

RIKILT, Rijks-Kwaliteitsinstituut
voor land- en tuinbouwprodukten,
Ministerie van Landbouw en Visserij,
Bornsesteeg 45,
6708 PD Wageningen,
Nederland.

Afdeling Koolhydraat- en Vetchemie

1986-09-04

Rapport 86.86

Pr.nr. 404.3020

Onderwerp: Voorkomen van glucosinolaten
in rettich.

Samensteller : H.J. van der Kamp



Projectleider: drs B.G. Muuse



Verzendlijst: directeur, directie VKA, directie AT, sektorhoofden,
afdeling KVC, Van de Worp, Cramwinckel, projectbeheer,
Agralin, Sprenger Instituut (Schouten), SVP (Toxopeus),
Proefstation voor Tuinbouw onder Glas (Janse), DLO,
CAD-KB (Miedema)

Project: Inventariserend onderzoek naar het voorkomen van glucosinolaten in akker- en tuinbouwprodukten.

Referaat:

Voorkomen van glucosinolaten in rettich.

B.G. Muuse en H.J. van der Kamp

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT),
Wageningen, RIKILT rapport 86.86
2 tabellen, 2 bijlagen, 15 literatuurreferenties.

Glucosinolaten (GSL) komen voor in gewassen uit de familie der Cruciferen (Brassica genus). Hiertoe behoren naast raapzaad en mosterdzaad ook veel voedingsmiddelen zoals de koolsoorten, broccoli, knolraap, radijs en rettich. GSL kunnen onder invloed van het enzym myrosinase uiteenvallen in verschillende afbraakprodukten zoals isothiocyanaten, thiocyanaten, nitrillen en oxazolidonthionen. Afbraakprodukten van bepaalde GSL zijn zeer geur en smaak bepalend. Zes soorten rettich zijn onderzocht op glucosinolaat samenstelling. Van het boven-, midden- en ondergedeelte van de knollen is ca. 100 gram gevriesdroogd en vervolgens gemalen in een koffiemolen. Na extractie met water en enzymatisch desulfateren van de GSL nadat ze op een anionenwisselaar zijn gebonden, is de GSL samenstelling bepaald met reversed phase hoge druk vloeistofchromatografie.

Het droge stof gehalte van de knollen lag tussen de 5 en 7%. Het GSL gehalte binnen de knollen varieerde zeer sterk. In het ondergedeelte was het GSL gehalte ca. 5 keer zo hoog als in het bovengedeelte. Het GSL gehalte van de verschillende soorten varieerde niet zo sterk. Het gehalte aan 4-methylthio-3-butenyl GSL (belangrijkste GSL van rettich) per 100 gram vers produkt lag in het ondergedeelte tussen 90 en 168 μmol , in het midden tussen 35 en 65 μmol en in het bovenste tussen 19 en 32 μmol . Deze waarden zijn ca. twee keer lager dan de in literatuur vermelde waarden.

Bij de monstervoorbewerking is geen bij de bepaling van GSL storende enzymwerking waargenomen zoals bij radijs.

Gezien de grote spreiding in het intacte GSL gehalte binnen een knol rettich, zal de smaak binnen de knol sterk moeten variëren, wanneer sprake is van een correlatie tussen smaak cq. scherpte en GSL gehalte. Bij een oriënterende smaakproef werd dit verschil niet gevonden.

Trefwoorden: Glucosinolaten, HPLC, Rettich, White Radish, smaak.

Inhoudsopgave

blz.

1. Inleiding	1
1.1 Algemeen	1
1.2 Onderzoek	2
2. Materiaal en methode	2
3. Resultaten en discussie	3
3.1 Droge stof gehalte	3
3.2 Glucosinolaatgehalte	3
3.3 Controle op enzymwerking bij de monstervoorbereiding	5
3.4 Correlatie tussen smaak en GSL gehalte	5
4. Conclusie	5
Literatuur	6
Bijlage:	
Bijlage I : Principe van de methode	
Bijlage II: HPLC chromatogram van GSL in de knol van rettich.	

