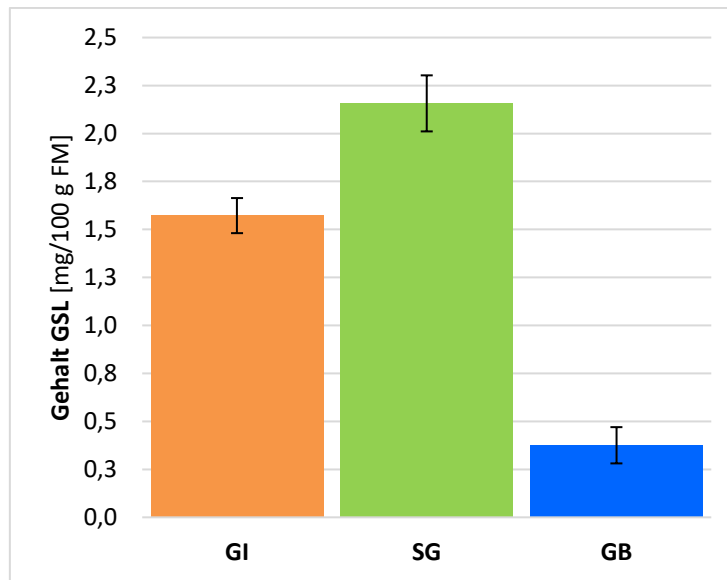


Abbildung 33: Gehalte an Glucoiberin, Sinigrin und Glucobrassicin [mg/100 g FM] in rohem Spitzkohl.

Die Verwandtschaft des Spitzkohls (*Brassica oleracea* var. *Capitata* f. *alba* subv. *Conica*) mit dem Weißkohl (*Brassica oleracea* convar. *Capitata* var. *Alba*) führte zur Hypothese, dass sich der Spitzkohl in seinem Fermentationsverhalten dem des Weißkohles ähnelt. So wurden ähnliche Ergebnisse erwartet wie sie in der Literatur für Weißkohl beschrieben wurden [72, 92, 101]. Die Verteilung der GSL und ihre GSL waren in dem durchgeführten Experiment jedoch anders als in der Literatur für den Weißkohl beschrieben. Sinigrin ist im analysierten rohen Spitzkohl mit $2,16 \pm 0,15$ mg/100 g FM das GSL mit dem höchsten Gehalt, gefolgt von Glucoiberin ($1,57 \pm 0,09$ mg/100 g FM) und Glucobrassicin ($0,38 \pm 0,09$ mg/100 g FM). Sarvan et al. beschrieben 2013 in Weißkohl Glucoiberin als das GSL mit dem höchsten Gehalt ($72,0 \mu\text{mol}/100$ g FM, entspricht $30,5$ mg/100 g FM) sowie Sinigrin mit $47,3 \mu\text{mol}/100$ g FM (entspricht $18,8$ mg/100 g FM), Glucoraphanin mit $19,5 \mu\text{mol}/100$ g FM (entspricht $8,5$ mg/100 g FM) und Progoitrin mit $11,3 \mu\text{mol}/100$ g FM (entspricht $4,4$ mg/100 g FM) [101]. Progoitrin wurde im analysierten Spitzkohl nur mit einem Gehalt von $0,18 \pm 0,02$ mg/100 g FM quantifiziert.

7 Ergebnisse und Diskussion

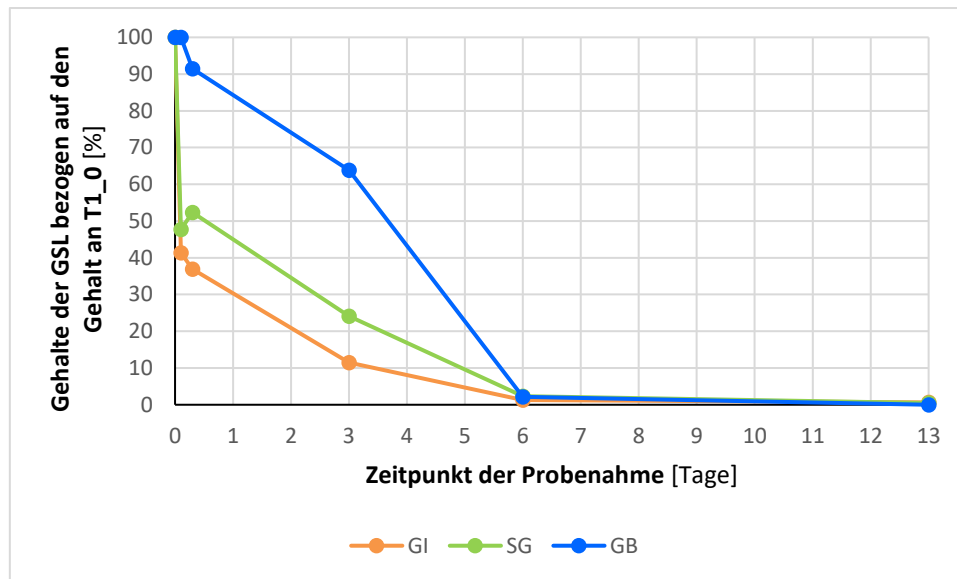


Abbildung 34: Prozentuale Gehalte der GSL Glucoiberin, Sinigrin und Glucobrassicin des Spitzkohlfenments von T1_0 bis T13, bezogen auf den GSL-Gehalt an T1_0.

Im Abbau der GSL vom rohen Zustand des Kohls an T3 unterschied sich Glucobrassicin markant durch einen geringen Konzentrationsanstieg von 2,82 % zu Zeitpunkt T1_0 auf T1_1 und einer nur geringen Abnahme um 8,56 % von T1_1 auf T1_2. Der leichte Anstieg kann wie beim Rotkohl auf Wechselwirkungen mit der Pflanzenmatrix oder den unterschiedlichen Zerkleinerungsgrad des Probenmaterials zurückzuführen sein. Weiterhin wird vermutet, dass durch Matrixeffekte im Spitzkohl das Glucobrassicin weniger schnell durch den anfänglichen Abbau der GSL betroffen war und erst mit fortschreitender Zersetzung des Pflanzengewebes in größeren Konzentrationen abgebaut worden ist. Glucoiberin wurde in der ersten Stunde nach Ansatz der Fermentation um mehr als die Hälfte (58,54 %) abgebaut. Von T1_1 auf T1_2 war die Abnahme des Gehaltes mit 4,86 % wesentlich geringer. Der Gehalt des Glucobrassicins verringerte sich von T1_2 auf T3 um 70,58 %. Bei Glucoiberin war im gleichen Zeitraum der Gehalt im Unterschied dazu nur um 25,32 % gesunken.

In den beiden Kohlsorten Rotkohl und Spitzkohl wurden sowohl Sinigrin als auch Glucoiberin identifiziert. Ein Vergleich des Verlaufs des Abbaus beider Verbindungen in den Gemüsen zeigte eine zeitliche Verzögerung des Abbaus des Sinigrins gegenüber dem Glucoiberin in beiden Ansätzen. Glucoiberin wurde zu Beginn in größeren Mengen abgebaut als Sinigrin. Die Reduktion des Gehaltes von T1_0 auf T1_2 in Rotkohl betrug 51,32 %, die des Sinigrins nur 44,48 %. Im Spitzkohl wurde bei Glucoiberin im gleichen Zeitraum eine Verringerung des Gehaltes um 63,41 % ermittelt, bei Sinigrin nur um 47,38 %. Mögliche Ursachen für diese Beobachtungen können die Substratspezifität der Myrosinase oder Matrixeffekte im Pflanzenmaterial sein, die zu einem schnelleren Abbau von Glucoiberin geführt haben [99].

Glucosinolat-Abbauprodukte

In allen während des Fermentationsprozesses genommenen und analysierten Proben von Spitzkohl konnten keine der aus den identifizierten GSL resultierenden oder aus der Literatur erwarteten Abbauprodukte identifiziert werden. Die bereits geringen Gehalte an GSL im rohen Spitzkohl und die hohe Abbaurate der GSL in den ersten Stunden der Fermentation gaben im Vorfeld der Analyse der Abbauprodukte Hinweise auf geringe Mengen an Abbauprodukten an. Dafür verantwortlich können Matrixeffekte im Spitzkohl, die Flüchtigkeit der ITC, oder Verluste bei der Aufarbeitung gewesen sein. Auch die vergangene Zeit zwischen Ernte des Kohls und Analyse des Pflanzenmaterials haben einen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse.

7.2.7 Fermentation von Chinakohl

Glucosinolate

In der Literatur finden sich bereits mehrfach Beschreibungen von Untersuchungen von GSL-Profilen einer Vielzahl an Chinakohl-Varianten [45, 91, 102]. Dabei wurden unter Anderem Gluconasturtiin, Glucobrassicin, Glucobrassicinapin und Progoitrin identifiziert. In der vorliegenden Arbeit konnten diese GSL ebenfalls im untersuchten Chinakohl identifiziert werden (siehe Abbildung 35). Ihre Gehalte waren jedoch geringer als in der Literatur angegeben [102]. Unterschiede in den GSL-Profilen treten zwischen unterschiedlichen Pflanzenarten, zwischen Sorten einer Art und den verschiedenen Pflanzenkompartimenten einer Pflanze auf [10]. Zudem hat die Lagerdauer des Probenmaterials eine große Bedeutung in der Betrachtung des enzymatischen Abbaus der GSL. Im Zuge dieser Arbeit wurde in rohem Chinakohl Progoitrin mit einem Gehalt von $1,49 \pm 0,15$ mg/100 g FM, Glucobrassicinapin mit $0,75 \pm 0,04$ mg/100 g FM, Glucobrassicin mit $0,19 \pm 0,02$ mg/100 g FM und Gluconasturtiin mit einem Gehalt von $0,39 \pm 0,04$ mg/100 g FM bestimmt.

Von den vier untersuchten Kohlsorten wies der Chinakohl den geringsten Gesamt-GSL-Gehalt ($2,89 \pm 0,16$ mg/100 g FM) auf.

Bei der Präparation des Chinakohls zum Fermentationsansatz trat nach der Salzzugabe und dem Beschweren des Pflanzenmaterials im Fermentationsgefäß mehr Flüssigkeit aus, als bei den Fermentationsansätzen der drei anderen Kohlsorten. Es wurde vermutet, dass mit dem stärkeren Flüssigkeitsaustritt auch verstärkt die GSL in die Fermentationsflüssigkeit austraten und somit nicht mehr im Pflanzenmaterial detektiert werden konnten. Diese wurde durch die analysierten Gehalte der vier genannten GSL zum Probenahmezeitpunkt T1_1 bestätigt. Der Gehalt des Progoitrins verringerte sich dabei um 85,33 %, der Gehalt des Glucobrassicinapins um 81,98 % und des Gluconasturtiins um 74,30 % zum Gehalt im rohen Pflanzenmaterial. Der Abfall des Gehaltes war bei Glucobrassicin mit

7 Ergebnisse und Diskussion

52,27 % im Vergleich zu den anderen drei GSL am geringsten. Die rapide Absenkung der Gehalte der GSL, bezogen auf den Ausgangszustand T1_0 ist in Abbildung 36 verdeutlicht.

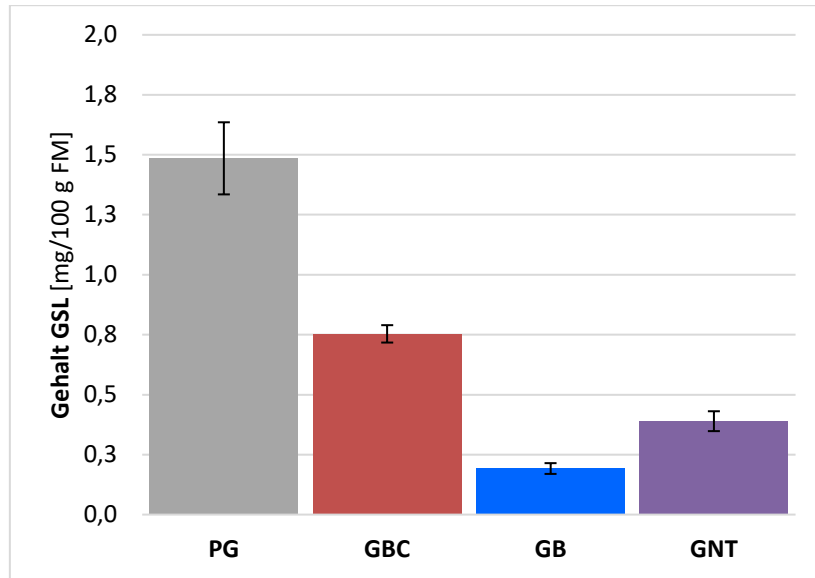


Abbildung 35: Gehalte an Progoitrin, Glucobrassicinapin, Glucobrassicin und Gluconasturtiin [mg/100 g FM] in rohem Chinakohl.

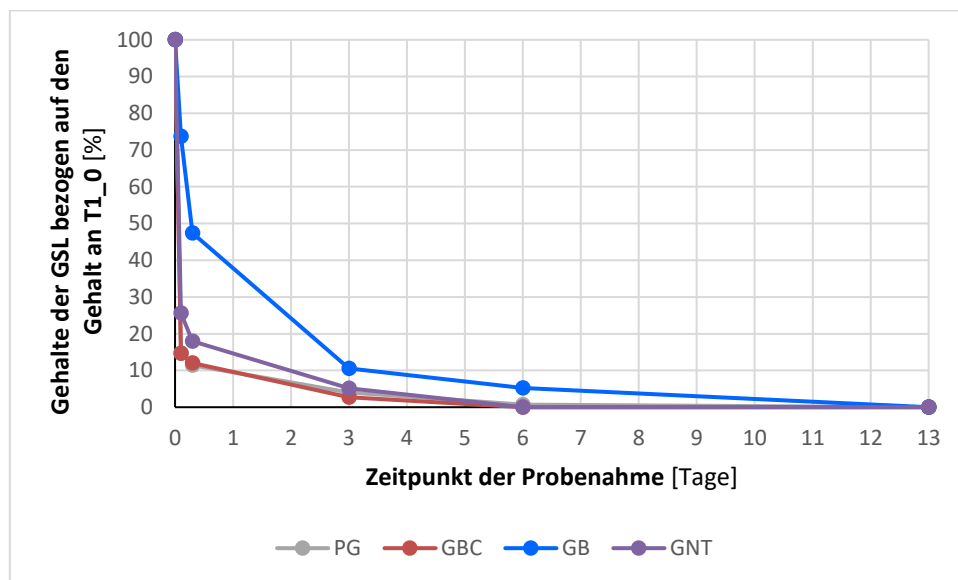


Abbildung 36: Prozentuale Gehalte der GSL Progoitrin, Glucobrassicinapin, Glucobrassicin und Gluconasturtiin des Chinakohlferments von T1_0 bis T13, bezogen auf den GSL-Gehalt an T1_0.

7 Ergebnisse und Diskussion

Glucosinolat-Abbauprodukte

Während des Prozesses der Fermentation von Chinakohl konnten verschiedene Abbauprodukte der im rohen Chinakohl enthaltenen GSL identifiziert werden. Die identifizierten und quantifizierten Abbauprodukte waren 4-Pentenyl-ITC aus der Hydrolyse von Glucobrassicinapin, Indol-3-acetonitril (aus Glucobrassicin) und die beiden aus dem Abbau des Gluconasturtiin entstehenden Abbauprodukte 2-Phenylethyl-ITC und 3-Phenylpropionitril (siehe Tabelle 39 und Abbildung 37). Anhand der bereits diskutierten GSL im Chinakohl wurden geringe Gehalte an Abbauprodukten erwartet.

Tabelle 39: Gehalte an GSL-Abbauprodukt im Pflanzenmaterial des Chinakohlferments zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenahmen in $\mu\text{mol}/100\text{ g FM}$.

GSL- Abbauprodukt	Zeitpunkt der Probenahme					
	T1_1	T1_2	T3	T6	T13	T20
2-Phenylethyl-ITC	$0,92 \pm 0,13$	$0,62 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,12$	$0,49 \pm 0,06$
Indol-3- acetonitril	$0,86 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,06$
3-Phenyl- propionitril	$0,39 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,01$
4-Pentenyl-ITC*	-	-	-	-	-	-

* nicht erworbener Standard – Identifizierung über die Datenbank

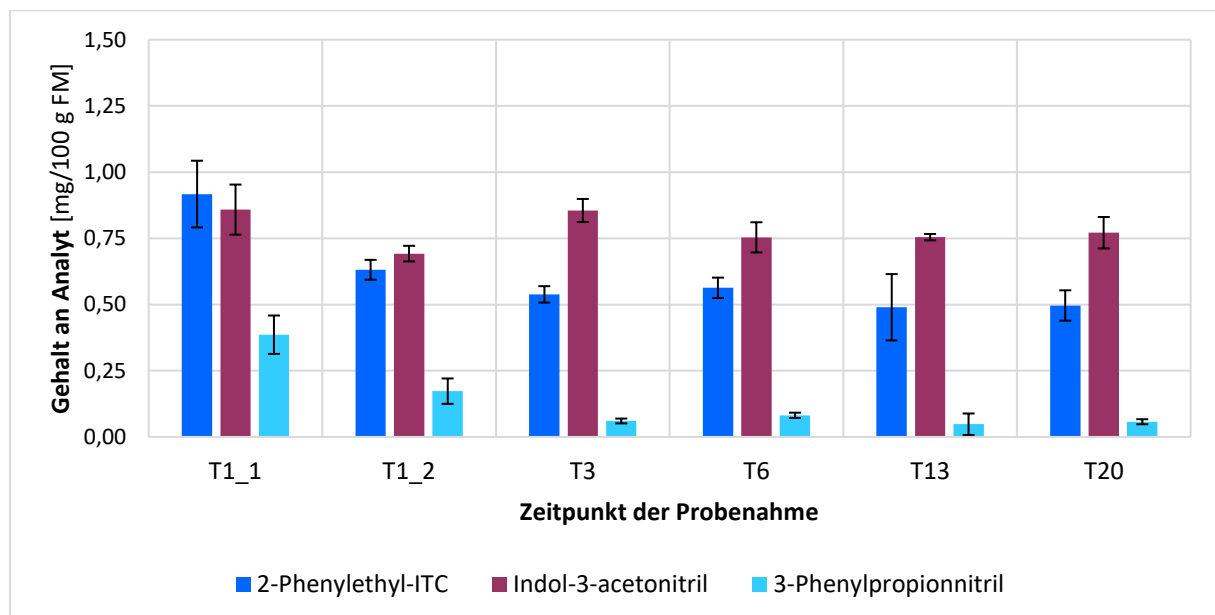


Abbildung 37: Gehalte der Abbauprodukte 2-Phenylethyl-ITC, Indol-3-acetonitril und 3-Phenylpropionitril [mg/100 g FM] im Chinakohlferment zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten während der Fermentation.

7 Ergebnisse und Diskussion

Als dominierendes GSL wurde in rohem Chinakohl das Progoitrin identifiziert. Dessen primär aus der Hydrolyse entstehendes Produkt Goitrin konnte jedoch zu keinem Probenahmezeitpunkt im Pflanzenmaterial identifiziert werden [103].

Die Analysen der Abbauprodukte zeigten, dass die höchste Hydrolyseaktivität innerhalb der ersten Stunde (T1_1) der Fermentation lag. Hier wurden die höchsten Gehalte aller Abbauprodukte ermittelt. Im Vergleich dazu waren die höchsten Gehalte der Abbauprodukte in Brokkoli und Rotkohl bei T1_2 beziehungsweise T3 zu verzeichnen. Dieser Unterschied kann seine Ursache im bereits beschriebenen starken Flüssigkeitsaustritt bei der Verarbeitung des Chinakohls haben. Dabei kann der Großteil der mit der Flüssigkeit ausgetretenen GSL durch die pflanzeigene Myrosinase zu den jeweiligen Abbauprodukten hydrolysiert worden sein. Diese Hypothese korreliert auch mit der bereits beschriebenen starken Reduktion der GSL von T1_0 auf T1_1 der Fermentation.

Ab dem Fermentationszeitpunkt T3 beziehungsweise T6 bei Indol-3-acetonitril veränderte sich der Gehalt der Abbauprodukte nicht mehr oder nur noch geringfügig. Durch die starke Abbaurate der GSL zu Beginn der Fermentation war im weiteren Verlauf die Neubildung von Abbauprodukten stark eingeschränkt. Ein Anstieg der Gehalte wurde daher als wenig wahrscheinlich eingeschätzt. Dieses konnte durch den Großteil der Ergebnisse auch bestätigt werden. Lediglich der Gehalt des Indol-3-acetonitril zeigte einen leichten Anstieg von T1_2 ($0,68 \pm 0,03$ mg/100 g FM) auf T3 ($0,83 \pm 0,04$ mg/100 g FM). Die Bildung des Nitrils kann durch die Absenkung des pH-Wertes des Ferments von pH 6,85 an Tag 1 auf pH 4,73 an Tag 3 begünstigt worden sein.

Anhand der über der Bestimmungsgrenze liegenden Konzentrationen an 3-Phenylpropionitril in der Fermentationsflüssigkeit ab T3 wurde ein Übergang aus dem Pflanzenmaterial beziehungsweise eine geringe Neubildung des Nitrils aus dem GSL Gluconasturtiin beobachtet.

Eine Neubildung wurde aufgrund des an T3 nur noch in geringen Mengen vorhandenen GSL ($0,02 \pm 0,00$ mg/100 g FM) im Pflanzenmaterials als wenig wahrscheinlich angesehen. Der Übergang des 3-Phenylpropionitrils durch die zunehmende Zersetzung des Pflanzenmaterials in die Flüssigkeit wurde als Begründung der Beobachtungen dem vorgezogen.

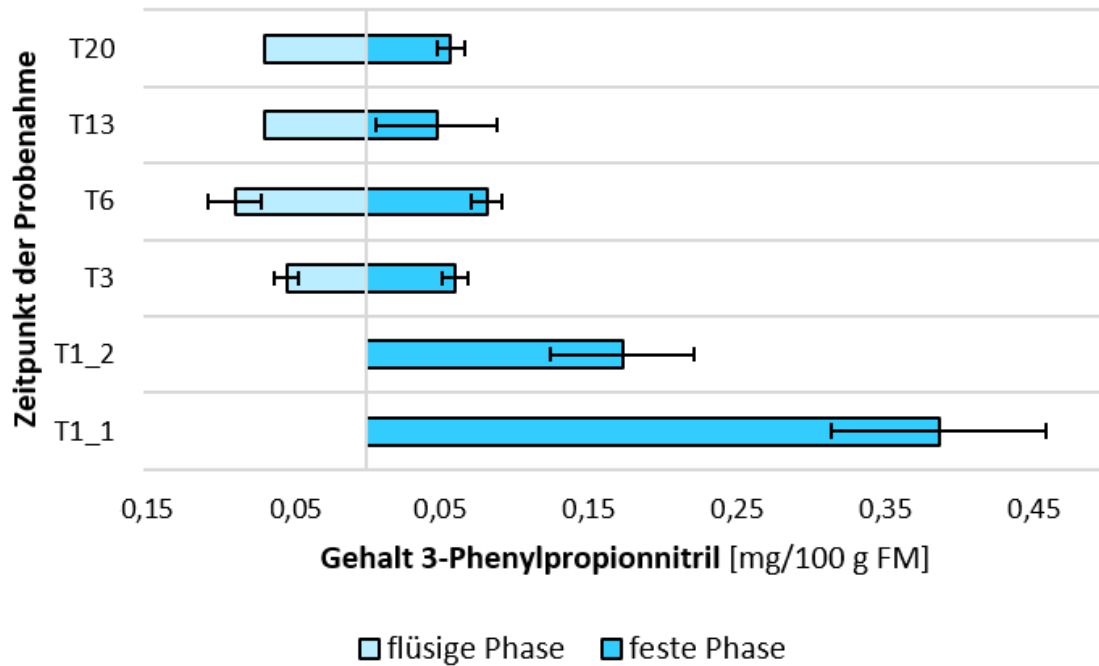


Abbildung 38: Gehalte an 3-Phenylpropionitril [mg/100 g FM] im Pflanzenmaterial des Chinakohls und der umgebenden Fermentationsflüssigkeit zu allen Zeitpunkten der Probenahme.

7.2.8 Ascorbigen – Reaktionsprodukt aus dem Abbau von Glucobrassicin

Ein Reaktionsprodukt des aus Glucobrassicin entstehenden 3-Hydroxymethylindols mit Ascorbinsäure ist das nicht flüchtige Ascorbigen. Ascorbinsäure ist in allen vier untersuchten *Brassica*-Gemüsen in unterschiedlichen Mengen enthalten. Nach Angaben in der Literatur enthält Brokkoli von den ausgewählten Pflanzen den höchsten Gehalt an Ascorbinsäure im Pflanzenmaterial von 88 – 118 mg/100 g, gefolgt von Rotkohl mit einem Konzentrationsbereich von 40 – 75 mg/100 g [104]. Für Chinakohl ist der geringste Gehalt mit 16 – 40 mg/100 g angegeben. Spitzkohl ist eine Untervarietät des Weißkohls und diesem in seiner Zusammensetzung ähnlich. Für Weißkohl wird in der Literatur ein Bereich von 30 – 60 mg/100 g für Ascorbinsäure angegeben [104]. Da in allen vier Proben ebenfalls das GSL Glucobrassicin identifiziert wurde, war die Analyse des Ascorbigens im Verlauf der Fermentation in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Hierbei sollte untersucht werden, in welchem Verhältnis Ascorbigen und 3-Hydroxymethylindol als miteinander konkurrierende Abbauprodukte gebildet werden.

Das natürlich vorkommende Ascorbigen A und dessen 2-Epimer Ascorbigen B wurden aus Mangel an kommerziell erhältlichem Ascorbigen eigenständig synthetisiert. Hierfür ist die in Abschnitt 6.7 beschriebene Methode von Kiss et al. (1966) verwendet worden [71]. Für die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurde nur das Ascorbigen A verwendet. Die Abtrennung des Ascorbigens B erfolgte durch Extrahieren mit Diethylether. Das nunmehr nur noch Ascorbigen A enthaltene Syntheseprodukt

7 Ergebnisse und Diskussion

ist anschließend auf seine Struktur und Reinheit untersucht worden. Die dafür angewandten Methoden sind ebenfalls unter Abschnitt 6.7 aufgeführt.

Charakterisierung des synthetisierten Ascorbigen-Standards mittels NMR

Das in der Synthese erhaltene weiße, kristalline Produkt wurde zur Charakterisierung in deuteriertem Wasser gelöst und mittels 1-D- und 2-D-NMR bei 400 MHz auf seine Struktur untersucht.

Im Folgenden werden die Auswertungen des ^1H - und ^{13}C -Spektrums, sowie die der Spektren des HSQC und COSY beschrieben. Alle Spektren sind ebenfalls im Anhang A3-5 aufgeführt.

Tabelle 40: Daten des ^1H -Spektrums des synthetisierten Ascorbigen A.

Protonen	δ [ppm]	Multiplizität	Anzahl der Protonen	J [Hz]
4'-H	7,58	Dublett	1	8,0
7'-H	7,46	Dublett	1	8,1
2'-H	7,30	Singulett	1	
6'-H	7,19	Triplett	1	7,5
5'-H	7,09	Triplett	1	7,4
5-H	4,40 – 4,34	Multiplett	1	
4-H	4,14	Multiplett	1	
6-CH ₂	4,40 – 3,97	Multiplett	2	
8a-CH ₂	3,40	Dublett	1	14,6
8b-CH ₂	3,28	Dublett	1	14,6

Im ^1H -Spektrum wurden die fünf aromatischen Protonen des Indol-Strukturelements den Signalen der chemischen Verschiebung von 7,58 – 7,09 ppm (siehe Abbildung 39, Tabelle 40) zugeordnet. Dieses geschah aufgrund ihrer niedrigen Abschirmung und der dadurch resultierenden Verschiebung ins Hochfeld. Die Protonen der chemischen Verschiebung 7,19 und 7,09 ppm wurden aufgrund der Multiplizität ihrer Signale als Triplets den Molekülpositionen 6' und 5' zugeordnet (siehe Abbildung 39). Die zwei Protonen der chemischen Verschiebung 3,40 (8a) und 3,28 ppm (8b) konnten aufgrund ihrer Umgebung und ihrer daraus folgenden Multiplizität der CH₂-Gruppe (8) zugeordnet werden. Zu den Protonen 4 – 6 konnten allein aus dem ^1H -Spektrum keine Aussagen getroffen werden.

7 Ergebnisse und Diskussion

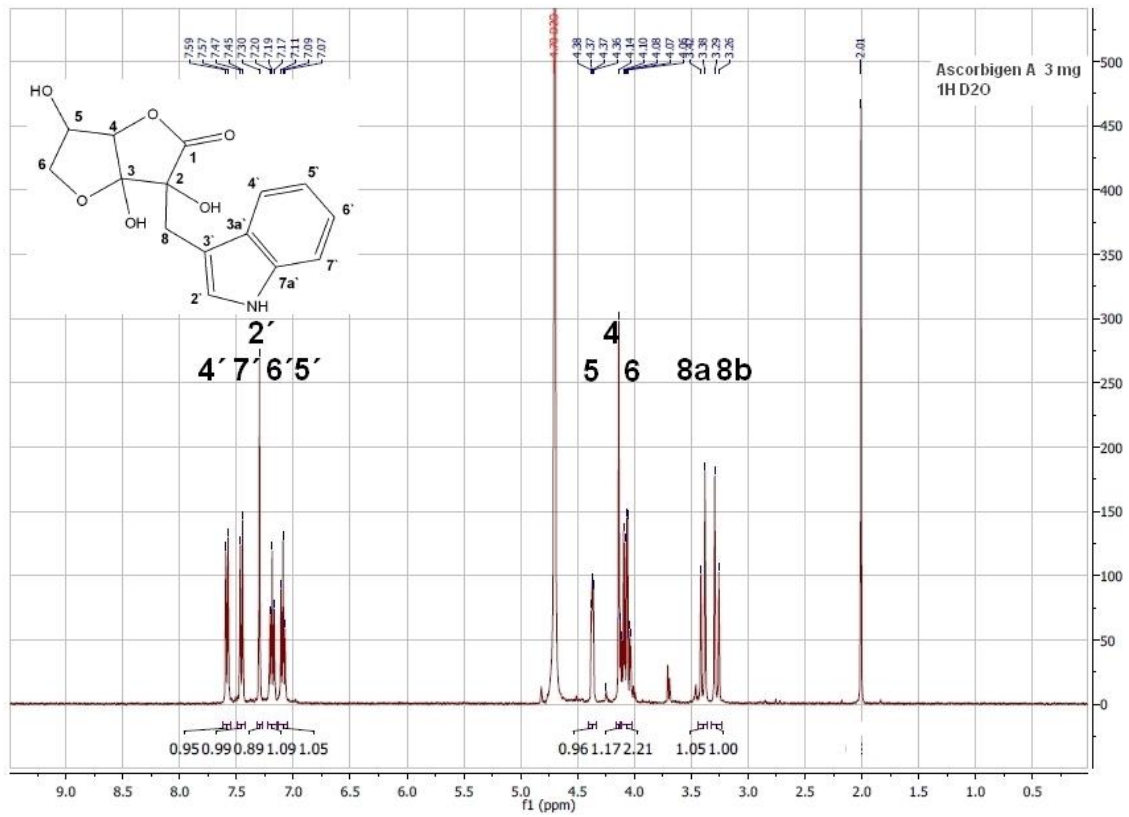


Abbildung 39: ¹H-NMR-Spektrum des synthetisierten Produktes zur Charakterisierung als Ascorbigen, gemessen bei 400 MHz in Deuteriumoxid.

