

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Veronika Holá

STANOVENÍ GLUKOSINOLÁTŮ V ROSTLINNÝCH MATERIÁLECH

Determination of glucosinolates in plant materials

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1.6.2020

Veronika Holá

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením glukosinolátů v rostlinném materiálu pomocí kapilární elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V práci je popsána chemická struktura glukosinolátů, biosyntéza a degradace glukosinolátů a také jsou popsány jejich biologické účinky. Část této práce se zabývá i metodami, kterými byly glukosinoláty v rostlinných materiálech stanoveny. V experimentální části je pak popsána samotná separace intaktních glukosinolátů pomocí kapilární elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro stanovení glukosinolátů byly k dispozici dva rostlinné materiály, a to lyofilizované listy řepky a šťáva z brokolice. Při stanovení intaktních glukosinolátů metodou kapilární elektroforézy se využila micelární elektrokinetická chromatografie za použití kationtového povrchově aktivního činidla. Po nalezení optimálních podmínek pro separaci intaktních glukosinolátů bylo zjištěno, že v rostlinných vzorcích je nemožné tyto látky stanovit. Důvodem byly interference z matrice, které toto stanovení rušily. Zatímco za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie se za optimálních podmínek, podařilo některé z intaktních glukosinolátů identifikovat v rostlinném vzorku řepky. Dále byly získány kalibrační závislosti jednotlivých glukosinolátů a vypočtena výtěžnost a opakovatelnost metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Glukosinoláty, micelární elektrokinetická chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the determination of glucosinolates in plant material by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. The chemical structure, biosynthesis, degradation, and also biological effects of glucosinolates are described. One part of this work also deals with the methods, which glucosinolates in plant materials were determined by. The experimental part describes the separation of intact glucosinolates by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. Two plant materials were available for the determination of glucosinolates, namely lyophilized rapeseed leaves and broccoli juice. Micellar electrokinetic chromatography using a cationic surfactant was used to determine intact glucosinolates by capillary electrophoresis. After finding the optimal conditions for the separation of intact glucosinolates, it was found that it is impossible to determine these substances in plant samples. The reason was interference from the matrix, which interfered with this determination. While using high performance liquid chromatography under optimal conditions, some of the intact glucosinolates were identified in a rapeseed plant sample. Furthermore, the calibration dependencies of individual glucosinolates were obtained and the recovery and repeatability of the method were calculated.

KEYWORDS

Glucosinolates, micellar electrokinetic chromatography, high performance liquid chromatography

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce, panu RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D., za jeho odborné vedení a rady při tvorbě této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala ÚKZÚZ a paní RNDr. Evě Čurdové, CSc, která mi poskytla možnost měření praktické části diplomové práce v laboratoři.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	8
ÚVOD	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Glukosinoláty	10
1.1.1 Chemická struktura glukosinolátů	10
1.1.2 Biosyntéza	11
1.1.3 Degradace	11
1.1.3.1 Myrosináza.....	12
1.1.3.2 Reakce enzymového rozkladu glukosinolátů	12
1.1.3.3 Produkty rozkladu.....	13
1.2 Biologické účinky glukosinolátů	13
1.3 Stanovení glukosinolátů	14
1.3.1 Metody měřící celkový obsah.....	15
1.3.2 Metody stanovující jednotlivé glukosinoláty	15
1.3.2.1 Plynová chromatografie (GC).....	15
1.3.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	16
1.3.2.3 Kapilární elektroforéza	17
1.3.2.4 Další metody	20
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	22
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1 Použité chemikálie a zařízení.....	23
3.1.1 Rostlinné vzorky.....	23
3.1.2 Standardy	23
3.1.3 Ostatní použité chemikálie	23
3.1.4 Použitá zařízení.....	25

3.2	Příprava roztoků.....	25
3.2.1	Příprava roztoků standardů.....	25
3.2.2	Příprava reálného vzorku pro CZE.....	25
3.2.3	Příprava reálného vzorku pro HPLC	26
3.2.4	Příprava základního elektrolytu pro CZE.....	26
3.2.5	Příprava mobilní fáze pro HPLC	26
3.3	Charakteristika experimentu.....	26
3.3.1	Experimentální podmínky pro CZE	26
3.3.2	Experimentální podmínky pro HPLC.....	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	28
4.1	Stanovení glukosinolátů metodou kapilární zónové elektroforézy	28
4.1.1	Volba detekční techniky	28
4.1.2	Volba vhodného základního elektrolytu.....	28
4.1.3	Optimalizace metody	29
4.1.4	Extrakce reálného vzorku	32
4.1.5	Identifikace jednotlivých glukosinolátů v reálném vzorku	37
4.2	Stanovení glukosinolátů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie	39
4.2.1	Volba vhodných chromatografických podmínek	39
4.2.2	Volba vhodné mobilní fáze	40
4.2.3	Úprava gradientové eluce	42
4.2.4	Kalibrační závislost jednotlivých glukosinolátů.....	43
4.2.5	Zjištění přítomnosti glukosinolátů v rostlinném vzorku	45
5	ZÁVĚR.....	48

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
FID	plamenoionizační detektor
FPD	plamenový fotometrický detektor
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (micellar electrokinetic capillary chromatography)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulfate)
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
GA	glukonová kyselina (gluconic acid)
ANDSA	7-aminonaftalen-1,3-disulfonová kyselina
LIF	fluorescence indukovaná laserem (laser induced fluorescence)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
ESI	elektrosprej
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
TOF	analyzátor doby letu (time-of-flight)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
RSD	směrodatná odchylka (relative standard deviation)
ACN	acetonitril (acetonitrile)
MeOH	methanol
NaOH	hydroxid sodný (sodium hydroxide)
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
R ²	koeficient determinace (coefficient of determination)

ÚVOD

Glukosinoláty jsou sekundární metabolity rostlin. Nachází se především ve dvouděložných rostlinách rodu brukvovitých, jako je například řepa, brokolice, zelí, ředkvičky a další. Tyto látky fungují jako přírodní pesticidy, a proto chrání rostlinu před různými škůdci. Glukosinoláty se vyskytují v celé rostlině, avšak jejich koncentrace se může v jednotlivých tkáních lišit. V dnešní době rozeznáváme více než 120 druhů glukosinolátů.

Tato diplomová práce vznikla na základě projektu biologická ochrana rostlin. Pokud by se vypěstovala rostlina, která by obsahovala větší množství těchto glukosinolátů, tak poté by se zjišťovalo, zda by se tato rostlina dokázala ochránit i bez různých postřiků proti škůdcům. V rámci projektu je nutné ověřit, zda vypěstované rostliny skutečně obsahují větší množství glukosinolátu. K tomu je zapotřebí vhodná analytická metoda.

Pro stanovení jednotlivých glukosinolátů v rostlinách je zapotřebí zvolit spolehlivou, rychlou a pokud možno málo nákladnou analytickou metodu. Jelikož jsou glukosinoláty záporně nabité látky, tak pro jejich stanovení lze volit několik analytických metod. Jako první popisovaná metoda pro stanovení glukosinolátů byla plynová chromatografie. Od této metody se ale v dnešní době ustoupilo. Ne všechny glukosinoláty byly dostatečně těkavé pro tuto analýzu. Hlavním důvodem ovšem bylo, že touto metodou se nestanovily všechny jednotlivé glukosinoláty. Jako vhodná alternativa této metody byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie. I tato metoda však trpí několika nevýhodami, např. analýzy jsou zdlouhavé, chemikálie jsou relativně drahé a další. Avšak tato metoda se neustále vyvíjí a zdokonaluje. Pro zajištění lepšího rozlišení, rychlosti a jednoduchosti analýzy je jako další vhodná metoda pro stanovení jednotlivých glukosinolátů kapilární elektroforéza. Tato metoda je oproti vysokoúčinné kapalinové chromatografii méně finančně náročná. Další pozitivem této metody je, že umožňuje oddělení glukosinolátů ve vzorku získaném rychlým a jednoduchým postupem extrakce.

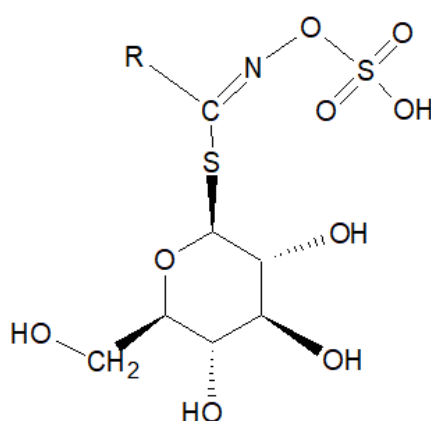
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Glukosinoláty

Glukosinoláty jsou β -D-thioglukosid-N-hydroxysulfáty [1]. Tvoří velkou skupinu důležitých přírodních produktů obsahující síru a dusík a přirozeně se vyskytují jako thio-glukosidy [2]. Dříve byly známy pod názvem glykosidy hořčičného oleje [2]. Označují se jako biologicky aktivní sekundární metabolity a nachází se u rostlin čeledi brukvovité (Brassicaceae) [2]. Do této čeledi patří běžné druhy zeleniny, jako je například brokolice, zelí, ředkvička, růžičková kapusta a další [3]. Množství glukosinolátů v této zelenině se pohybuje v rozmezí od 0,1 do 2,5 g/kg. Tento obsah se mění v závislosti na regionu a kultivačních podmínkách, genetických faktorech a faktorech prostředí [4]. Glukosinoláty najdeme ve všech částech rostliny, a to jak v kořenech, tak ve stoncích, ale i v listech nebo semenech [3]. Nejmladší tkáň obsahuje jejich největší množství [4]. V dnešní době je identifikováno a charakterizováno více než 120 různých druhů glukosinolátů [5].

1.1.1 Chemická struktura glukosinolátů

Všechny glukosinoláty mají společnou základní chemickou strukturu složenou ze skupiny β -D-thioglukózy, sulfonové oximové skupiny a variabilního postranního řetězce odvozeného od aminokyselin (viz obr. 1) [4, 6].



Obrázek 1: Základní vzorec glukosinolátů (převzato a upraveno z [2])

Tyto látky jsou chemicky stabilní, záporně nabitě a rozpustné ve vodě [6, 7]. Podle aminokyselin, ze kterých se glukosinoláty syntetizují, mohou být rozděleny do několika skupin [8]:

- alifatické – odvozené od aminokyselin alanin, leucin, izoleucin, valin,
 - sirné (obsahují v postranním řetězci methylthioskupinu) – odvozené od aminokyselin methionin, cystein,
 - aromatické (s nesubstituovaným nebo substituovaným benzenovým jádrem) – odvozené od aminokyselin fenylalanin, tyrosin,
 - indolové (se substituovaným indolem) – odvozené od aminokyseliny tryptofan.
- [4]

1.1.2 Biosyntéza

Tvorbu glukosinolátů můžeme rozdělit do tří samostatných úseků – prodloužení řetězce aminokyselin, glukonová biosyntéza a sekundární transformace [9].

V prvním kroku dochází k prodloužení řetězce. Primární aminokyselina nejprve podléhá deaminaci a poté následuje tříkrokový cyklus. Během tohoto cyklu se připojí do postranního řetězce aminokyseliny methylenová skupina a tím dojde k jejímu prodloužení [9, 10, 11].

Ve druhém kroku dochází k přeměně prodloužené aminokyseliny na aldoxim, který v dalších krocích podléhá katalytickým reakcím. Tato konverze vede ke tvorbě desulfoglukosinolátů podléhajících enzymatické sulfataci. Vzniká základní struktura glukosinolátů [10, 12].

V posledním kroku podléhají vzniklé glukosinoláty celé řadě dalších modifikací. Tyto reakce mají biologický i biochemický význam, jelikož ovlivňují směr hydrolýzy glukosinolátů a výslednou aktivitu produktů hydrolýzy [12].

1.1.3 Degradace

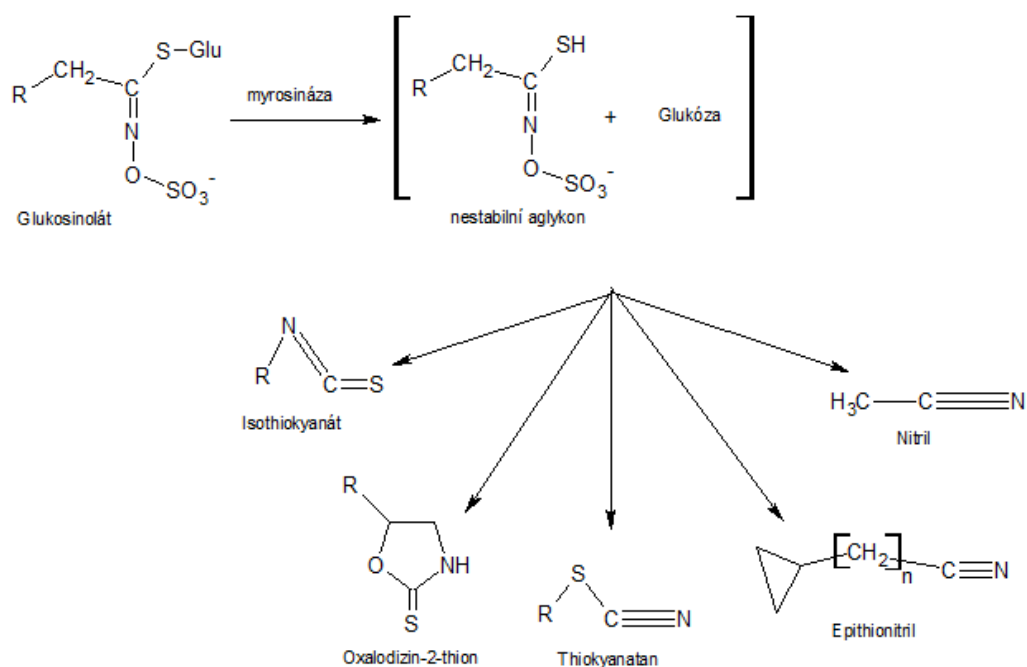
Glukosinoláty se rozkládají, pokud se rostliny mechanicky poškodí - například řezáním či žvýkáním. Následně dochází k uvolnění enzymu myrosináza, který je zodpovědný za intenzivní hydrolýzu [11, 12].

1.1.3.1 Myrosináza

Myrosináza je enzym vyskytující se v rostlině odděleně od glukosinolátů [10]. Nachází se ve všech rostlinách rodu brukvovitých [13]. Pokud je tkáň rostliny poškozena, tak se setká enzym myrosináza s glukosinoláty, které se nachází ve vakuole v parenchymatickém pletivu. To má za následek rozštěpení thio-glukózové vazby a vytvoření štěpných produktů [10]. U mnoha rostlin byla prokázána existence více forem myrosinázy [13]. Enzymy s myrosináзовou aktivitou jsou lokalizovány v myrosinových buňkách. Tyto buňky jsou idioblasty bohaté na bílkoviny [11].

1.1.3.2 Reakce enzymového rozkladu glukosinolátů

Hydrolyza glukosinolátů katalyzovaná enzymem se také nazývá glukosinolatomyrosináзовý systém. Po prasknutí buňky může myrosináza přijít do styku s glukosinoláty a tím je zahájena enzymatická degradace [14]. Dochází k tvorbě glukózy a nestabilního aglykonu. V závislosti na struktuře postranního řetězce, přítomnosti dalších proteinů a kofaktorů, chemických podmínkách, jako je pH či dostupnost železitých iontů, se aglykon přeuspořádá za vzniku bioaktivních sloučenin, jako je isothiokyanát, oxalozidin-2-thion, nitrily, epithionitril a thiokyanát (viz obr. 2) [2,11].