1. Inleiding

1.1 Algemeen

Glucosinolaten (GSL) komen voor in alle kruisbloemigen (cruciferen) en speciaal in de Brassica genus. Hiertoe behoren o.a. kool-, raap- en mosterdzaad, maar ook veel groenten zoals koolsoorten, knolraap, broccoli, radijs en rettich.

GSL zijn opgebouwd uit glucose, een sulfaatgroep, een SCN groep en een variabele restgroep die kan bestaan uit een aryl, alkyl of indolyl keten. Tot op heden zijn ca. 90 verschillende GSL bekend. GSL kunnen onder invloed van het enzym myrosinase (thioglucoside glucohydrolase) splitsen in isothiocyanaten, thiocyanaten, nitrillen, oxazolidonthionen en alcoholen (1). Deze afbraakprodukten zijn bepalend voor de geur en smaak van de brassica's (1,2). De bittere smaak van spruitjes wordt toegeschreven aan het afbraakprodukt van progoitrin, het vinyloxazolidonthion (3), de scherpe smaak van radijs en rettich aan trans en cis 4-methylthio-3-butenylisothiocyanaat, isomere afbraakprodukten van het overeenkomstige GSL (4,5,6).

Van GSL en hun afbraakprodukten is bekend dat de hoge concentraties zoals voorkomen in raapzaad, bij dieren een toxische invloed hebben op schildklier, lever en nieren (1,2,7). Dit beperkt de hoeveelheid raap-schroot die in diervoeders verwerkt kan worden. Bij menselijke consumptie van GSL is vooral de anti-mutagene werking van de indolyl-GSL van belang (8). Deze indolyl-GSL komen vooral voor in bloemkool, spruitjes en savoyekool.

De verdeling van GSL binnen een plant kan sterk variëren. Zo is bekend van radijs, kool, mosterd en raap dat het loof, de wortel en het zaad een totaal verschillende GSL samenstelling hebben (9). Ook het GSL gehalte binnen een deel van een plant kan sterk wisselen. Bij knol-raap is in de knol een toenemend GSL gehalte waargenomen naar de punt van de wortel toe, terwijl ook het GSL gehalte in de schil hoger is dan binnen in de knol. Ook van radijs (6) en Chinese kool is bekend dat de GSL niet homogeen over de knol verdeeld zijn. Een en ander is kenmerkend voor chemotaxonomische stoffen waartoe ook de GSL worden gerekend(2).

1.2 Onderzoek

In dit onderzoek zijn een aantal variëteiten rettich onderzocht. In ieder deel van de knol is het GSL gehalte bepaald met reversed phase hoge druk vloeistofchromatografie (9,12,13,14). In bijlage I is het principe van de methode opgenomen. Tevens is onderzocht of in rettich bij de monstervoorbereiding een enzymwerking optreedt die de GSL bepaling stoort.

De rettichmonsters zijn verkregen uit een teeltonderzoek. Bij dit onderzoek rees de vraag of er een correlatie bestaat tussen de intacte GSL gehalten en de smaak c.q. scherpte van rettich. Indien dit het geval is, dan zou het GSL gehalte een chemische parameter kunnen zijn voor de scherpte van rettich. Met deze vraagstelling op de achtergrond is dit onderzoek uitgevoerd waarbij met name is gekeken naar de analytische aspecten.

2. Materiaal en methode

De zes onderzochte variëteiten rettich zijn:

T924, T925; 44; Rex, RS1019 en Silverstar.

Uit het onder-, midden- en bovengedeelte van de knol zijn monsters genomen van 100-150 gram. De monsters zijn klein gesneden, vervolgens gevriesdroogd en gemalen in een koffiemolen. De GSL zijn geëxtraheerd met water. Vervolgens zijn de GSL gebonden op een anionenwisselaar en gedesulfateerd met het enzym arylsulfatase (11). Na elutie worden de gedesulfateerde GSL bepaald met HPLC met sinigrin als interne standaard.