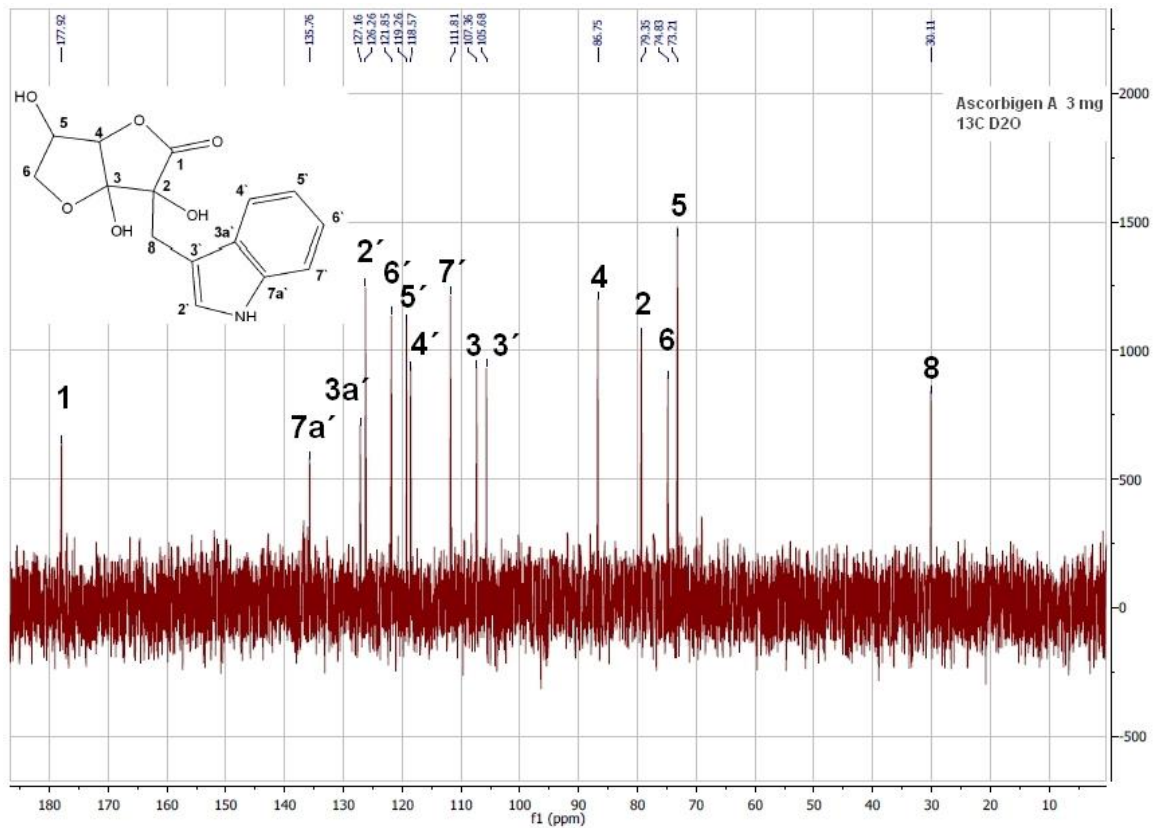


Abbildung 40: ¹³C-NMR-Spektrum des synthetisierten Produktes zur Charakterisierung als Ascorbigen, gemessen bei 400 MHz in Deuteriumoxid.

7 Ergebnisse und Diskussion

Im ^{13}C -Spektrum sind alle 15 Signale für die Kohlenstoffe im Molekül gefunden worden (siehe Abbildung 40, Tabelle 41). Durch die hohe chemische Verschiebung des Signals bei 177 ppm, ausgelöst durch den -M-Effekt der Carbonyl-Gruppe, handelte es sich um das quartäre Kohlenstoffatom (1) am Ascorbinsäure-Strukturelement.

Tabelle 41: Daten des ^{13}C -Spektrums des synthetisierten Ascorbigen A.

Kohlenstoffatom	δ [ppm]
1-C	177,92
7a'-C	135,76
3a'-C	127,16
2'-C	126,26
6'-C	121,85
5'-C	119,26
4'-C	118,57
7'-C	111,81
3-C	107,36
3'-C	105,58
4-C	86,75
2-C	79,35
6-C	74,83
5-C	73,21
8-C	30,11

Über das HSQC Experiment können ^1J -Kopplungen von Protonen zu Kohlenstoffatomen detektiert werden (siehe Anhang A3-5, Abbildung 55). Die nicht quartären Kohlenstoffatome der Positionen 4', 7', 2', 6', 5', 5, 4, 6 und 8 im ^{13}C -Spektrum lassen sich den Protonen aus dem ^1H -Spektrum zuordnen. Eine Kopplung des Protons bei einer chemischen Verschiebung von 2,01 ppm mit einem Kohlenstoff konnte nicht erkannt werden. Daher wurde vermutet, dass es sich hierbei um eine Verunreinigung handelt. Somit wurde dies nicht weiter betrachtet. Die Annahme, dass die beiden Dubletts bei der chemischen Verschiebung 3,40 und 3,28 ppm dem Kohlenstoff der Position 8 zuzuordnen sind, bestätigte sich durch eine detektierte ^1J -Kopplung. Ebenfalls konnte den beiden Protonen bei 4,10 – 3,97 ppm zusammen der zweite sekundäre Kohlenstoff an Position 6 im Ascorbigen-Strukturelement zugeordnet werden.

^2J - und ^3J -Kopplungen können durch das COSY Experiment detektiert werden (siehe Anhang A3-5, Abbildung 56). Die Nachbarschaft des 2'-Protons mit den Protonen 8a und 8b wurde festgestellt. Ebenso geschah dieses zwischen den Protonen 5, 4 und 6a/6b.

Das HMBC Experiment detektiert ^2J -, ^3J - und in aromatischen Systemen ^4J -Kopplungen zwischen Protonen und Kohlenstoffatomen (siehe Anhang A3-5, Abbildung 57). Die Positionen der quartären,

7 Ergebnisse und Diskussion

aber bislang nicht eindeutig zuordenbaren Kohlenstoffatome im Molekül wurden darüber identifiziert. Alle Signale konnten den Positionen im Molekül zugeordnet werden. Die Synthese wurde anhand dessen als erfolgreich angesehen.

Reinheitsbestimmung des Ascorbigen A mittels High Performance Liquid Chromatography

Nach erfolgreicher Synthese ist die Reinheit des Produkts untersucht worden. Zur Reinheitsbestimmung wurden der synthetisierte Ascorbigen A-Standard mittels RP-HPLC-UV bei 280 nm analysiert und die Flächeninhalte des Ascorbigen und seiner Nebenprodukte prozentual zueinander gesetzt (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42: Auswertung der Reinheitsanalyse der Signale des Ascorbigen A-Standards und der Blindprobe bei 280 nm.

Retentionszeit Blindprobe [min]	Retentionszeit Ascorbigen A [min]	Prozentuale Verteilung	Beschreibung
-	8,35	0,80	Nebenprodukt
-	8,80	96,7	Ascorbigen A
-	9,62	0,30	Nebenprodukt
-	9,90	0,30	Nebenprodukt
-	10,68	0,20	Nebenprodukt
-	11,74	0,70	Nebenprodukt
-	14,25	1,0	Nebenprodukt
26,29	26,29	-	Verunreinigung
34,77	34,77	-	Verunreinigung

Für das synthetisierte Produkt ist eine Reinheit von 96,7 % bestimmt worden. Nebenprodukte und Edukte konnten größtenteils aus dem Produkt entfernt werden. Die Synthese nach der Methode von Kiss et al. (1966) wurde erfolgreich durchgeführt. Das Produkt konnte durch eine NMR-Charakterisierung eindeutig bestimmt und eine hohe Reinheit mittels RP-HPLC-UV-Analyse nachgewiesen werden.

Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Stammlösung des Ascorbigen A hergestellt und mittels der in Abschnitt 6.5 aufgeführten ESI-LC-MS/MS-Methode analysiert. Das Signal des *Precursors* von Ascorbigen A hatte im gemessenen System eine Retentionszeit von 14,33 min. Unter Beachtung der Signalintensitäten des ermittelten *Precursors* und dessen Retentionszeit konnte das in den Proben enthaltene Ascorbigen A identifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgte bei dieser Methode mittels einer externen Kalibrierung.

Quantifizierung von Ascorbigen A in ausgewählten, fermentierten *Brassica*-Gemüsen

Analog zu den GSL wurde zur Quantifizierung des in den Proben enthaltenen Ascorbigen eine Kalibrierreihe des synthetisierten Standards angesetzt und mit Hilfe einer ESI-LC-MS/MS Methode mit

7 Ergebnisse und Diskussion

MRM-Modus (siehe Abschnitt 6.5) analysiert. Aus den daraus erhaltenen Daten ergab sich die Berechnung der folgenden Regressionsgerade:

Tabelle 43: Regressionsgerade der Kalibrierung von Ascorbigen A mittels ESI-LC-MS/MS.

Analyt	Regressionsgerade	Bestimmtheitsmaß
Ascorbigen A	$y = 12473,6 x + 34149$	0,9805

Die Berechnung der Ascorbigen-Gehalte erfolgte analog der Berechnung der GSL. Auch hier konnte keine geeignete Matrix zur Verfügung gestellt werden, um mögliche Matrixeffekte zu berücksichtigen. Diese Matrixeffekte wurden durch die hohe Selektivität der MRM-Methode jedoch als gering eingeschätzt.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Ascorbigen wurden mit der Blindwertmethode bestimmt und sind in Tabelle 44 aufgelistet. Die über diese Methode bestimmte Nachweisgrenze richtet sich nach dem für diesen Analyten bestimmten Grundrauschen. Geringes Rauschen und eine gute Ionisierbarkeit im Massenspektrometer sind hierbei gute Voraussetzungen für eine geringe Nachweisgrenze.

Tabelle 44: Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Ascorbigen A.

Analyt	Nachweisgrenze [mg/L]	Bestimmungsgrenze [mg/L]
Ascorbigen A	0,026	0,078

Zur Analyse der Ascorbigen-Gehalte in den vier *Brassica*-Gemüsen wurden innerhalb von 20 Tagen parallel zu den Proben zur Analyse der GSL und deren Abbauprodukte, Proben entnommen und lyophilisiert. Im Anschluss daran sind die Proben wie in Abschnitt 6.5 aufgearbeitet und mittels ESI-LC-MS/MS analysiert worden. Tabelle 45 listet die so analysierten Gehalte auf.

Tabelle 45: Gehalte an Ascorbigen im Pflanzenmaterial der fermentierten Gemüse zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenahmen in $\mu\text{mol}/100 \text{ g FM}$.

Zeitpunkt der Probenahme	Brokkoli	Rotkohl	Spitzkohl	Chinakohl
T1_0	$1,85 \pm 0,25$	$1,17 \pm 0,15$	$0,36 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,02$
T1_1	$0,98 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,05$	$0,41 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,01$
T1_2	$0,8 \pm 0,05$	u. NWG	u. NWG	$0,55 \pm 0,04$
T3	$1,07 \pm 0,05$	u. NWG	$0,6 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,05$
T6	$0,69 \pm 0,01$	$1,34 \pm 0,05$	$0,83 \pm 0,07$	$0,3 \pm 0,03$
T13	$0,06 \pm 0,01$	$1,61 \pm 0,1$	$1,01 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,02$
T20	$0,01 \pm 0,002$	$1,11 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,002$

u. x_{NWG} – unterhalb der Nachweisgrenze des Analyten

7 Ergebnisse und Diskussion

Ascorbigen A wurde in allen rohen Proben identifiziert. Die Gehalte lagen dabei oberhalb der Nachweisgrenze. Anhand der in der Literatur beschriebenen Gehalte an Ascorbinsäure und der analysierten Glucobrassicin-Gehalte, entstand die Vermutung, dass Brokkoli den höchsten und Chinakohl den geringsten Gehalt an Ascorbigen A besitzt. Eine Korrelation der Gehalte an Glucobrassicin mit den Gehalten an Ascorbigen konnte durch die Ergebnisse bestätigt werden. Roher Brokkoli enthielt $1,85 \pm 0,25$ mg/100 g FM (entspricht: $18,0 \pm 2,4$ mg/100 g TM), gefolgt von Rotkohl mit $1,17 \pm 0,15$ mg/100 g FM (entspricht: $14,2 \pm 1,8$ mg/100 g TM). Die anderen beiden Proben hatten mit $0,36 \pm 0,08$ mg/100 g FM (Spitzkohl; entspricht: $4,1 \pm 0,9$ mg/100 g TM) und $0,13 \pm 0,02$ mg/100 g FM (Chinakohl; entspricht: $2,9 \pm 0,5$ mg/100 g TM) die geringsten Gehalte an Ascorbigen A.

Wagner et al. (2009) und Buskov et al. (2000) beschrieben Gehalte von Ascorbigen A in rohem Brokkoli von $137 \mu\text{mol}/100 \text{ g TM}$ (entspricht: $41,8 \text{ mg}/100 \text{ g TM}$); entspricht: $2,2 \mu\text{mol}/100 \text{ g FM}$ bzw. $0,67 \text{ mg}/100 \text{ g FM}$), in Rotkohl von $43 \mu\text{mol}/100 \text{ g TM}$ (entspricht: $13,1 \text{ mg}/100 \text{ g TM}$) und in Chinakohl von $1,7 \mu\text{mol}/100 \text{ g FM}$ (entspricht: $0,5 \text{ mg}/100 \text{ g FM}$) [45, 105].

Die Änderungen der Ascorbigen A-Gehalte im Verlauf der Fermentation sind in folgender Abbildung veranschaulicht.

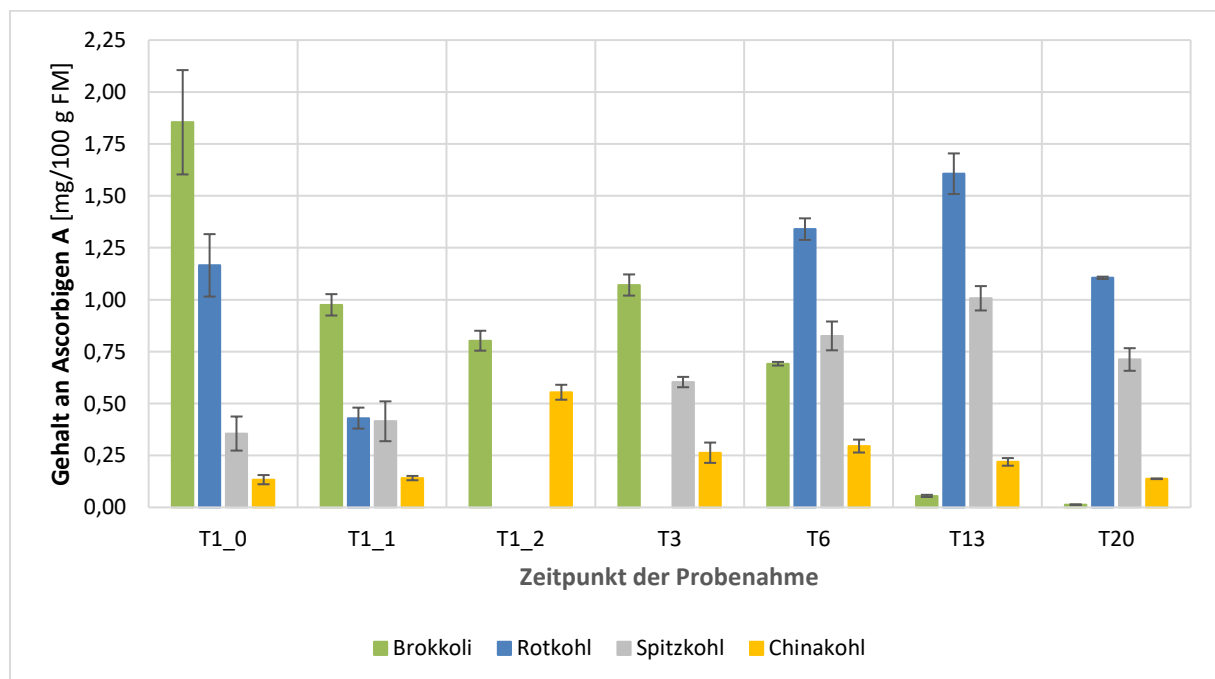


Abbildung 41: Ascorbigen A-Gehalte [mg/100 g FM] im Verlauf der Fermentationen.

Innerhalb der ersten Stunde der Fermentation war in Brokkoli und Rotkohl eine deutliche Reduktion der Gehalte zu beobachten. Der Ascorbigen A-Gehalt sank im Brokkoli um mehr als die Hälfte auf $0,98 \pm 0,05$ mg/100 g FM (T1_1). Der Verlust im Rotkohl war etwas geringer. Hier sank der Gehalt von

7 Ergebnisse und Diskussion

1,17 ± 0,15 mg/100 g FM auf 0,43 ± 0,05 mg/100 g FM. Im Gegensatz dazu stiegen die Gehalte in Chinakohl und Spitzkohl leicht an. Im Verlauf der nächsten vier Stunden sanken der Gehalt des Brokkoliansatzes auf 0,8 ± 0,05 mg/100 g FM und der des Rotkohlsatzes unter die Nachweisgrenze des Ascorbigens. Zum Probenahmezeitpunkt T3 konnte in Rotkohlproben ebenfalls keine über der Nachweisgrenze liegende Konzentration an Ascorbigen A bestimmt werden. Die bei Brokkoli und Rotkohl an T1_1 und bei Spitzkohl an T1_2 (Konzentration unter der Nachweisgrenze) kurz nach der Verarbeitung geringeren Konzentrationen an Ascorbigen als im Rohmaterial können aus einem Übergang des Ascorbigens aus dem festen Pflanzenmaterial in die umliegende ausgetretene bzw. dem Ansatz zugegebene Flüssigkeit resultieren. Es wurde nur das feste Pflanzenmaterial untersucht. In der Flüssigkeit vorhandenes Ascorbigen A ist nicht bestimmt worden. Besonders die große Menge an Wasser (370 mL), die benötigt wurde um den Brokkoli (175 g) im Fermentationsgefäß zu bedecken, kann die kontinuierliche Verringerung des Analyten erklären. Zum Fermentationsansatz des Chinakohls wurde kein Wasser hinzugegeben. Die ähnlichen Gehalte zu den Probenahmezeitpunkten T1_1 und T1_2 bestätigten diese Theorie.

In allen Proben wurde ein Wiederanstieg der Gehalte an Ascorbigen A beobachtet. Eine Ursache hierfür kann die Reaktion von Ascorbinsäure mit dem im Verlauf der Fermentation vermehrt gebildeten Glucobrassicin-Abbauprodukt Indol-3-acetonitril sein. Beispielsweise stieg der Gehalt an Indol-3-acetonitril im Brokkoliferment ab T3. Zum gleichen Zeitpunkt wurde ein Anstieg von Ascorbigen A in den Brokkoliproben verzeichnet. Über 60 % des im Brokkoli enthaltenen Glucobrassicins waren ab dem Probenahmezeitpunkt T3 abgebaut bzw. in die umgebene Flüssigkeit übergegangen. Ein weiterer Anstieg an Indol-3-acetonitril durch Neubildung aus der Hydrolyse von Glucobrassicin wurde als wenig wahrscheinlich angesehen. Vielmehr wurde eine Konkurrenz in der Bildung der beiden Produkte Indol-3-acetonitril und Ascorbigen A vermutet. Der optimale pH-Wert für die Bildung von Ascorbigen A liegt unterhalb von pH 4 [45, 106]. Die Bildung von Nitrilen wird ebenfalls bereits im leicht sauren pH-Bereich begünstigt [23]. Somit kann eine Konkurrenz in der Bildung des Abbauproduktes Indol-3-acetonitril gegenüber dem Ascorbigen A in Betracht gezogen werden. Durch die in großer Menge im Brokkoliansatz enthaltene Flüssigkeit wurde die starke Abnahme des Gehaltes an Ascorbigen A ab T13 auf die Auslaugung in die umgebene Flüssigkeit zurückgeführt.

Im Vergleich mit den anderen Pflanzen zeigte Chinakohl einen Anstieg im Gehalt an Ascorbigen A bereits 5 Stunden nach Beginn der Fermentation (T1_2). Das Maximum an Ascorbigen A war mit 0,55 ± 0,04 mg/100 g FM zu diesem Zeitpunkt erreicht. Dieses lässt sich damit in Verbindung bringen, dass der Gehalt an Glucobrassicin in einer sehr kurzen Zeit nach Beginn der Fermentation stark abnahm. Hier betrug die Abnahme an T1_2 bereits 67,68 %. Der Gehalt an dessen Abbauprodukt Indol-3-acetonitril wies zum Zeitpunkt T1_2 einen deutlichen Rückgang von 0,86 ± 0,09 mg/100 g FM

(T1_1) auf $0,69 \pm 0,03$ mg/100 g FM (T1_2) auf. Dies lässt auf eine bevorzugte Bildung von Ascorbigen A gegenüber dem Indol-3-acetonitril schließen. An T3 stieg der Gehalt bei letzterem wieder auf das Anfangsniveau ($0,86 \pm 0,04$ mg/100 g FM) und sank anschließend auf mäßig schwankende Werte um $0,7$ mg/100 g FM. Etwas zeitversetzt hierzu wurden auch bei Ascorbigen A ähnlich gering schwankende Gehalte von $0,26 \pm 0,05$ mg/100 g FM (T3), $0,29 \pm 0,03$ mg/100 g FM (T6) und $0,22 \pm 0,02$ mg/100 g FM (T13) beobachtet. Auch die Abnahme des pH-Wertes von 6,82 von T1_1 auf 3,23 an T6 kann ein Faktor der vermehrten Ascorbigen-Bildung sein.

Einen guten Einblick auf die Komplexität von Abbau- und Reaktionsprozessen gaben die analysierten Gehalte an Ascorbigen in Rotkohl und Spitzkohl. In beiden Gemüsen wurde das GSL Glucobrassicin identifiziert und quantifiziert. Das Abbauprodukt Indol-3-acetonitril konnte im Spitzkohl jedoch zu keinem Zeitpunkt der Fermentation nachgewiesen werden. Im späteren Verlauf befanden sich von den vier analysierten Gemüsen die höchsten Gehalte an Ascorbigen A im Rotkohlferment (T6: $1,34 \pm 0,05$ mg/100 g FM; T13: $1,61 \pm 0,10$ mg/100 g FM). Auch die Gehalte in Spitzkohl liegen ab dem Probenahmezeitpunkt T6 im mittleren Bereich aller untersuchter Fermente. Die verhältnismäßig hohen Verluste an Glucobrassicin im Rotkohl von T3 auf T6 um 42,98 % können sich hierbei mit dem hohen Anstieg der Ascorbigen-Konzentration von T3 auf T6 in Zusammenhang bringen lassen. Die Gehalte an Ascorbigen A in Rotkohl ($1,61 \pm 0,10$ mg/100 g FM), Spitzkohl ($1,01 \pm 0,06$ µmol/100 g FM) und in Chinakohl ($0,22 \pm 0,02$ mg/100 g FM) an Tag 13 lagen über dem des jeweiligen rohen Kohls. Dies kann aus einer Reaktion zwischen dem Abbauprodukt 3-Hydroxymethylindol, des in den Gemüsen enthaltenen Glucobrassicins, mit Ascorbinsäure unter den sauren Reaktionsbedingungen von pH 3,28 (Rotkohl), bzw. 3,34 (Spitzkohl) resultieren.

In Stabilitätstests zeigten Lagerungen von Ascorbigen-haltigen Lösungen mit pH-Werten von 3 – 6 bei 25 °C für 10 Stunden Verluste an Ascorbigen von 12 -20 % [45]. Dieser zeitlich bedingte Abbau kann die sinkenden Gehalte an Tag 20 bei allen fermentierten Gemüsen erklären.

7.2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse des Fermentationsexperiments

Das GSL-Profil der analysierten *Brassicaceae* wies im rohen Pflanzenmaterial gute Übereinstimmungen im qualitativen Vergleich mit den in der Literatur dargestellten Profilen auf. Der höchste GSL-Gehalt wurde in Brokkoli analysiert, gefolgt von Rotkohl, Spitzkohl und Chinakohl. Die Fermentationsansätze der Kohlsorten wurden über einen Zeitraum von 20 Tagen auf ihre GSL- und Abbauprodukt-Gehalte untersucht. Es wurden Proben nach einer und fünf Stunden, sowie nach 3, 6, 13 und 20 Tagen genommen (bezogen auf den Zeitpunkt der Herstellung der Fermentationsansätze).

Während der prozessbegleitenden Analyse der GSL in Rotkohl und Spitzkohl konnte eine geringere Beeinflussung der Verarbeitung und dem darauffolgenden enzymatischen Abbau auf die Gehalte des aliphatischen GSL Sinigrin beobachtet werden, als es beim ebenfalls aliphatischen Glucoiberins

7 Ergebnisse und Diskussion

beobachtet wurde. Dieser Effekt kann durch die postulierte Substratspezifität der pflanzeigenen Myrosinase begründet sein.

Durch den enzymatischen Abbau konnten in den Kohlfermenten nach 20 Tagen der Fermentation keine bzw. nur noch in Spuren vorhandene GSL nachgewiesen werden.

Für die mittels GC-MS bestimmten Abbauprodukte wurden teilweise höhere Gehalte bestimmt als für die jeweiligen GSL, aus denen diese resultieren. Es wurde erwartet, dass der Gehalt des jeweiligen GSL im rohen Pflanzenmaterial gleich oder höher des Gehaltes der daraus entstehenden Abbauprodukte ist. Die Hypothese, dass dieses zu jedem Zeitpunkt der Probenahme im Verlauf der Fermentation zutrifft, wurde nicht bestätigt. Dieses kann an einer nicht vollständigen Extraktion der GSL aus dem Pflanzenmaterial, beziehungsweise einer teilweisen Hydrolyse der GSL während der Aufarbeitung gelegen haben. In Rotkohl und Brokkoli wurden nach drei-tägiger Fermentation die höchsten Gehalte an ITCs analysiert. In Chinakohl wurde der maximale Gehalt an ITC bereits eine Stunde nach Herstellung des Fermentationsansatzes erreicht. Im Verlauf der Fermentation von Brokkoli stiegen bei sinkendem pH-Wert die Gehalte des, aus dem indolischen GSL Glucobrassicin gebildeten, Nitrils Indol-3-acetonitril. Diese Beobachtung bestätigte die, in der Literatur beschriebene, bevorzugte Nitrilbildung bei sauren Bedingungen. Der schnelle Abbau der GSL im Rot- und Chinakohl zu Beginn ließ darauf schließen, dass keine Neubildungen von Abbauprodukten aus intakten GSL zu erwarten waren. Ab Tag 3 des Fermentationsprozesses wurden geringere Gehalte der ITC bestimmt. Dieses ist auf die Flüchtigkeit dieser Verbindungen zurück zu führen. Zudem wurde der Übergang der GSL bzw. der daraus resultierenden Abbauprodukte aus dem Pflanzenmaterial in die umgebende Flüssigkeit gezeigt. Dieser führt zu geringeren GSL-Gehalten im Pflanzenmaterial, aber auch dazu, dass die Fermentationsflüssigkeit bioaktive Abbauprodukte enthält, die sich durch den Verzehr der Flüssigkeit positiv auf die Gesundheit auswirken können. Die Fermentationsflüssigkeit des Brokkoliansatzes enthielt an Tag 20 einen Gehalt von $5,48 \pm 0,032$ mg/100 g FM Sulforaphan (100 g FM entspricht 100 g Flüssigkeit). Im Pflanzenmaterial des Brokkolis wurde zum gleichen Probenahmezeitpunkt ein Gehalt des bioaktiven Erucins von $0,64 \pm 0,03$ mg/100 g FM, sowie ein Gehalt an Sulforaphan von $8,46 \pm 0,50$ mg/100 g FM analysiert. Letzteres ist aufgrund des postulierten krebspräventiven Potentials von besonderem Interesse. 2000 postulierten Gamet-Payraastre et al. in einer *in-vitro* Studie mit humanen HT29 Zellen, dass bereits 15 μ M Sulforaphan-Lösungen das Wachstum der Zellen inhibierten und ihre Anhaftung an der Platte verringerten [107]. Ein direkter Vergleich zwischen der Applizierung in *in-vitro* Studien und dem Verzehr *in-vivo* lässt sich allerdings nicht treffen, da die im Körper stattfindenden Umwandlungs- und Transportprozesse nicht berücksichtigt werden können. Gamet-Payraastre und seine Kollegen gaben zum Ausblick, dass 100 g Brokkoli etwa 40 μ mol Sulforaphan freisetzen könnte und somit womöglich lokal Konzentrationen im niedrigen mikromolaren

7 Ergebnisse und Diskussion

Bereich auftreten könnten. Sie stützten dabei ihre Annahme auf Gehalte an Sulforaphan, die bereits in der Literatur veröffentlicht sind [41, 59, 108].

Im Ferment des Chinakohls wurden nach 20 Tagen noch $0,5 \pm 0,06$ mg/100 g FM des, aus dem aromatischen GSL Gluconasturtiin gebildeten, 2-Phenylethyl-ITC analysiert, das in Zellstudien induzierend auf die Apoptose von verschiedenen Krebszellen wirkt [109]. Die in diesen Zellstudien wirksamen Konzentrationen im zweistelligen mikromolaren Bereich ließen jedoch ebenfalls die Frage offen, ob solche Konzentrationen im Zellplasma durch die Ernährung erreicht werden könnten.

Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Glucobrassicin und dem Gehalt des, aus 3-Hydroxymethylindol (Abbauprodukt des GSL Glucobrassicin) und Ascorbinsäure gebildeten, Ascorbigen A in rohem Kohl festgestellt. Je höher die Glucobrassicin-Gehalte in den rohen *Brassicaceae* waren, desto höher waren die Ascorbigen-Gehalte im entsprechenden Pflanzenmaterial. Der höchste Gehalt an Ascorbigen A ist in rohem Brokkoli mit $1,85 \pm 0,25$ mg/100 g FM bestimmt worden. In Rotkohl, Chinakohl und Spitzkohl wurden im Verlauf der Fermentation ebenfalls größere Mengen an Ascorbigen gebildet, die gegen Ende des Zeitraums der Fermentation aber wieder absanken. Die Berechnung der Gehalte ergab die höchsten Werte im Rotkohl ($1,61 \pm 0,10$ mg/100 g FM) und im Spitzkohl ($1,01 \pm 0,06$ mg/100 g FM) nach 13 Tagen Fermentation. Der pH-Wert der Ansätze war zu diesem Zeitpunkt bereits unter pH=4 gesunken. Im Fermentationsansatz des Rotkohls wurde bei steigenden Ascorbigen A-Gehalten ein dazu korrelierender Abbau an Glucobrassicin beobachtet. Am Ende des Fermentationszeitraums lag der Ascorbigen A-Gehalt im Brokkoli ($0,01 \pm 0,002$ mg/100 g FM) weit unter dem im rohen Kohl bestimmten Wert. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der Gehalt in Spitzkohl ($0,71 \pm 0,05$ mg/100 g FM) um das Zweifache des Ausgangsgehaltes während in Chinakohl ($0,14 \pm 0,002$ mg/100 g FM) und Rotkohl ($1,11 \pm 0,01$ mg/100 g FM) der Gehalt an Ascorbigen A um den Ausgangswert schwankte.

Zusammenfassend hatte der Fermentationsprozess insgesamt keine großen Auswirkungen auf die Bildung der bioaktiven ITC. Die durch Hydrolyse der GSL gebildeten ITC erreichten zu Beginn die höchsten Konzentrationen und nahmen im Verlauf der Fermentation größtenteils ab. Bezüglich des Spitzkohl- und Rotkohlferments kann eine Empfehlung des Verzehrs nach 13 Tagen Fermentation gegeben werden, da hier die höchsten Gehalte des bioaktiven Ascorbigen A bestimmt wurden.

7.3 Analyse von Glucosinolat-Abbauprodukten in humanen Matrices

Im voran gegangenen Experiment wurde beobachtet, dass eine Prozessierung GSL-haltigen Pflanzenmaterials durch Fermentation keinen großen Einfluss auf den Abbau von GSL hat. Da die meisten Gemüse jedoch nicht roh, sondern verarbeitet verzehrt werden, wurde im folgenden Teil der Arbeit dieses berücksichtigt und für eine Pilotstudie zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit und der

Ausscheidungswege von GSL-Abbauprodukten sowohl rohes als auch prozessiertes Probenmaterial verwendet. Vor der Durchführung einer solchen Studie mussten zunächst die Grundlagen für die Analytik der Abbauprodukte aus humanen Matrizes wie der Atemluft, Urin oder Plasma geschaffen werden.

7.3.1 Methodenentwicklung der Probenahme und Aufarbeitung der Atemluft

Zur Entwicklung der Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten in Atemluftproben wurde als Modellpflanze die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*) herangezogen. Die Kapuzinerkresse wurde an den Versuchsstätten des Leibniz-Instituts für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt eV, in Großbeeren, Deutschland gezüchtet und im Herbst 2014 geerntet. Die Düngung, die Bewässerung und der Pflanzenschutz entsprachen den üblichen Anbauverfahren von *Brassica* Gemüse. Vollständig entwickelte Blätter, die frei von Verletzungen oder Schädlingen waren, wurden geerntet. Das Pflanzenmaterial wurde bei -50 °C gefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde homogenisiert und zur Untersuchung eingesetzt.

Wie bereits in Abschnitt 4.5 dieser Arbeit beschrieben, wurde die Atemluftanalyse aufgrund von technischen Problemen in der Probenahme und Analyse und dem Fehlen einer Standardisierung in der klinischen Praxis noch nicht etabliert. Die Atemanalyse gestaltet sich deshalb so schwierig, weil die Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen in der Atemluft sehr gering sind. Zudem können andere Stoffwechselprodukte, die ebenfalls mit dem Atem ausgeschieden werden, die Bestimmung einzelner Stoffklassen stören.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anreicherung der GSL-Abbauprodukte durch Sorption untersucht. Hierfür standen zwei vielversprechende Systeme zur Verfügung. Zum einen wurden Anreicherungsversuche mit der *Solid Phase Microextraction (SPME)* durchgeführt und zum anderen wurde die *Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)* als Optimierung dieser Experimente verwendet. Die SPME-Fasern wurden von Supelco bezogen. Zur SBSE wurden die Twister® der Firma Gerstel KG verwendet.

Vorläufer dieser beiden Systeme war die *Open Tubular Trap (OTT)*, bestehend aus einer Kapillarsäule ähnlich zu den in der Gaschromatographie genutzten Säulen, welche mit einer 5-20 µm dicken Schicht PDMS ausgekleidet ist [67]. Die Proben wurden so lange durch die OTT gepumpt oder gesaugt bis die relevanten Analyten nicht mehr durch das PDMS zurückgehalten wurden. Anschließend erfolgte die Desorption der Analyten thermisch oder durch organische Lösungsmittel. Die geringe Probenkapazität, sowie die schlechte Handhabbarkeit und der hohe apparative Aufwand des Sammelprozesses führten zur Entwicklung der beiden genutzten Systeme SPME und SBSE [67].

7 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurden verschiedene Sorbenzien mittels SPME auf die Eignung zur Analyse von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril untersucht. Benzyl-ITC und Phenylacetonitril sind die beiden Abbauprodukte des in Kapuzinerkresse enthaltenen Glucotropaeolin. Die Sorption der aromatischen Abbauprodukte sollten an den folgenden Sorbenzien getestet werden: Polydimethylsiloxan (PDMS, 100 µm Beschichtung), eine Kombination aus Polydimethylsiloxan und Divenylbenzen (PDMS/DVB, 65 µm Beschichtung) und eine Kombination aus Divinylbenzen, Carboxen und Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm Beschichtung). Um möglichst authentisch die Anreicherung aus der Gasphase zu simulieren, wurden Kalibrierlösungen der Analyten mit einer Konzentration von 100 µmol/L auf Watte in einer Kunststoffsäule aufgebracht. Nach einer festgelegten Trocknungszeit wurde durch die Säulen auf die SPME-Fasern gepustet. Anhand dieser ersten Untersuchungen konnte geschlussfolgert werden, dass in der Beprobung von Gasen viele Variablen bestehen, die einen linearen Arbeitsbereich stören können. Als Beispiele sind die Trocknungszeit, die Verdichtung der Watte, die Wahl der Oberfläche der Säulen sowie die Stärke und Länge des Pustens in die Säulen zu nennen. In weiteren Modellen wurde statt der einfachen Watte eine Fritte aus Cellulose verwendet, wie sie in der *Solid Phase Extraction (SPE)* Anwendung findet. Um die Umspülung der Faser mit dem Analyten zu standardisieren, wurden Gassammelbehälter aus Polyvinylflourid (Tedlar® Bags) mit Atemluft befüllt. Diese wurden anschließend auf die Fasern mit den Sorbenzien entleert. Trotz dieser Optimierung konnte keine genügende Linearität der Methode erreicht werden (siehe Abbildung 42). Die Tedlar® Bags eigneten sich nur bedingt für die Analytik, da sie im Gegensatz zu vorherigen Systemen ein geschlossenes System bildeten, sich die Analyten jedoch an der Innenseite der Beutel akkumulierten. Um dieser Akkumulation entgegen zu wirken, wurden in den folgenden Experimenten 500 mL-Flachbodenglasflaschen von Duran verwendet, die den weiteren Vorteil haben, dass sie nach den Experimenten leicht zu reinigen sind und somit einer Verschleppung von Analyten in die Folgeexperimente entgegengewirkt werden konnte.

Aus Messungen mit den unterschiedlichen Sorbenzien konnten jedoch Rückschlüsse auf die Eignung eines Sorbens für die Analytik der aromatischen GSL-Abbauprodukte geschlossen werden. Die mit PDMS/DVB beschichtete Faser zeigte die höchste Sorption, jedoch auch eine sehr geringe Korrelation zwischen dem Signal und der Konzentration. Die Faser mit einer reinen PDMS-Beschichtung zeigte in der Analyse die größte Korrelation zwischen der Konzentration und dem gemessenen Signal. Das Sorbens PDMS wies damit die höchste Eignung für die Analyse auf.

PDMS weist zudem weitere Eigenschaften auf, die für die Analytik der verschiedenen GSL-Abbauprodukte vorteilhaft sind [67]. Zum einen werden die Analyten, anders als bei Adsorbenzien, nicht auf einer aktiven Oberfläche zurückgehalten, sondern in der Masse der PDMS-Phase verteilt. Da diese Sorption ein deutlich schwächerer Prozess ist als die Adsorption, kommt es seltener oder sogar

7 Ergebnisse und Diskussion

nicht zu einem Abbau instabiler Analyten. Zum anderen kann durch die geringe Interaktion mit den Analyten die thermische Desorption bei geringeren Temperaturen durchgeführt werden. Dadurch verringert sich der Verlust thermolabiler Analyten. Die Kapazität von PDMS für einen Analyten wird nicht durch die Anwesenheit großer Mengen Wasser oder anderen Analyten beeinflusst, da alle gelösten oder gasförmigen Stoffe ein eigenes Verteilungsgleichgewicht im PDMS besitzen. Ein Austausch der Analyten findet nicht statt. Ein Vorteil von PDMS gegenüber organischen Adsorbentien ist zudem, dass beim Abbau von PDMS charakteristische Silikonmassenfragmente entstehen, die bei Verwendung von massenselektiven Detektoren leicht erkannt werden.

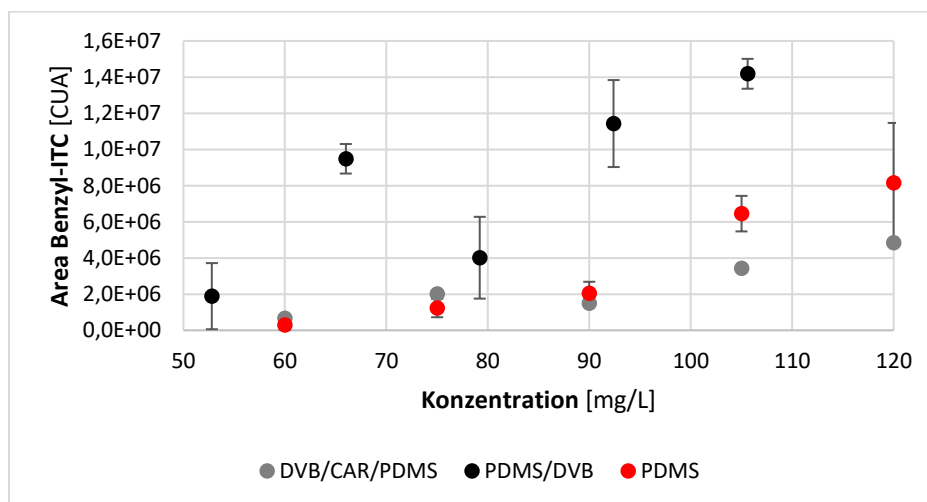


Abbildung 42: Vergleich der verschiedenen Sorbenzien der SPME in der Atemanalyse.

Bei allen Experimenten mit der SPME wurden geringe Signalintensitäten beobachtet. Grund hierfür könnte der Aufbau der Beprobung sein. Es handelte sich um ein offenes System, bei dem die Möglichkeit besteht, dass Analyten nicht direkt auf die Faser geleitet werden, sondern daran vorbeifließen. Ebenso konnte das Probenvolumen mit den verwendeten Materialien nicht fest definiert werden. Die Sorption beruht auf dem Gleichgewicht der Verteilung des Analyten zwischen der Probe und dem Sorbens. Dies erfordert daher, dass sich die Probe in einem geschlossenen und engen Raum befindet, um das Volumen genau zu bestimmen. Ebenso ist es wichtig, dass die Probe für ein schnelles Äquilibrieren gründlich gemischt wird [67]. Es wurde ein passenderes Probensammelsystem geschaffen, das mit einem definierten Probenvolumen (0,6 L) und einem besseren Durchmischungsprozess arbeitet, um diesem Prinzip gerecht zu werden. Eine größere Oberfläche und Schichtdicke des Sorbens waren ebenfalls Parameter, die für die Beprobung der Atemluft optimiert wurden. Hierfür wurden die Twister[®] herangezogen.

7 Ergebnisse und Diskussion

Die Beprobung der Atemluft erfolgte nun in 500 mL-Flachbodenglasflaschen über ein Mundstück. Dafür pusteten die Probandinnen für 20 Sekunden in das Mundstück, wobei das erste Drittel des Atems verworfen wurde (siehe Abbildung 43).



Abbildung 43: Probenahmegefäß für die Atemluft.

Zur Absicherung, dass keine Umgebungsluft in die Flasche gelangt, wurde der Auslass mit einem Gährröhrchen, gefüllt mit Wasser, verschlossen. Anschließend wurde Umgebungsluft über eine Zentrifugalpumpe für 10 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 mL pro Minute in die Flaschen gedrückt. Diese verdrängte damit die gesammelte Atemluft, die über den Gerstel Twister® geleitet wurde (Abbildung 44). Die Analyten wurden dadurch vom PDMS sorbiert. Nach Ablauf der 10 Minuten wurde der Twister® mit einem fussselfreien Tuch zum Entfernen von letzten Feuchtigkeitsresten abgetupft und zur Lagerung bis zur Messung in Injektionsfläschchen gefüllt.

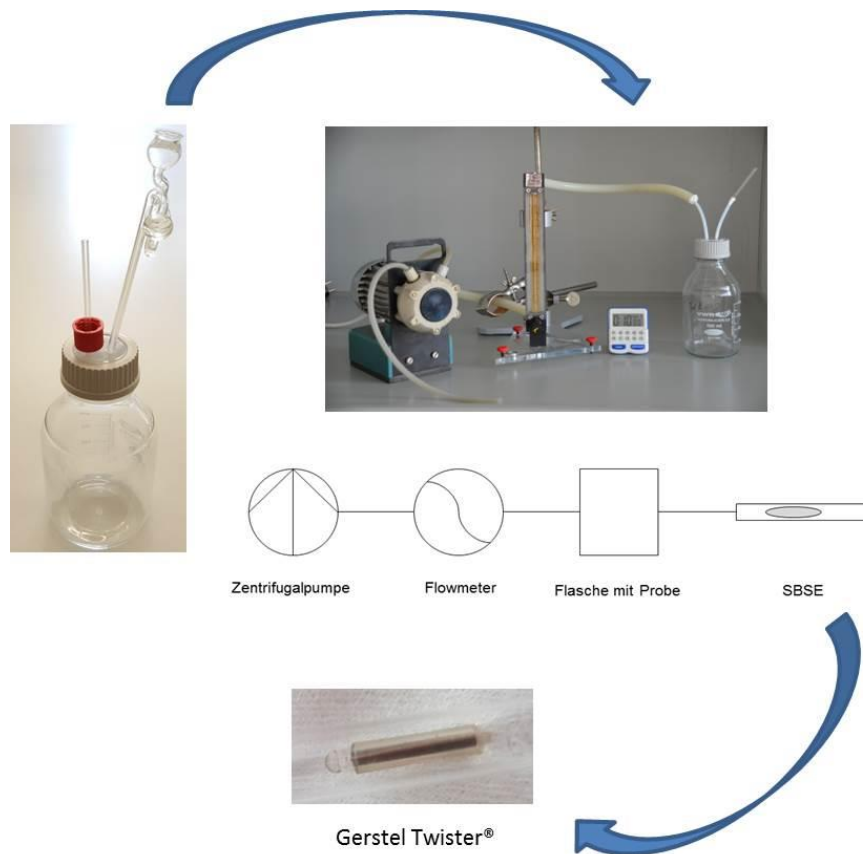


Abbildung 44: Überführung der Analyten in der Atemluft aus dem Probengefäß auf den Twister am Auslass der des Probengefäßes.

Zur gaschromatographischen Analyse der Atemluft auf die GSL-Abbauprodukte Benzyl-ITC und Phenylacetonitril wurde eine SBSE-TD-GC-MS/MS Methode entwickelt. Die Methodenparameter sind in Abschnitt 6.2 (Tabelle 7, Tabelle 8) aufgeführt.

7.3.2 Methodenentwicklung zur Aufarbeitung von Plasma- und Urinproben

Angelehnt wurde die Aufarbeitung der Humanproben Blutplasma und Urin an der Extraktion der GSL-Abbauprodukte aus Pflanzenmaterial. Im Unterschied zu dem in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenmaterial enthält Blutplasma einen höheren Anteil an Proteinen. Diese und andere Nucleophile können mit den Abbauprodukten, vor allem den ITC, reagieren und damit die Quantifizierung mittels GC stören. Urin hingegen enthält bei gesunden Menschen nur geringe Mengen an Proteinen und Aminosäuren, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch analog zu den Blutplasmaproben aufgearbeitet. Wo im Pflanzenmaterial zur Quantifizierung der GSL-Abbauprodukte bisher eine Extraktion mit DCM ohne vorherige Entfernung von Proteinen erfolgte, wurde bei den Plasma- und Urinproben nun eine Fällung der Proteine vor der Extraktion untersucht.

Die Optimierung der Aufarbeitung begann mit der Auswahl eines optimalen Fällungsmittels zur Entfernung der Proteine im Urin und Plasma. Dabei wurden zwei Wege verfolgt: die Fällung mit

7 Ergebnisse und Diskussion

Lösungsmittel und die Säurefällung. Eine üblicherweise eingesetzte Säure in der Proteinfällung ist die Trichloressigsäure (TCA). Diese wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ausgewählt. Prinzip der Fällung mit TCA ist ein Wasserentzug durch das eingesetzte Fällungsmittel [110]. Diese Fällung stellt eine Aussalzung der Proteine aus einer Lösung dar. Durch den Entzug der Wassermoleküle durch Bildung einer Hydrathülle um die TCA, nehmen die Wechselwirkungen der verbleibenden Wassermoleküle mit den Proteinen ab. Damit verringert sich die Löslichkeit der Proteine und sie treten als Niederschlag aus der Lösung aus [110].

Eine Fällung mit 300 μL einer 10 %igen TCA-Lösung zeigte im Chromatogramm eine Überlagerung des Peaks des ISTD mit Verschleppungen des Fällungsmittels. Es konnte keine eindeutige Identifizierung und Zuordnung dieser Standardsubstanz erfolgen (Abbildung 45).

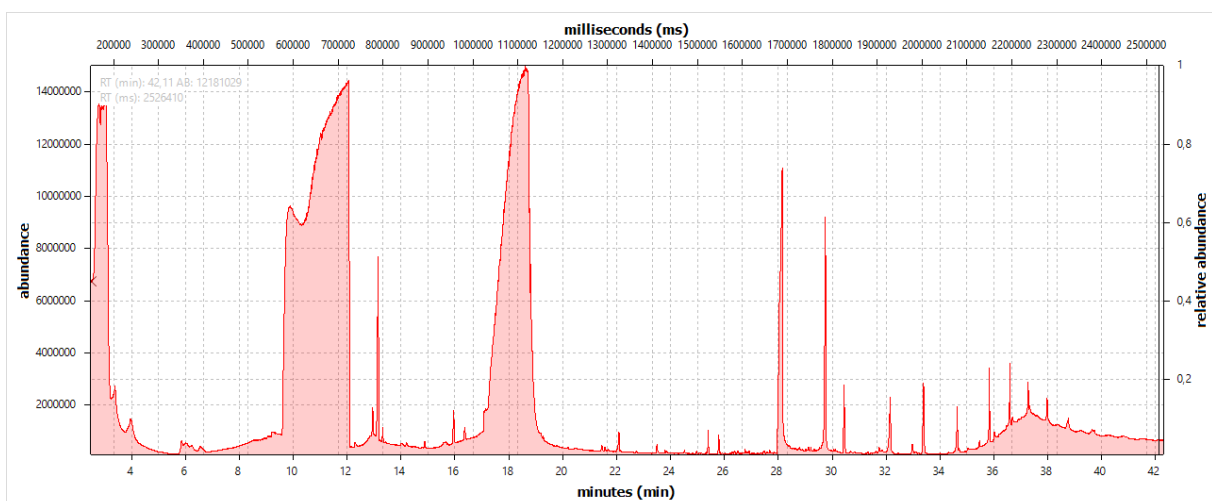


Abbildung 45: Chromatogramm des Multistandards, Fällung der Proteine aus dem Blutplasma mittels 10 %iger TCA.

Die Konzentration der TCA-Lösung wurde in folgenden Experimenten auf 5 % reduziert. Zudem wurde das Volumen der Säurezugabe variiert. Die Proben wurden mit 100 und 50 μL der 5 %igen Lösung versetzt und aufgearbeitet. Die Reduzierung der Konzentration bewirkte eine Reduktion der Überlagerung des ISTD. Die verschiedenen Volumina zeigten ebenfalls eine Veränderung im Chromatogramm. Bei einer Aufarbeitung mit 50 μL 5 %iger TCA-Lösung konnte eine verbesserte Peaktrennung erzielt werden. Zudem wurde eine genauere Zuordnung der Standards im Chromatogramm erreicht, da diese nicht mehr überdeckt waren. Bei der Aufarbeitung mit 100 μL 5 %iger TCA-Lösung wurde beobachtet, dass die Standards schlechter mit der stationären Phase interagiert hatten und die Peaktrennung schlechter war als in der Aufarbeitung mit dem geringeren Volumen des Fällungsreagenz (siehe Anhang A3-6, Abbildung 58). Der ISTD wurde dabei immer noch überlagert. Die TCA ist durch ihre stark hygroskopische Eigenschaft sehr gut geeignet um Proteine zu fällen [111]. Ihr niedriger pH-Wert kann bei Verschleppung während der Aufarbeitung jedoch Schäden

an der Kapillarsäule verursachen oder durch das Herauslösen von Stoffen aus den zur Aufarbeitung benutzten Materialien Verunreinigungen in das System bringen. Die Überlagerung der Peaks im Bereich des ISTD wurde auf eine Verschleppung der TCA und andere während der Aufarbeitung mitgeführte Verunreinigungen zurückgeführt. Beide Substanzen unterscheiden sich nur geringfügig in ihrem Siedepunkt. Die TCA hat einen Siedepunkt von 196 °C, während der ISTD bei 191 °C siedet [111]. Aufgrund ihrer geringen Größe und ähnlicher Siedepunkte zeigen beide Substanzen eine ähnliche Verteilung in der chromatographischen Auftrennung mittels GC und können sich somit überlagern. Die Retentionszeiten können sich dabei in einem Gemisch etwas verschieben, da diese temperaturabhängig sind. Diese Beobachtung führte zum Ausschluss von TCA als Fällungsmittel in dieser Methode.

Die Fällung der Proteine mit 300 µL eines eisgekühlten organischen Lösungsmittels wurde in parallel verlaufenden Experimenten anhand des Acetonitrils (ACN) analysiert. Dieses wird häufig in der Proteinfällung in biologischer Matrix wie beispielsweise in Serum verwendet [112]. Das Acetonitril verringert die Dielektrizitätskonstante der Probenlösung und erhöht so die Anziehungskräfte zwischen geladenen Molekülen. Dadurch sinkt die Löslichkeit der Proteine in der wässrigen Lösung und durch Zusammenballung dieser, fallen sie aus der Lösung aus und setzen sich als Niederschlag ab [113].

Die Aufarbeitung mit dem eiskühlten Acetonitril und eine Extraktion mit DCM bewirkte eine Fokussierung der Standards sowie eine bessere Auftrennung und Auflösung (Anhang A3-7, Abbildung 59). Aufgrund der geringen Siedetemperatur von 82 °C [111] würde es bei einer Verschleppung in den Extrakt zu einem frühen Zeitpunkt eluiert werden und wäre dadurch im Bereich der Standards im Chromatogramm nicht mehr sichtbar. Diese optimierte Aufarbeitung wurde für alle Plasma- und Blutproben angewandt.

7.3.3 Aufbau und Hintergrundinformationen der Humanstudie

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte humane Interventionsstudie diente der Untersuchung des Beitrages der einzelnen Metabolisierungs- und Exkretionswege von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril und ihren Metaboliten und Reaktionsprodukten nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse und Kapuzinerkresse-haltigen Produkten. Ebenso sollte die Durchführbarkeit der analytischen Ansätze demonstriert werden. Bekannt ist bereits, dass ITC über den Mercaptursäure-Stoffwechselweg metabolisiert und über den Urin ausgeschieden werden. Aufgrund ihrer Reaktivität sind sie jedoch auch im Stande mit nukleophilen Substanzen Konjugationen einzugehen [114]. Die Nitrile als zweites Hauptabbauprodukt von GSL sind vergleichsweise unreaktiv und es sind bislang keine Erkenntnisse über eine Metabolisierung gewonnen worden. Eine Ausscheidung als nicht-konjugiertes Abbauprodukt über den Urin ist daher wahrscheinlich. Nitrile und ITC sind leicht flüchtige Verbindungen, wodurch ihre Ausscheidung über die Atemluft ebenso möglich erscheint. Aus bisherigen Kenntnissen

7 Ergebnisse und Diskussion

verschiedener Studien und den bereits erläuterten Annahmen kann das folgende Schema von möglichen Metabolisierungs- und Ausscheidungswegen von GLS und ihren Abbauprodukten im menschlichen Organismus abgeleitet werden:

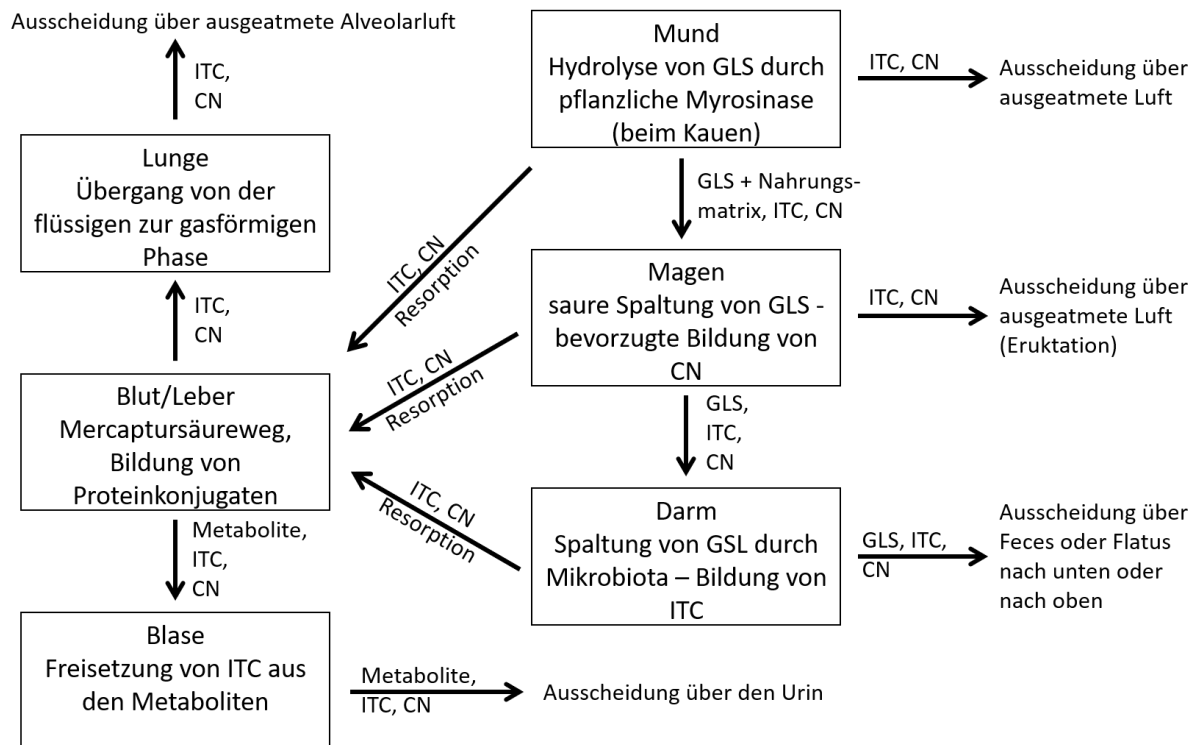


Abbildung 46: mögliche Metabolisierungs- und Exkretionswege von GSL und ihren Abbauprodukten im menschlichen Organismus nach [115].

Im Folgenden werden zwei mögliche Exkretionswege näher betrachtet: die Ausscheidung der nicht-konjugierten Abbauprodukte Benzyl-ITC und Phenylacetonitril über das Blutplasma und den Urin, sowie deren Ausscheidung über den Atem. Die Probenahmen wurden am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke durchgeführt. Vor Beginn wurde die Studie durch das Ethikkomitee der lokalen Behörde (Klinische Studien Brandenburg, Potsdam) begutachtet und unter der Zulassungsnummer 24/2011 freigegeben. Die Durchführung erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Es nahmen 7 gesunde, weibliche Probanden im Alter von 26 bis 61 teil. Alle Probandinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Genauere Angaben zu den Teilnehmerinnen sind in Tabelle 46 aufgeführt.

7 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 46: Charakteristika der Teilnehmerinnen der Interventionsstudie.

	Alle	Kapuzinerkresse-Suspension	mit Kapuzinerkresse angereichertes Brot
Teilnehmer	7	4	3
Alter	26 - 61	26 - 61	28 - 58
Körpergewicht [kg]	55 - 82	56 - 82	55 - 72
Körpergröße [m]	1,58 - 1,83	1,58 - 1,82	1,58 - 1,83
BMI [kg/m²]	19 - 28	19 - 28	19 - 25

Die Probandinnen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 verzehrte 10 g gefriergetrocknete Kapuzinerkresse als Suspension in 200 mL Wasser. Gruppe 2 wurde ein mit Kapuzinerkresse angereichertes Weizenmischbrot dargebracht, von dem 50 – 150 g verzehrt werden sollten (siehe Abbildung 47 und Abbildung 48).

Der Basisteig für das mit Kapuzinerkresse angereicherte Brot enthielt 41 % Weizenmehl, 30 % Wasser, 8,5 % Roggenmehl, 18 % Sauerteig, 1,5 % Salz und 1,2 % Hefe. In 500 g Teig wurden anschließend 60 g frische Kapuzinerkresseblätter (grob geschnitten, 2 x 2 cm) eingearbeitet. Dieser Schritt erfolgte vorsichtig, damit eine Zerstörung des Pflanzenmaterials vermieden wurde. Der fertige Teig ruhte für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur und ging weitere 40-50 Minuten in einer Fermentationskammer auf, bevor er für 40 Minuten bei 230 °C gebacken wurde. Das Brot wurde mit 10,7 % Kapuzinerkresse angereichert und enthielt $1,76 \pm 0,12$ mg/100 g Glucotropaeolin, $0,37 \pm 0,045$ mg/100 g Benzyl-ITC und $0,88 \pm 0,047$ mg/100 g Phenylacetonitril.