Obrázek 2: Degradace glukosinolátů (převzato a upraveno z [11])

1.1.3.3 Produkty rozkladu

Mnoho produktů degradace glukosinolátů je zajímavých kvůli jejich biologickým aktivitám. Některé z těchto produktů hydrolýzy mají biocidní aktivitu proti celé řadě organismů, jako jsou hmyz, rostliny, houby a bakterie. Jiné mají přínosy pro lidské zdraví [15].

Aglykon, který vznikne při hydrolýze, se spontánně přeskupuje v takzvaném Lossenově přesmyku na isothiokyanát. Pokud isothiokyanát obsahuje dvojnou vazbu a je přítomen epithiospecifický protein, může se isothiokyanát přeskupit na epithionitril. Při kyselém pH se inhibuje Lossenův přesmyk, vznikají nitrily a odštěpí se síra. Tato konverze je podpořena, pokud jsou přítomny ionty Fe^{2+} [2,10].

Nejčastějším produktem hydrolýzy jsou isothiokyanáty mající obrannou funkci. Tyto sloučeniny jsou zodpovědné za charakteristicky velmi intenzivní a ostrý zápach a štiplavou až pálivou chuť. Z přirozeně se vyskytujících glukosinolátů pouze tři podléhají enzymatické degradaci na thiokyanát. Jedná se o allyl-, benzyl- a 4-(methylthio) butylglukosinolát [15].

1.2 Biologické účinky glukosinolátů

Hlavní funkcí glukosinolátů v rostlinách je obrana proti škůdcům. Rostliny reagují na poškození hmyzem systematickou akumulací vyšších hladin glukosinolátů, což pravděpodobně zvyšuje jejich odolnost vůči následným útokům patogenů, jako jsou houby, bakterie, hmyz a škůdci [9, 16].

Rozsah biologických aktivit glukosinolátů je široký. Některé jsou prospěšné, zatímco jiné jsou škodlivé pro lidi a zvířata. Jejich biologické účinky jsou ovlivněny řadou exogenních a endogenních parametrů. Silně záleží na:

- druhu rostliny,
- koncentraci glukosinolátů a jejich degradačních produktech,
- koncentraci a stabilitě enzymu myrosináza,
- hydrolýze během skladování a zpracování rostlinného materiálu,
- rozsahu narušení buněk během mechanického poškození,
- stability a fyzikálně-chemických vlastnostech jednotlivých glukosinolátů [17].

Jakmile člověk pozře glukosinolát, dochází k malé absorpci intaktních glukosinolátů přímo v žaludku. Díky působení střevní mikroflóry se produkují bioaktivní isothiokyanáty. Ty jsou absorbovány z tenkého a tlustého střeva a jejich metabolity jsou detekovatelné v lidské moči 2-3 hodiny po konzumaci brukvovité zeleniny [18].

Produkty hydrolýzy glukosinolátů mají biocidní účinky. Bylo objeveno, že mají mimo jiné antifungální, antimikrobiální, herbicidní a insekticidní účinky [16]. Glukosinoláty a jejich metabolické produkty byly identifikovány jako účinné látky zabraňující rakovině kvůli schopnosti inhibovat mnoho karcinogenních látek [16]. Glukosinoláty se mohou chovat také jako modulátory zánětu, protože jsou schopny redukovat či dokonce inhibovat aktivitu β -buněk [18].

Bylo prokázáno, že glukosinoláty mají také toxické účinky. Nadměrná konzumace zeleniny z rodu brukvovitých může způsobit zvětšení štítné žlázy, snížení hladiny hormonu štítné žlázy, abnormality orgánů (játra, ledviny), snížení růstu, snížení reprodukční výkonnosti, úmrtnost. Zvětšení štítné žlázy je spojeno s dlouhodobým požíváním zeleniny rodu brukvovitých obsahující hlavně isothiokyanát. Ten blokuje vychytávání jodidu štítnou žlázou, což způsobuje vyčerpání jodu a inhibici tyroxínu. [17].

1.3 Stanovení glukosinolátů

Existují metody pro stanovení celkového obsahu glukosinolátů v rostlinném materiálu, pro stanovení hladiny jednotlivých glukosinolátů a pro měření produktů rozkladu způsobeného enzymem myrosináza. V ideálním případě by metoda měla být rychlá, jednoduchá, citlivá a přesná. Zřídka má jedna metoda všechny tyto vlastnosti, a proto se při výběru vhodné metody většinou musí upustit od některých těchto požadavků, a to s ohledem na specifické potřeby dané aplikace [19].

Kvantitativní metody pro stanovení glukosinolátů lze rozdělit do dvou skupin. Metody, které poskytují odhad celkového množství glukosinolátů v rostlinném materiálu, a metody, které umožňují stanovit jednotlivé glukosinoláty. Ačkoliv extrakce glukosinolátů a čištění extraktu jsou kritickým úsekem ve většině postupů, nejsou v žádném případě podmínkou pro všechny metody stanovení [19].

1.3.1 Metody měřící celkový obsah

Bylo popsáno několik metod pro měření celkového obsahu glukosinolátů. Jeden z nejjednodušších postupů je založen na tvorbě komplexu glukosinolátů s palladiem za vzniku chromoforu. Ten je snadno měřitelný kolorimetricky [19]. Tento způsob stanovení v dnešní době nahradila metoda založená na měření enzymaticky uvolněné glukózy. Enzymatická hydrolýza glukosinolátů uvolňuje stechiometrické množství glukózy. Pro stanovení glukózy v roztoku jsou k dispozici různé postupy např. papírky impregnované enzymy a chromogenem, specifické elektrody pro glukózu a další [5, 20]. Pokud se jako enzym zvolí myrosináza, vniká bisulfát, který můžeme stanovit například pomocí gravimetrie [21]. Další možností je použití enzymu sulfatáza, který dokáže také uvolnit bisulfát, jenž je následně vysrážen chloridem barnatým a zbylé baryum lze změřit pomocí rentgenové emisní spektroskopie [22, 23, 24].

1.3.2 Metody stanovující jednotlivé glukosinoláty

Jelikož biologická aktivita glukosinolátů je ovlivněna také povahou postranního řetězce, jsou výše popsané metody stanovení nevhodné pro získání informací o obsahu jednotlivých glukosinolátů. Mezi metody stanovující jednotlivé glukosinoláty patří plynová a kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance a ELISA [19].

1.3.2.1 Plynová chromatografie (GC)

GC byla první metoda, která byla použita jak pro separaci produktů vznikajících štěpením intaktních glukosinolátů, tak i ke stanovení desulfoglukosinolátů [25]. Jestliže se stanovují produkty štěpení intaktních glukosinolátů, musí této analýze předcházet úprava vzorku. Pokud se vzorek k analýze získával z rostlinných tkání, použila se jako extrakční činidla hexan, hexan/ether (1:1 v/v), ether, ether/acetone (94:6 v/v), ethanol, chloroform. Před extrakcí se rostlinná tkáň zvlhčila vodou a přidával se chlorid vápenatý. Vzorek k analýze může být získán i z půdy, do které mohou štěpné produkty glukosinolátů přecházet. Získávají se tak plynné isothiokyanáty (nejčastěji vzniká methyl isothiokyanát). V tomto případě se použije jako extrakční činidlo dichlormethan. K analýze bylo použito jako nosný plyn hélium. K detekci se použil plamenioionizační (FID) a plamenový fotometrický detektor (FPD). Kolona použitá k separaci měla délku 30 m a vnitřní průměr 0,32 mm a jako stacionární fáze byla použita DB-5 (5% fenylem

substituovaný methylpolysiloxan, 0,25 μm film). Identifikace byla založená na retenčním čase a přítomnosti síry měřené pomocí FPD. Za těchto podmínek se stanovilo přibližně 11 štěpných produktů, kterými jsou: allylkyanid, allylisothiokyanát, benzylisothiokyanát, 3-butenyl-isothiokyanát, 5-vinyl-2-oxazolidinethion, indol-3-acetonitril, methyl-isothiokyanát, 4-pentenyl-isothiokyanát, fenethyl-isothiokyanát, fenylisothiokyanát, propyl-isothiokyanát [26].

V případě desulfoglukosinolátů, které mají neiontovou povahu a nelze je přímo stanovit pomocí GC, je nutné z nich nejdříve vytvořit těkavé sloučeniny pomocí derivatizace [25]. Intaktní glukosinoláty v rostlinném extraktu byly nejprve přes noc desulfatovány enzymem sulfatázou na anexové koloně DEAE Sephadex A-25, desulfoglukosinoláty byly následně eluovány a derivatizovány *N*-trimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamidem a trimethylchlorosilanem. Derivatizované desulfoglukosinoláty se separovaly v plynovém chromatografu s FID. Byla použita skleněná kolona o rozměrech 1,2 m x 2 mm naplněná 2% OV-7, Chromosorb W, AW-DMCS. Jako nosný plyn se použil argon. [25, 27, 28, 29].

Nevýhoda této metody spočívala v tom, že nedokázala stanovit všechny jednotlivé glukosinoláty, a to především indolylglukosinoláty, kvůli jejich nedostatečné těkavosti a tepelné nestálosti [25, 30].

1.3.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vývoj této metody pro stanovení jednotlivých glukosinolátů začal poněkud později než v případě GC. Použití HPLC na zkoumání jednotlivých produktů rozkladu glukosinolátů bylo omezeno kvůli jejich těkavosti a skutečnosti, že některé produkty, především thiokyanáty a nitrily, nejsou detekovatelné spektrometricky. HPLC však nachází největší využití v analýze intaktních glukosinolátů a desulfoglukosinolátů [19].

Jsou popsány metody HPLC s reverzní fází, se kterými lze analyzovat jak neiontové desulfoglukosinoláty, tak i neporušené intaktní glukosinoláty [31]. Jedná se o dvě různá stanovení, která se liší hlavně v extrakci a ve složení mobilní fáze. Na rozdíl od stanovení desulfoglukosinolátů se při stanovení intaktních glukosinolátů používá vodná mobilní fáze obsahující iontově párové činidlo nebo specifická sůl [30,32]. Důležitým krokem před analýzou reálného vzorku glukosinolátů je i samotná extrakce. Pro získání desulfoglukosinolátů je nutná enzymatická desulfatace, která je sice velmi časově náročná, ale získá se směs téměř čistých desulfoglukosinolátů [30, 33].

K získání desulfoglukosinolátů se pro extrakci používá směs methanolu a vody 70:30 (v/v) [34] nebo ethanolu a vody v poměru 70:30 (v/v) [35]. Po extrakci následuje enzymatická desulfatace. Extrakce se může provádět ale i ze semen rostlin, kde je nejdříve potřeba inhibovat aktivitu enzymu myrosináza zahřátím semen ve vodní lázni přibližně na 3 minuty. Semena podléhají další úpravě, kdy jsou zbavena tuku [33]. Získané extrakty byly podrobeny enzymatické desulfataci. Tento krok je pro získané extrakty stejný. Extrakt je nanesen na aniontoměničovou kolonu DEAE Sephadex A-25. Do kolony se vnese arylsulfatáza (0,2%) a nechá se stát přes noc. Díky aktivitě enzymu sulfatáza se odstraní sulfátová skupina z molekuly intaktních glukosinolátů. Vzniklé desulfoglukosinoláty jsou z kolony eluovány vodou a můžou se nadávkovat na HPLC kolonu [33, 34, 36]. K separaci je použita kolona s reverzní fází HPLC-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Pro zaznamenání chromatogramů byla nastavena vlnová délka na 225-229 nm. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a vody nejčastěji v poměru 20:80 (v/v). Je popsáno několik separací s použitím různých gradientů [33, 34, 35].

Při stanovení intaktních glukosinolátů je extrakce jednodušší. Je možné použít směs methanol/voda v poměru 70:30. [37]. V jiném případě bylo použito stejné extrakční činidlo za horka [38]. Extrakce se může provést i vroucí vodou [30]. Pro chromatografickou separaci se používá kolona s reverzní fází HPLC-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Píky byly monitorovány při 230 - 237 nm. Složení mobilní fáze může být různé. Jedna z možností je použít iontově párové činidlo ve vodě s methanolem (např. 0,005 M tetrabutylamonium bisulfát a methanol v poměru 60:40 nebo 0,005 M tetrabutylamonium sulfát a methanol v poměru 88:12). Jako další možnost je použít acetonitril a vodný roztok soli (např. 0,2 M síran amonný s acetonitrilem v poměru 70:30, 0,1 M octan amonný s acetonitrilem v poměru 95:5). U všech analýz je použitý různý gradient [30, 37, 38, 39].

1.3.2.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je vhodnou metodou pro stanovení jednotlivých intaktních glukosinolátů a desulfoglukosinolátů, kde se nejčastěji využívá micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC). Pomocí kapilární elektroforézy lze stanovit také celkové množství glukosinolátů a jejich produktů rozkladu, stanovení je založené na enzymaticky uvolněné glukóze [40].

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie je založená na použití povrchově aktivního činidla, například dodecylsulfát sodný (SDS) či cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) [40, 41]. Při separaci glukosinolátů či desulfoglukosinolátů je nejběžněji vybírán CTAB jako kationtová povrchově aktivní látka. Tato látka tvoří micely, které jsou na povrchu kladně nabitě a uvnitř hydrofobní. CTAB se silně adsorbuje na záporně nabitě silanolové skupiny, které porývají vnitřní stěnu kapiláry. Tím se vnitřní stěna kapiláry změní na pozitivně nabitou. Výsledkem adsorpce CTAB je obrácení směru elektroosmotického toku (EOF). Pokud se tedy aplikuje vysoké napětí, EOF se pohybuje směrem k anodě a CTAB micely migrují proti EOF ke katodě [42, 43]. Glukosinoláty jsou díky přítomnosti negativně nabitě sulfátové skupiny ve své struktuře částečně začleněny do CTAB micel, se kterými vytvoří iontový pár a dochází k silným interakcím analyt-micela [43]. Za neutrálních a bazických podmínek je EOF dostatečně silný na to, aby micely unášel k detektoru. Čím více glukosinolát interaguje s CTAB micelou, tím delší je jeho migrační čas [40].

Jako vhodná metoda, která umožňuje účinné oddělení intaktních glukosinolátů a desulfoglukosinolátů, je nejčastěji zvolena MECC. Co se týče přípravy reálného vzorku je tento postup identický s postupem uvedeným u stanovení intaktních glukosinolátů pomocí HPLC. K separaci glukosinolátů pomocí MECC se používala kapilára o celkové délce 72 cm a délce k detektoru 50 cm o průměru 50 μm , teplota kapiláry byla 25 $^{\circ}\text{C}$, dávkování vzorku bylo hydrodynamické tlakem 5 kPa po dobu 3 s a bylo vkládáno napětí – 19 kV. Vlnová délka UV detektoru byla nastavena na 225 nm. Pufr byl připraven z 18 mM tetraboritanu sodného, 30 mM kyseliny fosforečné a 50 mM CTAB. pH pufru bylo upraveno na 7,0 pomocí NaOH. Před začátkem každé analýzy byla kapilára proplachována pufrům nejméně 10 minut, ale je i popisováno promytí kapiláry pomocí hydroxidu sodného. Existují kritické parametry ovlivňující oddělení glukosinolátů (koncentrace micel CTAB, pH, aplikované napětí atd.), které jsou nadále podrobně studovány [40, 42, 44, 45, 46]. Podle získaných informací o CTAB má přidavek této kationtové povrchově aktivní látky zlepšit separaci a selektivitu. Největší problém při použití těchto podmínek je v nereprodukovatelnosti [47]. Byla popsána alternativní metoda, která využila aniontovou povrchově aktivní látku, díky které se zlepšilo rozlišení a selektivita metody. Při analýze se použila křemenná kapilára o průměru 50 μm a o celkové délce 64,5 cm a délce k detektoru 56 cm, vzorek byl

dávkován z anodického konce kapiláry pomocí vakua 4 kPa a to 1 s, vlnová délka byla nastavena na 230 nm. Teplota kapiláry se udržovala na 30 °C a vkládalo se napětí 17 kV. Po každé analýze byla kapilára propláchnuta 1,0 M hydroxidem sodným, vodou a pufrem přibližně 2-5 minut. Pufr byl složen z 35 mM cholátu sodného, 100 mM hydrogenfosforečnanu disodného, 50 mM taurinu, a 2% 1-propanolu [41].

