

EIN NEUARTIGER GLUCOSE-TESTSTREIFEN FÜR DIE GLUCOSINOLAT-
BESTIMMUNG IN RAPSSAATEN

W. Schumann

Institut für Öl- und Futterpflanzenzüchtung "Hans Lembke",
O-2401 Malchow/Poel, BR DeutschlandEINLEITUNG

Während der Anbaumstellung auf 00-Rapssorten ist eine sichere Bestimmung des Glucosinolat(GSL)-gehaltes der anfallenden Erntepartien unerlässlich. Die verfügbaren exakten Labormethoden erfordern jedoch einen hohen Investitionsaufwand sowie qualifiziertes Laborpersonal.

Mit einfachen Glucose-Schnelltests kann dagegen kostengünstig eine erste Separierung in Qualitätsklassen vorgenommen werden. Dabei werden die GSLe durch Myrosinase gespalten und dann die in äquimolarer Menge freiwerdende Glucose bestimmt.

Zum Glucosenachweis finden überwiegend auf trockenchemischer Basis arbeitende Testpapiere, Teststreifen oder Teststäbchen Anwendung, welche die spezifische Glucoseoxidase/Peroxidase(GOD/POD)-Reaktion nutzen.

Erstmals setzte LEIN (1970) einen Glucose-Teststreifen zur GSL-Bestimmung ein. Der LEIN'sche "Glucotest" wurde in der Züchtung jahrelang zur Vorselektion von glucosinolatarmen Rapsgenotypen angewendet. Die Zuverlässigkeit des qualitativen Tests kann durch Anwendung von Aktivkohle zur Adsorption von störenden phenolischen Substanzen verbessert werden (VanETTEN et al. 1974).

Die Auswertung der Teststreifen erfolgte visuell durch den Vergleich der Reaktionsfarbe des Testfeldes mit einer Farbskala. Erst der Einsatz von Reflektometern zur Messung der Farbintensität der Glucose-Teststreifen konnte die Sicherheit der Methoden weiter erhöhen (THIES, 1985; FIEBIG, 1988).

Der hier vorgestellte GSL-Schnelltest beruht ebenfalls auf dem Nachweis enzymatisch abgespaltener Glucose. Wir verwendeten jedoch kein herkömmliches Glucose-Testpapier, sondern einen Teststreifen, dessen Indikatorfeld lichtdurchlässig ist. Dies bietet die Möglichkeit, die Anfärbung des Teststreifens spektralphotometrisch zu messen (SCHUMANN und KARGE 1990).

METHODE

Für unsere Untersuchungen stand ein neuartiges analytisches Material, der Glucose-Teststreifen ORWOANALYT^R GT 300 S (Hersteller: Filmfabrik Wolfen, BR Deutschland) zur Verfügung.

Aufbau und Eigenschaften des GT 300 S

Der GT 300 S besteht aus einer transparenten Glucose-Testfolie und einer beschriftbaren Griffleiste. Die Folie trägt die reaktionsfähige Schicht aus Gelatine und Indikator (Abb. 1).

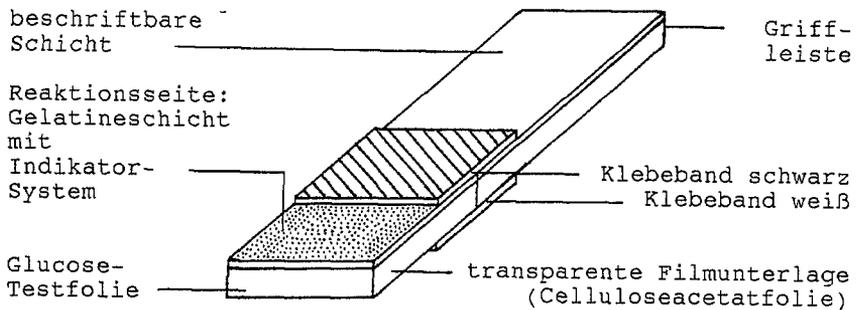


Abb. 1. Glucose-Teststreifen ORWOANALYT^R GT 300 S.

