

Untersuchungen zur Optimierung der Probenahme für die GSL*-Bestimmung in der Grünmasse von Futterraps

Zobelt, Ursula; Marquard, R.

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Justus-Liebig-Universität Gießen, 6300 Gießen, Ludwigstraße 23, BR Deutschland

Einleitung

Für die Beurteilung der Futterqualität von Grünraps sind die GSL*-Gehalte der Samen kein ausreichendes Kriterium, da offenbar keine generelle Korrelation zwischen dem GSL-Gehalt der Samen und dem der vegetativen Organe besteht (1). Um zuverlässige Aussagen über den Futterwert im Hinblick auf den GSL-Gehalt zu erhalten, ist somit eine Analyse der Grünmasse erforderlich.

Bei der Untersuchung von Grünraps besteht neben allgemeinen analytischen Problemen der GSL-Bestimmung eine besondere Schwierigkeit in der Probenahme und der Aufbereitung des Analysengutes. Es muß einerseits gewährleistet sein, daß der GSL-Gehalt des zur Verfütterung kommenden Aufwuchses repräsentativ erfaßt wird, andererseits dürfen keine GSL-Verluste durch enzymatische Spaltung auftreten.

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren, direkte Einbringung in kochendes Methanol (1), Schockgefrierung unter flüssigem Stickstoff oder Gefriertrocknung (3), sind auf relativ kleine Probemengen begrenzt und eignen sich deshalb nur bedingt für eine repräsentative Probenahme in schnittreifen Futterrapsbeständen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Analysenergebnisse nach unterschiedlicher Probenvorbereitung verglichen und zwar: Trocknung unbeschädigter Pflanzen bei 60° C und 80° C sowie Schockgefrierung unter flüssigem N₂ und Aufnahme in kochendem Methanol.

Material und Methoden

Von 6 verschiedenen Rapsgenotypen wurden je 10 Pflanzen pro Teilstück im Vegetationsstadium 39 entnommen und unter Vermeidung von Beschädigungen im belüfteten Trockenschrank bei 60° C und 80° C getrocknet. Anschließend wurden davon jeweils 5 Pflanzen als Ganzes vermahlen, die restlichen 5 Pflanzen in Blatt und Stengel zerlegt und die einzelnen Fraktionen vermahlen. Außerdem wurden Blätter von jeweils 10 Pflanzen je Rapsgenotyp mit flüssigem N₂ schockgefroren, zerrieben und ein aliquoter Teil davon mit kochendem Methanol übergossen. Daraus ergeben sich folgende Versuchsvarianten:

GSL* = Glucosinolat

Probenvorbereitung

- Trocknung bei 60° C
- Trocknung bei 80° C
- fl. N₂ /Methanol

Pflanzenmaterial

- Ganzpflanze
- Blattfraktion
- Ganzpflanze
- Blattfraktion
- Blattfraktion.

Die Analyse der einzelnen GSLe erfolgte mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) in Anlehnung an die Methode der Arbeitsgruppe von SANG und MINCHINTON (1,3). Als interner Standard wurde Sinigrin verwendet. Da keine weiteren Reinsubstanzen zur Verfügung standen, wurden die Response-Faktoren der Literatur (4) entnommen; auch die Identifizierung erfolgte anhand von Literaturangaben (3). Somit ist nicht auszuschließen, daß die absoluten GSL-Gehalte eventuell einer Korrektur bedürfen.

Ergebnisse und Diskussion

Bei der Auftrennung der Desulfo-GSLe an einer RP18-Säule mit einem Gradientenprogramm, wobei H₂O dest. und Acetonitril als Elutionsmittel verwendet wurden, konnten 8 Einzel-GSLe erfaßt werden (Abb. 1).