Pro stanovení intaktních glukosinolátů je popsána i metoda bez použití povrchově aktivní látky. Jako pufr byl zvolen tetraboritan sodný, kdy hodnota pH byla kolem 9. Po optimalizaci podmínek bylo zjištěno, že lepší rozlišení píků je při vyšších koncentracích pufru, a proto se zvolil 100 mM tetraboritan sodný. Při analýze extraktu z brokolice tato metoda vyžadovala modifikaci pro zvýšení selektivity, jelikož některé píky glukosinolátů nebyly dobře oddělené od složek matrice vzorku. K tomuto pufru byl přidán β -cyklodextrin, který se sice v CE používá jako chirální selektor, ale v některých případech může být vhodný pro nechirální separaci. Přítomnost β -cyklodextrinu pozitivně ovlivnila separaci složek matrice od glukosinolátů. Při separaci se použila křemenná kapilára o celkové délce 70 cm, délce k detektoru 60 cm a o vnitřním průměru 50 μ m, teplota kapiláry byla udržována na 20 °C, napětí vkládané na elektrody bylo 30 kV a proud 80 μ A. Vzorky se dávkovaly hydrodynamicky po dobu 20 s při tlaku 3,4 kPa a detekce byla při vlnové délce 225 nm. Jako pufr byl použit 100 mM tetraboritan sodný o pH 8,8 a 1% β -cyklodextrin. Před začátkem analýzy se kapilára promyla hydroxidem sodným a pufrem přibližně 2 minuty [47].

Pro získání informací o celkovém obsahu glukosinolátů se volí metoda založená na enzymatickém uvolnění glukózy z glukosinolátů působením myrosinázy. Uvolněná glukóza může být po ošetření gluksooxidázou snadno převedena na glukonovou kyselinu (GA). Výsledná glukonová kyselina (GA) může být fluorescenčně značena 7-aminonaftalen-1,3-disulfonovou kyselinou (ANDSA). Derivát GA-ANDSA má krátkou dobu migrace a pokud se kapilární elektroforéza spojí s detekcí pomocí fluorescence indukované laserem (LIF) získá se elektroferogram GA-ANDSA, který je jednoznačný a neobsahuje nečistoty. Celkové množství glukosinolátů bylo vypočteno z množství glukonové kyseliny vznikající z glukosinolátů a volné glukózy v extraktu po odečtení množství glukonové kyseliny získané z volné přítomné glukózy [4, 40].

1.3.2.4 Další metody

V dnešní době se pro analýzu glukosinolátů využívá hmotnostní spektrometrie (MS), která má oproti jiným metodám několik výhod, ať už jako samotná technika nebo v kombinaci se separačními metodami. Jako iontový zdroj se využívá elektrosprej (ESI) nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Jako hmotnostní analyzátor se nejčastěji používá kvadrupólový filtr nebo analyzátor doby letu (TOF). Úprava vzorku se nijak neliší od již zmiňované extrakce. Vzorek se extrahuje organickým rozpouštědlem, nejčastěji ethanol/voda (50:50) nebo methanol/voda (70:30) [48]. Tato metoda má skvělou selektivitu a vysokou citlivost. Spektrum zobrazuje monoisotopické hmotnosti ionizované molekuly vypočtené pomocí součtů hmot atomů složek. Každý monoisotopický iont, který se používá pro přesné stanovení, je vždy doprovázen dalšími isotopologickými ionty. Soubor těchto signálů se nazývá isotopový vzor [48]. Desulfoglukosinoláty jsou identifikovány v pozitivním iontovém režimu, protože jejich deprotonace je relativně obtížná bez sulfonátového zbytku. Naopak díky přítomnosti sulfonátového zbytku jsou intaktní glukosinoláty klasifikovány jako hydrofilní sloučeniny, které se vyskytují v aniontové formě a jsou snadno identifikovatelné v negativním iontovém režimu [48, 49].

V posledních desetiletích byla pro zvýšení selektivity analýzy MS úspěšně použita tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Některé glukosinoláty jsou strukturní izomery, kdy mají stejné molekulární vzorce ale různé polohy OH skupin. Za těchto okolností je MS/MS nejvhodnější metodou pro charakterizaci a identifikaci glukosinolátů, protože fragmentační obrazec pomáhá rozlišovat izomery glukosinolátů [50, 51].

Analýza glukosinolátů metodou LC/MS nahrazuje metodu HPLC-UV. Pokud srovnáme ESI-MS a APCI-MS, tak ESI-MS je vhodná pro identifikaci vysoce polárních a tepelně labilních sloučenin, jako jsou glukosinoláty. Zatímco APCI-MS je mnohem citlivější na alifatické, aromatické a indolové desulfoglukosinoláty [52].

Dále byla popsána i metoda kapilární elektroforézy v kombinaci s ESI-TOF-MS. Glukosinoláty byly separovány jako anionty, což vedlo k velmi dobré selektivitě. Rostlinné extrakty pak mohly být analyzovány bez jakéhokoli rušení matrice [43].

Užitečné informace poskytuje i nukleární magnetická rezonance (NMR) ve spojení s dalšími spektry například z UV, IR, MS. Díky těmto informacím lze

identifikovat dané glukosinoláty ale i jejich produkty rozkladu. Jsou známy jejich chemické posuny ^1H ale i ^{13}C [20, 53].

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vyvinout separační metodu stanovení vybraných glukosinolátů v rostlinných materiálech.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a zařízení

3.1.1 Rostlinné vzorky

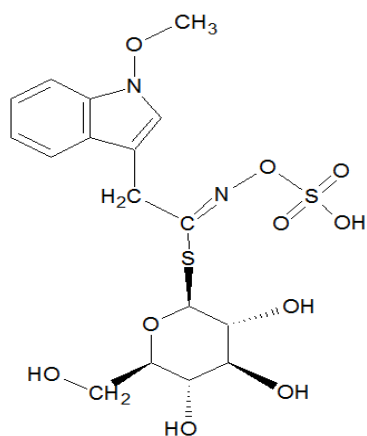
Reálné vzorky obsahující glukosinoláty poskytla doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc. z Katedry biochemie, PřF UK. Jednalo se o vzorek lyofilizovaných listů řepky a šťávy z brokolice.

3.1.2 Standardy

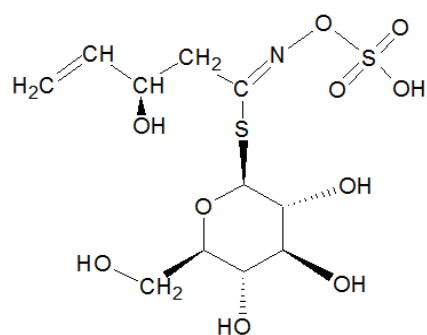
Standardy, které byly pro získání dat k dispozici, jsou od firmy Sigma Aldrich o čistotě $\geq 95\%$. Jejich strukturní vzorce a systematické názvy jsou na obrázku 3.

3.1.3 Ostatní použité chemikálie

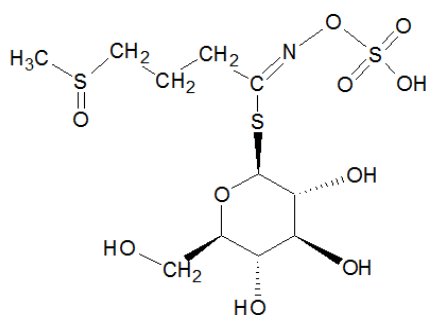
- acetonitril, pro HPLC gradient grade, Honeywell, Francie
- methanol, pro HPLC gradient grade, Honeywell, Francie
- octan amonný, p. a. $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA
- deionizovaná voda připravená systémem Milli-Q, Millipore, USA
- tetrabutylamonium chlorid hydrát 98%, Sigma-Aldrich, USA
- cetyltrimetylamonium bromid, $> 97\%$, Merck, Německo
- tetraboritan sodný dekahydrát, p. a., Lach-Ner, Česká republika
- kyselina fosforečná, 85 %, p. a., Lach-Ner, Česká republika
- hydroxid sodný p. a., Penta, Česká republika
- kyselina chlorovodíková 37 % p. a., VWR Chemicals International, Francie



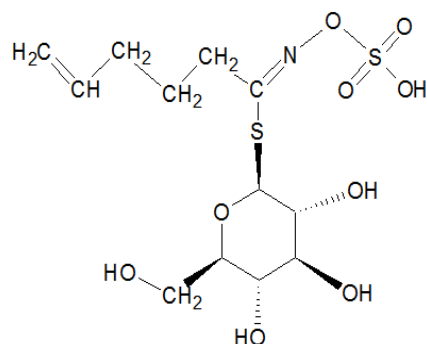
Glucobrassicin
(3-indolylmethylglucosinolat)



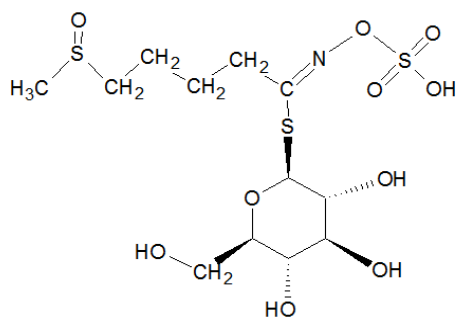
Progoitrin
(2-hydroxybut-3-en-1-ylglucosinolat)



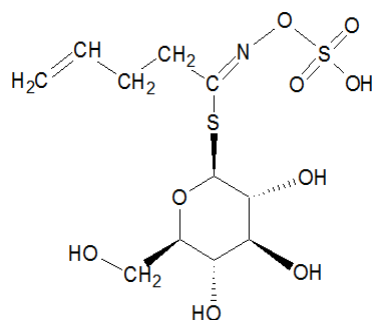
Glucoiberin
(3-methylsulfinylpropylglucosinolat)



Glucobrassicinapin
(Pent-4-en-1-ylglucosinolat)



Glucoraphanin
(4-methylsulfinylbutylglucosinolat)



Gluconapin
(But-3-en-1-ylglucosinolat)

Obrázek 3: Struktura jednotlivých glukosinolatů

3.1.4 Použitá zařízení

- analytické váhy 262 SMA-FR, Precisa, Švýcarsko
- pH metr, 3540 pH/conductivity meter, Jenway, UK
- ultrazvuková lázeň S15 Elmasonic, Elma, Německo
- odstředivka MiniSpin, Eppendorf, USA
- vakuový koncentrátor miVac, Genevac, UK
- vortex Vibramax 100, Heidolph, Německo
- kapilární elektroforéza Agilent Technologies CE 7100 s UV-VIS spektrometrickým a bezkontaktním vodivostním detektorem, Německo
- vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent Technologies HPLC 1200 s UV detektorem, Německo
- křemenná kapilára pokrytá polyimidem s vnitřním průměrem 50 μm , celkovou délkou 50 cm a efektivní délkou 41,5 cm, Polymicro Technologies, USA
- kolona poroshell HPH-C18 3,0x100 mm, 2,7 μm , Agilent Technologies, USA

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava roztoků standardů

Zásobní roztoky jednotlivých glukosinolátů byly připraveny rozpuštěním vypočteného množství standardu v deionizované vodě. Tento roztok tak měl koncentraci 1 mg/ml.

3.2.2 Příprava reálného vzorku pro CZE

K danému množství vzorku řepky, který byl rozetřen, bylo přidáno 400 μl 8,2 mM kyseliny chlorovodíkové. Poté se nechal tento vzorek 10 minut v ultrazvuku extrahovat. Poté byl vzorek centrifugován 6 minut při otáčkách 7000 za minutu. Odebraný supernatant byl před nadávkováním zfiltrován.

Vzorek brokolice byl odšťavněn a vzniklá šťáva byla dále zfiltrována.

3.2.3 Příprava reálného vzorku pro HPLC

K rozetřenému vzorku lyofilizovaných listů řepky bylo přidáno určité množství extrakčního činidla, jehož složení bylo methanol:voda v poměru 70:30. Vzorek byl extrahován 15 minut v ultrazvukové lázni. Poté byl centrifugován 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Supernatant byl odebrán a nechán odpařit ve vakuovém koncentrátoru. Po odpaření se přidalo 100 μ l směsi methanol:voda v poměru 1:1 a vše bylo zamícháno a opět centrifugováno. Před nadávkováním byl vzorek zfiltrován.

3.2.4 Příprava základního elektrolytu pro CZE

Základní elektrolyt byl připraven rozpuštěním čistých pevných nebo kapalných složek ve vodě tak, aby výsledný roztok obsahoval 40 mM cetyltrimethylamonium bromid, 18 mM tetraboritan sodný a 30 mM kyselinu fosforečnou. Po důkladném promíchání bylo upraveno pH tohoto roztoku na 7,0 pomocí 10 M hydroxidu sodného.

3.2.5 Příprava mobilní fáze pro HPLC

Eluent A byl připraven navážením potřebného množství tetrabutylamonium chloridu a rozpuštěním ve vodě tak, aby výsledný roztok měl koncentraci 0,005 mol/l. Tento roztok byl následně zfiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,2 μ m. Eluent B pak byl nejprve methanol a poté acetonitril.

3.3 Charakteristika experimentu

3.3.1 Experimentální podmínky pro CZE

Při separaci byl vzorek dávkován hydrodynamicky pod tlakem 5 kPa po dobu 5 s. Vkládané napětí bylo -20 kV. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm, přičemž délka k detektoru byla 41,5 cm. Vnitřní průměr kapiláry byl 50 μ m. Teplota kapiláry byla při měření udržována na 25 °C. Elektroferogram byl získán při vlnové délce 225 nm.

Při měření metodou CZE byla na začátku měřicího dne kapilára promyta nejprve vodou, poté hydroxidem sodným a pufrem do odpadní vialky, a to 5 minut. Další 3 minuty byla kapilára promyta základním elektrolytem do výstupní vialky, která obsahovala také základní elektrolyt. Vstupní a výstupní vialky obsahující základní

elektrolyt byly po každém třetím měření vyměněny. Mezi každou analýzou byla kapilára promývána přibližně 2 minuty.

3.3.2 Experimentální podmínky pro HPLC

Teplota kolony byla udržována na 30 °C. Mobilní fáze protékala kolonou rychlostí 0,6 ml za minutu. Objem dávkovaného vzorku byl 5 µl. Detektor zaznamenal píky při vlnové délce 235 nm. Délka analýzy byla nastavena na 14 minut, kdy se kolona stihla dostatečně promýt mezi jednotlivými analýzami.