Abbildung 47: mit Kapuzinerkresse angereichertes Weizenmischbrot zum Verzehr im Rahmen der Pilotstudie zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus humanen Matrices.

Für die Suspension wurden 10 g gefriergetrocknete Kapuzinerkresse in ein Schraubdeckelglas eingewogen, mit 200 mL Wasser verrührt und bei geschlossenem Deckel 30 min. stehen lassen, bevor die Probandinnen die Suspension zu sich nahmen. Eine Probe von 200 mg der gefriergetrockneten Kapuzinerkresse wurde wie in Abschnitt 6.1.1 beschrieben in einer Dreifachbestimmung aufgearbeitet und analysiert.

7 Ergebnisse und Diskussion

Das für die Studie verwendete Pflanzenmaterial enthielt $7,00 \pm 0,16$ mg/100 g Glucotropaeolin, $284,5 \pm 56,8$ mg/100 g Benzyl-ITC und $9,14 \pm 0,0586$ mg/100 g Phenylacetonitril. Die absoluten Mengen an Glucotropaeolin, Benzyl-ITC und Phenylacetonitril, die von den Probandinnen aufgenommen wurden sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 47: Absolute Mengen an Glucotropaeolin, Benzyl-ITC und Phenylacetonitril, die von den Probandinnen in der Pilotstudie aufgenommen wurden.

	Glucotropaeolin [μ mol]	Benzyl-ITC [μ mol]	Phenylacetonitril [μ mol]
Kapuzinerkresse-Suspension	$1,71 \pm 0,04$	$190,7 \pm 38,1$	$0,78 \pm 0,05$
Mit Kapuzinerkresse angereichertes Brot	$4,32 \pm 0,32$	$2,48 \pm 0,30$	$7,52 \pm 0,40$



Abbildung 48: Suspension aus 10 g gefriergetrockneter Kapuzinerkresse zum Verzehr im Rahmen der Pilotstudie zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus humanen Matrices.

Die Probandinnen starteten mit einer 2-wöchigen „Auswasch“-phase, in der ein Verzehr von GSL-haltigem Essen vermieden werden sollte. Als Hilfestellung erhielten sie eine Liste mit zu vermeidenden Lebensmitteln. Am ersten Tag der Studie wurde den Teilnehmerinnen nüchtern (fasten über Nacht) Blut entnommen. Zudem gaben sie je eine Urin- und Atemprobe ab. Anschließend wurden die Probandinnen in die oben aufgeführten zwei Gruppen aufgeteilt.

In den jeweiligen Gruppen verzehrten die Probandinnen das angereicherte Brot bzw. die Suspension und nach festgelegten Zeiten nach dem Verzehr wurden Urin, Blut und Atemluft beprobt. Das genaue Beprobungsschema ist im Folgenden dargestellt. Das x stellt die jeweilige Probenahme zum Zeitpunkt nach dem Verzehr dar.

Zur Gewinnung des Plasmas wurden direkt nach der Probenahme die Blutproben zentrifugiert, dieses anschließend aliquotiert und bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Aliquotierung der Urinproben erfolgte analog der Plasmaproben. Die Atemproben wurden direkt im Anschluss an die Beprobung auf

7 Ergebnisse und Diskussion

die Twister überführt und diese bis zur Analyse (innerhalb von 24 h) in Glasvials mit Schraubverschluss bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 48: Schema zur Beprobung von Blut, Urin und Atemluft nach Verzehr von Kapuzinerkresse bzw. einem mit Kapuzinerkresse angereicherten Weizenmischbrot.

	Zeitpunkt nach dem Verzehr [Stunde]	Beprobung von:		
		Blut	Urin	Atem
Tag 1	0	x	x	x
	Verzehr von Kresse bzw. Brot			
	10 Minuten			x
	30 Minuten			x
	1	x		x
	3	x		x
	4		x	
	5	x		x
	6		x	
Tag 2	24	x	x	x
Tag 3	48	x	x	x

7.3.4 Ergebnisse und Diskussion der Humanstudie

Durch die gesundheitsfördernden Effekte der GSL-Abbauprodukte sind auch die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus dieser Abbauprodukte im humanen Organismus von besonderem Interesse für die Forschung. In vielen Studien wird der Fokus auf die ITC und ihre Ausscheidung als Mercaptursäuren gelegt [116, 117]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass vor allem die ITC, für diese antibakteriellen oder antikanzerogenen Effekte verantwortlich sind und somit mehr Beachtung in der Forschung bekommen. Die Datenlage zur Bioaktivität und dem Metabolismus anderer Abbauproduktklassen wie den Nitrilen oder EPT, zu möglichen Transformationen (z.B. in Form von Proteinkonjugaten) oder zu Ausscheidungswegen (z.B. durch Exhalation) ist indes sehr gering. Diese sind jedoch ebenso von Bedeutung bei der Betrachtung des Gesamtprozesses, beginnend mit der Aufnahme von GSL in den Organismus, dem Metabolismus oder der Akkumulation sowie der letztendlichen Ausscheidung dieser und anderer relevanter Substanzen. Die Erkenntnisse über das Verhalten und die Wirkorte von GSL und deren jeweiligen Abbauprodukten im menschlichen Organismus ist Grundlage für die Erweiterung des Wissens über mögliche gesundheitsfördernde oder auch nachteilige Effekte nach dem Verzehr von

7 Ergebnisse und Diskussion

Brassicaceae. Ebenso wichtig können diese und weitere Erkenntnisse als Grundlage für eine mögliche pharmazeutische Applikation sein [118].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte humane Interventionsstudie demonstrierte, dass sich neben den bereits genannten Mercaptursäuren auch Benzyl-ITC-Proteinkonjugate im Plasma formen und dass die Ausscheidung von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril nicht nur über den Urin erfolgt, sondern auch über die Atemluft [115]. Der Schwerpunkt der folgenden Ausführungen liegt jedoch nur in der Betrachtung der nicht-konjugierten Abbauprodukte Phenylacetonitril und Benzyl-ITC und ihrer Ausscheidung über die Atemluft und den Urin.

Ergebnisse der Atemluftuntersuchungen

Die Studie zeigte, dass nach dem Verzehr der Kapuzinerkresse-Suspension Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in der Atemluft ebenso detektierbar waren wie nach dem Verzehr des mit Kapuzinerkresse angereicherten Brotes. Je nach Verzehrart und Probandin wurden unterschiedliche Konzentrationsverläufe der Analyten beobachtet. Bei den Probandinnen, die das Brot verzehrten, erfolgte die hauptsächliche Ausscheidung von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in der ersten Stunde nach dem Verzehr, mit maximalen Konzentrationen nach 10 bzw. 30 min. Benzyl-ITC wurde als hauptsächliches Abbauprodukt im Atem analysiert (0,01 – 13,04 nmol/L). Phenylacetonitril wies deutlich geringere Mengen in der Atemluft auf (0,01 – 0,21 nmol/L). Ein so deutliches Schema wie bei den Probandinnen, die das Brot zu sich nahmen, konnte bei den Probandinnen, die die Kapuzinerkresse-Suspension tranken, nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich bei jeder Probandin ein individueller Verlauf der Konzentrationen. Maximale Konzentrationen wurden zwischen 10 min und 24 h nach dem Verzehr analysiert. Diese lagen bei Benzyl-ITC bei 0,03 – 5,89 nmol/L und bei Phenylacetonitril bei 0,01 – 15,66 nmol/L. In den Atemproben von zwei Probandinnen war Phenylacetonitril das hauptsächlich detektierte Abbauprodukt. Bei den anderen beiden Probandinnen wurde ähnlich zu der Gruppe, die das Brot verzehrt hatte, zu einem Großteil Benzyl-ITC analysiert.

7 Ergebnisse und Diskussion

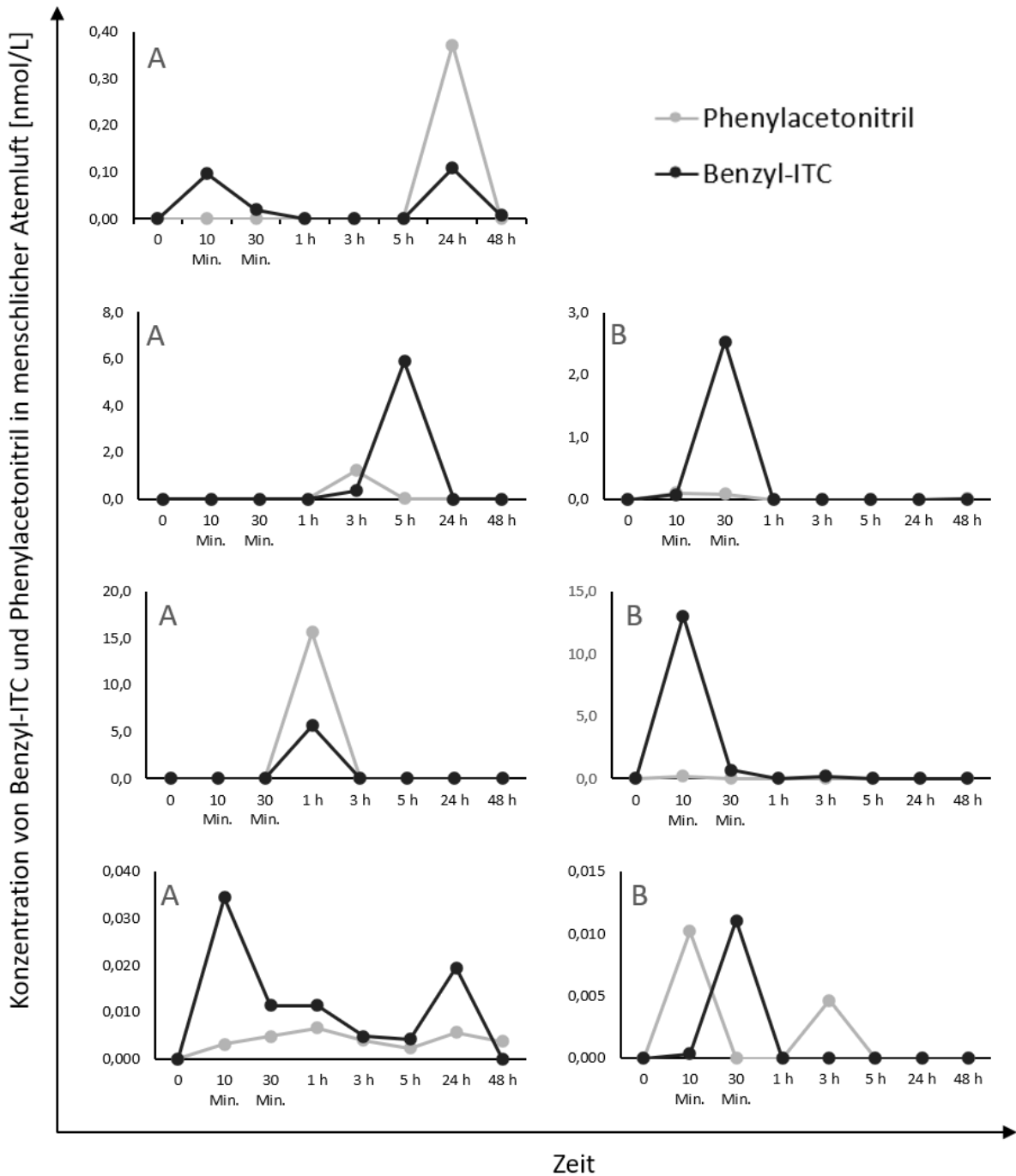


Abbildung 49: zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in Atemluft der Probandinnen nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse in Form von einer Suspension (A) bzw. eines angereicherten Brotes (B).

Ergebnisse der Urinuntersuchung

Ein anderes Bild zeigte sich in den Urinproben der Probandinnen. Benzyl-ITC wurde als einziges Abbauprodukt von Glucotropaeolin in den Proben aller Probandinnen detektiert. Sowohl in den Proben aus dem Brotverzehr, als auch in den Proben aus dem Verzehr der Kapuzinerkresse-Suspension wurde Benzyl-ITC noch 48 h nach dem Verzehr detektiert. Die höchsten Konzentrationen wurden im

7 Ergebnisse und Diskussion

Bereich von 4 – 24 h erreicht. Einzig bei einer Probandin der Gruppe, die das angereicherte Brot verzehrt hatten, wies die Urinprobe nach 24 h die höchste Konzentration an Benzyl-ITC auf. Die höchsten Konzentrationen im Urin der anderen zwei Mitglieder dieser Gruppe wurden nach 4 Stunden analysiert. In der Gruppe, die eine Kapuzinerkresse-Suspension verzehrt hatte, wurden die höchsten Konzentrationen im Urin 4 Stunden (9,19 $\mu\text{mol/L}$) beziehungsweise 6 Stunden (4,43 $\mu\text{mol/L}$) nach dem Verzehr quantifiziert. Die höchste Konzentration in der Gruppe, die das angereicherte Brot verzehrt hatte, lag nach 4 Stunden bei 7,40 $\mu\text{mol/L}$.

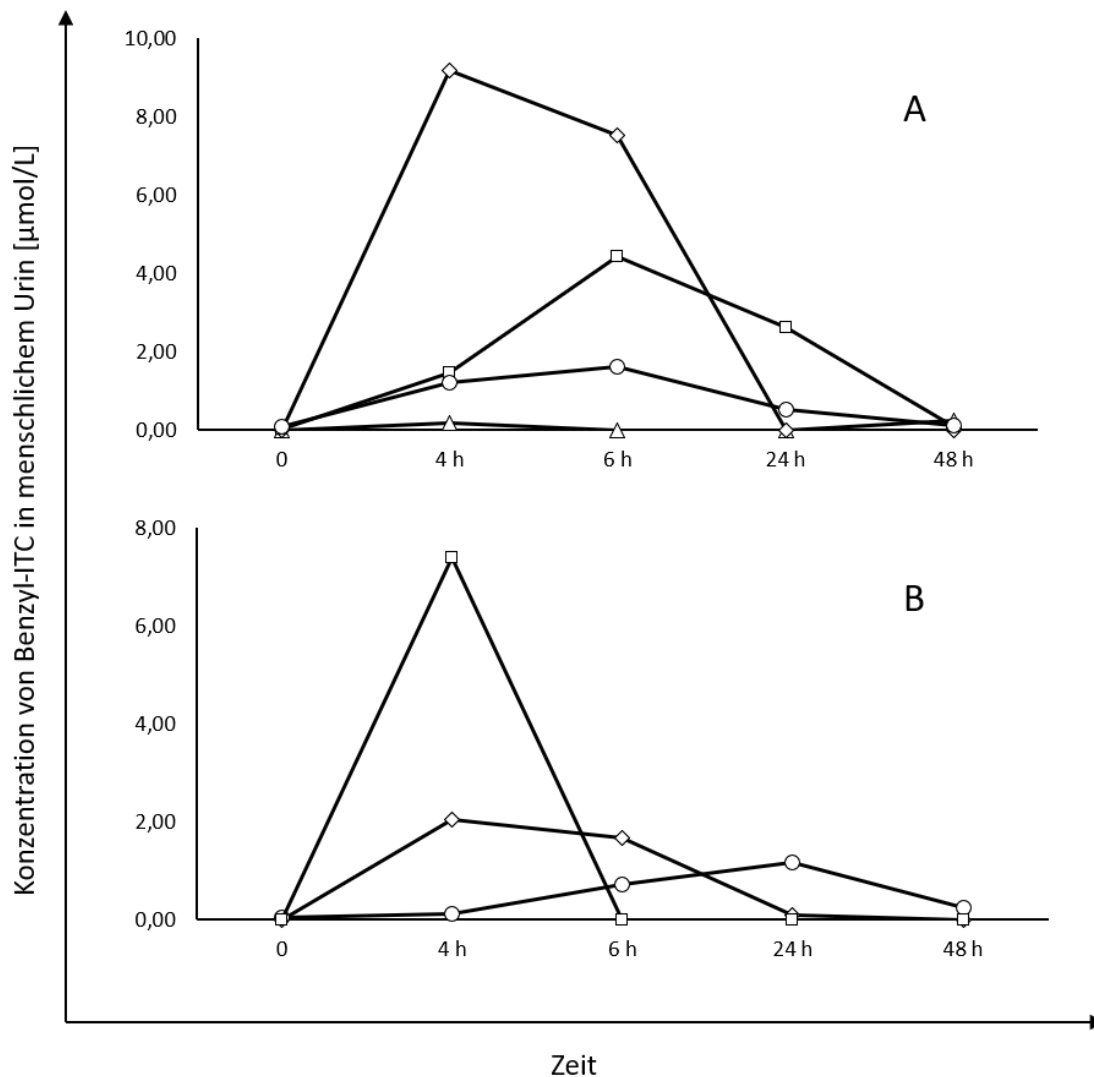


Abbildung 50: zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Benzyl-ITC im Urin der Probandinnen nach dem Verzehr von Kapuzinerkresse in Form von einer Suspension (A) bzw. eines angereicherten Brotes (B).

Ergebnisse der Blutplasmauntersuchungen

Benzyl-ITC ist bereits in voran gegangenen Studien im Blutplasma von humanen Probanden nach dem Verzehr von Kresse in Form seiner Mercaptursäuren analysiert worden [116]. Aufgrund des sehr

7 Ergebnisse und Diskussion

elektrophilen Kohlenstoffatoms in der N=C=S-Gruppe gehen ITC Reaktionen mit nukleophilen Substanzen wie Glutathion oder Nukleinsäuren [114]. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass Benzyl-ITC zusätzlich zu der Metabolisierung als Mercaptursäuren, Konjugate mit den im Blut enthaltenen Proteinen eingeht und daher nicht in seiner nicht-konjugierten Form beobachtet wird. Diese Hypothese konnte bestätigt werden. Anders als in den Matrices Atem und Urin, konnten im Blutplasma oberhalb der Nachweisgrenze weder Benzyl-ITC noch Phenylacetonitril im nicht-konjugierten Zustand analysiert werden.

Einfluss der Verarbeitung auf die Analytenaufnahme

Ein Bestandteil der Studie war es den Einfluss des Verarbeitungsgrades der beiden Kapuzinerkressequellen auf die Resorption und die Ausscheidung im Körper zu betrachten. Dass die Verarbeitung einen Einfluss auf die anfänglichen Gehalte von Glucotropaeolin und seinen Abbauprodukten Benzyl-ITC und Phenylacetonitril hat, zeigte sich bereits in der Analyse der beiden Darreichungsformen (Abbildung 51). Während in der Kapuzinerkresse-Suspension hauptsächlich Benzyl-ITC mit einem Gehalt von 98,7% analysiert wurde (daneben 0,4% Phenylacetonitril, 0,9% Glucotropaeolin), lag im angereicherten Brot Phenylacetonitril mit 52,2% vorrangig als Abbauprodukt vor (Tabelle 47). Benzyl-ITC wurde in geringeren Mengen gebildet (17,3%). Die bevorzugte Bildung eines Abbauproduktes gegenüber dem anderen war im Brot nicht so stark ausgeprägt wie in der Suspension. Auch war deutlich mehr Glucotropaeolin (30,2%) nachweisbar als in der Suspension.

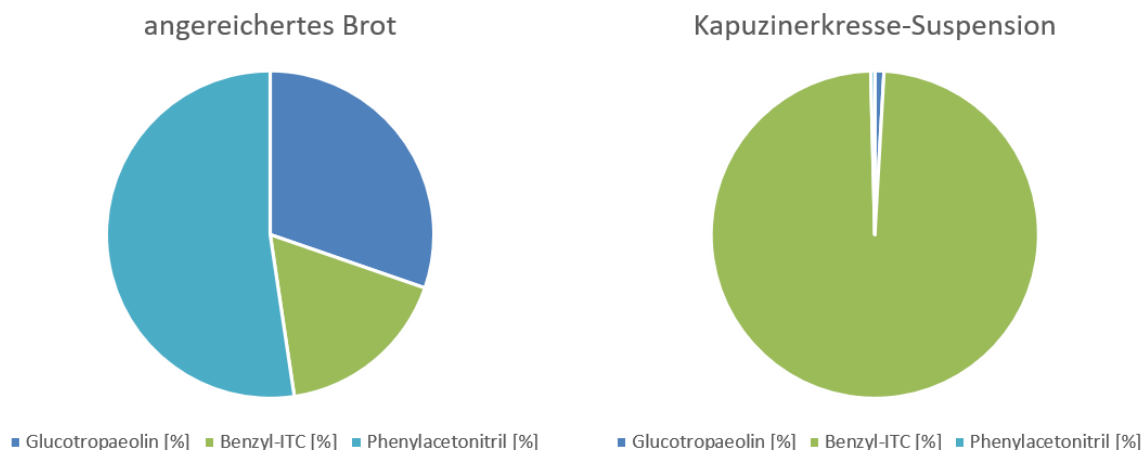


Abbildung 51: Prozentuale Verteilung der Analyten im angereicherten Brot und der Kapuzinerkresse-Suspension.

Als Grund für diese verschiedenen Ergebnisse ist die unterschiedliche Art der Hydrolyse bzw. der dabei vorherrschenden Bedingungen zu nennen. Die Myrosinase bleibt während des Lyophilisierens intakt. Dieses und der nahezu neutrale pH-Wert in der Kapuzinerkresse-Suspension führen zu einer vorrangig enzymatischen Hydrolyse, die die Formation von Benzyl-ITC begünstigt [11]. Der Backprozess ist

7 Ergebnisse und Diskussion

deutlich komplexer. Zunächst wird durch das Einbringen der Blätter (mechanische Zerstörung des Pflanzenmaterials) in den Teig der Abbau des GSL enzymatisch initiiert. Während der Erhitzung des Teiges im Ofen wird die Myrosinase inaktiviert und es folgt eine thermisch induzierte Hydrolyse des Glucotropaeolins, die die Bildung von Nitrilen begünstigt [94, 119, 120]. Nur 7,5 % der möglichen Ausgangsmenge an Abbauprodukten verblieb nach dem Backprozess im Brot erhalten. Gründe hierfür können die Evaporation der leicht flüchtigen Abbauprodukte während des Backens und eine mögliche Konjugation des Benzyl-ITC an Matrixbestandteilen wie Proteinen, Lipiden oder Ballaststoffen sein [15, 40, 121, 122].

Die folgende graphische Auftragung der Abbauprodukte von Kapuzinerkresse in den verschiedenen Verarbeitungsstufen verdeutlicht noch einmal diese beschriebenen Prozesse und den damit verbundenen Verlust an bioaktiven Abbauprodukten. Die Daten wurden zur Verfügung gestellt von Rebecca Klopsch vom Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) in Groß Beeren.

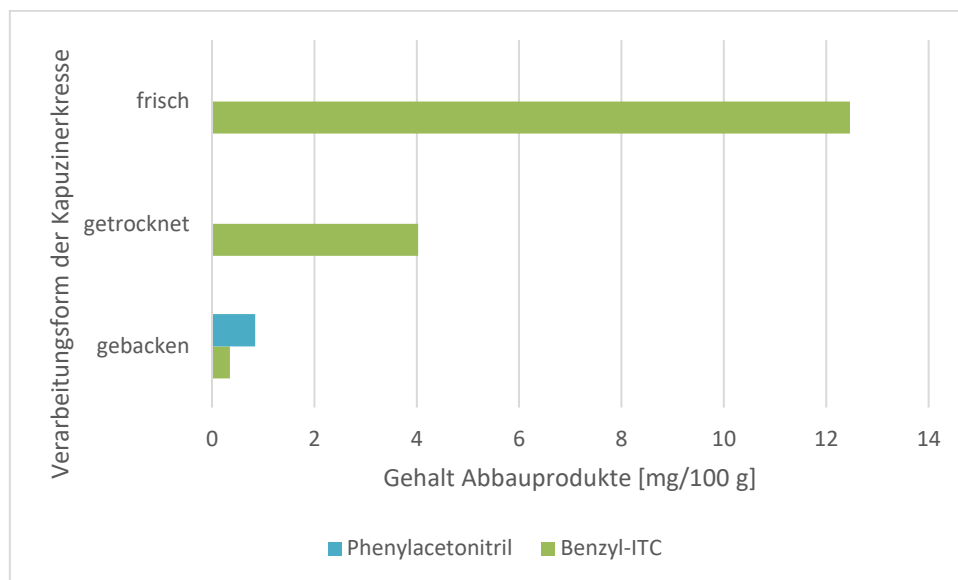


Abbildung 52: Vergleichende Darstellung des Analytenprofils bei unterschiedlicher Verarbeitung von Kapuzinerkresse.

Einen Vergleich zwischen frischen und verarbeiteten Lebensmitteln am Beispiel von Brokkoli zog die Studie von Saha et al. im Jahr 2012. Sie zeigte enge Beziehung zwischen der Verarbeitung eines Lebensmittels und der Verfügbarkeit von GSL und ihren Abbauprodukten. Schonendes kochen von frischen Brokkoliröschen führte zu einem Abbau des Glucoraphanins und merkbar Mengen an Sulforaphan, wohingegen die gleiche Vorgehensweise bei konventionell hergestellten, tiefgekühlten Brokkoliröschen zu keiner Bildung von Sulforaphan führte. Beim Verzehr von Letzterem wurde nur eine geringe Menge an Sulforaphan im Urin ausgeschieden (im Mittel rund 5 %) [123]. Saha et al. begründeten ihre Beobachtungen damit, dass kommerziell tiefgekühlter Brokkoli durch das kurze

7 Ergebnisse und Diskussion

Blanchieren vor dem Einfrieren keine Thio-Glucosidase-Aktivität aufweist und somit kein Sulforaphan gebildet werden kann [123].

Ein zweiter Faktor in der Bewertung der Messdaten der vorliegenden Humanstudie sind die Probanden. Je nach Alter, Ernährungsweise und individuellem Metabolismus, können Unterschiede in den Ergebnissen auftreten. Je nach Individuum kann die Aktivität oder das Volumen der Verdauungssäfte variieren [124]. Auch der pH-Wert der Magensäure variiert je nach Ernährungsweise bzw. dem Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme [124]. Aufgrund der geringen Probandenanzahl und der einfachen Ausgestaltung der Studie konnten hier jedoch keine gesicherten Erkenntnisse erhalten werden.

Einfluss der Essgewohnheit auf die Aufnahme von GSL und ihren Abbauprodukten

Neben dem individuellen Metabolismus der Probandinnen und der unterschiedlichen Analytenmenge und -art in den beiden Darreichungsformen, ist die Art und Weise ihres Verzehrs von Bedeutung für die vorliegenden Daten. Die Suspension wurde zügig verzehrt, wohingegen das Brot für eine kurze Zeit gekaut wurde und daher länger im Mund blieb als die Suspension. Ein längerer Verbleib im Mund, verbunden mit der mechanischen Verletzung des Pflanzenmaterials durch das Kauen, kann zu einer Freisetzung von Abbauprodukten aus dem Brotteig führen, die direkt ausgeatmet werden. Dieses wird durch den starken Anstieg an Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in den Atemproben in den ersten 10 Minuten bis zu einer halben Stunde nach dem Verzehr deutlich (Abbildung 49). Durch den im Vergleich schnelleren Verzehr der Suspension, könnten die Abbauprodukte und die geringe Menge intaktes GSL in den Magen gelangen, ohne im Mund signifikant verändert zu werden. Zwei der vier Probandinnen, die die Suspension verzehrt hatten zeigten keinerlei Anstieg in der Konzentration der Analyten in der ersten halben Stunde nach dem Verzehr. Bei allen Probandinnen dieser Gruppe konnte ein Anstieg der Konzentration der Analyten über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die beiden Analyten Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in den Gastrointestinaltrakt gelangten, dort resorbiert und im Verlauf des Versuches wieder über die Atemluft ausgeschieden wurden. Allerdings wiesen die Messungen von zwei der Probandinnen bereits erhöhte Konzentration der Analyten 10 Minuten nach dem Verzehr auf. Das könnte auf ein unterschiedliches Trinkverhalten der einzelnen Probandinnen hinweisen, bei dem die betreffenden Personen die Suspension nicht zügig verzehrten, sondern länger im Mund behielten.

Anteil der Atemluft an möglichen Ausscheidungswegen

Tierstudien an Ratten und Mäusen, in denen die Ausscheidung von ITCs über die Atemluft mit Gehalten von 3 – 30 % innerhalb von 24 Stunden nach dem Verzehr beobachtet wurde [125, 126] unterstützen die Hypothese der Resorption im Gastrointestinaltrakt. Bereits 1970 wurde bei Untersuchungen zum Hepatoxin α -Naphthylisothiocyanat in Ratten dessen Ausscheidung über die Atemluft beobachtet [125].

7 Ergebnisse und Diskussion

Hierfür wurde das Hepatoxin radioaktiv markiert und die Radioaktivität in allen Ausscheidungsprodukten, darunter der Atemluft, untersucht. Etwa 80 % der verabreichten Menge Hepatoxin wurden nach 72 Stunden über die Atemluft, den Urin und die Faeces ausgeschieden. Der Anteil an radioaktivem Material in der Atemluft lag bei 30 % [125]. Eine weitere Studie von Ioannou et al. (1984) beschäftigte sich mit dem Verbleib von Allylisothiocyanat im Organismus von Ratten nach oraler oder intravenöser Gabe [126]. Die Detektion erfolgte analog zur bereits aufgeführten Studie von Capizzo und Roberts über die radioaktive Markierung des Kohlenstoffatoms der NCS-Gruppe. Nach diesen Untersuchungen stellte die Ausscheidung der vom Allylisothiocyanat herrührenden Radioaktivität als CO₂ in der Atemluft die zweitgrößte Route dar. Die Atemluft der Untersuchungstiere wurde dafür kontinuierlich für 24 Stunden durch zwei Fallen, gefüllt mit 500 mL 4 N Natriumhydroxid-Lösung, geleitet, um dieses radioaktiv markierte CO₂ zu sammeln. Die kumulierte Ausscheidung betrug geschlechtsabhängig 12,60 – 3,98 % (männliche Ratten) beziehungsweise 14,50 – 2,37 % (weibliche Ratten) von der ursprünglich verabreichten Dosis [126]. Weiterhin ließen die Experimente vermuten, dass die gastrointestinale Resorption beim Vergleich von oraler zu intravenöser Einnahme annähernd vollständig verlief und die Art der Einnahme keinen erkennbaren Einfluss auf den Transport im Gewebe oder der Ausscheidung hatte [126]. Im Unterschied zu den beiden Tierstudien, war es in der aktuellen humanen Pilotstudie nicht möglich den Atem der Probandinnen kontinuierlich zu sammeln und zu analysieren. Aus diesem Grund, sowie der einfachen Gestaltung der Studie und ihrer geringen Teilnehmerzahl, ist der Anteil der Exkretion über Atemluft an der Gesamtausscheidung nicht genau zu beziffern. Dieser scheint übereinstimmend mit den Ergebnissen der Tierstudien eine geringe Rolle zu spielen. Beide Studien waren auf die Aufnahme von ITC und der Untersuchung ihres Verbleibes im Organismus konzipiert. Die Ausgangslage der humanen Interventionsstudie war eine andere. Im Brot beispielsweise wurde neben seinen Abbauprodukten auch intaktes Glucotropaeolin analysiert (30,2 %). Die Ergebnisse demonstrierten eine Ausscheidung von Phenylacetonitril, Benzyl-ITC und seinen Metaboliten über den gesamten Verlauf des Experiments. Daraus ergeben sich Fragen zu den Transportwegen und möglichen Reaktionen des Glucotropaeolins und seiner Abbauprodukte nach Eintreten in den Gastrointestinaltrakt.