Van de monstervoorbewerking (vriesdrogen) is bekend dat bij radijs geen GSL worden gevonden, omdat bij radijs een enzymwerking (4) optreedt waardoor de GSL worden afgebroken. Dit kan voorkomen worden door een extractie met methanol uit te voeren. Om na te gaan of bij rettich ook een enzymwerking plaats vindt, is een rettichmonster voorbereid zoals radijs.

3. Resultaten en discussie

3.1 Droge stof gehalte

In tabel 1 staan de gevonden droge stof gehalten.

Tabel 1: Droge stof gehalte in % van het boven-, midden- en ondergedeelte van rettichvariëteiten.

Variëteit	KNOLDEEL		
	Boven	Midden	Onder
T924	6,4	5,1	5,6
T925	6,1	5,1	5,6
44	6,7	6,1	6,7
Rex	5,9	5,5	5,9
RS 1019	5,9	5,2	5,8
Silverstar	6,7	6,1	7,0

Uit tabel 1 blijkt dat het droge stof gehalte van rettich tamelijk constant is rond 6%. Het onder- en bovengedeelte van de knol hebben een iets hoger droge stof gehalte dan het middengedeelte.

3.2 Glucosinolaatgehalte

In tabel 2 staan de gehalten van de individuele GSL van de verschillende delen van de rettichknollen. In bijlage II is een chromatogram van de HPLC analyse opgenomen.

Tabel 2: Gehalte aan 4-hydroxy-3-indolylmethyl-, 3-indolylmethyl-, 4-methylthio-3-butenyl GSL en twee niet geïdentificeerde GSL (NN 1 en NN 2) uitgedrukt in $\mu\text{mol/gram}$ droge stof van het onder-, midden- en bovengedeelte van de knol van zes rettich variëteiten.

Variëteit		4-OH ind. methyl	indol. methyl	4-methyl thiobut.	NN 1	NN 2	som
T924	onder	0,6	0,5	27,8	1,7	2,1	32,7
T925	onder	0,5	0,1	15,0	0,7	-	16,7
44	onder	0,4	0,5	25,4	0,8	-	27,1
Rex	onder	1,0	0,5	20,0	1,3	-	22,8
RS 1019	onder	1,0	0,5	27,5	0,8	-	29,8
Silverst.	onder	0,5	0,2	24,0	0,7	-	25,4

Vervolg tabel 2

Variëteit		4-OH ind. methyl	indol. methyl	4-methyl thiobut.	NN 1	NN 2	som
T924	midden	0,1	sp	9,2	0,5	0,7	10,5
T925	midden	0,1	sp	5,8	sp	0,3	6,2
44	midden	0,2	0,4	10,6	0,3	0,5	12,0
Rex	midden	0,5	0,4	9,3	0,2	0,8	11,2
RS 1019	midden	sp	0,5	10,6	0,3	sp	11,4
Silverst.	midden	0,3	0,3	10,0	0,4	0,3	11,3
T924	boven	sp	sp	4,3	0,2	sp	4,5
T925	boven	sp	sp	3,2	sp	0,3	3,5
44	boven	sp	0,2	5,3	0,2	1,0	6,7
Rex	boven	0,3	0,1	3,5	sp	1,7	5,6
RS 1019	boven	sp	0,3	4,6	sp	sp	4,9
Silverst.	boven	0,3	0,2	5,3	sp	0,5	6,3

Gebruikte responsfactoren t.o.v. Sinigrin:

Indolyl GSL	4
4-Methylthio-3-butenyl GSL	2
NN 1 en NN 2	1

Opvallend zijn de grote verschillen in GSL gehalte binnen een knol. Uit tabel 2 blijkt dat in het onderste gedeelte ca. 5 keer zoveel GSL voorkomen als in het bovenste gedeelte en ca. 2 keer zoveel als in het middenstuk. Er is dus een duidelijke toename aan GSL naar de wortelpunt toe, hetgeen in de literatuur (10) ook geconstateerd is voor knolraap.