Počáteční složení mobilní fáze bylo 89 % eluentu A a 11 % eluentu B. Během analýzy byla použita gradientová eluce, kde se měnilo složení mobilní fáze v čase. V tabulce 1 je uveden průběh gradientové eluce během analýzy.

Tabulka 1: Gradientová eluce

Čas analýzy [min]	Eluent A [obj. %]	Eluent B [obj. %]
1	89	11
6	60	40
8	60	40
9	89	11
14	89	11

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení glukosinolátů metodou kapilární zónové elektroforézy

4.1.1 Volba detekční techniky

V první řadě bylo nezbytné zjistit, jaká je vhodná detekční technika pro stanovení glukosinolátů. Pro separaci byl zvolen jako základní elektrolyt tetraboritan sodný, a to o koncentraci 10 mmol/l a 20 mmol/l. Do vzorku směsi glukosinolátů byla navíc přidána thiomocovina, která fungovala jako značkovací EOF. Pokud byla zvolena UV detekce, tak se v elektroferogramu ukázal pík nerozdělených glukosinolátů, na rozdíl od elektroferogramů získaných pomocí vodivostní detekce, kde se žádný pík glukosinolátů neukázal. Při porovnání elektroferogramů získaných při různých koncentracích základního elektrolytu se u UV detekce šum základní linie zmenšil při použití vyšší koncentrace základního elektrolytu. Zatímco u vodivostní detekce se šum základní linie při vyšší koncentraci základního elektrolytu zvětšil. Z těchto získaných informací byl vyvozen závěr, že vhodná detekce pro stanovení glukosinolátů bude UV detekce. Na obrázku č. 4 můžeme pozorovat, že s koncentrací základního elektrolytu se měnily jak migrační časy píků, tak i jejich tvary. Vlnová délka u UV detekce byla zvolena na základě získaných informací z odborné literatury [40, 42, 47].

4.1.2 Volba vhodného základního elektrolytu

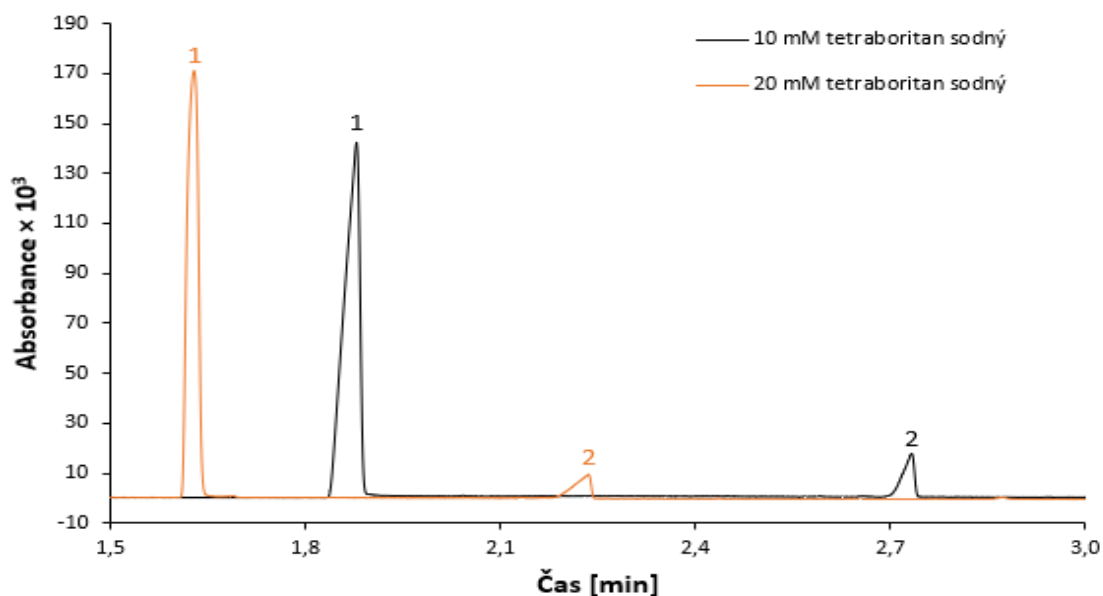
Na základě prostudovaných informací z odborných článků [44] byly zaznamenány elektroferogramy při různém složení základního elektrolytu. Při této analýze bylo použito menší napětí než v předchozí separaci. Napětí bylo nastaveno na 20 kV. Toto napětí bylo zvoleno na základě studií zabývajících se stanovením glukosinolátů. K 18 mM tetraboritanu sodnému byla nejdříve přidána kyselina fosforečná o koncentraci 30 mmol/l. Tento přírůstek způsobil, že pík nerozdělených glukosinolátů se lépe separoval a rozdělil se na více píků než jeden (viz obr. 5). Toto oddělení píků ovšem bylo stále neuspokojivé.

Dále se k tomuto základnímu elektrolytu přidala povrchově aktivní látka CTAB. Při zachování podmínek daných odborným článkem [44] se v elektroferogramu nezaznamenal žádný pík. V okamžiku, kdy na elektrody bylo vloženo záporné napětí, se micely CTAB začaly pohybovat k anodě a obrácený EOF, směřující ke katodě, tyto

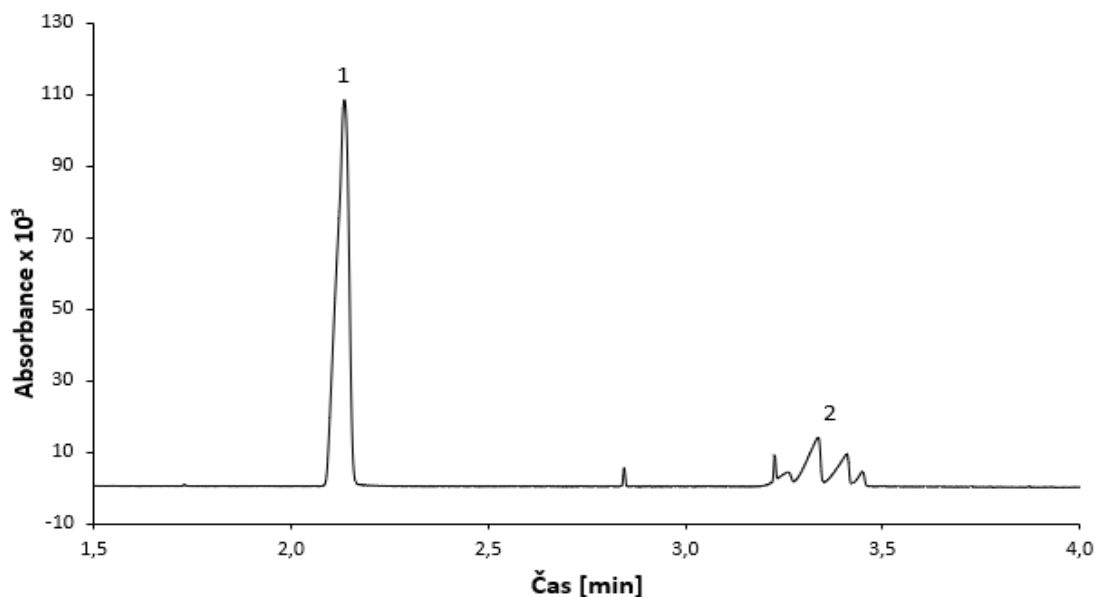
micely unášel stejným směrem k detektoru. V elektroferogramu se poté zobrazilo šest píků, které bylo možné nadále identifikovat a zjistit tak, migrační časy jednotlivých glukosinolátů (viz obr. 6).

4.1.3 Optimalizace metody

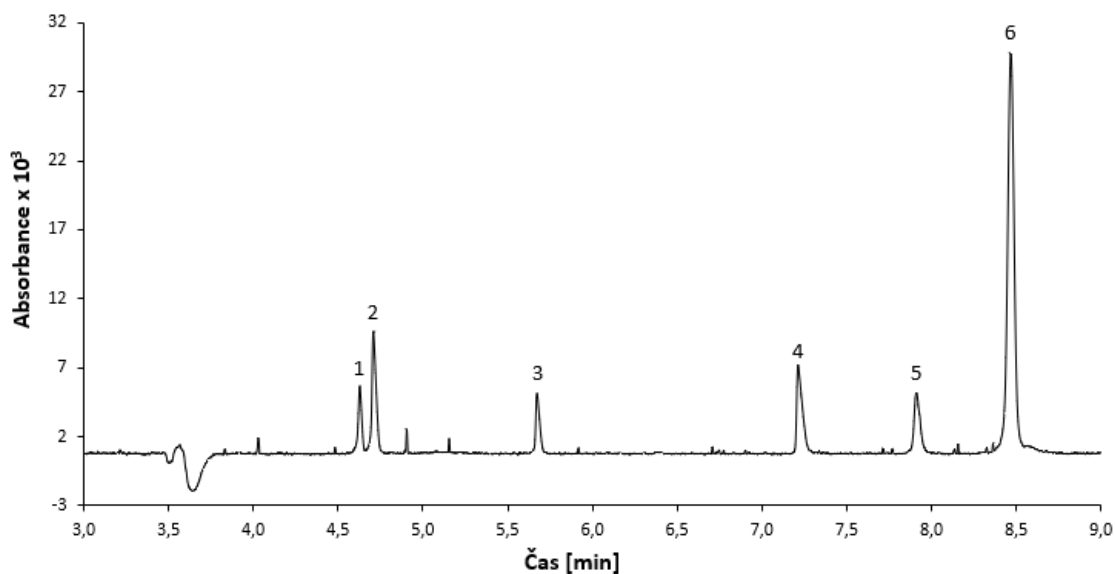
Některé separační podmínky, které byly převzaté z odborných článků, byly pozměněny. Následně byl sledován jejich vliv na separaci glukosinolátů. Jedna z úprav separačních podmínek byla separace glukosinolátů na krátkém konci kapiláry. Při této změně ale došlo k nedostatečnému oddělení prvních dvou píků. Ostatní píky nebyly ostré (viz obr. 7). Z toho důvodu se zachovala separace na dlouhém konci kapiláry.



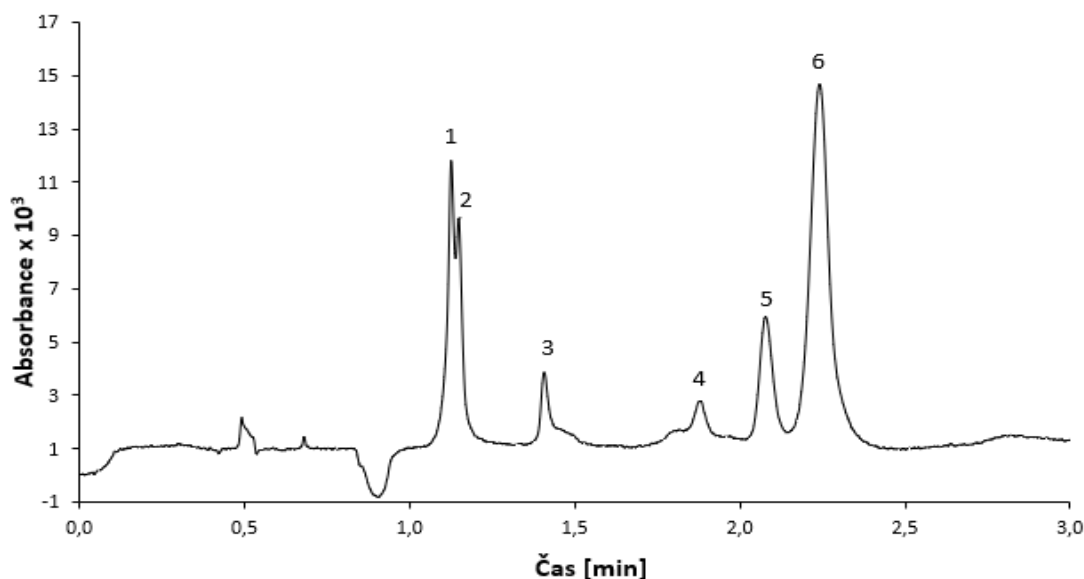
Obrázek 4: Elektroferogram zobrazující separaci směsi glukosinolátů a thiomocoviny jako značkovače EOF za použití UV detekce. Základní elektrolyt byl 10 mM a 20 mM tetraboritan sodný. Separace probíhala na dlouhém konci kapiláry. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 41,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno kladné napětí o velikosti 30 kV. Vlnová délka byla 225 nm. Pík 1 patří thiomocovině, pík 2 patří nerozděleným glukosinolátům. Koncentrace analytů byla 0,067 mg/ml.



Obrázek 5: Elektroferogram zobrazující separaci směsi glukosinolátů po změně složení základního elektrolytu. Základní elektrolyt byl 18 mM tetraboritan sodný a 30 mM kyselina fosforečná, pH 7,0. Separace probíhala na dlouhém konci kapiláry. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 41,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno napětí o velikosti 20 kV. Vlnová délka byla 225 nm. Pík 1 patří thiomocovině, píky 2 patří částečně rozděleným glukosinolátům. Koncentrace analytů byla 0,067 mg/ml.



Obrázek 6: Elektroferogram zobrazující separaci jednotlivých glukosinolátů získaný za optimálních podmínek. Základní elektrolyt byl 18 mM tetraboritan sodný a 30 mM kyselina fosforečná a 40 mM CTAB, pH 7,0. Separace probíhala na dlouhém konci kapiláry. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 41,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno napětí o velikosti -20 kV. Vlnová délka byla 225 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicapin, 6: glucobrassicin. Koncentrace analytů byla 0,4 mg/ml.



Obrázek 7: Elektroferogram zobrazující separaci jednotlivých glukosinolátů na krátkém konci kapiláry. Základní elektrolyt byl 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselina fosforečná a 40 mM CTAB. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 8,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno napětí o velikosti 20 kV. Vlnová délka byla 225 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin, 6: glucobrassicin. Koncentrace analytů byla 0,1 mg/ml.

Dále se postupně upravovala koncentrace povrchově aktivní látky v základním elektrolytu. Při změně koncentrace CTAB bylo pozorováno, jaký má tato úprava vliv na separaci jednotlivých píků glukosinolátů. Byly získány elektroferogramy při koncentracích CTAB v základním elektrolytu 50 mmol/l, 40 mmol/l, 30 mmol/l a 20 mmol/l. Tato změna koncentrace v základním elektrolytu měla největší vliv na rozlišení prvních dvou píků zaznamenaných v elektroferogramu. Plocha a rozlišení ostatních píků klesaly se snižováním koncentrace CTAB. Čím nižší byla koncentrace CTAB, tím nižší bylo rozlišení prvních dvou píků. Hodnoty rozlišení prvních dvou píků v elektroferogramu jsou uvedeny v tabulce č. 2. Změna koncentrace CTAB měla také vliv na migrační časy jednotlivých glukosinolátů. Se snižováním koncentrace CTAB se migrační časy glukosinolátů zkracovaly, což bylo způsobeno nižší koncentrací micel, které unášejí analyty směrem od detektoru.