Intakte GSL und ihre Bioverfügbarkeit – Effizienz der Umwandlung durch Darmbakterien

Intakte GSL können im Magen durch die Magensäure degradiert oder mit der Nahrung weiter in den Darm transportiert werden, wo sie durch die dort vorherrschende Mikroflora umgesetzt werden [32, 127]. Fahey et al. beobachteten in einer Studie mit 45 Teilnehmern, dass intakte GSL mit bis zu 40 % der aufgenommenen Dosis mittels bakterieller Myrosinase im Darm gespalten werden können [32]. Der Mittelwert liege jedoch deutlich niedriger (11,8 % der Dosis). Sie schlussfolgerten, dass hohe

Konversationsraten nicht der Regel entsprechen, da in der 2012 durchgeführten Studie 80 % der Umsatzraten unterhalb des Mittelwertes von 11,8 % lagen [32].

Unter den sauren pH-Bedingungen im Magen sind die hauptsächlichen Abbauprodukte Nitrile [22, 23]. Die Art der Abbau- oder Reaktionsprodukte im Darm hingegen würde sehr stark von dem Mechanismus der Reaktionen abhängen, die in der Mikroflora stattfinden. In der Literatur ist hinreichend bekannt, dass Bakterien der humanen Darmflora Myrosinase-Aktivität besitzen und damit in der Lage sind GSL umzusetzen [32, 123, 128, 129]. Verbunden mit einem nahezu neutralen pH-Wert im Darmtrakt wären ITC die präferierten Abbauprodukte. Werden diese anschließend resorbiert und über den Mercaptursäure-Stoffwechselweg ausgeschieden, können sie im Urin detektiert werden. Nach der Resorption besteht aber auch die Möglichkeit der Ausscheidung mit der Alveolarluft über die Lunge. Auch andere Reaktionen wären möglich. Krul et al. stellten die Hypothese auf, dass das Sinigrin durch die humane Mikroflora nicht ausschließlich zu Allyl-ITC abgebaut wird, sondern dass es weitere teils unbekannte Abbauprodukte aus dem mikrobiellen Abbau von GSL geben könnte [128]. In einem weiteren Experiment demonstrierte die Gruppe um Krul die Bildung von Allylamin und Benzylamin aus der Umsetzung von Sinigrin bzw. Glucotropaeolin durch eine humane Mikroflora *in-vitro* [130]. Schon Tang et al. zeigten 1972, dass Benzyl-ITC aus dem Abbau von Glucotropaeolin durch Bakterien zu Benzylamin umgewandelt wurde [131]. Die vorliegende Pilotstudie verfolgte einen *targeted*-Ansatz und kann daher keine Aussagen zu möglichen weiteren Abbau- und Reaktionsprodukten machen.

Intakte GSL weisen eine geringere Bioverfügbarkeit auf als ihre Abbauprodukte [123, 128, 132]. In einer Studie von Shapiro et al. beispielsweise erhielten erwachsene Probanden im Zeitrahmen von 6 – 12 Tagen alle 8 Stunden oral eine Gabe eines Brokkoli-Extraktes (GSL bzw. ITC) und der gesammelte Urin wurde analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass die Probanden nach einer Gabe des ITC-haltigen Extraktes durchschnittlich 70.5 ± 2.0 % der Dosis als Mercaptursäuren (in der Literatur als Dithiocarbamate bezeichnet) im Urin ausschieden, bei Gabe des GSL-haltigen Extraktes jedoch nur durchschnittlich 18.7 ± 9.4 % [133]. Saha et al. untersuchten die Resorption und gegenseitige Umwandlung von Sulforaphan und Erucin im humanen Organismus nach Verzehr von konventionellem Tiefkühlbrokkoli bzw. frischem Brokkoli und beobachteten im Mittel eine Ausscheidung von 58,5 % Sulforaphan der aufgenommenen Dosis. Wie bereits beschrieben führte das schonende Kochen von konventionell tiefgekühltem Brokkoli zu keiner Bildung von Sulforaphan. Beim Verzehr dieser Zubereitung mit hohen Gehalten intakten GSL wurde allerdings nur eine geringe Menge an Sulforaphan im Urin ausgeschieden (im Mittel rund 5 %) [123]. Diese Beobachtung spricht für eine geringere Umsetzung von GSL im humanen Organismus. Des Weiteren traten nach dem Verzehr der Zubereitung aus dem gefrorenen Brokkoli die höchsten Konzentrationen an Sulforaphan im Blutplasma später auf, als nach dem Verzehr der Zubereitung aus frischem Brokkoli. Die Autoren schlussfolgerten,

dass die Umsetzung des Glucoraphanins vermutlich erst durch die Mikroflora des Darms erfolgte und daher die Absorption des Sulforaphans nicht bereits im Magen bzw. Dünndarm stattfinden konnte. Saha et al. folgerten abschließend aus ihren Daten, dass die Effektivität der Sulforaphanaufnahme ins Blutplasma aus den im Dickdarm umgesetzten GSL geringer ist als die Aufnahme im oberen Gastrointestinaltrakt [123]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Vrca et al. bei der Untersuchung der Stabilität von Benzyl-ITC in der Simulation von *in-vitro* und *ex-vivo* Verdaureaktionen [134]. Die Simulation wurde auf zwei Weisen durchgeführt. Die *in-vitro* Methode fußte auf kommerziell erhältlichen Enzymen des Magens und des Dünndarms. Für die *ex-vivo* Methode wurden menschliche Verdauungssäfte von gesunden Spendern verwendet. In beiden Methoden wurde eine höhere Stabilität des aus Kapuzinerkresse extrahierten Benzyl-ITC in der gastrischen Phase beobachtet (97,57 % *in-vitro* und 73,47 % *ex-vivo*) als in der intestinalen Phase (71,17 % *in-vitro* und 54,90 % *ex-vivo*). Diese Experimente sind nur bedingt vergleichbar, zeigen übereinstimmend mit anderen Daten der Literatur jedoch eindeutig die geringere Bioverfügbarkeit von GSL im Intestinaltrakt.

Ein merklicher Abbau noch intakter GSL durch die im Darm angesiedelten Bakterien wurde bei der Suspension aufgrund der geringen GSL-Menge nicht erwartet. Bei einem Anteil von 30,2 % intaktem Glucotropaeolin im Brot bestand eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit, dass ein Abbau im Darm stattfindet. Aufgrund der geringen Teilnehmerzahl der Studie, konnte jedoch kein Trend im zeitlichen Verlauf der Detektion der Abbauprodukte beobachtet werden. Die individuellen Konzentrationsverläufe von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril bei den Probandinnen über den gesamten Untersuchungszeitraum sind übereinstimmend mit Beobachtungen aus der Literatur [133]. Bereits 2006 beobachteten Shapiro et al., dass die Umwandlung von GSL zu ITC bzw. ihren Mercaptursäure-Metaboliten in den einzelnen Probanden sehr unterschiedlich verlief. Der Unterschied in ihrem Gehalt zwischen den einzelnen Probanden betrug in dieser Studie annähernd das Vierfache [133].

Ähnliche Beobachtungen machten Krul et al. 2002 [128]. Diese untersuchten die Degradierung von Sinigrin zu Allyl-ITC mittels eines dynamischen *in-vitro* Intestinal-Modell mit einem Mix von humaner Darmmikroflora, welches die Prozesse im proximalen Colon simulierte. Höchste Gehalte an Allyl-ITC beobachteten die Forscher 9-12 Stunden nach der Zugabe von Sinigrin zum Mikroorganismengemisch. Die Verwendung von verschiedenen individuellen Mikrofloren führte zu merklich höheren Konversionsraten [128]. Dies zeigt deutlich wie groß der Einfluss des individuellen Metabolismus und hier im Besonderen der Einfluss der Darmflora ist. Die in der vorliegenden humanen Interventionsstudie analysierten individuellen Konzentrationsverläufe deuten ebenfalls auf einen größeren Einfluss des individuellen Metabolismus auf die Ausscheidung von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril. Auch Krul et al. berücksichtigten in ihren Experimenten die Möglichkeit, dass die

Bioverfügbarkeit intakter GSL geringer ist als die ihrer Abbauprodukte. Nur etwa 10-30 % (im Mittel 19 %) des Sinigrins standen für die Umsetzung durch die Bakterien im Darmlumen zur Verfügung [128]. Rund 74 % wurde nach 36 Stunden in der Dialyseflüssigkeit gefunden, die die Absorption aus dem Darminhalt simulierte. In einem ähnlichen Experiment an Ratten, die in ihrem Darm einen humanen Bakterienstamm beherbergten, beobachteten Elfoul et al., dass rund 50 % des oral verabreichten Sinigrins im Darmtrakt für den Abbau durch die Bakterien zur Verfügung stand [135].

Hohe Reaktionsvielfalt von Abbauprodukten *in-vivo*

Neben der Verfügbarkeit und Umsetzung der intakten GSL ist auch die Verfügbarkeit der Abbauprodukte selbst humanen Organismus von großer Bedeutung. Vor allem die elektrophilen ITC können Reaktionen mit nukleophilen Substanzen aus der Nahrung eingehen [40, 121, 122, 136]. In der humanen Interventionsstudie zeigte sich, dass im Brot der Anteil an Benzyl-ITC deutlich geringer war als in der Suspension. Die hauptsächlichen Gründe hierfür wurden bereits im Zusammenhang der unterschiedlichen Verarbeitungsformen genannt. Die Konjugation des Benzyl-ITC mit Proteinen wurde in der vorliegenden Studie intensiv untersucht und an anderer Stelle veröffentlicht [115]. Die Proteinkonjugation ist bis auf Ausnahmen reversibel. Eine dieser Ausnahmen ist die Konjugation mit ϵ -ständiger NH_2 -Gruppe von Lysin [137]. Nach Aufnahme und Konjugation der ITC kann es wieder zu einer Lösung der Konjugation kommen und die ITC entsprechend zu einem späteren Zeitpunkt auf den unterschiedlichen Wegen ausgeschieden werden. Ein wichtiger Faktor in der Reversibilität der Konjugationen ist hierbei der pH-Wert. Sie sind in einem sauren Milieu stabil, bei neutralem bis basischem pH-Wert instabiler [40, 117, 136].

Neben der Atemluft wurde nicht-konjugiertes Benzyl-ITC ebenfalls im Urin der Probandinnen (höchste Konzentrationen zwischen 4,43 und 9,19 $\mu\text{mol/L}$; Abbildung 50) analysiert. Die maximalen Gehalte lagen im Bereich von 4-6 Stunden nach dem Verzehr. Ebenfalls zu dieser Zeit wurden in der vorliegenden Studie die Maximalgehalte an Metaboliten aus dem Mercaptursäure-Stoffwechselweg detektiert. Diese Ergebnisse gehen einher mit dem analysierten nicht-konjugierten Benzyl-ITC und stimmen mit Ergebnissen aus der Literatur überein [116, 138]. Bereits Brüsewitz (1977) demonstrierte, dass die ITC nicht irreversibel als Metabolite des Mercaptursäure-Stoffwechselweges vorliegen, sondern sich wieder davon lösen können. Das wird auch dadurch unterstützt, dass basische Bedingungen im umgebenden Medium die Herauslösung des nicht-konjugierten ITCs begünstigen [139]. Mennicke et al. berichteten, dass bei Harnwegsinfektionen der pH-Wert bis über 9 ansteigen könne, sie im frischen Urin mit pH 7,3 eines gesunden Probanden jedoch bereits Benzyl-ITC detektiert haben. Der pH-Wert des Urins lag in der vorliegenden Humanstudie nicht im Fokus. Daher können keine weiteren Vermutungen zu den Ursachen für das Vorhandensein nicht-konjugierten Benzyl-ITCs getroffen werden.

8 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasste sich mit der Analyse ausgewählter Abbauprodukte von GSL in verschiedenen Lebensmittel- und Humanmatrizes. Sie ist dabei in drei Abschnitte gegliedert:

1. Erstellung, Erweiterung und Validierung von Methoden zur Bestimmung von ITC und Nitrilen in verschiedenen Matrizes.
2. Untersuchung des Einflusses der Lebensmittelverarbeitung auf die Hydrolyse von GSL anhand der sauren Gärung von ausgewählten *Brassicaceae*
3. Entwicklung einer Probenahme- und Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von ITC und Nitrilen in Atemluft – eine Pilotstudie

Ein Bestandteil dieser Arbeit war es, ausgewählte ITCs und Nitrile in verschiedenen *Brassicaceae* mittels einer validierten Methode zu quantifizieren. Die praktischen Arbeiten hierzu wurden in zwei Aufgabengebiete unterteilt, das Erweitern einer bekannten Methode um die Substanzklasse der Epithionitrile sowie deren Teilvalidierung und das Entwickeln einer geeigneten Methode zur Probenvorbereitung verschiedener Matrizes.

Die bereits aus der Literatur bekannte GC-MS-Methode wurde mit den zur Verfügung stehenden Geräten zur Probenvorbereitung und Messung teilvalidiert und im Rahmen dessen auf ihre Präzision, Richtigkeit und Linearität untersucht. Hierfür wurde eine Auswahl verschiedener ITC und Nitrile als Multistandard hergestellt und in entsprechenden Verdünnungsstufen analysiert. Keimlinge von den drei *Brassicaceae* Brokkoli, Daikon-Rettich und weißer Senf sind parallel dazu herangezogen und nach der Methode aufgearbeitet und analysiert worden. Alle ausgewählten ITC, Nitrile und Epithionitrile (nicht Teil der Validierung) unterlagen einer linearen Kalibrierfunktion. Die aus den Ergebnissen der Kalibrierniveaus berechneten Verfahrensstandardabweichungen und Verfahrensvariationskoeffizienten entsprachen den zuvor festgesetzten Anforderungen. Ein linearer Zusammenhang im untersten Konzentrationsbereich für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ist erfolgreich nachgewiesen worden. Die Analyse der Richtigkeit der Methode erfolgte über die Bestimmung der Wiederfindungsraten in den drei *Brassicaceae*-Keimlingen.

Im zweiten Abschnitt fanden diese Methoden Anwendung an einem prozessierten Lebensmittel am Beispiel fermentierter *Brassicaceae* ähnlich dem traditionell asiatischen Kimchi. Es sollte der Einfluss der Verarbeitung auf das Spektrum der GSL-Abbauprodukte untersucht werden. Einflussfaktoren hierbei waren der sich verändernde pH-Wert des Ferments während der Gärung und mögliche Begleitsubstanzen mit Einfluss auf die Aktivität der pflanzeigenen Myrosinase.

Das GSL-Profil der analysierten *Brassicaceae* wies im rohen Pflanzenmaterial gute Übereinstimmungen mit den in der Literatur dargestellten Profilen auf. Der höchste GSL-Gehalt wurde in Brokkoli analysiert, gefolgt von Rotkohl, Spitzkohl und Chinakohl. Die Fermentationsansätze der Kohlsorten wurden über

8 Zusammenfassung

einen Zeitraum von 20 Tagen auf ihre GSL- und Abbauprodukt-Gehalte untersucht. Es wurden Proben nach einer und fünf Stunden, sowie nach 3, 6, 13 und 20 Tagen genommen (bezogen auf den Zeitpunkt der Herstellung der Fermentationsansätze). Während der prozessbegleitenden Analyse der GSL in Rotkohl und Spitzkohl konnte eine geringere Beeinflussung der Verarbeitung und dem darauffolgenden enzymatischen Abbau auf die Gehalte des aliphatischen GSL Sinigrin beobachtet werden, als es beim ebenfalls aliphatischen Glucoiberins beobachtet wurde. Durch den enzymatischen Abbau konnten in den Kohlfermenten nach 20 Tagen der Fermentation keine bzw. nur noch in Spuren vorhandene GSL nachgewiesen werden.

Für die mittels GC-MS bestimmten Abbauprodukte wurden teilweise höhere Gehalte bestimmt als für die jeweiligen GSL, aus denen diese resultieren. In Rotkohl und Brokkoli wurden nach drei-tägiger Fermentation die höchsten Gehalte an ITCs analysiert. In Chinakohl wurde der maximale Gehalt an ITC bereits eine Stunde nach Herstellung des Fermentationsansatzes erreicht. Im Verlauf der Fermentation von Brokkoli stiegen bei sinkendem pH-Wert die Gehalte des, aus dem indolischen GSL Glucobrassicin gebildeten, Nitrils Indol-3-acetonitril. Zudem wurde der Übergang der GSL bzw. der daraus resultierenden Abbauprodukte aus dem Pflanzenmaterial in die umgebende Flüssigkeit gezeigt. Die Fermentationsflüssigkeit des Brokkoliansatzes enthielt an Tag 20 einen Gehalt von $5,48 \pm 0,032$ mg/100 g FM (100 g FM entspricht 100 g Flüssigkeit). Im Pflanzenmaterial des Brokkolis wurde zum gleichen Probenahmezeitpunkt ein Gehalt an Erucin von $0,64 \pm 0,03$ mg/100 g FM, sowie ein Gehalt an Sulforaphan von $8,46 \pm 0,50$ mg/100 g FM analysiert. Im Ferment des Chinakohls wurden nach 20 Tagen noch $0,5 \pm 0,06$ mg/100 g FM des, aus dem aromatischen GSL Gluconasturtiin gebildeten, 2-Phenylethyl-ITC analysiert.

Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Glucobrassicin und dem Gehalt des, aus 3-Hydroxymethylindol (Abbauprodukt des GSL Glucobrassicin) und Ascorbinsäure gebildeten, Ascorbigen A in rohem Kohl festgestellt. Je höher die Glucobrassicin-Gehalte in den rohen *Brassicaceae* waren, desto höher waren die Ascorbigen-Gehalte im entsprechenden Pflanzenmaterial. Der höchste Gehalt an Ascorbigen A ist in rohem Brokkoli mit $1,85 \pm 0,25$ mg/100 g FM bestimmt worden. In Rotkohl, Chinakohl und Spitzkohl wurden im Verlauf der Fermentation ebenfalls größere Mengen an Ascorbigen gebildet, die gegen Ende des Zeitraums der Fermentation aber wieder absanken. Die Berechnung der Gehalte ergab die höchsten Werte im Rotkohl ($1,61 \pm 0,10$ mg/100 g FM) und im Spitzkohl ($1,01 \pm 0,06$ mg/100 g FM) nach 13 Tagen Fermentation. Der pH-Wert der Ansätze war zu diesem Zeitpunkt bereits unter pH 4 gesunken. Im Fermentationsansatz des Rotkohls wurde bei steigenden Ascorbigen A-Gehalten ein dazu korrelierender Abbau an Glucobrassicin beobachtet. Am Ende des Fermentationszeitraums lag der Ascorbigen A-Gehalt im Brokkoli ($0,01 \pm 0,002$ mg/100 g FM) weit unter dem im rohen Kohl bestimmten Wert. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der Gehalt in

8 Zusammenfassung

Spitzkohl ($0,71 \pm 0,05$ mg/100 g FM) um das Zweifache des Ausgangsgehaltes während in Chinakohl ($0,14 \pm 0,002$ mg/100 g FM) und Rotkohl ($1,11 \pm 0,01$ mg/100 g FM) der Gehalt an Ascorbigen A um den Ausgangswert schwankte. Zur Entwicklung einer Probenahme und Analyse von GSL und ihren Abbauprodukten in humanen Matrices wurde im weiteren Verlauf der Arbeit als Modelllebensmittel die Kapuzinerkresse gewählt, da sie als einziges GSL Glucotropaeolin mit seinen zwei Abbauprodukten Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in ausreichender Menge enthält und leicht verarbeitet werden kann.

Dieser dritte Abschnitt beschäftigte sich im Rahmen einer kleinen humanen Interventionsstudie mit der Metabolisierung und den verschiedenen Ausscheidungswegen von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril nach einmaligem Verzehr von Kapuzinerkresse in verschiedenen Darreichungsformen. Ein Fokus lag dabei auf der Anwendung einer neu entwickelten Probenahme und Analyse dieser Analyten aus der Atemluft. Zunächst wurden Experimente mit der *Solid-Phase-Microextraction*, kurz SPME, durchgeführt, bei denen die Atemluft mit den Analyten aus inerten Beuteln über Fasern mit immobilisiertem Extraktionsmittel geleitet wurde. Diese sollten anschließend in der GC-MS durch die hohe Temperatur im Injektionsofen wieder freigesetzt und analysiert werden. Fasern mit PDMS/DVB beschichtet, zeigten die höchste Sorption, allerdings erzielte dieser Versuchsaufbau keine Linearität der Messergebnisse. Aufgrund der ebenfalls geringen Aufnahmekapazität der Fasern wurden die folgenden Experimente mit der *Stir-Bar-Sorptive-Extraction* Methode, kurz SBSE, durchgeführt. Ein Versuchsaufbau mit 500 mL-Flachbodenglasflaschen, in die die Atemluft beprobt wurde, und einem Teflon®-Schlauch-System, das die Atemluft aus der Flasche über ein SBSE-Magnetührstäbchen leitet, führte zu den gewünschten linearen Messergebnissen. Diese Probenahme fand anschließend Anwendung in der humanen Interventionsstudie.

Die Studie demonstrierte, dass neben den bereits bekannten Mercaptursäuren die Ausscheidung von nicht-konjugiertem Benzyl-ITC und Phenylacetonitril über den Urin ebenso erfolgt wie über die Atemluft. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Betrachtung der nicht-konjugierten Abbauprodukte Phenylacetonitril und Benzyl-ITC und ihrer Ausscheidung über den Urin und die Atemluft. Bei letzterem wurden je nach Verzehrart und Probandin unterschiedliche Konzentrationsverläufe der Analyten beobachtet. Nach Verzehr eines mit Kapuzinerkresse angereicherten Brotes erfolgte die hauptsächliche Ausscheidung von Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in der ersten Stunde nach dem Verzehr, mit maximalen Konzentrationen von Benzyl-ITC mit $13,04$ nmol/L und von Phenylacetonitril mit $0,21$ nmol/L. Ein individueller Verlauf der Konzentrationen zeigte sich hingegen in der Gruppe, die eine Kapuzinerkressesuspension verzehrte. Maximale Konzentrationen wurden zwischen 10 min und 24 h nach dem Verzehr analysiert. Diese lagen bei Benzyl-ITC bei $0,03 - 5,89$ nmol/L und bei Phenylacetonitril bei $0,01 - 15,66$ nmol/L. Benzyl-ITC wurde als hauptsächliches Abbauprodukt im Atem analysiert ($0,01 - 13,04$ nmol/L). Phenylacetonitril wies

8 Zusammenfassung

deutlich geringere Mengen in der Atemluft auf (0,01 – 0,21 nmol/L). In den Atemproben von zwei Probandinnen, die die Kapuzinerkressesuspension zu sich nahmen, war Phenylacetonitril das hauptsächlich detektierte Abbauprodukt. Bei den anderen beiden Probandinnen wurde ähnlich zu der Gruppe, die das Brot verzehrt hatte, zu einem Großteil Benzyl-ITC analysiert.

Ein anderes Bild zeigte sich in den Urinproben der Probandinnen. Benzyl-ITC wurde als einziges Abbauprodukt von Glucotropaeolin in den Proben aller Probandinnen detektiert. Sowohl in den Proben aus dem Brotverzehr, als auch in den Proben aus dem Verzehr der Kapuzinerkresse-Suspension wurde Benzyl-ITC noch 48 h nach dem Verzehr detektiert. Die höchsten Konzentrationen wurden im Bereich von 4 – 24 h erreicht. Einzig bei einer Probandin der Gruppe, die das angereicherte Brot verzehrt hatten, wies die Urinprobe nach 24 h die höchste Konzentration an Benzyl-ITC auf. Die höchsten Konzentrationen im Urin der anderen zwei Mitglieder dieser Gruppe wurden nach 4 Stunden analysiert. In der Gruppe, die eine Kapuzinerkresse-Suspension verzehrt hatte, wurden die höchsten Konzentrationen im Urin 4 Stunden (9,19 $\mu\text{mol/L}$) beziehungsweise 6 Stunden (4,43 $\mu\text{mol/L}$) nach dem Verzehr quantifiziert. Die höchste Konzentration in der Gruppe, die das angereicherte Brot verzehrt hatte, lag nach 4 Stunden bei 7,40 $\mu\text{mol/L}$. Anders als in den Matrices Atem und Urin, konnten im Blutplasma oberhalb der Nachweisgrenze weder Benzyl-ITC noch Phenylacetonitril im nicht-konjugierten Zustand analysiert werden.

9 Summary

This work dealt with the analysis of selected degradation products of GSL in various food and human matrices. It is divided into three sections:

1. establishment, extension and validation of methods for the determination of ITC and nitriles in different matrices.
2. investigation of the influence of food processing on the hydrolysis of GSL based on the acid fermentation of selected Brassicaceae
3. development of a sampling and testing method for the quantification of ITC and nitriles in breath - a pilot study.

One component of this work was to quantify selected ITCs and nitriles in various *Brassicaceae* using a validated method. The practical work for this was divided into two tasks, the extension of a known method by the substance class of epithionitriles as well as their partial validation and the development of a suitable method for the sample preparation of different matrices.

The GC-MS-method, which is already known from the literature, was partially validated with the available devices for sample preparation and measurement and examined for its precision, accuracy and linearity. For this purpose, a selection of different ITCs and nitriles was prepared as a multi component reference and analysed in corresponding dilution levels. Seedlings of the three *Brassicaceae* broccoli, daikon radish and white mustard were grown in parallel and processed and analysed according to the method. All selected ITC, nitriles and epithionitriles (not part of the validation) were subject to a linear calibration function. The procedure standard deviations and procedure coefficients of variation calculated from the results of the calibration levels were in accordance with the previously established requirements. A linear relationship in the lowest concentration range for the detection and quantification limits has been successfully demonstrated. The analysis of the accuracy of the method was carried out by determining the recovery rates in the three *Brassicaceae* seedlings. The extension of the method to include the analyte group of epithionitriles was carried out without any problems and served the aim of being able to analyse as large an analyte profile as possible in the second section of the work.

In the second section, these methods were applied to a processed food using the example of fermented *Brassicaceae* similar to the traditional Asian kimchi. The influence of processing on the spectrum of GSL degradation products was investigated. Influencing factors here were the changing pH value of the ferment during fermentation and possible accompanying substances with an influence on the activity of the plant's own myrosinase.

9 Summary

The qualitative GSL profile of the analysed *Brassicaceae* in the raw plant material was in accordance with the profiles presented in the literature. The highest GSL content was analysed in broccoli, followed by red cabbage, pointed cabbage and Chinese cabbage. The fermentation mixtures of the cabbage varieties were analysed for their GSL and degradation products over a period of 20 days. Samples were taken after one and five hours, as well as after 3, 6, 13 and 20 days (based on the time of preparation of the fermentation mixtures). During the in-process analysis of the GSL in red cabbage and pointed cabbage, a lower influence of the processing and the subsequent enzymatic degradation on the contents of the aliphatic GSL sinigrin was observed than it was for the aliphatic Glucoiberin. Due to the enzymatic degradation, no GSL or only traces of GSL were detected in the cabbage ferments after 20 days of fermentation.

In some cases, higher contents were determined for the degradation products determined by GC-MS than for the respective GSLs from which they result. In red cabbage and broccoli, the highest contents of ITCs were analysed after three days of fermentation. In Chinese cabbage, the maximum content of ITCs was already reached one hour after preparation of the fermentation batch. In the course of the fermentation of broccoli, the contents of the nitrile indole-3-acetonitrile, formed from the indolic GSL Glucobrassicin, increased with decreasing pH. In addition, the transfer of the GSL or the resulting degradation products from the plant material into the surrounding liquid was shown. The fermentation liquid of the broccoli batch contained $5,48 \pm 0,032$ mg/100 g FM (100 g FM corresponds to 100 g liquid) on day 20. In the broccoli plant material, a content of Erucin of $0,64 \pm 0,03$ mg/100 g FM and a content of sulforaphane of $8,46 \pm 0,50$ mg/100 g FM were analysed at the same sampling time. In the Chinese cabbage ferment, $0,5 \pm 0,06$ mg/100 g FM of 2-phenylethyl-ITC, formed from the aromatic GSL Gluconasturtiin, was still analysed after 20 days.

A correlation was found in raw cabbage between the content of Glucobrassicin and the content of Ascorbigen A, formed from 3-Hydroxymethylindole (degradation product of GSL Glucobrassicin) and ascorbic acid. The higher the Glucobrassicin contents in the raw *Brassicaceae*, the higher the Ascorbigen A contents in the corresponding plant material. The highest Ascorbigen A content was determined in raw broccoli with $1,85 \pm 0,25$ mg/100 g FM. In red cabbage, Chinese cabbage and pointed cabbage, larger amounts of Ascorbigen A were also formed in the course of fermentation, but these decreased again towards the end of the fermentation period. The calculation of the contents showed the highest values in red cabbage ($1,61 \pm 0,10$ mg/100 g FM) and in pointed cabbage ($1,01 \pm 0,06$ mg/100 g FM) after 13 days of fermentation. The pH value of the mixtures had already dropped below pH 4 at this point. In the red cabbage fermentation batch, a correlating degradation of Glucobrassicin was observed with increasing Ascorbigen A contents. At the end of the fermentation period, the Ascorbigen A content in broccoli ($0,01 \pm 0,002$ mg/100 g FM) was far below the value

9 Summary

determined in the raw cabbage. In contrast, the content in pointed cabbage ($0,71 \pm 0,05$ mg/100 g FM) increased by two times the initial content while in Chinese cabbage ($0,14 \pm 0,002$ mg/100 g FM) and red cabbage ($1,11 \pm 0,01$ mg/100 g FM) the Ascorbigen A content fluctuated around the initial value. In order to develop a sampling and analysis method of GSL and its degradation products in human matrices, nasturtium was chosen as a model food in the further course of the work. It only Glucotropaeolin with its two degradation products Benzyl-ITC and Phenylacetonitrile in sufficient quantity and can be easily processed.