Grundlage der Farbindikation ist die GOD/POD-Reaktion mit dem farbgebenden System o-Tolidin/Farbkuppler F654. Dabei wird die in die Indikatorschicht diffundierende Glucose (1 Minute Reaktionszeit) durch GOD unter Wasserstoffperoxidbildung abgebaut. Das H₂O₂ oxidiert in einer POD-katalysierten Folgereaktion den Leukofarbstoff o-Tolidindihydrochlorid. Der gebildete chinoide Komplex wird dann zur Erzeugung des Indikatorfarbstoffes mit einem in der Colorphotographie als Farbkuppler verwendeten Naphtholsulfonsäurederivat (F654) stabilisiert.

Der Teststreifen GT 300 S zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus:

1. Der blaugrüne Indikatorfarbstoff läßt sich photometrisch auswerten. Die Extinktion wird bei 620 nm im Durchlicht gegen Luft gemessen. Dazu muß der Streifen mit Hilfe eines Küvettenadapters im Strahlengang des Photometers fixiert werden.
 2. Die Abhängigkeit von Extinktion und Konzentration ist linear, wenn E gegen \sqrt{c} aufgetragen wird.
 3. Nachweisbereich für Glucoselösungen: 0,5 - 5,0 mmol/l
 4. Reproduzierbarkeit der photometrischen Messung: s % \leq 5
 5. Der Indikatorfarbstoff ist längere Zeit stabil.
- Die Auswertung kann beliebig lange nach der Anfärbung der Streifen erfolgen. Archivierung ist unter Lichtausschluß möglich.

GSL-Bestimmung in Rapssamenextrakten

Für die GSL-Extraktion sind die Einsatzmengen von Rapsamen und Wasser so zu bemessen, daß die Glucosekonzentration des Extraktes im Nachweisbereich des Teststreifens liegt. Bei Sameneinwaagen von 250 mg und 5 ml Wasser ergeben sich für GSL-Gehalte von 20-80 μ mol/g Glucosekonzentrationen von 1-4 mmol/l.

Auf den Zusatz von Fremdmyrosinase für die GSL-Spaltung wurde verzichtet, da in aller Regel die Aktivität der samen-eigenen Myrosinase für eine quantitative Glucosefreisetzung ausreicht. Dies wurde durch Zumischen von Sinigrin zu Rapsamenextrakten bestätigt. Neben den bekannten GSL-Gehalten wurden dabei die eingesetzten Sinigrinmengen (0,6-3,0 mmol/l) sicher als Glucose wiedergefunden. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug 101 %. Zusätzliche Myrosinase ist nach unserer Erfahrung nur erforderlich, wenn die Saat vorher stark erhitzt wurde.

Allerdings müssen ohne Fremdmyrosinasezusatz längere Reaktionszeiten (mindestens 30 Min.) in Kauf genommen werden.

Zur Adsorption störender phenolischer Verbindungen wurde wie bei vergleichbaren GSL-Schnelltests Aktivkohlepulver eingesetzt. Aktivkohle adsorbiert jedoch auch Glucose. Diese unerwünschte Adsorption hängt ab von der Glucosekonzentration und kann bereits bei der Kalibrierung berücksichtigt werden. Geht man jedoch von reinen Glucoselösungen zu Rapsextrakten über, so wird die Glucoseadsorption teilweise wieder zurückgedrängt. Dieser Matrixeinfluß machte sich unterschiedlich stark bemerkbar und führte zu erhöhten und stark streuenden Glucosewerten.

Kalibrierung

Die Methode wurde daher indirekt mit einer Vergleichsmethode kalibriert. Dazu wurden 5 Rapssamenproben mit bekannten GSL-Gehalten (9-30 $\mu\text{mol/g}$ Saat; Vergleichsmethode: Glucosebestimmung mit Hexokinase) mehrfach analysiert und durch lineare Regressionsrechnung eine Kalibrierfunktion ermittelt (Abb. 2).