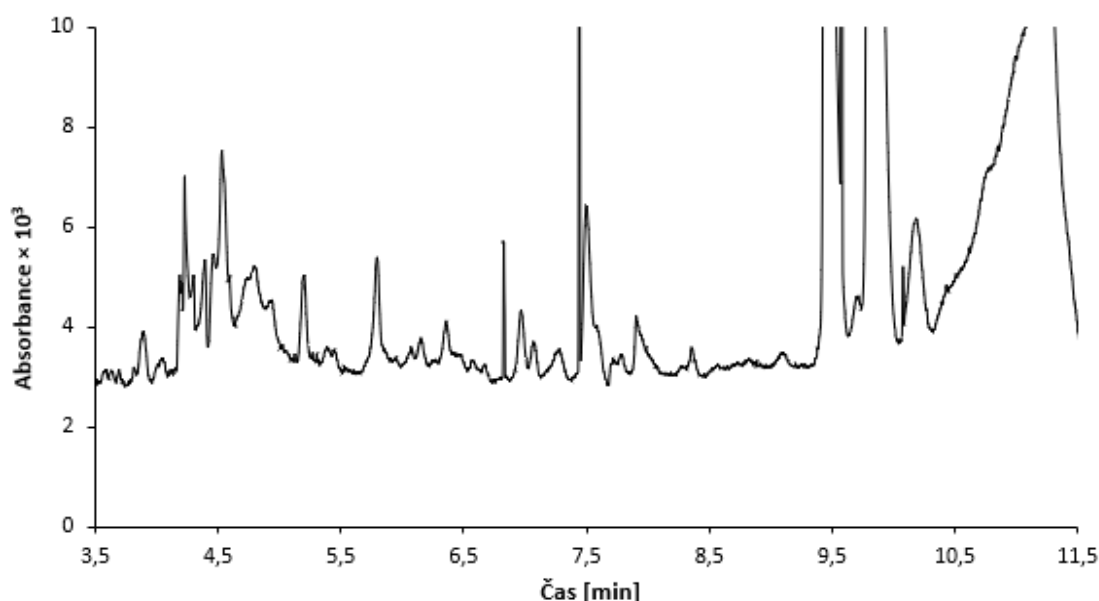
Tabulka 2: Hodnoty rozlišení glucoiberinu a glucoraphaninu v závislosti na změně koncentrace CTAB v základním elektrolytu.

Koncentrace CTAB [mmol/l]	Rozlišení R_s
50	1,84
40	1,60
30	1,23
20	1,02

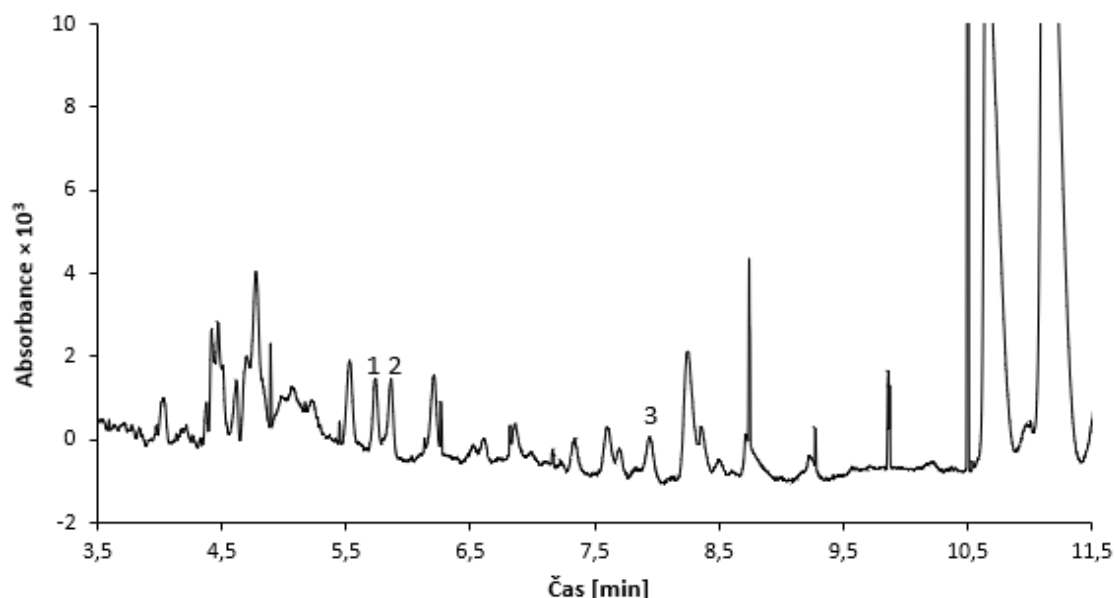
Jako vhodná koncentrace CTAB v základním elektrolytu byla zvolena 40 mM koncentrace. Sice hodnota rozlišení u 50 mM CTAB byla vyšší než u 40 mM koncentrace, ale po delším stání při pokojové teplotě se 50 mM CTAB začal srážet, což by mohlo vést k zanesení kapiláry. Dalším důvodem pro použití 40 mM CTAB byla plocha prvního píku, která byla výrazně větší než při použití 50 mM CTAB. Optimální podmínky pro separaci glukosinolátů metodou CZE jsou popsány v experimentální části, viz výše.

4.1.4 Extrakce reálného vzorku

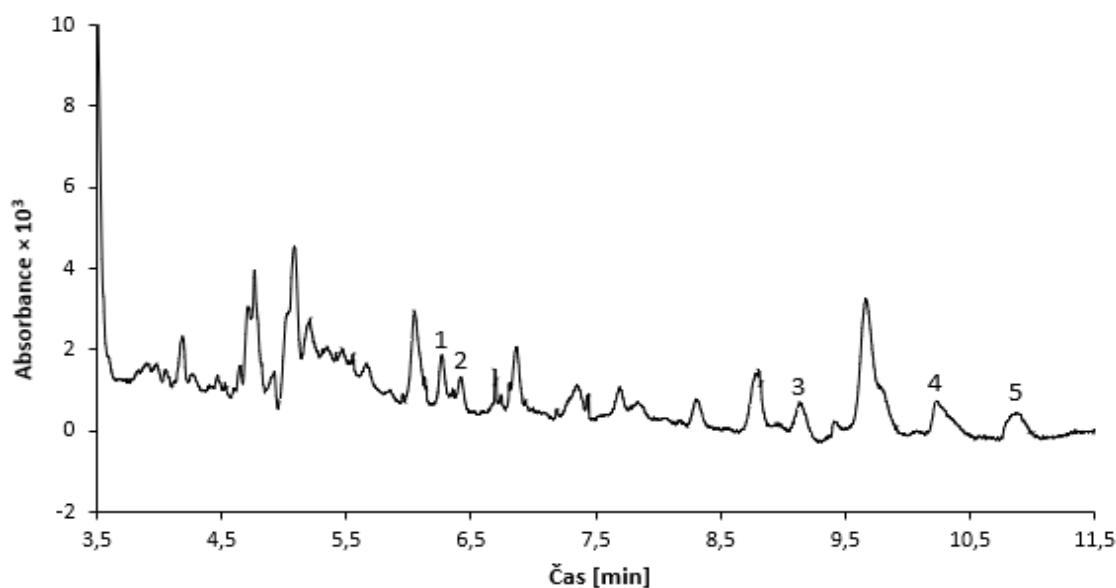
Po získání extraktu řepky následovala identifikace jednotlivých glukosinolátů. Ke vzorku řepky byly nejdříve přidány tři standardy glukosinolátů, a to glucoiberin, glucoraphanin a progoitrin. Získané elektroferogramy z měření se porovnaly s elektroferogramem vzorku řepky bez přídavku. Po vyhodnocení bylo zřejmé, že žádný z přidaných glukosinolátů vzorek řepky neobsahoval v detekovatelné koncentraci, jelikož se objevily tři nové píky, které předtím v elektroferogramu řepky nebyly. Dále byly ke stejnému vzorku řepky přidány poslední tři standardy glukosinolátů, a to gluconapin, glucobrassicinapin a glucobrassicin. Opět byly porovnány elektroferogramy mezi sebou. Zjistilo se, že ani další dva glukosinoláty ve vzorku řepky nejsou, jelikož se objevily dva nové píky. Co se týče posledního přidaného glukosinolátu, tedy glucobrassicinu, nebylo prokázáno, že by jeden z posledních píků v elektroferogramu řepky mohl patřit jemu (viz obr. 8, 9, 10).



Obrázek 8: Elektroferogram zobrazující separaci reálného vzorku řepky. Základní elektrolyt byl 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselina fosforečná a 40 mM CTAB, pH 7,0. Separace probíhala na dlouhém konci kapiláry. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 41,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno napětí o velikosti -20 kV. Vlnová délka byla 225 nm.

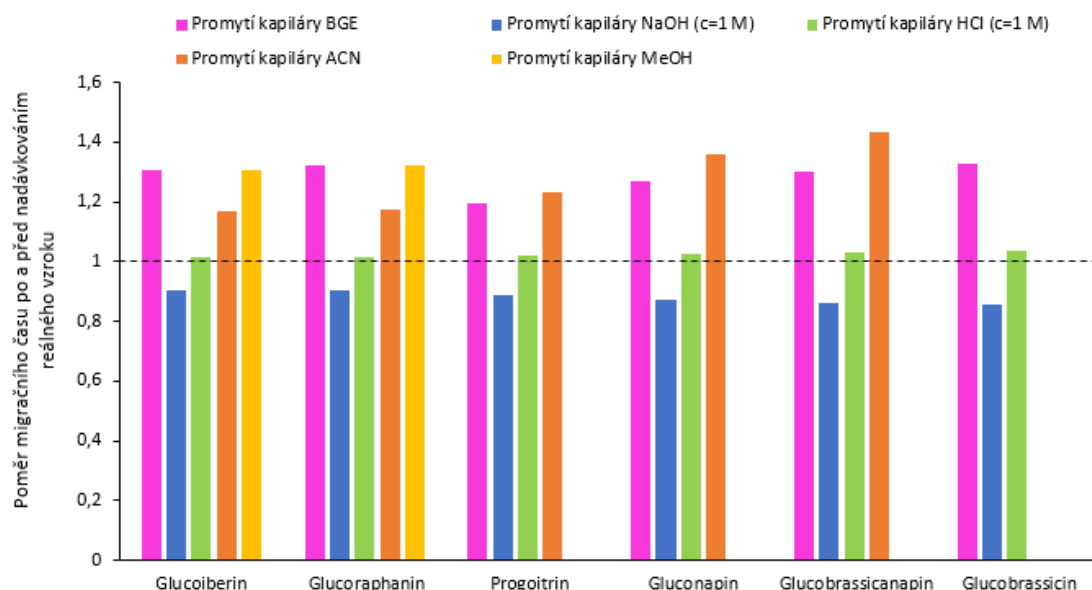


Obrázek 9: Elektroferogram zobrazující separaci reálného vzorku řepky po standardním přidavku glucoiberinu, glucoraphaninu a progoitrinu. Základní elektrolyt byl 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselina fosforečná a 40 mM CTAB, pH 7,0. Separace probíhala na dlouhém konci kapiláry. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 41,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno napětí o velikosti -20 kV. Vlnová délka byla 225 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin. Koncentrace standardního přidavku byla 0,1 mg/ml.



Obrázek 10: Elektroferogram zobrazující separaci reálného vzorku řepky po standardním přídavku glucoiberinu, glucoraphaninu, progoitrinu, gluconapinu, glucobrassicinapinu a glucobrassicinu. Základní elektrolyt byl 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselina fosforečná a 40 mM CTAB, pH 7,0. Separace probíhala na dlouhém konci kapiláry. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 41,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno napětí o velikosti -20 kV. Vlnová délka byla 225 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin. Koncentrace standardního přídavku byla 0,1 mg/ml.

Tato problematika by byla řešena dále, pokud by se neobjevil jiný zásadní problém. Z opakovaných separací bylo jasně vidět, že s každou další analýzou se migrační časy jednotlivých píků zpožďovaly a nastavená délka separace pak nebyla dostačující. Toto zpožďování měla za následek nejspíše adsorpce matrice vzorku řepky na stěny kapiláry, jelikož při opakovaném měření standardů glukosinolátů k posouvání migračních časů nedocházelo. Migrační časy píků se opožděovaly jen tehdy, pokud byl nadávkován reálný vzorek. Proto cílem následujícího kroku bylo stabilizovat migrační časy pomocí promytí kapiláry před každou separací. Postup byl pro promytí kapiláry různými roztoky stejný. Nejdříve se nadávkovala směs všech standardů glukosinolátů, po této separaci byla promyta kapilára pouze základním elektrolytem a nadávkován reálný vzorek. Následně proběhla znova analýza směsi standardů glukosinolátů, a to po promytí kapiláry základním elektrolytem. Pak se kapilára promyla zvoleným roztokem a základním elektrolytem a opět se změřila směs standardů glukosinolátů. Účinek promytí kapiláry zvoleným roztokem na opoždění migračních času ukazuje obrázek č. 11.



Obrázek 11: Vliv různého promytí kapiláry po nadávkování reálného vzorku na migrační časy glukosinolatů

Stabilizace kapiláry – promytí kyselinou chlorovodíkovou:

Po analýze reálného vzorku brokolice se kapilára promyla kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 1 mol/l po dobu 180 s a následně základním elektrolytem po dobu 90 s. Ve srovnání s měřením, kdy se promývalo pouze základním elektrolytem se migrační časy píků po promytí kyselinou chlorovodíkovou zkrátily v průměru o 22,5 %. Nicméně oproti migračním časům směsi standardu glukosinolatů získaným před nadávkováním reálného vzorku byly píky pořád opožděné v průměru o 2,7 %.

Stabilizace kapiláry – promytí acetonitrilem:

Po separaci reálného vzorku bylo sledováno, jaký vliv má promytí kapiláry acetonitrilem po dobu 180 s a základním elektrolytem po dobu 90 s na migrační časy. Toto promytí ovšem nemělo pozitivní vliv. Migrační časy píků se ještě více prodloužily, a to v průměru o 30,7 %.

Stabilizace kapiláry – promytí methanolem:

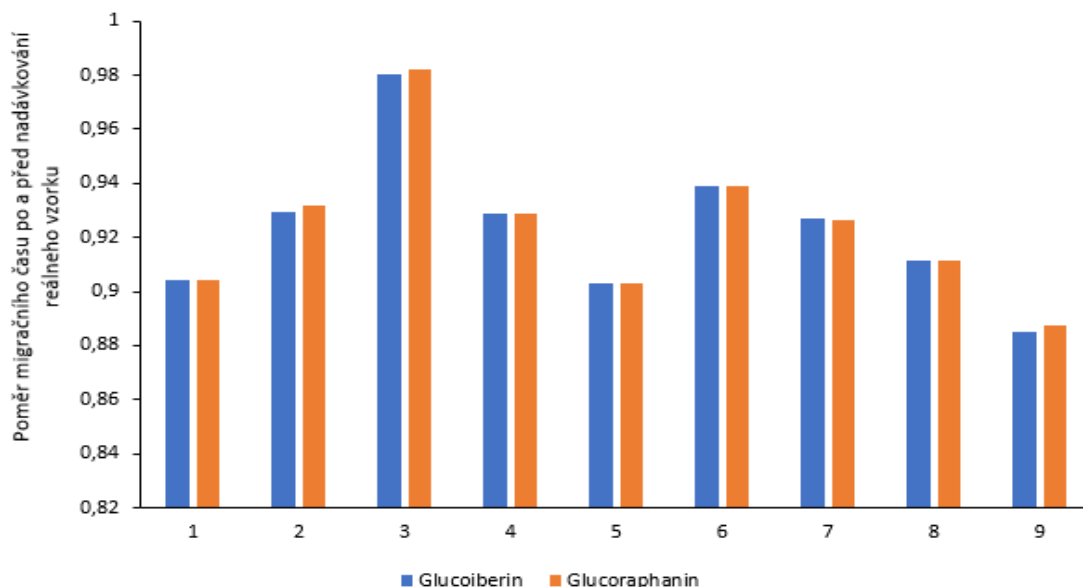
Pokud byla kapilára promyta 180 s methanolem a 90 s základním elektrolytem po analýze reálného vzorku, výsledný elektroferogram se poněkud odlišil od elektroferogramu získaného před nadávkováním reálného vzorku. V elektroferogramu byly pouze první dva píky, které měly stejné migrační časy jako migrační časy píku

v elektroferogramu získaném po separaci reálného vzorku a promytí kapiláry pouze základním elektrolytem. Migrační časy těchto dvou píků byly opožděny v průměru o 31,3 % oproti migračním časům prvních dvou píků v elektroferogramu získaném před nadávkováním reálného vzorku.