Het belangrijkste GSL in rettich is 4-methylthio-3-butenyl GSL (> 80%). Door Carlson, Daxenbichler, en Van Etten (6) is een 4-methylthio-3-butenyl GSL gehalte gevonden van 82-184 umol/100 g vers produkt. Door ons is in het onderste gedeelte een gehalte tussen 15 en 28 umol/g droge stof gevonden, wat overeenkomt met een gehalte tussen 90 en 168 umol per 100 g vers produkt (6% droge stof). Voor het boven en middengedeelte liggen de gehalten resp. tussen 19-32 umol en tussen 35-64 umol/100 g vers produkt. Daar het gehalte in het middengedeelte als globaal gemiddelde voor de hele rettich kan worden aangemerkt, is het door ons gevonden gehalte 2 à 3 keer lager dan gevonden door Carlson et al. Van de 6 soorten hebben Rex en T925 het laagste GSL gehalte. De overige variëteiten verschillen weinig in GSL samenstelling.

3.3 Controle op enzymwerking bij de monstervoorbereiding

Als radijs wordt gevriesdroogd, worden er geen GSL bij de HPLC-analyse gevonden. Er treedt een enzymwerking op, waardoor de GSL afgebroken worden. Deze enzymwerking kan voorkomen worden door radijs te cutteren in kokende methanol. Het monster wordt daarna gemalen met een Waring Blender. Vervolgens wordt een tweede extractie met methanol/water (70-30) uitgevoerd (15). Deze monstervoorbereiding is ook toegepast op een rettichmonster. De resultaten gaven dezelfde tendens te zien als de voorbewerking waarbij werd gevriesdroogd. Ook nu werden in de punt van de knol 5 keer zoveel GSL gevonden als in het bovenste deel. De GSL in rettich worden dus niet afgebroken wanneer het monster wordt gevriesdroogd.

3.4 Correlatie tussen smaak en GSL gehalte.

Wanneer sprake is van een correlatie tussen smaak en GSL gehalte, zou er, gezien het grote verschil in GSL gehalte in het onder- en boven-gedeelte van een rettich, een groot verschil in smaak moeten zijn tussen de verschillende delen. Eigen smaakwaarnemingen (3 mensen) gaven geen opmerkelijke verschillen in smaak voor de diverse delen van rettich. De literatuur (4, 5, 6) spreekt wel over een correlatie met het afbraakprodukt, 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanaat. Met de hier beschreven methode worden echter specifiek de intacte GSL bepaald en juist niet de afbraakprodukten!!

4. Conclusie

In rettich komt 4-methylthio-3-butenyl GSL als hoofdcomponent van de GSL voor (> 80%). De GSL zitten sterk verdeeld over de knol. In het onderste gedeelte zit ca. 5 keer zoveel GSL als in het bovenste gedeelte. Deze spreiding is kenmerkend voor chemotaxonomische stoffen. De soorten Rex en T925 hebben een iets lager GSL gehalte dan de soorten Silverstar, RS 1019, T925 en 44.

In rettich is geen enzymwerking, die de bepaling van GSL stoort, waargenomen zoals bij radijs. Vriesdrogen van rettich geeft geen verliezen van GSL.

Het droge stof gehalte van rettich ligt constant verdeeld over de knol tussen 5 en 7%.

Een correlatie tussen het intacte GSL gehalte en scherpte van rettich is bij een oriënterende proef niet gevonden. In de literatuur wordt wel een directe correlatie van de scherpe smaak met het afbraakprodukt 4-methylthio-3-butenyliso-thiocyanaat vermeld.