This third section dealt with the metabolisation and the different excretion pathways of Benzyl-ITC and Phenylacetonitrile after a single consumption of nasturtium in different dosage forms in the context of a small human intervention study. One focus was on the application of a newly developed sampling and analysis of these analytes from breath. First, experiments were carried out with *Solid-Phase-Micro-Extraction*, or SPME, in which the respiratory air containing the analytes was passed from inert bags over fibres with immobilised extractant. These were then to be released and analysed again in GC-MS due to the high temperature in the injection oven. Fibres coated with PDMS/DVB showed the highest sorption, but this experimental setup did not achieve linearity of the measurement. Due to the also low absorption capacity of the fibres, the following experiments were carried out with the *Stir-Bar-Sorptive-Extraction* (SBSE). An experimental set-up with 500 mL flat-bottomed glass bottles, into which the respiratory air was sampled, and a Teflon® tube system, which passed the respiratory air from the bottle over an SBSE magnetic stir bar, led to the desired linear measurement. This sampling was subsequently used in the human intervention study.

The study demonstrated that, in addition to the already known mercapturic acids, the excretion of non-conjugated Benzyl-ITC and Phenylacetonitrile occurs via the urine as well as via the respiratory air. The focus of this work is on the non-conjugated degradation products Phenylacetonitrile and Benzyl-ITC and their excretion via urine and respiratory air. In the latter, different concentration courses of the analytes were observed depending on the type of consumption and the test person. After consumption of a bread enriched with nasturtium, the main excretion of benzyl-ITC and Phenylacetonitrile occurred in the first hour after consumption, with maximum concentrations of benzyl-ITC at 13,04 nmol/L and of Phenylacetonitrile at 0,21 nmol/L. In contrast, an individual course of the concentrations was shown in the group that consumed a nasturtium suspension. Maximum concentrations were analysed between 10 min and 24 h after consumption. These were 0,03 – 5,89 nmol/L for Benzyl-ITC and 0,01 – 15,66 nmol/L for Phenylacetonitrile. Benzyl-ITC was analysed as the main degradation product in breath (0,01 – 13,04 nmol/L). Phenylacetonitrile showed significantly lower amounts in breath (0,01 – 0,21 nmol/L). In the respiratory air samples of two test persons who ingested the suspension, Phenylacetonitrile was the main degradation product detected.

9 Summary

In the other two volunteers, similar to the group that had eaten the bread, Benzyl-ITC was analysed to a large extent.

The urine samples of the test persons showed a different course. Benzyl-ITC was the only detected degradation product of Glucotropaeolin in the samples of all test persons. Benzyl-ITC was still detected 48 h after consumption in the samples from bread consumption as well as in the samples from the consumption of the nasturtium suspension. The highest concentrations were reached in the range of 4 – 24 h. Only one subject in the group that had consumed the enriched bread showed the highest concentration of benzyl-ITC in the urine sample after 24 h. The highest concentrations in the urine of the other two members of this group were analysed after 4 hours. In the group that had consumed a nasturtium suspension, the highest concentrations in the urine were quantified 4 h (9,19 $\mu\text{mol/L}$) and 6 h (4,43 $\mu\text{mol/L}$) after consumption, respectively. The highest concentration in the group that had consumed the enriched bread was 7,40 $\mu\text{mol/L}$ after 4 hours. Unlike in the respiratory air and urine matrices, neither benzyl-ITC nor Phenylacetonitrile could be analysed in the non-conjugated state in blood plasma above the detection limit.

10 Schlussfolgerungen

Die Validierung der GC-MS-Methode zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten aus pflanzlicher Matrix kann als erfolgreich bewertet werden, da die beschriebenen Validierungsparameter den Anforderungen entsprachen. Die Erweiterung der Methode um die Analytengruppe der Epithionitrile erfolgte problemlos und diente dem Ziel, im zweiten Abschnitt der Arbeit ein möglichst großes Analytenprofil analysieren zu können.

Für die mittels GC-MS bestimmten Abbauprodukte im Fermentationsexperiment wurden teilweise höhere Gehalte bestimmt als für die jeweiligen GSL, aus denen diese resultieren. Dieses kann an einer nicht vollständigen Extraktion der GSL aus dem Pflanzenmaterial, beziehungsweise einer teilweisen Hydrolyse der GSL während der Aufarbeitung gelegen haben. Zusammenfassend hatte der Fermentationsprozess insgesamt keine großen Auswirkungen auf die Bildung der bioaktiven ITC. Die durch Hydrolyse der GSL gebildeten ITC erreichten zu Beginn die höchsten Konzentrationen und nahmen im Verlauf der Fermentation größtenteils ab. Aufgrund der geringen Analytenmengen am Ende der Fermentation und des beobachteten Übergangs von GSL und deren Abbauprodukten in die Fermentationsflüssigkeit, wurde der fermentierte Kohl als Modelllebensmittel für die weitere Arbeit verworfen. Stattdessen wurde auf die leicht zu verarbeitende Kapuzinerkresse mit einem eindeutigen GSL-Profil zurückgegriffen. Diese stand zudem für die Interventionsstudie in der benötigten Menge und verarbeiteten Form zur Verfügung.

Ein Bestandteil der Studie war es den Einfluss des Verarbeitungsgrades der beiden Kapuzinerkressequellen auf die Resorption und die Ausscheidung im Körper zu betrachten. Dass die Verarbeitung einen Einfluss auf die anfänglichen Gehalte von Glucotropaeolin und seinen Abbauprodukten Benzyl-ITC und Phenylacetonitril hat, zeigte sich bereits in der Analyse der beiden Darreichungsformen durch die unterschiedliche Art der Hydrolyse bzw. der dabei vorherrschenden Bedingungen. Nur 7,5 % der möglichen Ausgangsmenge an Abbauprodukten verblieb nach dem Backprozess im Brot erhalten. Gründe hierfür können die Evaporation der leicht flüchtigen Abbauprodukte während des Backens und eine mögliche Konjugation des Benzyl-ITC an Matrixbestandteilen wie Proteinen, Lipiden oder Ballaststoffen sein [15, 40, 121, 122]. Dies bestätigt ähnliche Experimente aus der Literatur [123]. Ein zweiter Faktor in der Bewertung der Messdaten der vorliegenden Humanstudie waren die Probanden. Je nach Alter, Ernährungsweise und individuellem Metabolismus, können Unterschiede in den Ergebnissen auftreten. Aufgrund der geringen Probandenanzahl und der einfachen Ausgestaltung der Studie konnten hier jedoch keine gesicherten Erkenntnisse erhalten werden. Neben dem individuellen Metabolismus der Probandinnen und der unterschiedlichen Analytenmenge und -art in den beiden Darreichungsformen, ist die Art und Weise

10 Schlussfolgerungen

ihres Verzehrs von besonderer Bedeutung für die vorliegenden Daten. Die Suspension wurde zügig verzehrt, wohingegen das Brot für eine kurze Zeit gekaut wurde und daher länger im Mund blieb als die Suspension. Ein längerer Verbleib im Mund, verbunden mit der mechanischen Verletzung des Pflanzenmaterials durch das Kauen, kann zu einer Freisetzung von Abbauprodukten aus dem Brotteig führen, die direkt ausgeatmet werden. Dieses wird durch den starken Anstieg an Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in den Atemproben in den ersten 10 Minuten bis zu einer halben Stunde nach dem Verzehr deutlich. Durch den im Vergleich schnelleren Verzehr der Suspension, könnten die Abbauprodukte und die geringe Menge intaktes GSL in den Magen gelangen, ohne im Mund signifikant verändert zu werden. Zwei der vier Probandinnen, die die Suspension verzehrt hatten zeigten beispielsweise keinerlei Anstieg in der Konzentration der Analyten in der ersten halben Stunde nach dem Verzehr. Allerdings wiesen die Messungen der zwei anderen Probandinnen bereits erhöhte Konzentration der Analyten 10 Minuten nach dem Verzehr auf. Das könnte wieder auf ein unterschiedliches Trinkverhalten der einzelnen Probandinnen hinweisen, bei dem die betreffenden Personen die Suspension nicht zügig verzehrten, sondern länger im Mund behielten. Daraus kann geschlossen werden, dass in künftigen Studien besonderes Augenmerk auf die Standardisierung des Probenverzehrs gelegt werden sollte.

Bei allen Probandinnen der Suspensions-Gruppe konnte eine Ausscheidung der Analyten in der Atemluft über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die beiden Analyten Benzyl-ITC und Phenylacetonitril in den Gastrointestinaltrakt gelangten, dort resorbiert und im Verlauf des Versuches wieder über die Atemluft ausgeschieden wurden. Im Brot beispielsweise wurde neben seinen Abbauprodukten auch intaktes Glucotropaeolin analysiert (30,2 %). Daraus ergeben sich Fragen zu den Transportwegen und möglichen Reaktionen des Glucotropaeolins und seiner Abbauprodukte nach Eintreten in den Gastrointestinaltrakt. Unter den sauren pH-Bedingungen im Magen würden übereinstimmend mit der Literatur Nitrile gebildet werden [22, 23]. Die Art der Abbau- oder Reaktionsprodukte im Darm hingegen würde sehr stark von dem Mechanismus der Reaktionen abhängen, die in der Mikroflora stattfinden. Verbunden mit einem nahezu neutralen pH-Wert im Darmtrakt wären ITC die präferierten Abbauprodukte. Werden diese anschließend resorbiert und über den Mercaptursäure-Stoffwechselweg ausgeschieden, können sie im Urin detektiert werden. Nach der Resorption besteht aber auch die Möglichkeit der Ausscheidung mit der Alveolarluft über die Lunge. Ein merklicher Abbau noch intakter GSL durch die im Darm angesiedelten Bakterien wurde bei der Suspension aufgrund der geringen GSL-Menge nicht erwartet. Bei einem Anteil von 30,2 % intaktem Glucotropaeolin im Brot bestand eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit, dass ein Abbau im Darm stattfindet. Aufgrund der geringen Teilnehmerzahl der Studie, konnte jedoch kein Trend im zeitlichen Verlauf der Detektion der Abbauprodukte beobachtet werden. In der Literatur wurden auch andere Reaktionsprodukte beschrieben, die im Gastrointestinaltrakt gebildet werden könnten [128].

10 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Pilotstudie verfolgte einen *targeted*-Ansatz und konnte daher keine Aussagen zu möglichen weiteren Abbau- und Reaktionsprodukten machen.

Neben der Verfügbarkeit und Umsetzung der intakten GSL ist auch die Verfügbarkeit der Abbauprodukte selbst im humanen Organismus von großer Bedeutung. In der humanen Interventionsstudie zeigte sich, dass im Brot der Anteil an Benzyl-ITC deutlich geringer war als in der Suspension. Die hauptsächlichen Gründe hierfür wurden bereits im Zusammenhang der unterschiedlichen Verarbeitungsformen genannt. Die Konjugation des Benzyl-ITC mit Proteinen im humanen Blutplasma wurde in der vorliegenden Studie intensiv untersucht und an anderer Stelle veröffentlicht [115]. Nach Aufnahme und Konjugation der ITC kann es aber wieder zu einer Lösung der Konjugation kommen und die ITC entsprechend zu einem späteren Zeitpunkt auf den unterschiedlichen Wegen ausgeschieden werden. Dies kann ein Grund für die Ausscheidung des Benzyl-ITC in Urin und Atemluft über den gesamten Versuchszeitraum sein.

Neben der Atemluft wurde nicht-konjugiertes Benzyl-ITC ebenfalls im Urin der Probandinnen (höchste Konzentrationen zwischen 4,43 und 9,19 $\mu\text{mol/L}$) analysiert. Die maximalen Gehalte lagen im Bereich von 4 - 6 Stunden nach dem Verzehr. Ebenfalls zu dieser Zeit wurden in der vorliegenden Studie die Maximalgehalte an Metaboliten aus dem Mercaptursäure-Stoffwechselweg detektiert. Diese Ergebnisse gehen einher mit dem analysierten nicht-konjugierten Benzyl-ITC und stimmen mit Ergebnissen aus der Literatur überein [116, 138].

Nach Betrachtung aller untersuchten Ausscheidungswege, konnten die Beobachtungen bisheriger Studien bestätigt werden, dass die dominante Ausscheidung von ITCs als Metabolite der Mercaptursäure über den Urin erfolgt und die Ausscheidung über die Atemluft nur eine untergeordnete Rolle spielt. Im Unterschied zu den meisten Tierstudien, war es in der aktuellen humanen Pilotstudie nicht möglich den Atem der Probandinnen kontinuierlich zu sammeln und zu analysieren. Aus diesem Grund, sowie der einfachen Gestaltung der Studie und ihrer geringen Teilnehmerzahl, ist der Anteil der Exkretion über Atemluft an der Gesamtausscheidung nicht genau zu beziffern.

11 Conclusions

The validation of the GC-MS-method for the quantification of GSL degradation products from plant matrix can be evaluated as successful, as the described validation parameters met the requirements. The extension of the method to include the analyte group of epithionitriles was carried out without any problems and served the aim of being able to analyse as large an analyte profile as possible in the second section of the work.

In some cases, higher contents were determined for the degradation products determined by GC-MS in the fermentation experiment, than for the respective GSLs from which they result. This may have been due to incomplete extraction of the GSL from the plant material or partial hydrolysis of the GSL during processing. In summary, the fermentation process did not have a major impact on the formation of bioactive ITCs. The ITCs formed by hydrolysis of the GSL reached the highest concentrations at the beginning and decreased for the most part in the course of the fermentation. Due to the low amounts of analytes at the end of the fermentation and the observed transfer of GSL and its degradation products into the fermentation liquid, fermented cabbage was discarded as a model food for further work. Instead, the easy-to-process nasturtium with a clear GSL profile was used. This was also available for the intervention study in the required quantity and processed form.

One topic of the study was to observe the influence of the degree of processing of the two nasturtium sources on absorption and excretion in the body. That the processing itself has an influence on the initial contents of Glucotropaeolin and its degradation products Benzyl-ITC and Phenylacetonitrile was already shown in the analysis of the two dosage forms by the different type of hydrolysis due to the prevailing conditions. Only 7.5 % of the possible initial amount of degradation products remained in the bread after the baking process. Reasons for this may be the evaporation of the highly volatile degradation products during baking and a possible conjugation of the Benzyl-ITC to matrix components such as proteins, lipids or dietary fibres [15, 40, 121, 122]. This confirms similar experiments from the literature [123]. A second factor in the evaluation of the results of the present study was the subjects. Depending on age, diet and individual metabolism, differences in the results may occur. However, due to the small number of test persons and the simple design of the study, no reliable findings could be obtained here. In addition to the individual metabolism of the test persons and the different amount and type of analytes in the two dosage forms, the way they were consumed is of particular importance for the available data. The suspension was consumed quickly, whereas the bread was chewed for a short time and therefore remained longer in the mouth than the suspension. Prolonged retention in the mouth, combined with the mechanical injury to the plant material caused by chewing, may result in the release of degradation products from the bread dough that are directly exhaled. This is evident

11 Conclusions

from the strong increase in Benzyl-ITC and Phenylacetonitrile in the respiratory air samples in the first 10 minutes to half an hour after consumption. Due to the comparatively faster consumption of the suspension, the degradation products and the small amount of intact GSL could enter the stomach without being significantly changed in the mouth. For example, two of the four volunteers who consumed the suspension did not show any increase in the concentration of the analytes in the first half hour after consumption. However, the measurements of the other two subjects showed an increased concentration of the analytes 10 minutes after consumption. This could again indicate a different drinking behaviour of the individual test persons, who did not consume the suspension quickly but kept it in their mouths longer. From this it can be concluded that in future studies special attention should be paid to the standardisation of sample consumption.

In all subjects of the suspension group, excretion of the analytes in the breath could be observed over the entire test period. This indicates that the two analytes Benzyl-ITC and Phenylacetonitrile entered the gastrointestinal tract, were absorbed and excreted again via the respiratory air in the course of the test. In bread, for example, intact Glucotropaeolin was analysed in addition to its degradation products (30.2 %). This raises questions about the transport pathways and possible reactions of Glucotropaeolin and its degradation products after entering the gastrointestinal tract. Under the acidic pH conditions in the stomach, nitriles would be formed, consistent with the literature [22, 23]. The nature of the degradation or reaction products in the intestine, on the other hand, would depend very much on the mechanism of the reactions taking place in the microflora. Coupled with a near-neutral pH in the intestinal tract, ITCs would be the preferred degradation products. If these are subsequently absorbed and excreted via the mercapturic acid metabolic pathway, they can be detected in the urine. After resorption, however, there is also the possibility of excretion with the alveolar air via the lungs. A noticeable degradation of still intact GSL by the bacteria settled in the intestine was not expected with the suspension due to the low amount of GSL. With a proportion of 30.2 % intact Glucotropaeolin in the bread, there was a significantly higher probability that degradation would take place in the intestine. However, due to the small number of participants in the study, no trend in the time course of the detection of the degradation products could be observed. Other reaction products that could be formed in the gastrointestinal tract have also been described in the literature [128]. The present pilot study pursued a *targeted* approach and could therefore not make any statements on possible further degradation and reaction products.

In addition to the availability and conversion of the intact GSL, the availability of the degradation products themselves in the human organism is also of great importance. The human intervention study showed that the proportion of Benzyl-ITC in the bread was significantly lower than in the suspension. The main reasons for this have already been mentioned in connection with the different forms of

11 Conclusions

processing. The conjugation of Benzyl-ITC with proteins in human blood plasma was intensively investigated in the present study and published elsewhere [115]. However, after uptake and conjugation of the ITC, the conjugation may again dissolve and the ITC may be excreted accordingly at a later time by the different routes. This may be a reason for the excretion of the Benzyl-ITC in urine and respiratory air over the entire test period.

In addition to the respiratory air, non-conjugated Benzyl-ITC was also analysed in the urine of the test subjects (highest concentrations between 4,43 and 9,19 $\mu\text{mol/L}$). The maximum levels were in the range of 4 - 6 hours after consumption. Also at this time, the maximum levels of metabolites from the mercapturic acid pathway were detected in the present study. These results comply with the analysed non-conjugated Benzyl-ITC and are in agreement with results from the literature [116, 138].

After considering all the excretion pathways investigated, the observations of previous studies could be confirmed that the dominant excretion of ITCs occurs via their mercapturic acid metabolites in the urine and that excretion via the respiratory air only plays a subordinate role. In contrast to the most animal studies, it was not possible to continuously collect and analyse the respiratory air of the subjects in the current human pilot study. For this reason, as well as the simple design of the study and its small number of participants, the share of excretion via breath in the total excretion cannot be precisely quantified.

12 Literatur

Im Folgenden ist die für diese Arbeit relevante Literatur aufgeführt.

1. Könneker, C. and U. Reichert. *Kompaktlexikon Biologie - Sekundäre Pflanzenstoffe*. Spektrum der Wissenschaft [Online Lexikon] [cited 2017 11.04.]; Available from: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/sekundaere-pflanzenstoffe/10686>.
2. Nultsch, W., *Allgemeine Botanik*. Vol. 11. Auflage. 2001: Thieme Verlag.
3. Watzl, B., *Einfluss sekundärer Pflanzenstoffe auf die Gesundheit*. Ernährungsbericht 2008, Bonn: Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V., 2008.
4. Conrad, A., et al., *In vitro study to evaluate the antibacterial activity of a combination of the hulum of nasturtium (Tropaeoli majoris herba) and of the roots of horseradish (Armoracia rusticanae radix)*. Arzneimittel-Forschung-Drug Research, 2006. **56**(12): p. 842-849.
5. Gupta, P., et al., *Molecular targets of isothiocyanates in cancer: Recent advances*. Molecular Nutrition & Food Research, 2014. **58**(8): p. 1685-1707.
6. Harris, K.E. and E.H. Jeffery, *Sulforaphane and erucin increase MRP1 and MRP2 in human carcinoma cell lines*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2008. **19**(4): p. 246-254.
7. Jadhav, U., et al., *Dietary Isothiocyanate Iberin Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells*. Journal of Pharmacological Sciences, 2007. **103**(2): p. 247-251.
8. Ishida, M., et al., *Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables*. Breeding Science, 2014. **64**(1): p. 48-59.
9. Schreiner, M., et al., *Bioaktive Inhaltsstoffe in Gemüse – Glucosinolate in Brassicales-Arten*. 2010, 2010(422).
10. Bellostas, N., J.C. Sørensen, and H. Sørensen, *Qualitative and quantitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycles*. Agroindustria, 2004. **3**(3): p. 5-10.
11. Holst, B. and G. Williamson, *A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds*. Natural Product Reports, 2004. **21**(3): p. 425-447.
12. Haller, D., G. Rimbach, and T. Grune, *Glucosinolate*, in *Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe* 2013, Springer. p. 227-234.
13. Schütze, W., *Die Glucosinolate der Brassicaceen - ein Potential für den biologischen Pflanzenschutz*. 2013, 2013(436).
14. Fahey, J.W., A.T. Zalcmann, and P. Talalay, *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*. Phytochemistry, 2001. **56**(1): p. 5-51.
15. Hanschen, F.S., et al., *Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods*. Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(43): p. 11430-11450.
16. Belitz, H.-D., W. Grosch, and P. Schieberle, *Gemüse und Gemüseprodukte*, in *Lebensmittelchemie* 2008, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 795-830.
17. Magrath, R., et al., *Genetics of aliphatic glucosinolates. 1.Side-chain elongation in brassica napus and arabidopsis thaliana*. Heredity, 1994. **72**: p. 290-299.
18. Belitz, H.-D., G. Werner, and P. Schieberle, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Vol. Sechste, vollständig überarbeitete Auflage. 2008, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
19. Thangstad, O.P., K. Evjen, and A. Bones, *Immunogold-EM localization of myrosinase in Brassicaceae*. Protoplasma, 1991. **161**(2): p. 85-93.
20. Wittstock, U. and M. Burow, *Glucosinolate Breakdown in Arabidopsis: Mechanism, Regulation and Biological Significance*. The Arabidopsis Book, 2010: p. e0134.
21. Bocker, E.R., et al., *Metabolism and Distribution of 3,4-Epithiobutanenitrile in the rat*. Food and Chemical Toxicology, 1984. **22**(3): p. 227-232.
22. Williams, D.J., et al., *Differing mechanisms of simple nitrile formation on glucosinolate degradation in Lepidium sativum and Nasturtium officinale seeds*. Phytochemistry, 2009. **70**(11-12): p. 1401-1409.

23. Bones, A.M. and J.T. Rossiter, *The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry*. *Physiologia Plantarum*, 1996. **97**(1): p. 194-208.
24. Bitzer, J. and A. Schieber, *Thieme RÖMPP Online*, in *Glucosinolate2017*, Georg Thieme Verlag KG.
25. Forbes, R.M. and J.W. Erdman Jr, *Bioavailability of trace mineral elements*. *Annual review of nutrition*, 1983. **3**(1): p. 213-231.
26. Watzl, B., *Einfluss sekundärer Pflanzenstoffe auf die Gesundheit*. Ernährungsbericht 2012/2012, Bonn: Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. .
27. Rask, L., et al., *Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae*. *Plant Molecular Biology*, 2000. **42**(1): p. 93-114.
28. Foo, H.L., et al., *Purification and characterisation of epithiospecifier protein from Brassica napus: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis*. *FEBS Letters*, 2000. **468**(2-3): p. 243-246.
29. Burow, M., et al., *Glucosinolate hydrolysis in Lepidium sativum—identification of the thiocyanate-forming protein*. *Plant Molecular Biology*, 2007. **63**(1): p. 49-61.
30. Hasapis, X. and A.J. MacLeod, *Benzylglucosinolate degradation in heat-treated Lepidium sativum seeds and detection of a thiocyanate-forming factor*. *Phytochemistry*, 1982. **21**(5): p. 1009-1013.
31. Li, X. and M.M. Kushad, *Purification and characterization of myrosinase from horseradish (Armoracia rusticana) roots*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005. **43**(6): p. 503-511.
32. Fahey, J.W., et al., *Protection of Humans by Plant Glucosinolates: Efficiency of Conversion of Glucosinolates to Isothiocyanates by the Gastrointestinal Microflora*. *Cancer Prevention Research*, 2012. **5**(4): p. 603-611.
33. Oerlemans, K., et al., *Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage*. *Food Chemistry*, 2006. **95**(1): p. 19-29.
34. Hanschen, F.S., et al., *Thermally induced degradation of sulfur-containing aliphatic glucosinolates in Broccoli Sprouts (Brassica oleracea var. italica) and model systems*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **60**(9): p. 2231-2241.
35. Crozier, A., I.B. Jaganath, and M.N. Clifford, *Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health*. *Nat Prod Rep*, 2009. **26**(8): p. 1001-43.
36. Hwang, E.S. and E.H. Jeffery, *Evaluation of urinary N-acetyl cysteinyl allyl isothiocyanate as a biomarker for intake and bioactivity of Brussels sprouts*. *Food and Chemical Toxicology*, 2003. **41**(12): p. 1817-1825.
37. McMillan, M., E.A. Spinks, and G.R. Fenwick, *Preliminary observations on the effect of dietary brussels sprouts on thyroid function*. *Hum Toxicol*, 1986. **5**(1): p. 15-9.
38. Choi, E.-j., P. Zhang, and H. Kwon, *Determination of Goitrogenic Metabolites in the Serum of Male Wistar Rat Fed Structurally Different Glucosinolates*. *Toxicological Research*, 2014. **30**(2): p. 109-116.
39. Palmer, S., *Diet, nutrition, and cancer*. *Prog Food Nutr Sci*, 1985. **9**(3-4): p. 283-341.
40. Brown, K.K. and M.B. Hampton, *Biological targets of isothiocyanates*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **9**: p. 888-94.
41. Shapiro, T.A., et al., *Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1998. **7**(12): p. 1091-1100.
42. Matusheski, N.V. and E.H. Jeffery, *Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(12): p. 5743-5749.
43. Keck, A.S., R. Staack, and E.H. Jeffery, *The cruciferous nitrile crambene has bioactivity similar to sulforaphane when administered to Fischer 344 rats but is far less potent in cell culture*. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 2002. **42**(2): p. 233-240.

44. Nho, C.W. and E. Jeffery, *The Synergistic Upregulation of Phase II Detoxification Enzymes by Glucosinolate Breakdown Products in Cruciferous Vegetables*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2001. **174**(2): p. 146-152.
45. Wagner, A.E. and G. Rimbach, *Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties*. Clinics in Dermatology, 2009. **27**(2): p. 217-224.
46. Williams, D.J., et al., *Key Role of Fe²⁺ in Epithiospecifier Protein Activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(15): p. 8512-8521.
47. Lüthy, J. and M. Benn, *Cyanoepithioalkanes: Some Chemical and Toxicological Studies*, in *Natural Sulfur Compounds: Novel Biochemical and Structural Aspects*, D. Cavallini, G.E. Gaull, and V. Zappia, Editors. 1980, Springer US: Boston, MA. p. 381-389.
48. Dietz, H.M., S. Panigrahi, and R.V. Harris, *Toxicity of hydrolysis products from 3-butenyl glucosinolate in rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991. **39**(2): p. 311-315.
49. Hanschen, F.S., et al., *Degradation of biofumigant isothiocyanates and allyl glucosinolate in soil and their effects on the microbial community composition*. Plos One, 2015. **10**(7).
50. Ahmed, A.E. and M.Y.H. Farooqui, *Comparative Toxicities of Aliphatic Nitriles*. Toxicology Letters, 1982. **12**(2-3): p. 157-163.
51. Rungapamestry, V., et al., *Effect of cooking brassica vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates*. Proceedings of the Nutrition Society, 2007. **66**(1): p. 69-81.
52. Volden, J., et al., *Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. capitata f. rubra)*. Food Chemistry, 2008. **109**(3): p. 595-605.
53. Eylen, D.V., et al., *Effects of pressure/temperature treatments on stability and activity of endogenous broccoli (*Brassica oleracea* L. cv. Italica) myrosinase and on cell permeability*. Journal of Food Engineering, 2008. **89**(2): p. 178-186.
54. Song, L. and P.J. Thornalley, *Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables*. Food and Chemical Toxicology, 2007. **45**(2): p. 216-224.
55. Thomas, *Thieme RÖMPP Online*, in *L-Ascorbinsäure* 2010.
56. Mullaney, J.A., et al., *Lactic Acid Bacteria Convert Glucosinolates to Nitriles Efficiently Yet Differently from Enterobacteriaceae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(12): p. 3039-3046.
57. Tolonen, M., et al., *Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut*. Food Microbiology, 2004. **21**(2): p. 167-179.
58. Kiddle, G., et al., *High-performance liquid chromatographic separation of natural and synthetic desulphoglucosinolates and their chemical validation by UV, NMR and chemical ionisation-MS methods*. Phytochemical Analysis, 2001. **12**(4): p. 226-242.
59. Chiang, W.C.K., D.J. Pusateri, and R.E.A. Leitz, *Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for the Determination of Sulforaphane and Sulforaphane Nitrile in Broccoli*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(3): p. 1018-1021.
60. Aleksandrova, L.G., A.M. Korolev, and M.N. Preobrazhenskaya, *Study of natural ascorbigen and related compounds by HPLC*. Food Chemistry, 1992. **45**(1): p. 61-69.
61. Ji, Y. and M.E. Morris, *Determination of phenethyl isothiocyanate in human plasma and urine by ammonia derivatization and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 2003. **323**(1): p. 39-47.
62. Platz, S., et al., *Bioavailability and metabolism of benzyl glucosinolate in humans consuming Indian cress (*Tropaeolum majus* L.)*. Molecular Nutrition & Food Research, 2016. **60**(3): p. 652-660.
63. Miekisch, W., J.K. Schubert, and G.F.E. Noeldge-Schomburg, *Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds*. Clinica Chimica Acta, 2004. **347**(1–2): p. 25-39.
64. Manolis, A., *The diagnostic potential of breath analysis*. Cliii Chem, 1983. **198329**: p. 5-15.