Stabilizace kapiláry – promytí hydroxidem sodným:

Jako poslední možnost byl zvolen 1 M hydroxid sodný. Kapilára byla po separaci reálného vzorku promyta 180 s hydroxidem sodným a 90 s základním elektrolytem. Migrační časy jednotlivých píků se neopožďovaly, ale také se ještě zkrátily v průměru na 97,5 % původní hodnoty. Proto bylo toto promytí kapiláry zvoleno za optimální.

V dalším kroku byly testovány různé možnosti promytí kapiláry před analýzou hydroxidem sodným v kombinaci se základním elektrolytem a vodou. Měnily se časy promytí a sledovaly se pouze první dva píky. Získané elektroferogramy byly mezi sebou porovnány. Zjistilo se, že nejlepší promytí kapiláry, při kterém se migrační časy před a po dávkování reálného vzorku nejméně lišily, je 240 s NaOH a 60 s BGE (viz obr. 12).



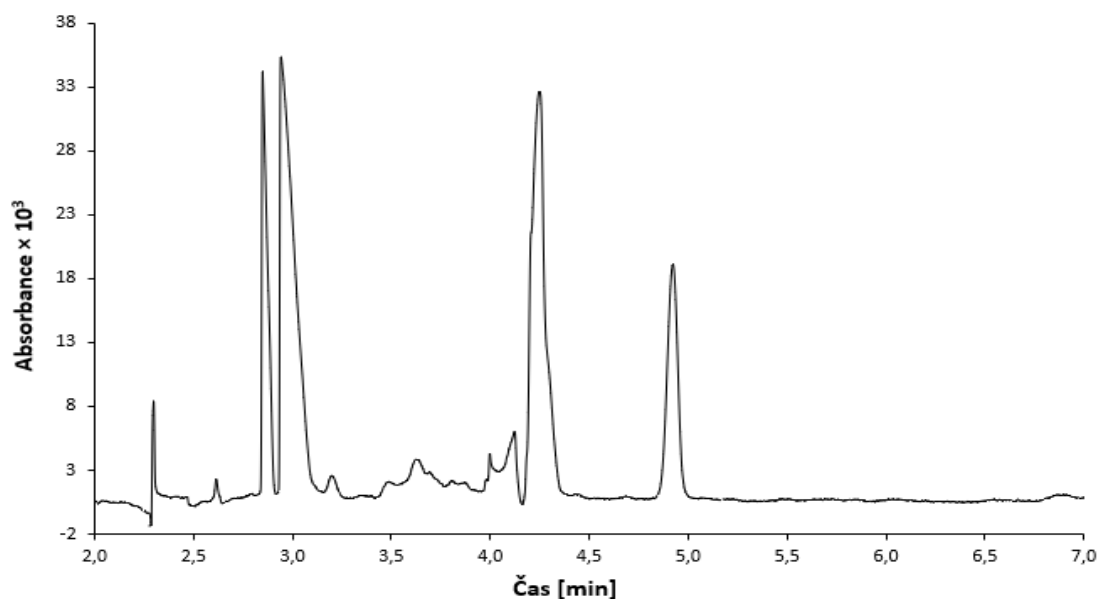
Obrázek 12: Vliv různých možností promytí kapiláry NaOH/H₂O/základní elektrolyt před a po nadávkování reálného vzorku na glucoiberin a glucoraphanin. 1: 180s/60s/90s, 2: 180s/180s/180s, 3: 300s/-/90s, 4: 180s/180s/60s, 5: 240s/30s/30s, 6: 240s/60s/60s, 7: 240s/180s/60s, 8: 240s/30s/60s, 9: 240s/-/60s

Toto promytí kapiláry pak bylo ověřeno, jak na směsi standardů glukosinolátů, tak i na reálném vzorku. Pozitivní vliv na migrační časy byl potvrzen. Poměr migračního času po a před nadávkováním reálného vzorku se pro jednotlivé glukosinoláty pohyboval od 0,998 do 1,017.

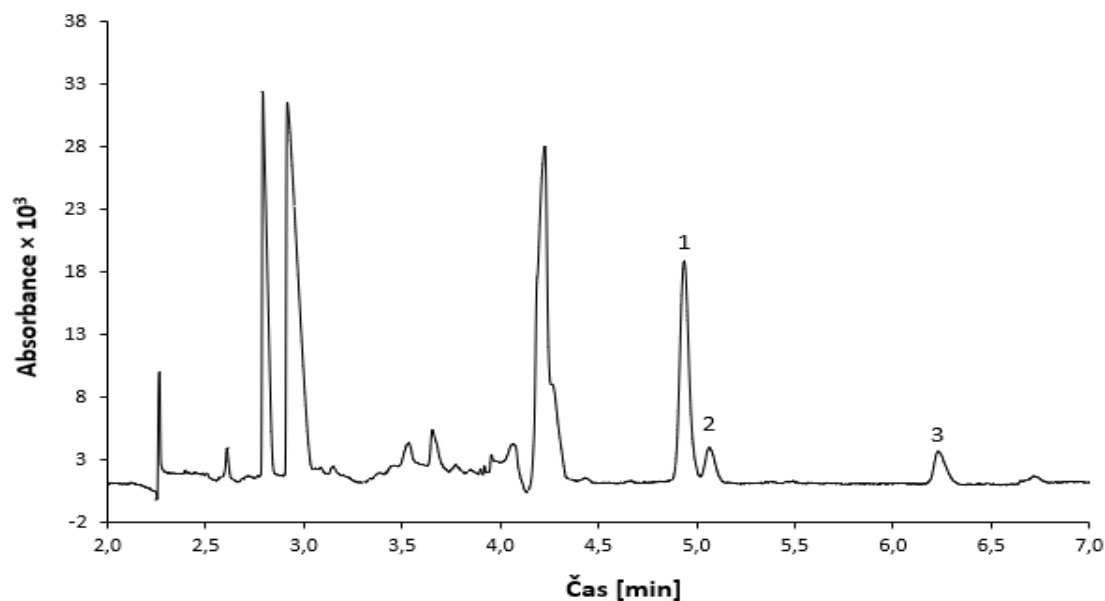
4.1.5 Identifikace jednotlivých glukosinolátů v reálném vzorku

Za těchto separačních podmínek s promýváním, které zajistilo stabilní migrační časy, se mohla znovu zjistit přítomnost jednotlivých glukosinolátů v reálném vzorku brokolice. Tento postup byl identický s postupem, který byl už popsán výše v kap. 4.1.4 extrakce reálného vzorku. Po přidavku glucoiberinu, glucoraphaninu a progoitrinu se v elektroferogramu ukázaly dva nové píky (viz obr. 13, 14). Zdá se, že pík 1 na obr. 14 patří glucoiberinu a prokazuje jeho přítomnost ve vzorku brokolice. Po bližším zkoumání bylo však zjištěno, že pík 1 z obr. 14 patří interferenci z matrice, která překrývá pík glucoiberinu. Závěrem tedy je, že ve vzorku brokolice nebyl nalezen žádný ze jmenovaných tří glukosinolátů.

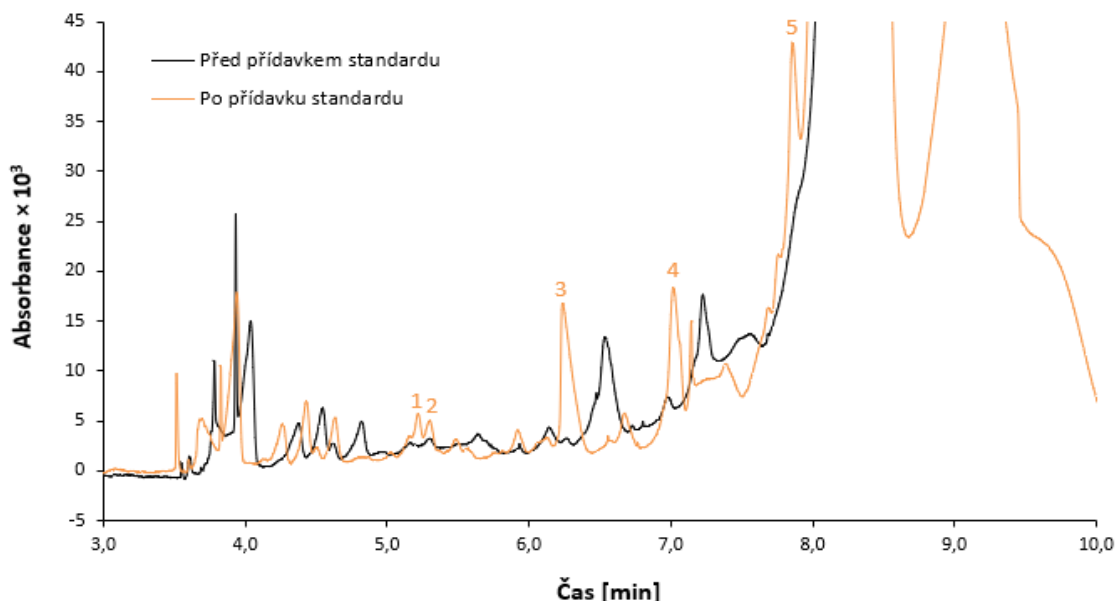
Jako druhý reálný vzorek byly k dispozici lyofilizované listy řepky. Získaný extrakt byl následně odpařen, aby byl zakoncentrován a znova rozpuštěn v extrakčním činidle. Pro identifikaci glukosinolátů byl nutný přídavek standardů. Pokud se porovnal elektroferogram vzorku řepky bez přídavku a s přídavkem, je u píku 1, 2 a 5 jasně vidět, že v tomto vzorku řepky nejsou přítomny v detekovatelném množství. Ovšem u píku 3 a 4 je to nejasné a jejich přítomnost ve vzorku by se musela ještě ověřit. Nicméně z elektroferogramu je vidět, že je zde mnoho interferencí z matrice. Z tohoto důvodu nebyl nadále tento problém řešen (viz obr. 15).



Obrázek 13: Elektroferogram zobrazující separaci vzorku brokolice po promytí 240 s NaOH a 60 s základním elektrolytem kapiláry před separací. Základní elektrolyt byl 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselina fosforečná a 40 mM CTAB, pH 7,0. Separace probíhala na dlouhém konci kapiláry. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 41,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno napětí o velikosti -20 kV. Vlnová délka byla 225 nm.



Obrázek 14: Elektroferogram zobrazující separaci vzorku brokolice s přidavkem glucoiberinu, glucoraphaninu a progoitrinu po promytí 240 s NaOH a 60 s základním elektrolytem kapiláry před separací. Základní elektrolyt byl 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselina fosforečná a 40 mM CTAB, pH 7,0. Separace probíhala na dlouhém konci kapiláry. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 41,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno napětí o velikosti -20 kV. Vlnová délka byla 225 nm. 1: interference z matrice, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin. Koncentrace přidavku byla 0,1 mg/ml.

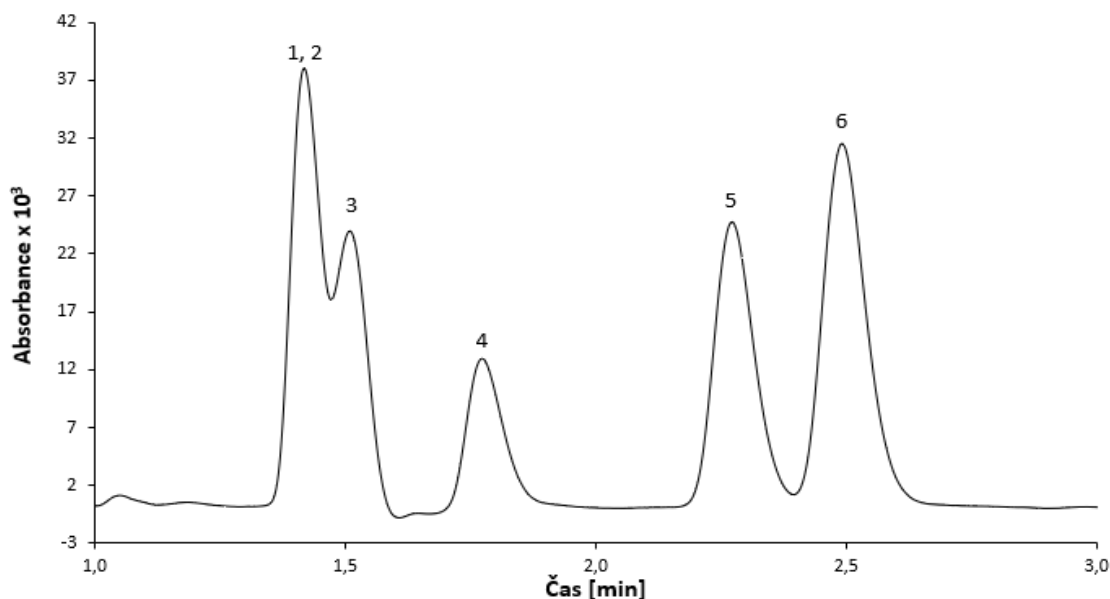


Obrázek 15: Elektroferogram zobrazující separaci reálného vzorku řepky po promytí kapiláry před separací. Základní elektrolyt byl 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselina fosforečná a 40 mM CTAB, pH 7,0. Separace probíhala na dlouhém konci kapiláry. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm a délka k detektoru byla 41,5 cm. Na elektrody bylo vkládáno napětí o velikosti -20 kV. Vlnová délka byla 225 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin. Koncentrace přidavku byla 0,06 mg/ml.