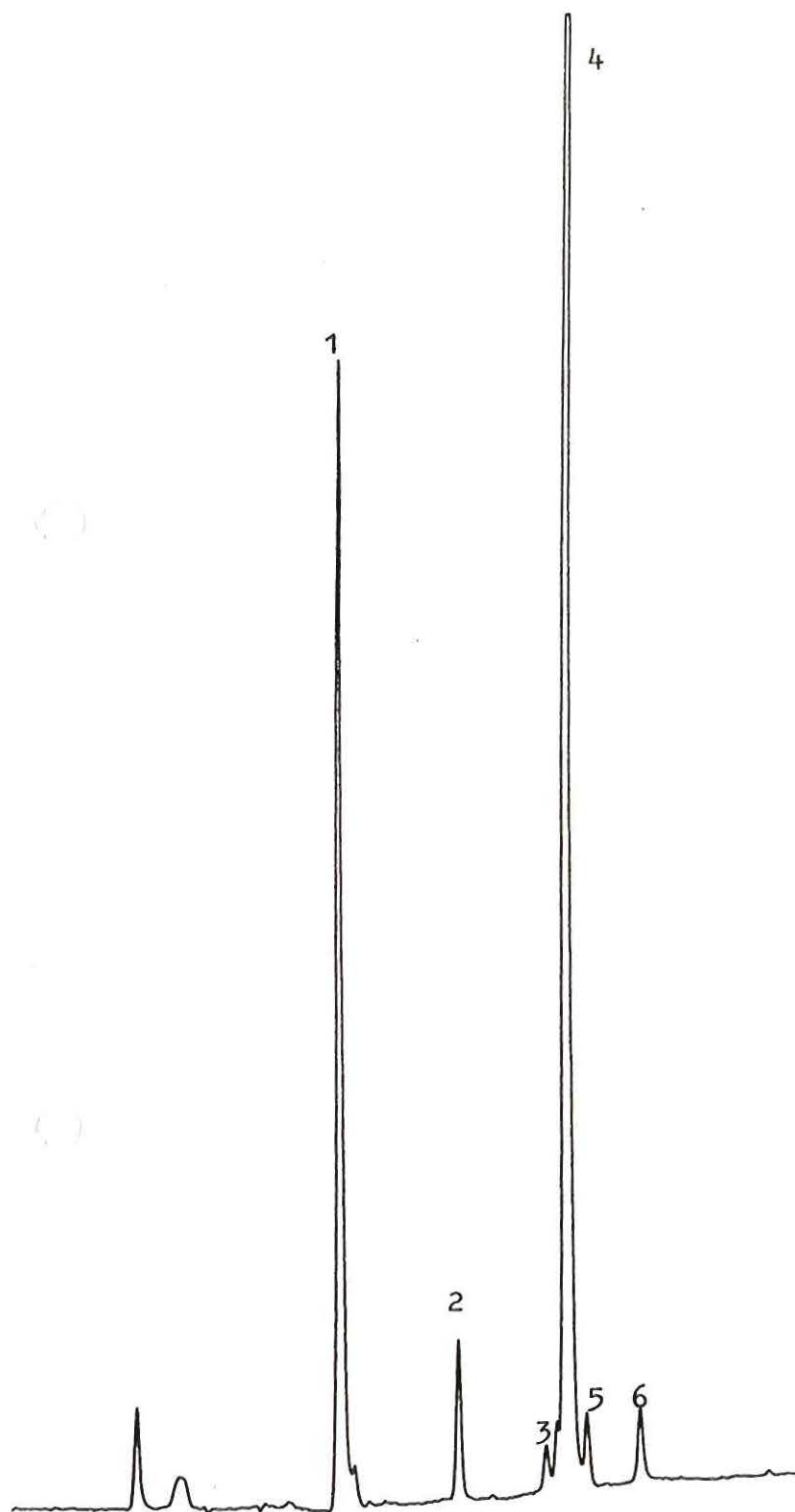
Literatuur

1. D.I. McGregor, W.J. Mullin en G.R. Fenwick
Review of analysis of glucosinolates. Analytical methodology for determining glucosinolate composition and content.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. vol.66 (1983) nr.4, blz.825-849.
2. G.R. Fenwick, R.K. Heaney en W.J. Mullin
Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition vol.18 (1983), blz.123-201.
3. G.R. Fenwick en N.M. Griffiths
The identification of the goitrogen, (-)5-vinyloxazolidone-2-thione (Goitrin), as a bitter principle of cooked Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*). Z. Lebensm. Unters. Forsch. vol.172 (1981), blz.90-92.
4. P. Friis en A. Kjaer
4-Methylthio-3-butenyl Isothiocyanate, the pungent principle of radish root. Acta Chem. Scand. vol.20 (1966) nr.3, blz.698-705.
5. K. Herrmann
Übersicht über nichtessentielle Inhaltstoffe der Gemüsearten. II Cruciferen (Kohlarten, Radieschen, Rettiche, Speiserüben, Kohlrüben, Meerrettich) sowie Gramineen (Zwiebeln, Porree, Schnittlauch, Knoblauch, Spargel). Z. Lebensm. Unters. Forsch. vol.165 (1977), blz.151-164.
6. D.G. Carlson, M.E. Daxenbichler, C.H. Van Etten, C.B. Hill en P.H. Williams
Glucosinolates in radish cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. vol.110 (1985) nr.5, blz.634-638.

7. W. Brzezinski en P. Mendelewski
Determination of total glucosinolate content in rapeseed meal with thymol reagent. Z. Pflanzenzüchtg. vol.93 (1984), blz.177-183.
8. G.R. Fenwick en R.K. Heaney
Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feedingstuffs. Food Chemistry vol.11 (1983), blz.249-271.
9. J.P. Sang, I.R. Minchinton, P.K. Johnstone en R.J.W. Truscott
Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. Can. J. Plant Sci. vol.64 (1984), blz.77-93.
10. K. Jürges en G. Röbbelen
Möglichkeiten einer Auslese auf Glucosinolat-gehalt in Kohlrüben (*Brassica napus* L. var. *napobrassica* (L.) Rchb.).
Z. Pflanzenzüchtg. vol.85 (1980), blz.265-274.
11. W. Thies
Detection and utilization of a glucosinolate sulphohydrolase in the edible snail. Helix pomatia, Die Naturwiss. vol.66 (1979), blz.364-365.
12. J.P. Sang en R.J.W. Truscott
Liquid chromatographic determination of glucosinolates in rapeseed as desulfoglucosinolates. J. Assoc. Off. Anal. Chem. vol.67 (1984) nr.4, blz.829-833.
13. E.A. Spinks, K. Sones en G.R. Fenwick
The quantitative analysis of glucosinolates in cruciferous vegetables, oilseeds and forage crops using high performance liquid chromatography. Fette-Seifen-Anstrichmittel vol.86 (1984) nr.6, blz.228-231.
14. I. Minchinton, J. Sang, D. Burke en R.J.W. Truscott
Separation of desulphoglucosinolates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. of Chromatography vol.247 (1982), blz.141-148
15. C.H. Van Etten, M.E. Daxenbichler, P.H. Williams en W.F. Kwolek
Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables. Analysis of the edible part from twenty-two varieties of cabbage. J. Agric. Food Chem. vol.24 (1976) nr.3, blz.452-455.

Bijlage II:

HPLC chromatogram van Glucosinolaten in de knol van rettich.



1. Sinigrin (I.S)
2. 4-hydroxy-3-indolylmethyl GSL
3. NN 1
4. 4-methylthio-3-butenyl GSL
5. NN 2
6. 3-indolylmethyl GSL

HPLC omstandigheden:

Kolom : 5 μ m Lichrosorb RP 18, 4.6 mm ID x 15 cm.
Eluens : gradient, 100% water ---> acetonitril/water (30-70) in 20 min.
Flow : 1 ml/min.
Injektievolume : 25 μ l.
Detektor : UV 226 nm; A.R. 0.2

HPLC ANALYSE VAN GEDESULFATEERDE GSL