Abb. 1:
HPLC-Chromatogramm der
Desulfo-GSLe eines
Raps-Blattextraktes

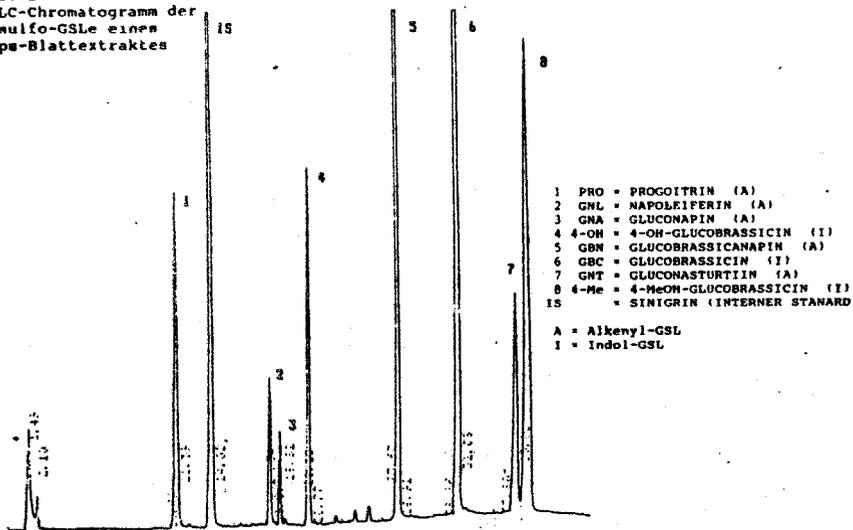
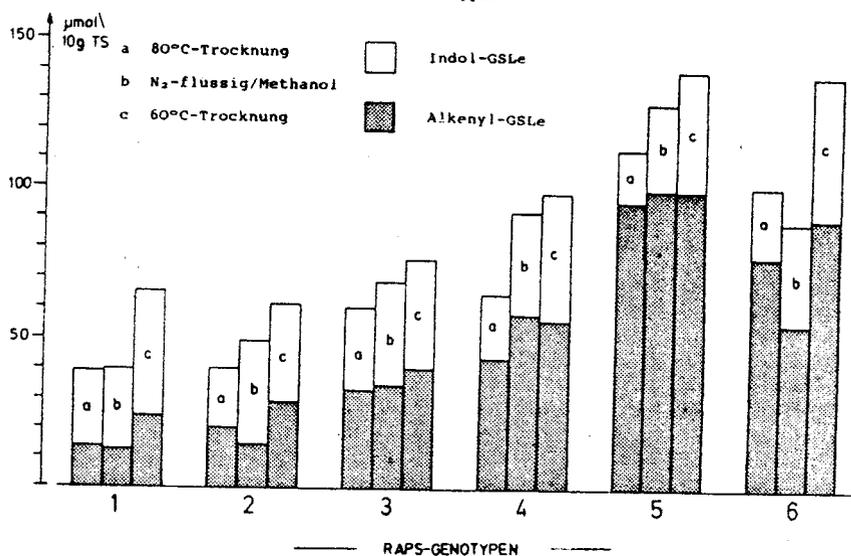


Abbildung 2 zeigt die GSL-Gehalte in der Blattfraktion der 6 Raps-Genotypen nach unterschiedlicher Probenvorbereitung. Es ist klar ersichtlich, daß die Behandlung mit flüssigem N_2 und insbesondere die Trocknung bei $80^\circ C$ niedrigere GSL-Gehalte ergab. Auch bei der Untersuchung der Ganzpflanze sind die GSL-Gehalte aller Raps-Genotypen nach der Trocknung bei $80^\circ C$ deutlich niedriger als nach der Trocknung bei $60^\circ C$ (Abb. 3). Die Reduktion des Gesamt-GSL-Gehaltes resultiert offenbar aus einer Zerstörung oder verminderten Extrahierbarkeit sowohl der Alkenyl- als auch der Indol-GSLe (Abb. 2,3).

Abb. 2: Einfluß der Probenvorbereitung auf das Analyseergebnis; GSL-Gehalte in der Blattfraktion von 6 Raps-Genotypen



Nach einem Vergleich der von uns gefundenen GSL-Gehalte, mit Untersuchungsergebnissen eines anderen Institutes (5) an den gleichen Raps-Genotypen, kann davon ausgegangen werden, daß nach einer Trocknung bei $60^\circ C$ die GSLe weitgehend quantitativ erfaßt werden.