4.2 Stanovení glukosinolátů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie

4.2.1 Volba vhodných chromatografických podmínek

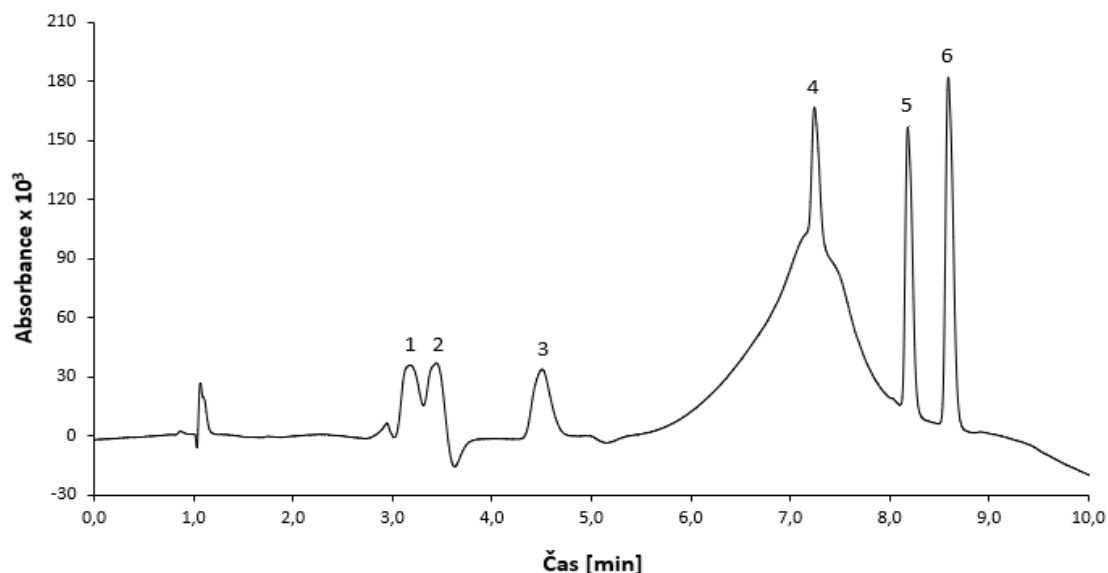
Chromatografické podmínky, a to UV detekce (235 nm) a složení mobilní fáze (40 % methanolu a 60 % 0,005 M TBA) se stacionární fází (RP-C18), byly zvoleny na základě odborného článku [37]. Nejdříve bylo ověřeno, že za zvolených podmínek pro analýzu se jednotlivé glukosinoláty na koloně zadržují. Eluční pořadí jednotlivých glukosinolátů se shodovalo s migračním pořadím u CZE. Po nadávkování směsi standardů glukosinolátů bylo z chromatogramu vidět, že glucoiberin a glucoraphanin se ve stacionární fázi zadržovaly stejnou dobu a jejich retenční časy se tak shodovaly (viz obr. 16). Glukosinoláty ale celkově vykazovaly poměrně slabou retenci.



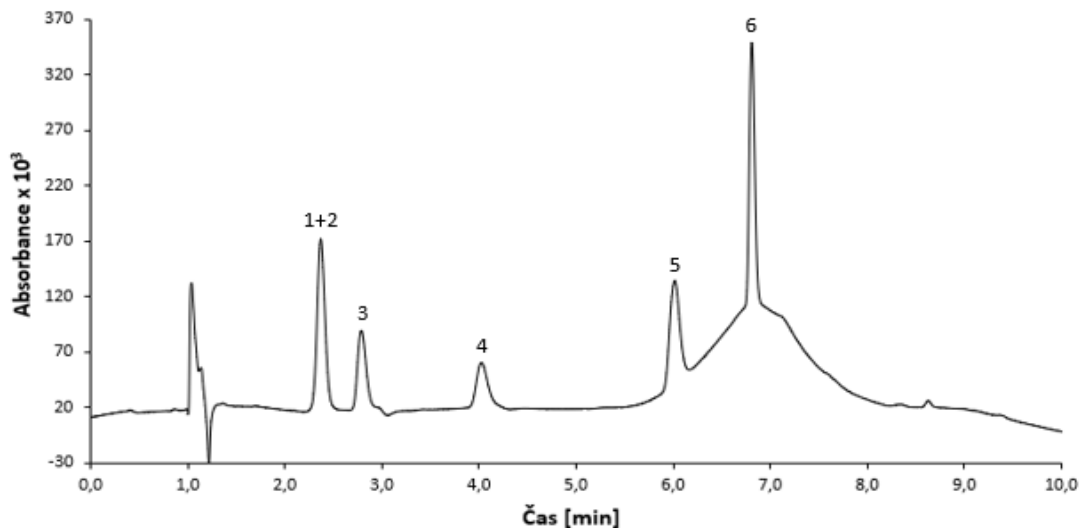
Obrázek 16: Chromatogram zobrazující separaci standardu glukosinolátů. Mobilní fáze byla složena z vodného 0,005 M TBA a methanolu v poměru 60:40. Kolona se použila 3x100 mm HPLC-C18, průtok byl 0,4 ml/min, teplota kolony se udržovala na 30°C. Dávkovalo se 1 μ l vzorku a vlnová délka byla 235 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin, 6: glucobrassicin. Koncentrace progoitrinu a glucoraphaninu byla 0,125 mg/ml a koncentrace ostatních glukosinolátů byla 0,5 mg/ml.

4.2.2 Volba vhodné mobilní fáze

Za účelem zvýšení retence glukosinolátů ve stacionární fázi se měnil poměr složek mobilní fáze. Jestliže se poměr obrátil, tedy složení mobilní fáze bylo 40 % TBA a 60 % MeOH, tak se v chromatogramu objevil pouze jeden velký pík s velmi krátkým retenčním časem. Tímto se potvrdilo, že čím méně je vodné složky mobilní fáze, tedy párového činidla, tím méně se glukosinoláty zadržují ve stacionární fázi a eluují tak všechny s mrtvým časem. Poté byl poměr složek mobilní fáze změněn na 80 % TBA a 20 % MeOH. Při této změně se v chromatogramu zaznamenaly tři píky. Základní linie byla nestabilní. Nejlépe se glukosinoláty separovaly, pokud byl poměr mobilní fáze 70 % TBA a 30 % MeOH. V chromatogramu bylo 5 píků, kdy poslední z nich eluoval před 8. minutou. Ovšem glucoiberin a glucoraphanin i tak nadále koeluovaly, a proto byla zvolena gradientová eluce. Jestliže se MeOH nahradil ACN, tak jednotlivé glukosinoláty byly eluovány rychleji než při použití MeOH. Na obrázku č. 17 a 18 jsou chromatogramy získané za stejných podmínek lišící se pouze organickou částí mobilní fáze. Dalším rozdílem byl tlak kolony, kdy při použití ACN se výrazně snížil. Pro další měření byl proto vybrán acetonitril.



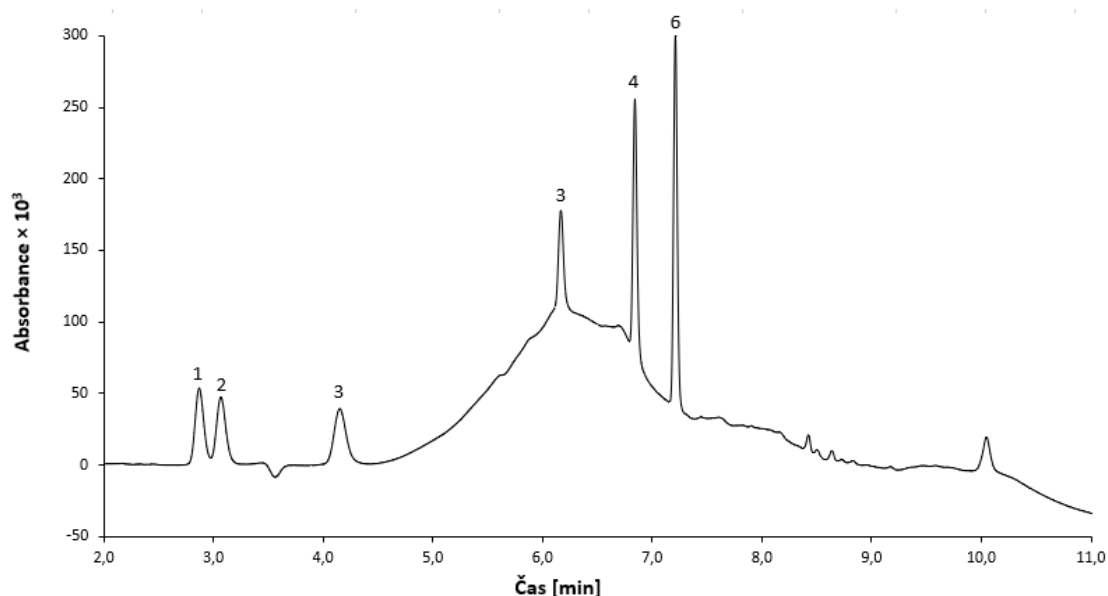
Obrázek 17: Chromatogram zobrazující separaci standardu glukosinolátů při použití methanolu jako organické části mobilní fáze. Byla použita gradientová eluce: 0-2 min. 80 % TBA a 20 % MeOH, 5-7 min. 60 % TBA a 40 % MeOH, 8-12 min. 80 % TBA a 20 % MeOH. Kolona se použila 3x100 mm HPLC-C18, průtok byl 0,4 ml/min, teplota kolony se udržovala na 30°C. Dávkovalo se 5 μ l vzorku a vlnová délka byla 235 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin, 6: glucobrassicin. Koncentrace progoitrinu a glucoraphaninu byla 0,125 mg/ml a koncentrace ostatních glukosinolátů byla 0,5 mg/ml.



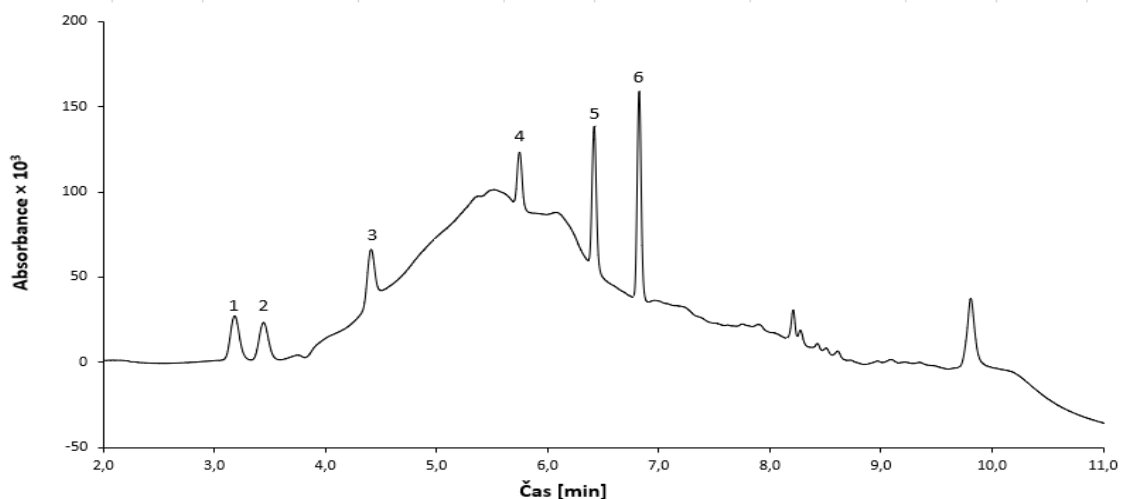
Obrázek 18: Chromatogram zobrazující separaci standardu glukosinolátů při použití acetonitrilu jako organické části mobilní fáze. Byla použita gradientová eluce: 0-2 min. 80 % TBA a 20 % ACN, 5-7 min. 60 % TBA a 40 % ACN, 8-12 min. 80 % TBA a 20 % ACN. Kolona se použila 3x100 mm HPLC-C18, průtok byl 0,4 ml/min, teplota kolony se udržovala na 30 °C. Dávkovalo se 5 μ l vzorku a vlnová délka byla 235 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin, 6: glucobrassicin. Koncentrace progoitrinu a glucoraphaninu byla 0,125 mg/ml a koncentrace ostatních glukosinolátů byla 0,5 mg/ml.

4.2.3 Úprava gradientové eluce

Změnou gradientu se zlepšovalo oddělení glucoiberinu a glucoraphaninu. Pokud se nastavil gradient od 15 % ACN, došlo k nedokonalému oddělení glucoiberinu a glucoraphaninu. Jestliže se ale nastavil gradient od 2. minuty a od 12 % ACN jednotlivé píky byly dostatečně od sebe odděleny. Dále bylo zjištěno, že pokud se gradient nastaví od 1 minuty a od 11 % ACN, oddělení glukosinolátů od sebe je pak nejlepší (viz obr. 19, 20). Optimální podmínky této metody pro separaci glukosinolátů metodou HPLC jsou popsány v experimentální části, viz kap. 3.3.2.



Obrázek 19: Chromatogram zobrazující separaci standardu glukosinolátů. Gradientová eluce: 0-2 min. 88 % TBA a 12 % ACN, 5-7 min. 60 % TBA a 40 % ACN, 8-14 min. 88 % TBA a 12 % ACN. Kolona se použila 3x100 mm HPLC-C18, průtok byl 0,6 ml/min, teplota kolony se udržovala na 30 °C. Dávkovalo se 5 μ l vzorku a vlnová délka byla 235 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin, 6: glucobrassicin. Koncentrace progoitrinu a glucoraphaninu byla 0,125 mg/ml a koncentrace ostatních glukosinolátů byla 0,5 mg/ml.



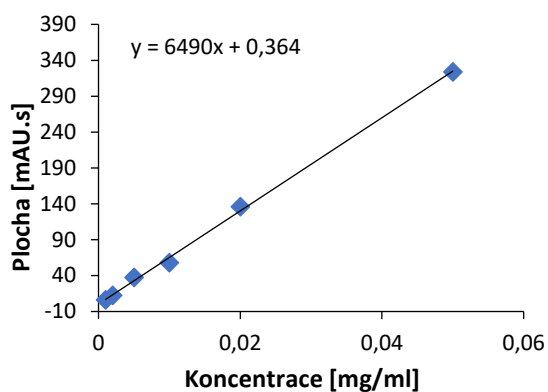
Obrázek 20: Chromatogram zobrazující separaci standardu glukosinolátů. Gradientová eluce: 0-1 min. 89 % TBA a 11 % ACN, 5-7 min. 60 % TBA a 40 % ACN, 8-14 min. 89 % TBA a 11 % ACN. Kolona se použila 3x100 mm HPLC-C18, průtok byl 0,6 ml/min, teplota kolony se udržovala na 30 °C. Dávkovalo se 5 µl vzorku a vlnová délka byla 235 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin, 6: glucobrassicin. Koncentrace progoitrinu a glucoraphaninu byla 0,125 mg/ml a koncentrace ostatních glukosinolátů byla 0,5 mg/ml.