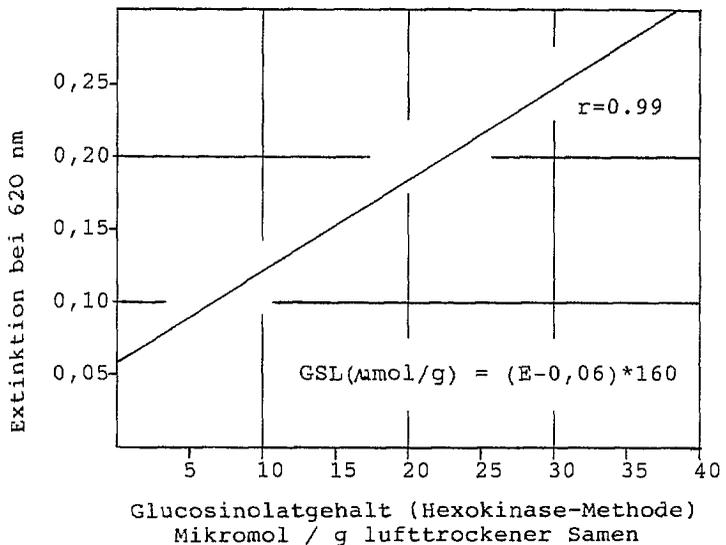


Abb. 2. Chargenspezifische Kalibrierfunktion für GT 300 S.

Anstieg sowie Schnittpunkt mit der y-Achse (Eigenextinction der Teststreifen) sind chargenspezifisch. Die Kalibrierung sollte auch nach längerer Lagerung der Streifen (+4°C; Ausschluß von Luftfeuchtigkeit) überprüft werden.

Analysengang

- Folgende Arbeitsvorschrift wird vorgeschlagen:
1. Etwa 5 g Rapsamen in Kaffeemühle fein zerkleinern (20 Sek. mahlen - Mahlgut auflockern - 10 Sek. mahlen)
 2. Einwaage von 250 mg Schrot
 3. Extraktion der GSLs mit 5 ml dest. Wasser (umrühren, 60 Min. stehen lassen, gelegentlich schütteln)
 4. Zugabe von 200 mg Aktivkohlepulver (schütteln, 15 Min. stehen lassen)
 5. Filtration durch engporiges Filter in zwei Prüfröhrchen (Doppelbestimmung). Das Filtrat muß klar und farblos sein
 6. Teststreifen GT 300 S eine Min. eintauchen (Stoppuhr). Danach mit weichem Tuch abwischen und mindestens 12 Min. reagieren lassen
 7. Photometrische Messung der Farbausprägung bei 620 nm (Küvettenadapter verwenden)
 8. Auswertung mittels chargenspezifischer Kalibrierung

Präzision und Richtigkeit

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Messungen wurden Wiederholungsanalysen an drei Rapsproben mit unterschiedlichen GSL-Gehalten ausgeführt. Folgende statistische Kennwerte wurden erhalten (Tabelle 1):

Tabelle 1. Präzision der GSL-Bestimmung mittels GT 300 S

Proben		µmol Glucosinolate/Gramm Samen			
Nr.	n ⁽¹⁾	\bar{c}	s	R _C ⁽²⁾	s %
1	10	13,3	0,98	2,2	7,4
2	10	24,8	0,59	2,0	2,4
3	10	44,5	0,84	2,7	1,9

(1) je Extrakt zwei Teststreifen gemessen

(2) Spannweite bezogen auf c

Die berechneten Variationskoeffizienten können für einen Schnelltest als vergleichsweise niedrig angesehen werden.

In einem weiteren Versuch wurde der Prüffehler der Methode bestimmt. Für die Wiederholbarkeit r (als maximal zulässige Differenz zwischen aufeinanderfolgenden Meßergebnissen) ergab sich ein Wert von 3,1 µmol/g luftttr. Saat.

Maßgebend für die Richtigkeit der GSL-Werte ist die Kalibrierung des Tests mit der Glucosemethode. Zusätzlich wurde die Richtigkeit durch Prüfung auf konstante oder systematische Fehler kontrolliert. Beide Tests verliefen negativ.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der neue Teststreifen wurde im Sommer 1990 zur Untersuchung von 254 Ernteproben aus einem Anbauversuch für 00-Raps (13000 ha; Sorte Madora-00) sowie 12 glucosinolatreichen Partien eingesetzt. Parallel dazu wurde der GSL-Gehalt aller Proben mit der Glucose-Methode bestimmt.

Zwischen den beiden Methoden ergab sich für alle Meßwerte eine sehr gute Korrelation von $r = 0,96$ (Abb. 3).