Abb. 3: Einfluß der Trocknungstemperatur auf das Analyseergebnis:
GSL-Gehalte in der Gesamtpflanze von 6 Raps-Genotypen

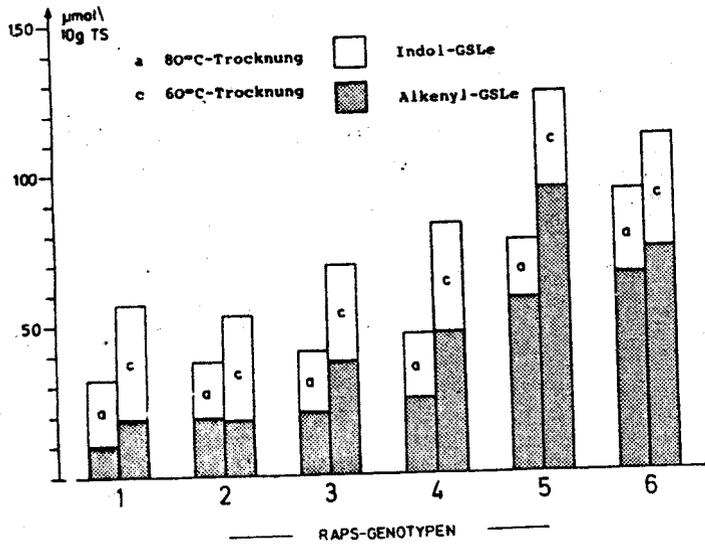
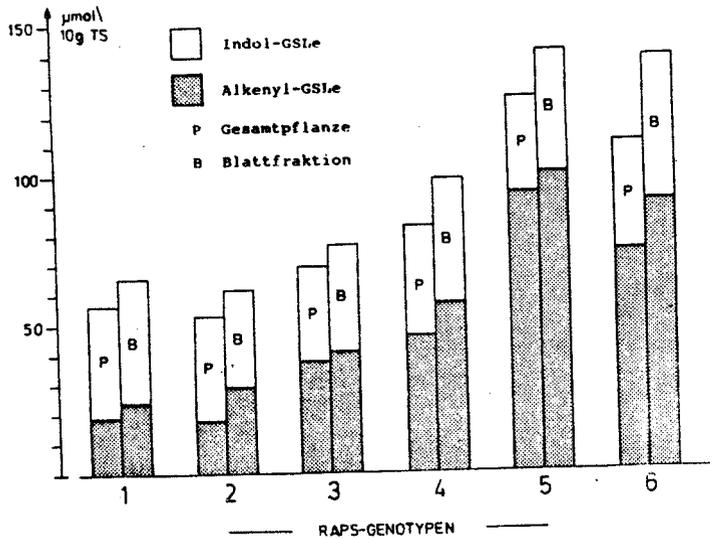


Abb. 4: GSL-Gehalte in der Blattfraktion und der Gesamtpflanze von
6 Raps-Genotypen im Vegetationsstadium 39 - Trocknung bei 60°C -



In Abbildung 4 sind die GSL-Gehalte der Blattfraktion denen der Gesamtpflanze gegenübergestellt. Es ist ersichtlich, daß eine enge positive Korrelation ($r=0,99$) zwischen den GSL-Gehalten des Blattes und der Gesamtpflanze besteht. Es erscheint danach möglich, aus den GSL-Gehalten der Blätter auf den GSL-Gehalt eines Futterpflanzenbestandes zu schließen. Für die praktische Probenahme ergibt sich unseres Erachtens daraus jedoch kein Vorteil, da die Abtrennung der Blätter entweder in tiefgefrorenem oder getrocknetem Zustand der Pflanze erfolgen sollte, um enzymatische GSL-Spaltungen an den Schnitt- oder Bruchstellen zu vermeiden. Wenn somit ohnehin eine Konservierung ganzer Pflanzen erforderlich ist, erscheint es sinnvoller auch die Gesamtpflanze zu analysieren, um den GSL-Gehalt eines Futterpflanzenbestandes zu ermitteln.

Die Ergebnisse von je 4 Vergleichsanalysen in getrocknetem Mahlgut der gleichen Sorte, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind, zeigen, daß die verwendete Analysenmethode eine durchaus befriedigende Präzision bzw. Reproduzierbarkeit aufweist.