65. Co., S.-A. *SPME Applications Guide*. 2009 [cited 2017 24.06.]; Available from: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/1/t199925.pdf.
66. Zlatkis, A., H.A. Lichtenstein, and A. Tishbee, *Concentration and analysis of trace volatile organics in gases and biological fluids with a new solid adsorbent*. *Chromatographia*, 1973. **6**(2): p. 67-70.
67. Baltussen, E., et al., *Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles*. *Journal of Microcolumn Separations*, 1999. **11**(10): p. 737-747.
68. Shen, V.K., Siderius, D.W., Krekelberg, W.P., and Hatch, H.W., Eds., ed. *NIST Standard Reference Simulation Website*. NIST Standard Reference Database Number 692018, National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg MD, 20899.
69. Krohn, K. and U. Wolf, *Drei- und Vierringheterocyclen*, in *Kurze Einführung in die Chemie der Heterocyclen* 1994, Vieweg+Teubner Verlag: Wiesbaden. p. 14-31.
70. Bouda, H., et al., *Synthesis of Thiiranes from Epoxides in the Presence of Thiourea in a Weakly Hydrated Organic Medium*. *Synthetic Communications*, 1989. **19**(3-4): p. 491-500.
71. Kiss, G. and H. Neukom, *Über die Struktur des Ascorbigens*. *Helvetica Chimica Acta*, 1966. **49**(2): p. 989-&.
72. Martinez-Villaluenga, C., et al., *Influence of Fermentation Conditions on Glucosinolates, Ascorbigen, and Ascorbic Acid Content in White Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. *Taler*) Cultivated in Different Seasons*. *Journal of Food Science*, 2009. **74**(1): p. C62-C67.
73. Witzel, K., et al., *Verticillium Suppression Is Associated with the Glucosinolate Composition of *Arabidopsis thaliana* Leaves*. *Plos One*, 2013. **8**(9): p. e71877.
74. Kromidas, S., *Validierung in der Analytik* 1999, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH.
75. Gottwald, W., *Statistik für Anwender* 2000.
76. Atkins, P.W. and J. De Paula, *Physikalische Chemie* 2013.
77. Riedel, E. and C. Janiak, *Anorganische Chemie* 2007.
78. Matissek, R., G. Steiner, and M. Fischer, *Lebensmittelanalytik* 2013.
79. Funk, W. and G. Donnevert, *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. Vol. 2. Auflage. 2005, Weinheim: Wiley-VCH.
80. Küster, F.W., A. Thiel, and A. Ruland, *Rechentafeln für die chemische Analytik*. 2002: de Gruyter.
81. Neizel, V., *Lineare Kalibrationsfunktionen (Teil 1)*. CLB Chemie in Labor und Biotechnik, 2002. **53. Jahrgang**(01): p. 9-13.
82. e.V, D.I.f.N., *DIN 32625 - Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen*, 1994, Beuth: Berlin. p. 1ff.
83. Wellmitz, J.G.M., *Leitlinie zur Methodvalidierung*. Qualitätssicherungsstelle im Bund/Länder-Messprogramm Nord- und Ostsee (BLMP), 2005: p. 1-22.
84. Hanschen, F.S., et al., *The Brassica epithionitrile 1-cyano-2,3-epithiopropene triggers cell death in human liver cancer cells in vitro*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015. **59**(11): p. 2178-2189.
85. Shofran, B.G., et al., *Antimicrobial properties of sinigrin and its hydrolysis products*. *Journal of Food Science*, 1998. **63**(4): p. 621-624.
86. Lan, T., P.D. Kaviratna, and T.J. Pinnavaia, *Epoxy self-polymerization in smectite clays*. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 1996. **57**(6): p. 1005-1010.
87. Tebaldi de Sordi, M.L., et al., *Controlled radical polymerization of 2,3-Epithiopropyl methacrylate*. *Macromolecular rapid communications*, 2007. **28**(1): p. 63-71.
88. Latscha, H.P., H.A. Klein, and K. Gulbins, *Chemie für Laboranten und Chemotechniker* 1993: Springer-Verlag.
89. Dimsey, R. *Broccoli*. [Agriculture Database of the State of Victoria, Australia] 2009 08.05.2017 [cited 2019 18.08.]; Available from: <http://agriculture.vic.gov.au/agriculture/horticulture/vegetables/vegetables-a-z/broccoli>.

90. Schonhof, I., A. Krumbein, and B. Brückner, *Genotypic effects on glucosinolates and sensory properties of broccoli and cauliflower*. Food / Nahrung, 2004. **48**(1): p. 25-33.
91. McGee, H., *On food and cooking - the science and lore of the kitchen* 2004, New York: Scribner.
92. Ciska, E. and D.R. Pathak, *Glucosinolate derivatives in stored fermented cabbage*. J. Agric. Food Chem., 2004. **52**(26): p. 7938-7943.
93. Grose, K.R. and L.F. Bjeldanes, *Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid*. Chemical Research in Toxicology, 1992. **5**(2): p. 188-193.
94. Bones, A.M. and J.T. Rossiter, *The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates*. Phytochemistry, 2006. **67**(11): p. 1053-1067.
95. Schulze, T., et al., *Towards a community-driven, open-access accurate mass spectral database for the identification of emerging pollutants*. NORMAN Bulletin, 2012(3rd): p. 9-10.
96. Vicas, S.I., et al., *HPLC Fingerprinting of Glucosinolates during Fermentations Assisted by Chemometric Analysis*. Romanian Biotechnological Letters, 2015. **20**(6): p. 11067.
97. Kübler, K., *Analyse von Glucosinolaten und Isothiocyanaten mittels Flüssigkeitschromatographie-bzw. Gaschromatographie-Massenspektrometrie*, 2010, Universitätsbibliothek Giessen.
98. Botti, M.G., M.G. Taylor, and N.P. Botting, *Studies on the Mechanism of Myrosinase: Investigation of the effect of glycosyl acceptors on enzyme activity (*)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(35): p. 20530-20535.
99. Winde, I.B., *Entgiftung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems durch generalistische Herbivoren der Lepidoptera*, 2011.
100. Tiedink, H.G.M., et al., *Role of glucosinolates in the formation of N-nitroso compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991. **39**(5): p. 922-926.
101. Sarvan, I., et al., *Glucosinolate content of blanched cabbage (Brassica oleracea var. capitata) fermented by the probiotic strain Lactobacillus paracasei LMG-P22043*. Food Research International, 2013. **54**(1): p. 706-710.
102. Lewis, J. and G. Roger Fenwick, *Glucosinolate content of Brassica vegetables-Chinese cabbages Pe-tsai (Brassica pekinensis) and Pak-choi (Brassica chinensis)*. Vol. 45. 1988. 379-386.
103. Oginsky, E.L., A.E. Stein, and M.A. Greer, *Myrosinase Activity in Bacteria as Demonstrated by the Conversion of Progoitrin to Goitrin*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1965. **119**(2): p. 360-364.
104. Souci, S.W., W. Fachmann, and H. Kraut, *Food composition and nutrition tables - Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen - La composition des aliments tableaux des valeurs nutritives*. 6., revidierte und ergänzte Auflage - 6th revised and completed edition - 6ème édition, revue et complétée ed2000, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.
105. Buskov, S., et al., *Determination of Ascorbigens in Autolysates of Various Brassica Species Using Supercritical Fluid Chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(7): p. 2693-2701.
106. Hrnčirik, K., J. Valusek, and J. Velisek, *Investigation of ascorbigen as a breakdown product of glucobrassicin autolysis in Brassica vegetables*. European Food Research and Technology, 2001. **212**(5): p. 576-581.
107. Gamet-Payrastre, L., et al., *Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells*. Cancer research, 2000. **60**(5): p. 1426-1433.
108. Jiao, D., et al., *Total Isothiocyanate Contents in Cooked Vegetables Frequently Consumed in Singapore*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(3): p. 1055-1058.
109. Rose, P., et al., *β -phenylethyl isothiocyanate-mediated apoptosis in hepatoma HepG2 cells*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2003. **60**(7): p. 1489-1503.
110. Pingoud, A. and C. Urbanke, *Arbeitsmethoden der Biochemie* 1997, Berlin, New York: de Gruyter.
111. der, I.f.A. and D.G.U. (IFA), *GESTIS Stoffdatenbank*, 2020.

112. Kromidas, S. and H.-J. Kuss, *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten - Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC2008*, Weinheim: Wiley-VCH.
113. Phenomenex, I. *Probenvorbereitung ganz einfach - Auswahl und Benutzerhandbuch*. 2016 [cited 2020 22.01.]; Available from: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/29d4eb6b-2f38-40e0-b8fc-bd214669b2fe.pdf>.
114. Márton, M.-R., et al., *Determination of bioactive, free isothiocyanates from a glucosinolate-containing phytotherapeutic agent: A pilot study with in vitro models and human intervention*. *Fitoterapia*, 2013. **85**: p. 25-34.
115. Kühn, C., et al., *Diverse Excretion Pathways of Benzyl Glucosinolate in Humans after Consumption of Nasturtium (*Tropaeolum majus* L.)—A Pilot Study*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018. **62**(20): p. 1800588.
116. Platz, S., et al., *Bioavailability and metabolism of benzyl glucosinolate in humans consuming Indian cress (*Tropaeolum majus* L.)*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016. **60**(3): p. 652-660.
117. Platz, S., et al., *Determination of benzyl isothiocyanate metabolites in human plasma and urine by LC-ESI-MS/MS after ingestion of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.)*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013. **405**(23): p. 7427-7436.
118. Traka, M. and R. Mithen, *Glucosinolates, isothiocyanates and human health*. *Phytochemistry reviews*, 2009. **8**(1): p. 269-282.
119. Ghawi, S.K., et al., *Thermal and high hydrostatic pressure inactivation of myrosinase from green cabbage: A kinetic study*. *Food Chemistry*, 2012. **131**(4): p. 1240-1247.
120. Hanschen, F.S., et al., *Leaching and degradation kinetics of glucosinolates during boiling of Brassica oleracea vegetables and the formation of their breakdown products*. *Food Chemistry*, 2018. **263**: p. 240-250.
121. Hernández-Triana, M., et al., *Benzyl-isothiocyanate (BITC) decreases quality of egg white proteins in rats*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1996. **7**(6): p. 322-326.
122. Oliviero, T., et al., *Bioavailability of Isothiocyanates From Broccoli Sprouts in Protein, Lipid, and Fiber Gels*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018. **62**(18): p. 1700837.
123. Saha, S., et al., *Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2012. **56**(12): p. 1906-1916.
124. Furlund, C.B., et al., *Bovine lactoferrin digested with human gastrointestinal enzymes inhibits replication of human echovirus 5 in cell culture*. *Nutrition Research*, 2012. **32**(7): p. 503-513.
125. Capizzo, F. and R.J. Roberts, *Disposition of the hepatotoxin α -naphthylisothiocyanate (ANIT) in the rat*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1970. **17**(1): p. 262-271.
126. Ioannou, Y.M., L.T. Burka, and H.B. Matthews, *Allyl isothiocyanate: Comparative disposition in rats and mice*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1984. **75**(2): p. 173-181.
127. I., M. and S. R., *Degradation of glucosinolates during in vitro incubations of rapeseed meal with myrosinase (EC 3.2.3.1) and with pepsin (EC 3.4.23.1)-hydrochloric acid, and contents of porcine small intestine and caecum*. *Br J Nutr.*, 1994. **72**(3): p. 455-66.
128. Krul, C., et al., *Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(6): p. 1009-1016.
129. Rabot, S., et al., *Rape-seed meal toxicity in gnotobiotic rats: influence of a whole human faecal flora or single human strains of *Escherichia coli* and *Bacteroides vulgatus**. *British Journal of Nutrition*, 1993. **70**(1): p. 323-331.
130. Combourieu, B., et al., *Identification of New Derivatives of Sinigrin and Glucotropaeolin Produced by the Human Digestive Microflora Using ^1H NMR Spectroscopy Analysis of in Vitro Incubations*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2001. **29**(11): p. 1440.
131. Tang, C.-S., K. Bhothipaksa, and H.A. Frank, *Bacterial Degradation of Benzyl Isothiocyanate*. *Applied Microbiology*, 1972. **23**(6): p. 1145-1148.

132. Shapiro, T.A., et al., *Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: Metabolism and excretion in humans*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2001. **10**(5): p. 501-508.
133. Shapiro, T.A., et al., *Safety, Tolerance, and Metabolism of Broccoli Sprout Glucosinolates and Isothiocyanates: A Clinical Phase I Study*. *Nutrition and Cancer*, 2006. **55**(1): p. 53-62.
134. Vrca, et al., *Comparison of gastrointestinal stability of isothiocyanates from *Tropaeolum Majus* L. using in vitro and ex vivo digestion methods*. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2021. **13**(2): p. 160-166.
135. Elfoul, L., et al., *Formation of allyl isothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron**. *FEMS Microbiology Letters*, 2001. **197**(1): p. 99-103.
136. Hanschen, F.S., et al., *Characterization of Products from the Reaction of Glucosinolate-Derived Isothiocyanates with Cysteine and Lysine Derivatives Formed in Either Model Systems or Broccoli Sprouts*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **60**(31): p. 7735-7745.
137. Nakamura, T., et al., *Covalent Modification of Lysine Residues by Allyl Isothiocyanate in Physiological Conditions: Plausible Transformation of Isothiocyanate from Thiol to Amine*. *Chemical Research in Toxicology*, 2009. **22**(3): p. 536-542.
138. Mennicke, W.H., et al., *Studies on the metabolism and excretion of benzyl isothiocyanate in man*. *Xenobiotica*, 1988. **18**(4): p. 441-447.
139. Brüsewitz, G., et al., *The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate*. *Biochemical Journal*, 1977. **162**(1): p. 99-107.

13 Anhang

A1 Geräte und Materialien

Tabelle 49: Verzeichnis der verwendeten Materialien.

Material	Hersteller, Firmensitz
2mL-Spritze (Injekt®)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Einmal-Injektions-Kanüle 0,80 mm x 80 mm (Gr.2)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Einwegpipetten, Glas 150 mm x 230 mm	Corning Incorporated Life Sciences (Amsterdam, Niederlande)
Gas Sampling Bag Polypropylen, 1 L, Tedlar®, 1 L	Restek GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Glasliner für GC	Agilent Technologies (Santa Clara, U.S.A.)
Glasliner für GC mit Eignung für Twister	Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)
Glasverdampferrohr zur Twister-Konditionierung	Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)
Glasvial (GC, HPLC) 1,5 mL, 20 mL	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Glaswolle	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kapillarsäule HP5-MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm stationäre Phase: Phenylmethylsiloxan 5 %	Agilent Technologies (Santa Clara, U.S.A.)
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Pyrex® Kulturgläser mit PTFE Deckel	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Reaktionsgefäße (versch. Größen)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Reaktionsgefäße (versch. Größen)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
SBSE-Stäbchen (Twister®) PDMS, 10 mm x 0,5 mm	Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)
SPE-Polyethylen-Fritten SPE-Säulen	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
SPME-Fasern DVB/CAR/PDMS – 50/30 µm PDMS – 100 µm PDMS/DVB – 65 µm	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Transportadapter für GERSTEL TDU Desorption Liner	Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)
Vial Insert 250 µL	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Vialdeckel (Crimpverschluss und Schraubverschluss)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)

Tabelle 50: Verzeichnis der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller, Firmensitz	Spezifikation
Analysenwaage	Sartorius GmbH (Göttingen, Deutschland)	Typ 1602 004; Maximalgewicht: 160 g; Genauigkeit 0,05 mg
Blockthermostat	Cole-Parmer (Staffordshire, Großbritannien)	Stuart®, 3 Blöcke, Digital, SBH130D/3
Flussmesser (Rotameter)	Supelco Inc. (Bellefonte, U.S.A.)	0-150 mL/min, ohne Nadelventil
<u>GC-MS-System 1</u>		
Gaschromatograph	Agilent Technologies (Santa Clara, U.S.A.)	6890 N
Massenspektrometer	Agilent Technologies (Santa Clara, U.S.A.)	MSD 5973 Network
Autosampler	Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)	Multi Purpose Sampler MPS 2
<u>GC-MS-System 2</u>		
Gaschromatograph	Agilent Technologies (Santa Clara, U.S.A.)	7890 B
Massenspektrometer	Agilent Technologies (Santa Clara, U.S.A.)	7010 GC-MS Triple Quadrupole
Autosampler	Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)	Multi Purpose Sampler MPS 2
therm. Desorptionseinheit	Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)	TDU 2
Kühlfalle	Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)	CIS 4
HPLC	Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (Berlin, Deutschland)	Smartline, Autosampler 3950 Pump 1000, Manager 5050 UV-Detector 2500
Kolbenhubpipetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Brühl, Deutschland)	Research 10 L; 100 µL; 200 µL; 1000 µL
Kugelschwingmühle	Retsch Technology GmbH (Haan, Deutschland)	MM 400 PTFE Adapter für 10 2 mL Reaktionsgefäße TissueLyser
<u>LC-MS-System</u>		
HPLC	Agilent Technologies (Santa Clara, U.S.A.)	1200 Series Degasser G13798 Binary Pump SL G 1312B FC/ALS G1330B Autosampler G1367B Thermostated Column Compartment G1316B
Massenspektrometer	ABSciex (Vertrieb Darmstadt, Deutschland)	API2000 ESI-Quelle
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)	RTC Basic Drehzahlbereich 15-1500 1/min Temperaturbereich RT-310 °C

Gerät	Hersteller, Firmensitz	Spezifikation
NMR	Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts, U.S.A.)	AVANCE II 400 MHz Spektrometer Probenkopf 5 mm BBI, ATM und z-Gradient Probenwechsler B-ACS 120
pH-Elektrode	WTW GmbH (Weilheim, Deutschland)	SenTix 41
pH-Meter	WTW GmbH (Weilheim, Deutschland)	inoLab pH720
Probenkonzentrator	Cole-Parmer (Staffordshire, Großbritannien)	Stuart® SBHCONC/1
Rotationsverdampfer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland) Vacuubrand GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)	Laborata 4000 Membran Vacuumpumpe MZ 2C
Thermomixer	Digital Biomedical Imaging Systems AG (Pforzheim, Deutschland)	MKR 23
Trockenschrank	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)	Typ T6120 Maximaltemperatur 300 °C
Twister Konditionierer	Gerstel GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)	Tube Conditioner (TC 2)
Vortexer	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)	Digital Vortex Mixer
Zentrifugalpumpe	VEB Reglerwerk Dresden (Dresden, Deutschland (DDR))	Typ 1.20 00 02
Zentrifuge	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Brühl, Deutschland)	Centrifuge 5810R

A2 Gefahrstoffverzeichnis

Tabelle 51: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien mit GHS Piktogrammen und H- und P-Sätzen.

Substanz	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller, Firmensitz
3-(Methylsulfinyl)propyl-Isothiocyanat (Iberin, >98 %)	02	225	210, 280, 303+361+353	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
3-Butennitril (98 %)	02, 06	226, 301, 312, 319, 335	210, 260, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
3-Butenyl-Isothiocyanat	06	331, 301, 335, 315, 319	301+310, 403+233, 321	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, U.S.A.)
3-Hydroxymethylindol	07	315, 319	305+351+338	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
4-(Methylsulfinyl)butyl-Isothiocyanat (Sulforaphan, >98 %)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, U.S.A.)
4-(Methylthio)butyl-Isothiocyanat (Erucin, >98 %)	07, 08	315, 319, 334, 317, 335	210, 260, 264, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 363	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, U.S.A.)
4-Pentennitril	07	302, 312, 332	280	TCI Deutschland GmbH (Eschborn, Deutschland)
5-(Methylthio)pentyl-Isothiocyanat		keine GHS-Einstufung vorhanden		
5-Hexennitril (95 %)	02, 07	226, 315, 335	210, 302+352	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Aceton	02, 07	335, 319, 336, EUH066	210, 240, 305+351+338, 403+233	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Acetonitril (LC-MS-Grade)	02, 07	225, 332, 302, 312, 319	210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233	TH. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Allylisothiocyanat (95 %)	02, 06, 09	226, 310, 315, 319, 335, 410	210, 273, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 309+310	Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Deutschland)
Ameisensäure (98 %)	02, 05, 06	226, 302, 314, 331, EUH071	210, 250, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 308+310	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumacetat		keine GHS-Einstufung vorhanden		Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumhydrogencarbonat	07	302	301+312+330	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Benzoessäure (≥99,5 %)	05, 08	315, 318, 372	280 302+352, 305+351+338, 314	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Substanz	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller, Firmensitz
Benzol (≥99,5 %)	02, 07, 08	340, 350, 225, 304, 315, 319, 372, 412	201, 210, 240, 273, 301+330+331, 302+351+338, 403+233	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Benzonitril (99 %)	07	302, 312	280, 301, 330, 302+352, 312	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Benzylisothiocyanat (98 %)	07, 08	302, 312, 315, 319, 332, 334, 335	261, 380, 305+351+338, 342+311	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Deuteriumoxid (99,9 %)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Dichlormethan (≥99,0 %)	07,08	315, 319, 335, 336, 351, 373	281, 302+352, 305+351+338, 314	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Diethylether (≥99,5 %)	02, 07	224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 240, 304+340, 403+233	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat		keine GHS-Einstufung vorhanden		Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (absolut)	02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (≥99,8 %)	02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylacetat (99,8 %)	02, 07	225, 319, 336, EUH066	210, 240, 261, 280.1-3, 305+351+338, 403+233	TH. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Glucobrassicinapin (Kaliumsalz)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsreuth, Deutschland)
Glucobrassicin (Kaliumsalz)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsreuth, Deutschland)
Glucoiberin ((Kaliumsalz, 87 %)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsreuth, Deutschland)
Gluconapin (Kaliumsalz, 87 %)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsreuth, Deutschland)
Gluconasturtiin (Kaliumsalz, 89 %)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsreuth, Deutschland)
Glucoraphanin (Kaliumsalz, 88 %)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsreuth, Deutschland)

Substanz	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller, Firmensitz
Glucotropaeolin (Kaliumsalz, 87 %)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland)
Helium (>99,99 %)	04	280	403	Linde AG (Hamburg, Deutschland)
Hydrochinon (≥99 %)	05, 07, 08, 09	302, 317, 318, 341, 351, 400	273, 280, 302+351+338, 313	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Kaliumdihydrogen- phosphat		keine GHS-Einstufung vorhanden		Merk KGaA (Darmstadt, Deutschland)
m-Chlorperbenzoesäure (≤77 %)	02, 05, 07	242, 302, 314	301+330+331, 280, 305+351+338, 301+312	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Methanol (MS-Grade)	02, 06, 08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352, 309+310	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumbisulfit-Lösung (39 %ig)	05, 07	302, 318, EUH031	280, 305+351+338, 313	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Natriumcarbonat (99,5 %)	07	319	260, 305+351+338	Grüssing GmbH Analytika (Filsum, Deutschland)
Natriumchlorid		keine GHS-Einstufung vorhanden		
Natriumhydrogencarbonat (99 %)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Grüssing GmbH Analytika (Filsum, Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat		keine GHS-Einstufung vorhanden		Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland)
Natriumsulfat (wasserfrei)		keine GHS-Einstufung vorhanden		VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
n-Pentan	02, 07, 08, 09	225, 336, 304, 411, EUH066	273, 301+310, 331, 403+235	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Phenylacetonitril (98 %)	06	301, 311, 330	280, 302+352, 304+340, 309+310	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
2-Phenylethylisothiocyanat (97 %)	07, 08	302, 312, 315, 319, 332, 334, 335	261, 280, 305+351+338, 342+311	Fisher Scientific GmbH (Wien, Österreich)
Phenylisothiocyanat (≥99 %)	05, 06, 08, 09	301, 314, 317, 334, 410	260, 301+310, 303+361+353, 305+351+338, 405, 501	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Progoitrin (Kaliumsalz, 85 %)		keine GHS-Einstufung vorhanden		Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland)
Sephadex DEAE		keine GHS-Einstufung vorhanden		Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Substanz	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller, Firmensitz
Sinigrin	07	3015, 319, 335	261, 264, 271, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 312, 321, 332+313, 337+313, 362, 403+233, 405, 501	Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland)
Stickstoff	04	280	403	Linde AG (Hamburg, Deutschland)
Thioharnstoff	07, 08, 09	302, 351, 3361d, 411	273, 281, 308+313	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Trichloressigsäure (>99 %)	05, 07, 09	314, 355, 410	273, 280, 303+361+353, 305+351+338, 391, 501	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Zitronensäure (99,5 %)	07	319	280, 305+351+338, 337+313	Fisher Scientific GmbH (Wien, Österreich)

A3 Tabellen und Berechnungen

A3-1: Ergebnisse der Methodenpräzision am Beispiel der Senfmatrix.

Tabelle 52: Methodenpräzision anhand der Senfmatrix.

Parameter	Einwaage [g]	Allyl-ITC	Phenyl-ITC	Benzyl-ITC	Phenylethyl-ITC	5-(Methylthio)pentyl-ITC
undotiert [mg/kg]	0,5157	-	-	-	-	-
Messung 1 [mg/L]	0,5914	36,01	45,68	45,38	50,79	49,73
Messung 2 [mg/L]	0,5567	40,56	49,36	50,03	56,26	42,42
Messung 3 [mg/L]	0,5682	40,69	51,15	51,22	59,07	46,53
Messung 4 [mg/L]	0,5930	39,52	52,57	50,16	55,90	44,37
undotiert [mg/kg]	0,5157	-	-	-	-	-
Messung 1 [mg/kg]	0,5914	18,27	23,17	23,02	25,76	25,23
Messung 2 [mg/kg]	0,5567	21,86	26,60	26,96	30,32	22,86
Messung 3 [mg/kg]	0,5682	21,48	27,01	27,04	31,19	24,57
Messung 4 [mg/kg]	0,5930	19,99	26,60	25,38	28,28	22,45
\bar{x} [mg/kg]	-	20,40	25,84	25,60	28,89	23,78
Σ [mg/kg]	-	1,634	1,791	1,883	2,413	1,334
σ_{rel} [%]	-	8,01	6,93	7,36	8,35	5,61

13 Anhang

A3-2: Zusammenfassung der Hilfsgrößen für die lineare und quadratische Regression

1. Zusammenfassung der berechneten Hilfsgrößen für Allyl-ITC.

Level	x [mg/L]	y [Area]	Q _x	Q _y	Q _{xy}	x _i ²	x _i ³	x _i ⁴	x _i · y _i	x _i ² · y _i
1	9,86	993684	1970,03	5,1203·10 ¹³	3,1760·10 ⁰⁸	97,22	958,59	9451,65	9,7977·10 ⁰⁶	9,6606·10 ⁰⁷
2	19,73	2848150	1191,29	2,8102·10 ¹³	1,8297·10 ⁰⁸	389,27	7680,35	1,5153·10 ⁰⁵	5,6194·10 ⁰⁷	1,1087·10 ⁰⁹
3	29,59	4275175	607,87	1,5009·10 ¹³	9,5516·10 ⁰⁷	875,57	25908,06	7,6662·10 ⁰⁵	1,2650·10 ⁰⁸	3,7432·10 ⁰⁹
4	39,45	5613691	218,89	6,4292·10 ¹²	3,7514·10 ⁰⁷	1556,30	61396,13	2,4221·10 ⁰⁶	2,2146·10 ⁰⁸	8,7366·10 ⁰⁹
5	49,31	7029406	24,35	1,2541·10 ¹²	5,5266·10 ⁰⁶	2431,48	1,1990·10 ⁰⁵	5,9121·10 ⁰⁶	3,4662·10 ⁰⁸	1,7092·10 ¹⁰
6	59,18	9070875	24,35	8,4933·10 ¹¹	4,5480·10 ⁰⁶	3502,27	2,0726·10 ⁰⁵	1,2266·10 ⁰⁷	5,3681·10 ⁰⁸	3,1769·10 ¹⁰
7	69,04	11176925	218,89	9,1666·10 ¹²	4,4794·10 ⁰⁷	4766,52	3,2908·10 ⁰⁵	2,2720·10 ⁰⁷	7,7165·10 ⁰⁸	5,3275·10 ¹⁰
8	78,90	11823017	607,87	1,3496·10 ¹³	9,0576·10 ⁰⁷	6225,21	4,9117·10 ⁰⁵	3,8753·10 ⁰⁷	9,3284·10 ⁰⁸	7,3601·10 ¹⁰
9	88,76	13850643	1191,29	3,2505·10 ¹³	1,9678·10 ⁰⁸	7878,34	6,9928·10 ⁰⁵	6,2068·10 ⁰⁷	1,2294·10 ⁰⁹	1,0912·10 ¹¹
10	98,63	14811293	1970,03	4,4382·10 ¹³	2,9569·10 ⁰⁸	9727,88	9,5946·10 ⁰⁵	9,4632·10 ⁰⁷	1,4608·10 ⁰⁹	1,4408·10 ¹¹
Summe	542,45	81492859	8024,86	2,0240·10 ¹⁴	1,2715·10 ⁰⁹	37450,06	2,9021·10 ⁰⁶	2,3970·10 ⁰⁸	5,6921·10 ⁰⁹	4,4262·10 ¹¹

2. Zusammenfassung der berechneten Hilfsgrößen für Phenyl-ITC.

Level	x [mg/L]	y [Area]	Q _x	Q _y	Q _{xy}	x _i ²	x _i ³	x _i ⁴	x _i · y _i	x _i ² · y _i
1	10,92	2503712	2412,28	3,5809·10 ¹⁴	9,2942·10 ⁰⁸	119,25	1302,17	14219,70	2,7341·10 ⁰⁷	2,9856·10 ⁰⁸
2	21,83	7248564	1459,62	2,0103·10 ¹⁴	5,4169·10 ⁰⁸	476,55	10403,06	2,2710·10 ⁰⁵	1,5824·10 ⁰⁸	3,4543·10 ⁰⁹
3	32,75	11232354	744,47	1,0393·10 ¹⁴	2,7816·10 ⁰⁸	1072,56	35126,42	1,1504·10 ⁰⁶	3,6786·10 ⁰⁸	1,2047·10 ¹⁰
4	43,66	14797016	268,14	4,3958·10 ¹³	1,0857·10 ⁰⁸	1906,20	83224,50	3,6336·10 ⁰⁶	6,4604·10 ⁰⁸	2,8206·10 ¹⁰
5	54,58	18398284	29,76	9,1735·10 ¹²	1,6522·10 ⁰⁷	2978,98	1,6259·10 ⁰⁵	8,8743·10 ⁰⁶	1,0042·10 ⁰⁹	5,4808·10 ¹⁰
6	65,49	23858827	29,76	5,9135·10 ¹²	1,3265·10 ⁰⁷	4288,94	2,8088·10 ⁰⁵	1,8395·10 ⁰⁷	1,5625·10 ⁰⁹	1,0233·10 ¹¹
7	76,41	30179043	268,14	7,6597·10 ¹³	1,4331·10 ⁰⁸	5838,49	4,4612·10 ⁰⁵	3,4088·10 ⁰⁷	2,3060·10 ⁰⁹	1,7620·10 ¹¹
8	87,32	30633763	744,47	8,4763·10 ¹³	2,5120·10 ⁰⁸	7624,78	6,6580·10 ⁰⁵	5,8137·10 ⁰⁷	2,6749·10 ⁰⁹	2,3358·10 ¹¹
9	98,24	36128393	1459,62	2,1613·10 ¹⁴	5,6166·10 ⁰⁸	9651,10	9,4812·10 ⁰⁵	9,3144·10 ⁰⁷	3,5493·10 ⁰⁹	3,4868·10 ¹¹
10	109,15	39290689	2412,28	3,1911·10 ¹⁴	8,7737·10 ⁰⁸	11913,72	1,3004·10 ⁰⁶	1,4194·10 ⁰⁸	4,2886·10 ⁰⁹	4,6810·10 ¹¹
Summe	600,35	214270645	9828,55	1,4187·10 ¹⁵	3,7212·10 ⁰⁹	45870,56	3,9340·10 ⁰⁶	3,5960·10 ⁰⁸	1,6585·10 ¹⁰	1,4277·10 ¹²