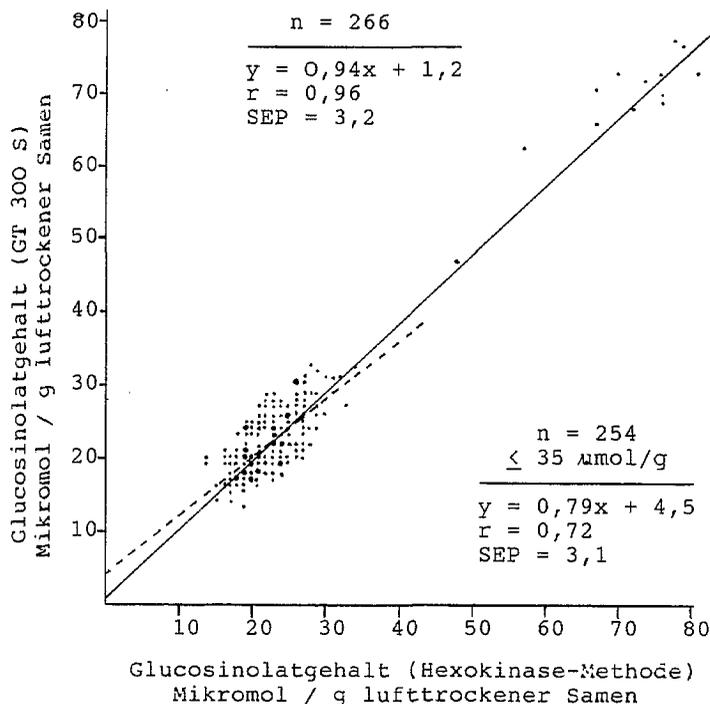


Abb. 3. Gesamtglucosinolatgehalte von 266 Ernteproben aus Anbauversuch 1989/90: Übereinstimmung zwischen Schnelltest mit Teststreifen GT 300 S und Glucosemethode für alle Werte (—) sowie für Proben $\leq 35 \mu\text{mol/g}$ Saat (---).

Aus dem 95%-Vertrauensbereich der Regressionsgeraden wurde der Standardfehler der Methode zu $SEP = 3,2 \mu\text{mol/g}$ berechnet. Die Zerlegung des SEP in seine Komponenten ergab einen vernachlässigbaren systematischen Fehler von $D = -0,17 \mu\text{mol/g}$ sowie einen zufälligen Fehler $SEP(C) = 3,3 \mu\text{mol/g}$.

Unter Beachtung der derzeit geltenden Höchstgrenze für den GSL-Gehalt von 00-Raps wurde für Proben $\leq 35 \mu\text{mol/g}$ Saat eine gesonderte Korrelation berechnet. Die für diesen sehr engen Selektionsbereich ermittelten Daten sind Abb. 3 zu entnehmen.

Der vorgestellte GSL-Schnelltest liefert aufgrund der direkten photometrischen Auswertbarkeit der Indikatorzone der Teststreifen gut reproduzierbare und im Vergleich zur Glucosemethode richtige Ergebnisse.

Er hat sich inzwischen in der Praxis zur Einteilung von Rapspartien in 0- und 00-Qualitäten gut bewährt. Beachtet man einen ausreichenden Sicherheitsabstand zum Qualitätsgrenzwert, dann können auch für den interessierenden Bereich zwischen Einfach- und Doppelqualität brauchbare GSL-Werte erhalten werden. Der Test zeichnet sich durch einfache Handhabbarkeit aus und es fallen nur geringe Materialkosten ($0,56 \text{ DM} / \text{Teststreifen}$) an.

LITERATUR

LEIN, K.-A. 1970. Quantitative Bestimmungsmethoden für Samen-glucosinolate in Brassica-Arten und ihre Anwendung in der Züchtung von glucosinolatarmem Raps. Z. Pflanzenzüchtg. 63: 137-154

SCHUMANN, W. und KARGE, M. 1990. Ein neuer Glucosinolat-Schnelltest zur Qualitätsbewertung von 00-Rapssaaten. Getreidewirtschaft 24: 161-162

THIES, W. 1985. Determination of the Glucosinolate Content in Commercial Rapeseed Loads with a Pocket Reflectometer. Fette, Seifen, Anstrichmittel 87: 347-350

VanETTEN, C.H., McGREW, C.E. and DAXENBICHLER, M.E. 1974. Glucosinolate Determination in Cruciferous Seeds and Meals by Measurement of Enzymatically Released Glucose. J. Agr. Food Chem. 22: 483-487