Tab. 1: Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Methode bei unterschiedlichem GSL-Gehalt; 4 Einwaagen aus 2 Mischproben; Angaben in $\mu\text{mol}/10 \text{ g TM}$

Probe	PRO	GNL	GNA	GBN	GNT	4-OH	GBC	4-Me	Gesamt
A	5.48	2.40	2.55	5.33	0.50	0.26	18.45	2.25	37.22
	5.10	2.18	2.40	4.95	0.53	0.30	17.85	1.95	35.26
	4.80	2.03	2.25	5.03	0.56	0.23	17.40	2.10	34.40
	5.25	2.18	2.40	4.88	0.53	0.30	16.95	2.33	34.82
\bar{x}	5.16	2.20	2.40	5.05	0.53	0.27	17.66	2.16	35.43
cv%	5.52	6.93	5.10	3.92	4.62	12.61	3.63	7.78	3.52
B	22.58	14.25	3.60	21.08	7.58	1.13	28.80	4.28	103.30
	22.13	13.80	3.75	23.18	7.13	1.20	26.93	3.45	101.57
	20.85	13.28	4.05	23.33	6.53	1.50	27.08	4.50	101.12
	21.83	14.10	4.50	22.20	6.75	1.28	27.75	3.75	102.16
\bar{x}	21.85	13.86	3.98	22.45	7.00	1.28	27.64	4.00	102.04
cv%	3.35	3.09	9.97	4.63	6.58	12.54	3.08	12.02	0.92

Nach den vorliegenden Untersuchungen wird folgender Analysengang vorgeschlagen:

- Entnahme von Gesamtpflanzen im Vegetationsstadium 39
- Trocknung der unbeschädigten Pflanzen bei 60°C im belüfteten Trockenschrank
- Vermahlung, Siebgröße 0,7 mm
- Probenteilung, 1g Einwaage
- Extaktion mit kochendem 80%igem Methanol
- Zusatz von Sinigrin als Internem Standard
- Nachhomogenisierung mit Ultra Thurax

- Abnutschen des Extraktes, Einengen am Rotationsverdampfer bei 40° C auf ca. 10 ml
- Volumeneinstellung auf 25 ml mit H₂O dest.
- Fällung der Proteine mit Pb-/Ba-acetatlösung (0,5 m)
- Zentrifugieren, 3ml aliquoter Teil des klaren Überstandes abnehmen
- Verdünnung mit 3 ml H₂O dest.
- Desulfatierung on column

- 20 ul Eluat für HPLC-Analyse
- Trennung an RP18-Säule, Elution mit H₂O dest./Acetonitril im Gradientenprogramm
- Detektion bei 230 nm, Auswertung mit elektronischem Integrator unter Verwendung vor Response-Faktoren

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen die Entnahme ganzer Pflanzen und Trocknung bei 60° C als ein gut geeignetes Verfahren der repräsentativen Probenahme und -vorbereitung erscheinen. Nach der Vermahlung des getrockneten Materials erhält man ein befriedigend homogenes Analysengut, das eine unproblematische Probenteilung ermöglicht. Dies wiederum ist die Voraussetzung für die Gestaltung eines arbeitstechnisch günstigen und kostensparenden Analysenganges.

Literatur

1. MINCHINTON I., SANG J., BURKE D., TRUSCOTT R.J.W. (1982); J. Chromatography, 247, 141-148
- MÖLLER P., PLÖGER ANETTE, SÖRENSEN H. (1984); Advances in the production and utilization of cruciferous crops with special emphasis to oilseed rape, Copenhagen, 11.-13.9.1984
3. SANG J.P., MINCHINTON I.R., JOHNSTONE P.K., TRUSCOTT R.J.W. (1984); Canm J. Plant Sci., 64, 77-93
4. MÖLLER P., OLSEN O., PLÖGER ANETTE, RASMUSSEN K.W., SÖRENSEN H. (1984); Advances in the production and utilization of cruciferous crops with special emphasis to oilseed rape, Copenhagen, 11.-13.9.1984
5. RÖBBELEN G. (1987); persönliche Mitteilung