3. Zusammenfassung der berechneten Hilfsgrößen für Benzyl-ITC.

Level	x [mg/L]	y [Area]	Q _x	Q _y	Q _{xy}	x _i ²	x _i ³	x _i ⁴	x _i · y _i	x _i ² · y _i
1	10,65	2596124	2296,81	4,3863·10 ¹⁴	1,0037·10 ⁰⁹	113,42	1207,95	12864,66	2,7649·10 ⁰⁷	2,9446·10 ⁰⁸
2	21,30	7756756	1389,43	2,4910·10 ¹⁴	5,8831·10 ⁰⁸	453,69	9663,60	2,0583·10 ⁰⁵	1,6522·10 ⁰⁸	3,5192·10 ⁰⁹
3	31,95	12137393	708,89	1,3001·10 ¹⁴	3,0359·10 ⁰⁸	1020,80	32614,64	1,0420·10 ⁰⁶	3,8779·10 ⁰⁸	1,2390·10 ¹⁰
4	42,60	16031249	255,20	5,6377·10 ¹³	1,1995·10 ⁰⁸	1814,76	77308,78	3,2934·10 ⁰⁶	6,8293·10 ⁰⁸	2,9093·10 ¹⁰
5	53,25	20144953	28,36	1,1524·10 ¹³	1,8077·10 ⁰⁷	2835,56	1,5099·10 ⁰⁵	8,0404·10 ⁰⁶	1,0727·10 ⁰⁹	5,7122·10 ¹⁰
6	63,90	26526050	28,36	8,9183·10 ¹²	1,5902·10 ⁰⁷	4083,21	2,6092·10 ⁰⁵	1,6673·10 ⁰⁷	1,6950·10 ⁰⁹	1,0831·10 ¹¹
7	74,55	33821725	255,20	1,0572·10 ¹⁴	1,6426·10 ⁰⁸	5557,70	4,1433·10 ⁰⁵	3,0888·10 ⁰⁷	2,5214·10 ⁰⁹	1,8797·10 ¹¹
8	85,20	33706866	708,89	1,0337·10 ¹⁴	2,7070·10 ⁰⁸	7259,04	6,1847·10 ⁰⁵	5,2694·10 ⁰⁷	2,8718·10 ⁰⁹	2,4468·10 ¹¹
9	95,85	39683621	1389,43	2,6063·10 ¹⁴	6,0176·10 ⁰⁸	9187,22	8,8060·10 ⁰⁵	8,4405·10 ⁰⁷	3,8037·10 ⁰⁹	3,6458·10 ¹¹
10	106,5	42992300	2296,81	3,7840·10 ¹⁴	9,3227·10 ⁰⁸	11342,25	1,2079·10 ⁰⁶	1,2865·10 ⁰⁸	4,5787·10 ⁰⁹	4,8763·10 ¹¹
Summe	585,75	235397037	9357,36	1,7427·10 ¹⁵	4,0185·10 ⁰⁹	43667,66	3,6540·10 ⁰⁶	3,2590·10 ⁰⁸	1,7807·10 ¹⁰	1,4956·10 ¹²

4. Zusammenfassung der berechneten Hilfsgrößen für Phenylethyl-ITC.

Level	x [mg/L]	y [Area]	Q _x	Q _y	Q _{xy}	x _i ²	x _i ³	x _i ⁴	x _i · y _i	x _i ² · y _i
1	10,83	2466584	2376,76	2,9088·10 ¹⁴	8,3148·10 ⁰⁸	117,29	1270,24	13756,69	2,6713·10 ⁰⁷	2,8930·10 ⁰⁸
2	21,67	6844939	1437,32	1,6070·10 ¹⁴	4,8061·10 ⁰⁸	469,59	10175,99	2,2051·10 ⁰⁵	1,4833·10 ⁰⁸	3,2143·10 ⁰⁹
3	32,50	10429556	733,43	8,2670·10 ¹³	2,4624·10 ⁰⁸	1056,25	34328,13	1,1157·10 ⁰⁶	3,3896·10 ⁰⁸	1,1016·10 ¹⁰
4	43,33	13753473	264,13	3,3274·10 ¹³	9,3748·10 ⁰⁷	1877,49	81351,59	3,5250·10 ⁰⁶	5,9594·10 ⁰⁸	2,5822·10 ¹⁰
5	54,17	17045118	29,29	6,1342·10 ¹²	1,3404·10 ⁰⁷	2934,39	1,5896·10 ⁰⁵	8,6106·10 ⁰⁶	9,2333·10 ⁰⁸	5,0017·10 ¹⁰
6	65,00	22140815	29,35	6,8590·10 ¹²	1,4190·10 ⁰⁷	4225,00	2,7463·10 ⁰⁵	1,7851·10 ⁰⁷	1,4392·10 ⁰⁹	9,3545·10 ¹⁰
7	75,83	27892122	264,00	7,0062·10 ¹³	1,3600·10 ⁰⁸	5750,19	4,3604·10 ⁰⁵	3,3065·10 ⁰⁷	2,1151·10 ⁰⁹	1,6038·10 ¹¹
8	86,66	27760865	733,22	6,7881·10 ¹³	2,2310·10 ⁰⁸	7509,96	6,5081·10 ⁰⁵	5,6399·10 ⁰⁷	2,4058·10 ⁰⁹	2,0848·10 ¹¹
9	97,50	32273329	1437,77	1,6260·10 ¹⁴	4,8351·10 ⁰⁸	9506,25	9,2686·10 ⁰⁵	9,0369·10 ⁰⁷	3,1466·10 ⁰⁹	3,0680·10 ¹¹
10	108,33	34611660	2376,37	2,2770·10 ¹⁴	7,3560·10 ⁰⁸	11735,39	1,2713·10 ⁰⁶	1,3772·10 ⁰⁸	3,7495·10 ⁰⁹	4,0618·10 ¹¹
Summe	595,82	195218461	9681,64	1,1088·10 ¹⁵	3,2579·10 ⁰⁹	45181,79	3,8457·10 ⁰⁶	3,4889·10 ⁰⁸	1,4889·10 ¹⁰	1,2658·10 ¹²

5. Zusammenfassung der berechneten Hilfsgrößen für 5-(Methylthio)pentyl-ITC.

Level	x [mg/L]	y [Area]	Q _x	Q _y	Q _{xy}	x _i ²	x _i ³	x _i ⁴	x _i · y _i	x _i ² · y _i
1	4,83	85125	471,89	8,6327·10 ¹¹	2,0183·10 ⁰⁷	23,33	112,68	544,24	4,1115·10 ⁰⁵	1,9859·10 ⁰⁶
2	9,66	314231	285,37	4,9002·10 ¹¹	1,1825·10 ⁰⁷	93,32	901,43	8707,80	3,0355·10 ⁰⁶	2,9323·10 ⁰⁷
3	14,48	504387	145,76	2,5996·10 ¹¹	6,1555·10 ⁰⁶	209,67	3036,03	43961,68	7,3035·10 ⁰⁶	1,0576·10 ⁰⁸
4	19,31	701381	52,46	9,7885·10 ¹⁰	2,2661·10 ⁰⁶	372,88	7200,24	1,3904·10 ⁰⁵	1,3544·10 ⁰⁷	2,6153·10 ⁰⁸
5	24,14	872191	5,82	2,0180·10 ¹⁰	3,4278·10 ⁰⁵	582,74	14067,33	3,3959·10 ⁰⁵	2,1055·10 ⁰⁷	5,0826·10 ⁰⁸
6	28,97	1150450	5,84	1,8551·10 ¹⁰	3,2920·10 ⁰⁵	839,26	24313,39	7,0436·10 ⁰⁵	3,3329·10 ⁰⁷	9,6553·10 ⁰⁸
7	33,79	1392336	52,37	1,4295·10 ¹¹	2,7362·10 ⁰⁶	1141,76	38580,21	1,3036·10 ⁰⁶	4,7047·10 ⁰⁷	1,5897·10 ⁰⁹
8	38,62	1555534	145,61	2,9299·10 ¹¹	6,5317·10 ⁰⁶	1491,50	57601,90	2,2246·10 ⁰⁶	6,0075·10 ⁰⁷	2,3201·10 ⁰⁹
9	43,45	1732864	285,51	5,1641·10 ¹¹	1,2142·10 ⁰⁷	1887,90	82029,36	3,5642·10 ⁰⁶	7,5293·10 ⁰⁷	3,2715·10 ⁰⁹
10	48,28	1833975	472,06	6,7195·10 ¹¹	1,7810·10 ⁰⁷	2330,96	1,1254·10 ⁰⁵	5,4334·10 ⁰⁶	8,8544·10 ⁰⁷	4,2749·10 ⁰⁹
Summe	265,53	10142474	1922,70	3,3742·10 ¹²	8,0323·10 ⁰⁷	8973,32	3,4038·10 ⁰⁵	1,3762·10 ⁰⁷	3,4964·10 ⁰⁸	1,3329·10 ¹⁰

13 Anhang

Tabelle 53: Einwaagen der GSL-Referenzsubstanzen für die Kalibrierung mittels LC-ESI-MS/MS.

Substanz	Masse GSL K Salz	Masse GSL	%	EW [mg] Salz auf 10ml	EW rein [mg] auf 10ml	c [mmol]
Glucotropaeolin	447,52	408,43	0,913	7,2	6,57	1,6089
Sinigrin hydrat	415,46	358,37	0,863	6,8	5,87	1,6367
Glucobrassicin	486,56	447,47	0,920	1,6	1,47	1,0961
Glucoiberin	461,57	422,48	0,915	2,2	2,01	0,9533
Glucoraphanin	475,6	436,51	0,918	3	2,75	1,2616
Gluconapin	411,49	372,4	0,905	3	2,72	1,4581
Progoitrin	427,49	388,4	0,909	4,8	4,36	1,1228

A3-4: Zusammenfassung der Kalibrierung zur Quantifizierung von GSL-Abbauprodukten mittels GC-MS.

Tabelle 54: Einwaagen der Abbauprodukt-Referenzsubstanzen für die Kalibrierung mittels GC-MS.

Abbauprodukt	Einwaage [mg] auf 10ml	Molare Masse	n [mmol]	c [mg/L]
Allyl-ITC	4,600	99	0,0464646	460
Allyl-CN	5,400	67	0,0805970	540
Indol-3-Carbinol	3,000	147	0,0204082	300
3-Methylsulfinyl- propyl ITC (Iberin)	6,700	163	0,0411043	670
Sulforaphan	6,000	177	0,0338983	600
Erucin	10,200	161	0,0633540	1020
3-Butenyl-ITC	3,800	113	0,0336283	380
Phenylethyl-ITC	9,700	163	0,0595092	970
Benzyl-IT	10,300	149,21	0,0690302	1030
3- Phenylpropionitril	10,300	131,17	0,0785241	1030
5-Hexennitril *	8,800	95,15	0,0924855	880
4-Pentennitril *	7,600	81,12	0,0936884	760
I3ACN	4,3	156,18	0,0275323	430

13 Anhang

Im Folgenden ist die Kalibrierung zur Quantifizierung der Abbauprodukte mittels GC-MS für die einzelnen Referenzsubstanzen aufgeführt:

3-Butenyl-ITC		Erucin		I3ACN		Iberin	
Konz [mg/l]	Area	Konz [mg/l]	Area	Konz [mg/l]	Area	Konz [mg/l]	Area
100	15993794,2	100	28974466,9	100	20867407,8	100	8959269,86
75	25825751,2	75	18346245,3	50	8077177,4	75	5358984,99
50	18175610,4	50	11784501,6	25	2260987,76	50	3362233,55
25	4931786,95	25	4340932,17	20	1241701,83	25	1147388,11
20	3189688,66	20	3689723,75	15	768998,387	20	652457,177
15	1409437,28	15	1631705,79	10	477797,827		
10	160807,612	10	1054224,73	5	159589,964		

3-Phenylpropionitril		5-Hexennitril		4-Pentennitril	
Konz [mg/l]	Area	Konz [mg/l]	Area	Konz [mg/l]	Area
100	37674030,1	100	10660889,3	100	10387324,2
75	27754032,3	75	8210566,22	75	7970357,06
50	16437613,8	50	5231034,57	50	4974227,9
25	10149967,5	25	3273282,66	25	3282186,71
20	6390512,72	20	2196471,15	20	2425337,48
15	5462458,78	15	1456965,83	15	1608522,42
10	3666297,11	10	962118,496	10	1024418,47
5	2587503,21	5	796619,817	5	920732,704
2	1916639,62	2	465741,609	2	540713,723
1	661673,235	1	246627,189	1	344988,274

Allyl-ITC		Phenylethyl-ITC		Allyl-CN		Sulforaphan	
Konz [mg/l]	Area	Konz [mg/l]	Area	Konz [mg/l]	Area	Konz [mg/l]	Area
100	17857067	100	37445832	100	11162405,4	2100	317214334
75	13997162,7	75	43063810,4	75	9044883,76	1800	289380052
50	9476540,88	50	27773430,6	50	6109230,22	1500	176386262
25	3466872,84	25	9422683,86	25	3096164,21	1200	130406014
20	3378421,93	20	7773195,64	20	2391803,84	900	93233637,3
15	1903535,76	15	5407348,28	15	1926951,36	800	88751381,4
10	1278253,9	10	2878112,68	10	1356432,66	700	77506914,5
5	434255,549	5	1239620,22	5	630542,792	600	72601926,2
2	53392,762	2	262069,557	2	455415,829	500	69171762,8
				1	305817,398	400	47997197,2
				0,5	322399,881	300	21843618,8
				0,1	308147,758	200	19413752,9
						100	6167129,49
						50	638740,014

A3-5: Charakterisierung von Ascorbigen mittels NMR-Spektroskopie.

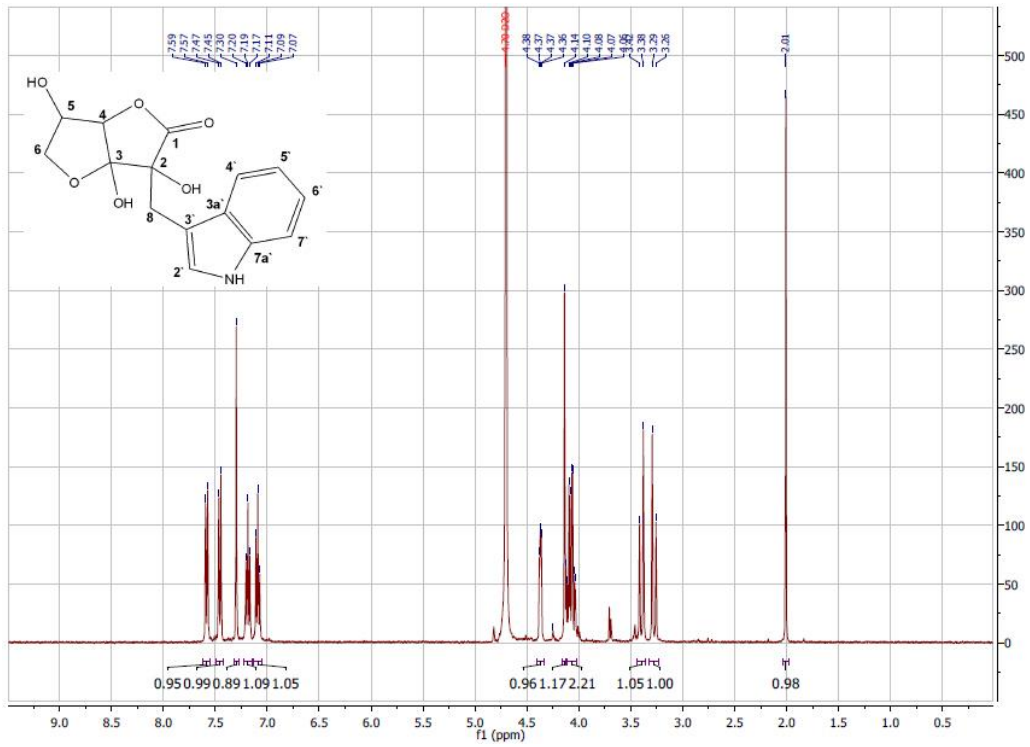


Abbildung 53: ¹H-NMR (400 MHz, D₂O).

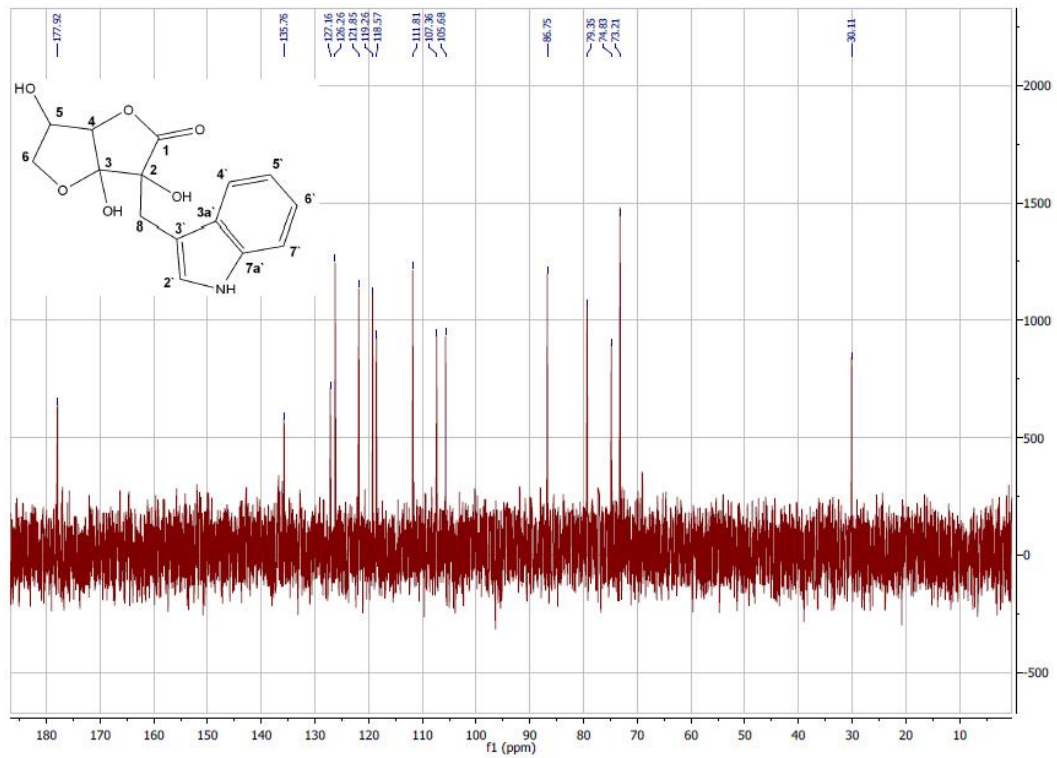


Abbildung 54: ¹³C-NMR (400 MHz, D₂O).

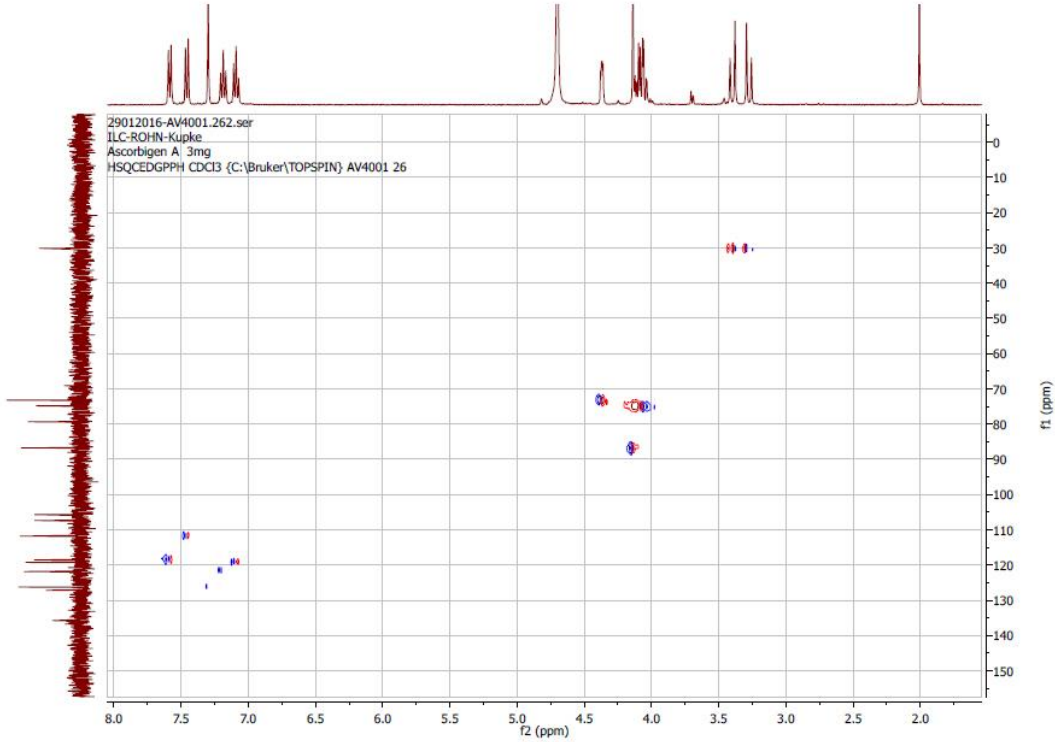


Abbildung 55: HSQC-Experiment.

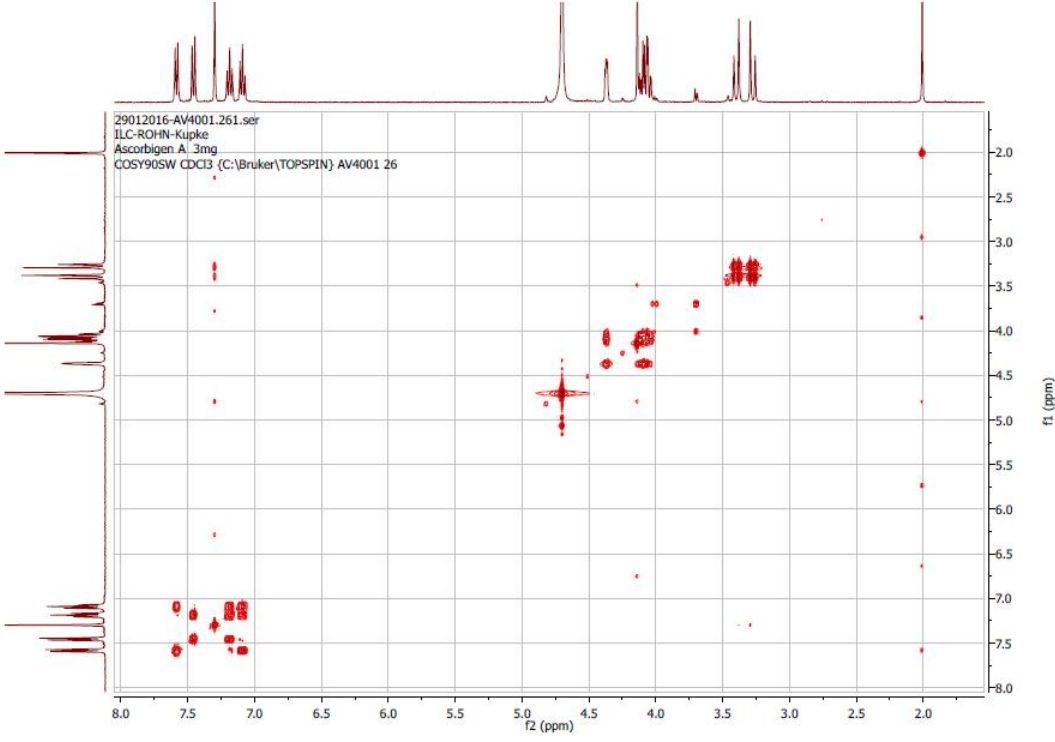


Abbildung 56: COSY-Experiment.

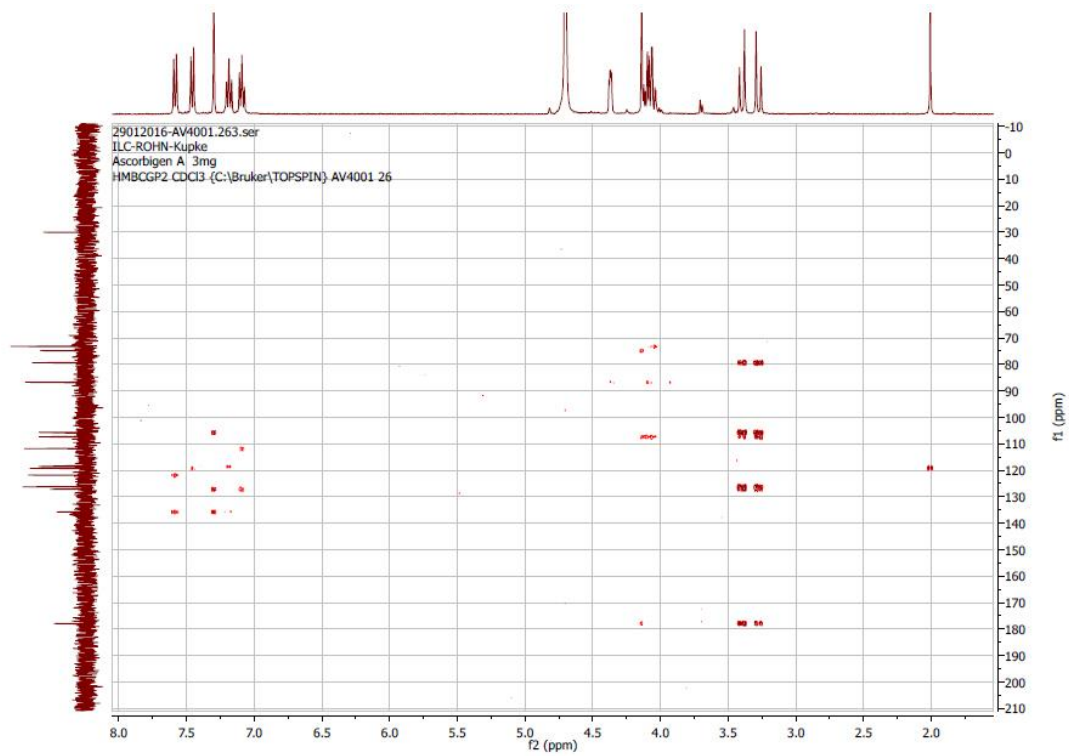


Abbildung 57: HMBC-Experiment.

A3-6: Proteinfällung mit TCA, Einfluss auf die Peaktrennung.

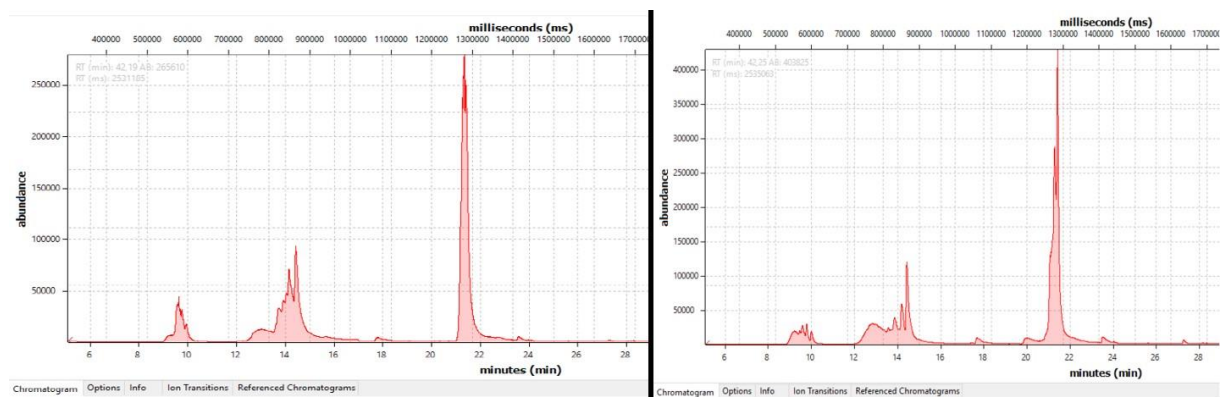


Abbildung 58: Proteinfällung mit TCA: Chromatogramm des Multistandards im SIM-Modus - nach Proteinfällung mit links 100 µL und rechts 50 µL 5%iger TCA.

A3-7: Proteinfällung mit eiskaltem Acetonitril, Einfluss auf die Peaktrennung.

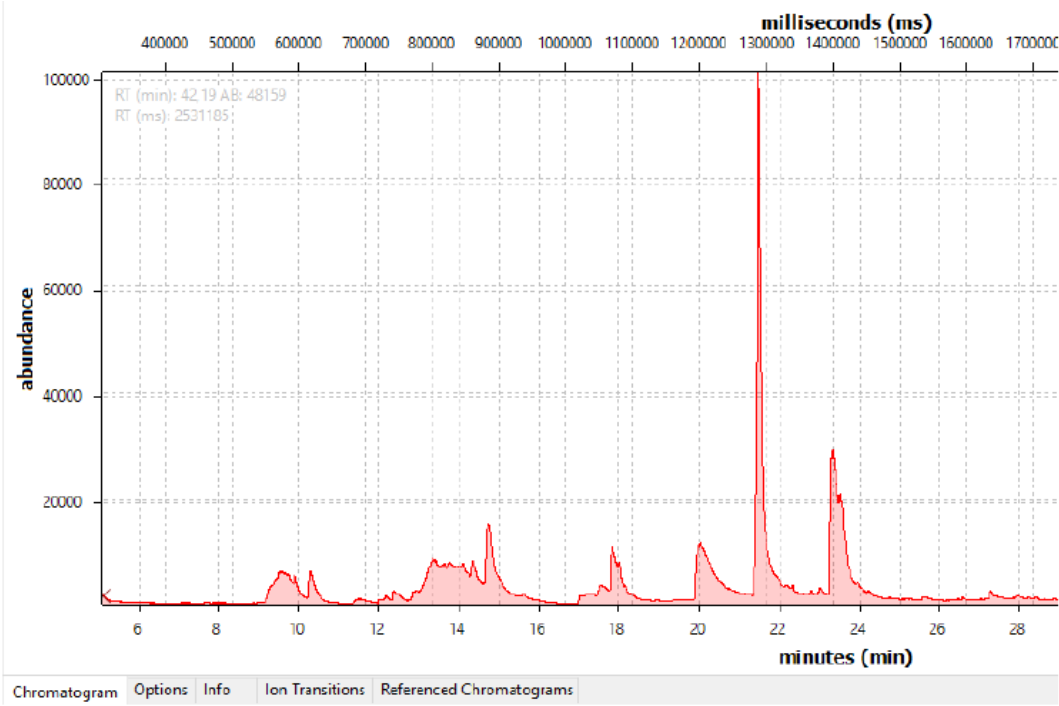


Abbildung 59: Proteinfällung mit Acetonitril: Chromatogramm des Multistandards im SIM-Modus

13 Anhang

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 15. November 2022