4.2.4 Kalibrační závislost jednotlivých glukosinolátů

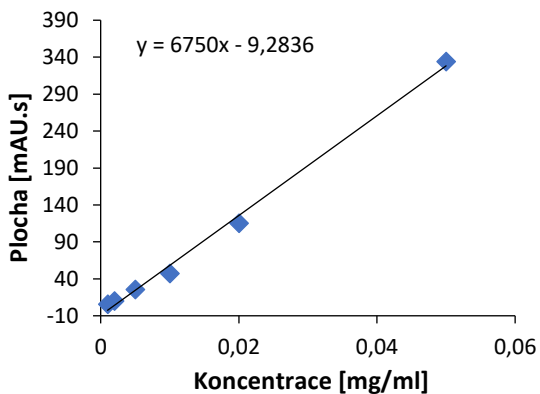
Ke každému glukosinolátu byla změřena kalibrační závislost. Rozmezí koncentrace bylo od 0,001 mg/ml do 0,05 mg/ml. Ze získaných hodnot ploch píků byly sestaveny kalibrační přímky (viz obr. 21-26). Mezi další parametry, které byly vypočteny, patří LOD, jejíž hodnota u jednotlivých glukosinolátů se pohybovala v rozmezí od 0,0015 mg/ml do 0,0032 mg/ml a LOQ, která se pohybovala v rozmezí od 0,0049 mg/ml do 0,0106 mg/ml. Oba tyto parametry jsou pro stanovení glukosinolátů metodou HPLC využitelné. Koeficient determinace byl u glucoraphaninu nejmenší, a to 0,9954, a u ostatních glukosinolátů se pohyboval v rozmezí 0,9985–0,9987. Dále byl také zjištěn lineární dynamický rozsah. Výsledky zmíněných parametrů pro jednotlivé glukosinoláty jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Přehled parametrů pro zhodnocení kalibračních přímek jednotlivých glukosinolátů

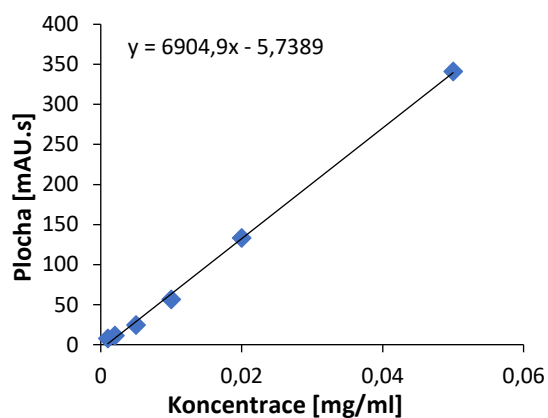
GLUKOSINOLÁT	KOEFICIENT DETERMINACE R^2	LINEÁRNÍ DYNAMICKÝ ROZSAH [mg/ml]	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
Glucoiberin	0,9985	0,0064-0,05	0,0019	0,0064
Glucoraphanin	0,9954	0,0061-0,05	0,0018	0,0061
Progoitrin	0,9985	0,0060-0,05	0,0018	0,0060
Gluconapin	0,9987	0,0106-0,05	0,0032	0,0106
Glucobrassicinapin	0,9987	0,0086-0,05	0,0026	0,0086
Glucobrassicin	0,9985	0,0049-0,05	0,0015	0,0049



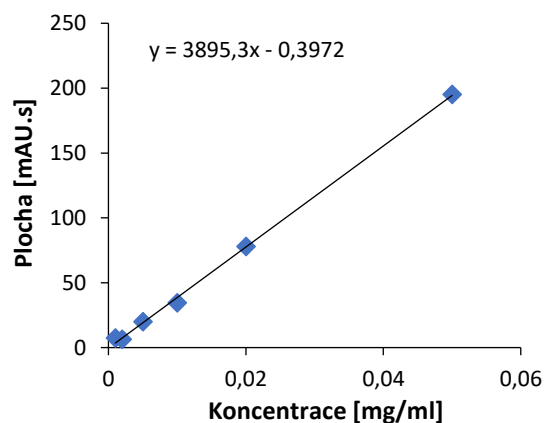
Obrázek 21: Kalibrační závislost glucoiberinu



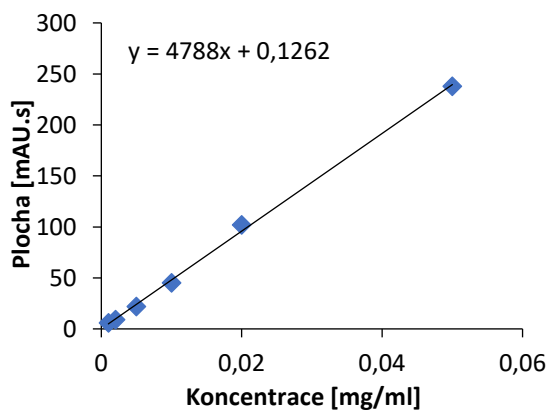
Obrázek 22: Kalibrační závislost glucoraphaninu



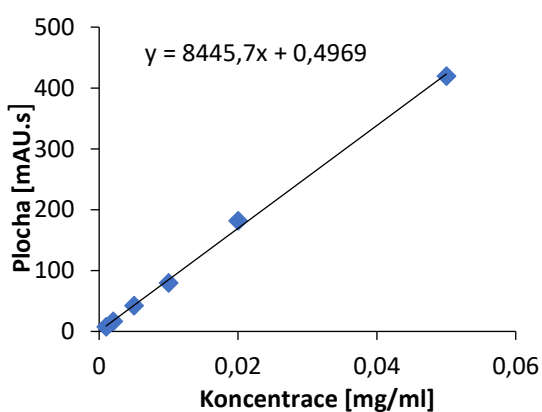
Obrázek 23: Kalibrační závislost progoitrinu



Obrázek 24: Kalibrační závislost gluconapinu



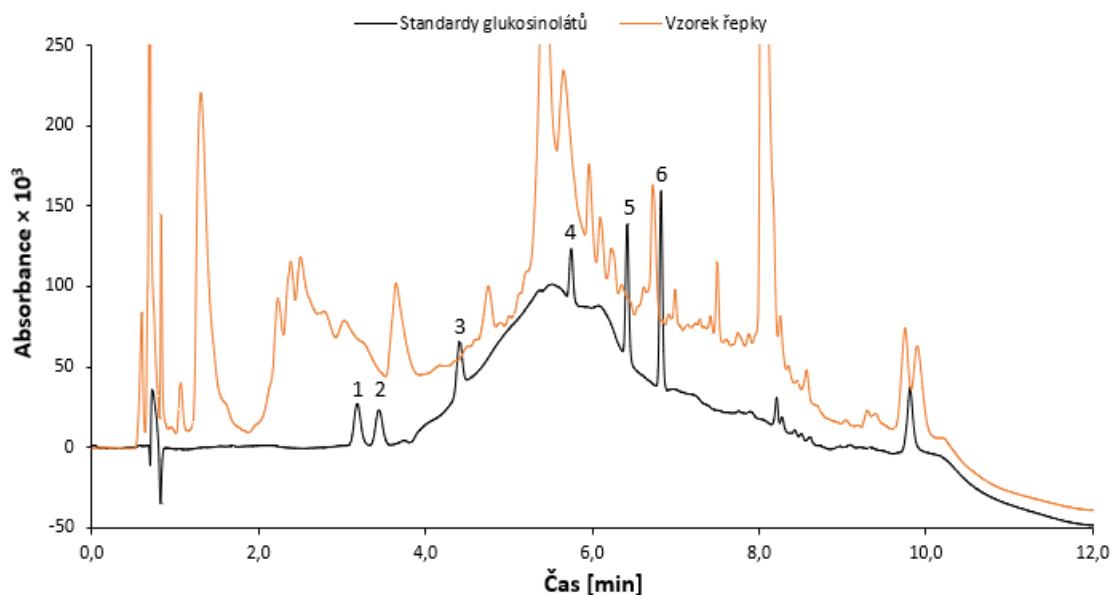
Obrázek 25: Kalibrační závislost glucobrassicinapinu



Obrázek 26: Kalibrační závislost glucobrassicinu

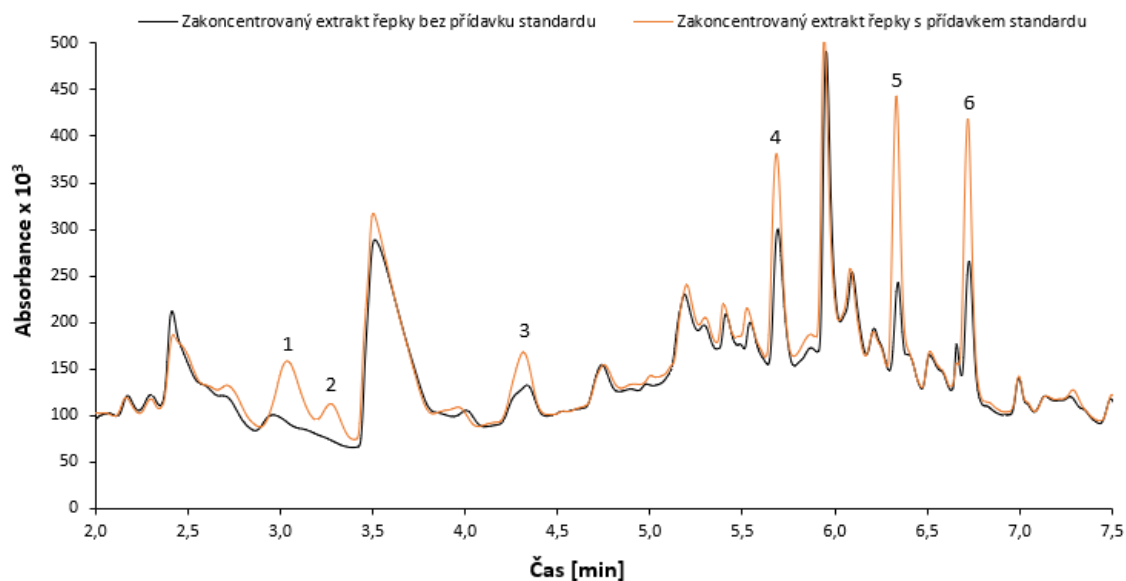
4.2.5 Zjištění přítomnosti glukosinolátů v rostlinném vzorku

První extrakt byl získán extrakcí lyofilizovaných listů řepky. Po 15 minutách ve vodní lázni a následném zfiltrování byl vzorek analyzován. Po srovnání chromatogramu extraktu a standardu glukosinolátů bylo možné pouze odhadnout, zda se nějaký glukosinolát v rostlinném vzorku nachází. Píky, které by mohly patřit glukosinolátům, byly poměrně malé na to, aby se přítomnost glukosinolátů mohla potvrdit (viz obr. 27).



Obrázek 27: Chromatogram zobrazující separaci standardu glukosinolátů a reálného vzorku řepky za použití gradientové eluce. Kolona se použila 3x100 mm HPLC-C18, průtok byl 0,6 ml/min, teplota kolony se udržovala na 30 °C. Dávkovalo se 5 μ l vzorku a vlnová délka byla 235 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin, 6: glucobrassicin. Koncentrace progoitrinu a glucoraphaninu byla 0,125 mg/ml a koncentrace ostatních glukosinolátů byla 0,5 mg/ml.

Proto se při další extrakci získaný extrakt desetinasobně zakoncentroval odpařením a pak následně naředit a změřil. Do takto připraveného reálného vzorku byly přidány standardy glukosinolátů pro ověření jejich přítomnosti ve vzorku. Na obrázku č. 28 je vidět, že tento přídavek glukosinolátů potvrdil přítomnost některých glukosinolátů ve vzorku řepky.



Obrázek 28: Chromatogram zobrazující separaci zakoncentrovaného extraktu řepky za použití gradientové eluce. Kolona se použila 3x100 mm HPLC-C18, průtok byl 0,6 ml/min, teplota kolony se udržovala na 30 °C. Dávkovalo se 5 μ l vzorku a vlnová délka byla 235 nm. 1: glucoiberin, 2: glucoraphanin, 3: progoitrin, 4: gluconapin, 5: glucobrassicinapin, 6: glucobrassicin. Koncentrace přídavku progoitrinu a glucoraphaninu byla 0,033 mg/ml a koncentrace přídavku ostatních glukosinolátů byla 0,066 mg/ml.

Po získání chromatogramů bez přídavku a s přídavkem standardu glukosinolátu se zjistila, z 5 opakovaných měření po sobě, výtěžnost metody a opakovatelnost. Koncentrace přídavku glucoraphaninu a progoitrinu byla 0,033 mg/ml. Koncentrace přídavku glucoiberinu, gluconapinu, glukobrassicinapinu a glucobrassicinu byla 0,066 mg/ml. Výsledky výtěžnosti jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Hodnoty výtěžnosti metody pro jednotlivé glukosinoláty

GLUKOSINOLÁT	MEDIÁN KONCENTRACÍ BEZ PŘÍDAVKU [mg/ml]	MEDIÁN KONCENTRACÍ S PŘÍDAVKEM [mg/ml]	ROZDÍL MEDIÁNŮ [mg/ml]	VÝTĚŽNOST [%]
Glucoiberin	0,018	0,087	0,069	104,8
Glucoraphanin	< LOD	0,024	0,024	72,0
Progoitrin	0,044	0,072	0,028	84,3
Gluconapin	0,132	0,206	0,074	112,1
Glucobrassicinapin	0,044	0,161	0,117	177,1
Glucobrassicin	0,044	0,097	0,053	79,7

Výtěžnost u glucoraphaninu byla nízká a vzhledem k tomu, že v reálném vzorku nebyl prokázán, není důvod zjišťovat příčinu. Naopak u glucobrassicinapinu vyšla výtěžnost výrazně vyšší než 100 %. To může mít za následek neúplné oddělení glucobrassicinapinu od matrice v reálném vzorku řepky. U ostatních glukosinolátů byla výtěžnost uspokojivá, pohybovala se od 79,7 do 112,1 %.

Opakovatelnost byla vyhodnocena z naměřených ploch píků, výšky píků a retenčních časů píků jednotlivých glukosinolátů při opakovaném měření vzorků. Z těchto hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka RSD (viz tabulka č. 5).

Tabulka 5: Opakovatelnost metody pro jednotlivé glukosinoláty

GLUKOSINOLÁT	RSD plochy píku [%]	RSD výšky píku [%]	RSD retenčního času píku [%]
<i>Bez přídavku standardu</i>			
Glucoiberin	3,70	3,30	0,88
Glucoraphanin	/	/	/
Progoitrin	1,92	1,30	0,24
Gluconapin	0,69	1,33	0,23
Glucobrassicinapin	2,48	0,43	0,10
Glucobrassicin	1,08	1,06	0,08
<i>S přídavkem standardu</i>			
Glucoiberin	2,79	4,63	0,48
Glucoraphanin	2,63	3,01	0,22
Progoitrin	2,55	4,43	0,22
Gluconapin	0,81	2,08	0,12
Glucobrassicinapin	0,34	0,44	0,11
Glucobrassicin	0,33	1,15	0,06

Nejlepší opakovatelnost měly retenční časy jednotlivých glukosinolátů, u kterých se hodnoty RSD pohybovaly od 0,06 do 0,88 %. Naopak nejnižší opakovatelnost vykazovaly výšky píků, u nichž se hodnoty RSD pohybovaly od 0,43 do 4,63 %. Hodnoty RSD plochy píků se pohybovaly v rozmezí 0,33 do 3,70 %. Poslední tři glukosinoláty, tedy gluconapin, glucobrassicinapin a glucobrassicin, měly nejlépe

stabilní všechny tři parametry, a to jak bez přídavku standardu, tak i s přídavkem standardu. Relativní směrodatná odchylka u těchto tří glukosinolátů byla nejvýše 2,5 %.

5 ZÁVĚR

V této práci byly hledány vhodné podmínky pro stanovení glukosinolátů v rostlinném materiálu, a to pomocí kapilární elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Tyto látky se nachází v rostlinách rodu brukvovitých. Jsou to sekundární metabolity, jejichž funkce spočívá v ochraně proti škůdcům.

Byl učiněn pokus o identifikaci intaktních glukosinolátů v lyofilizovaných listech řepky a šťávy z brokolice pomocí kapilární elektroforézy. Jelikož glukosinoláty obsahují negativně nabitou sulfátovou skupinu, využila se micelární elektrokinetická chromatografie. Při této metodě se použilo CTAB, jako kationtové povrchové aktivní činidlo. CTAB tvoří micely, do kterých se glukosinoláty částečně začlenily. Pokud se vyvíjená metoda aplikovala na rostlinný materiál, docházelo při opakovaném měření k prodloužení migračních časů jednotlivých glukosinolátů. Tento problém byl řešen promýváním kapiláry před analýzou rostlinného materiálu. Nejlepší promývání kapiláry před analýzou vzorku bylo 240 s NaOH a 60 s BGE. Ve vzorku brokolice nebyl prokázán žádný intaktní glukosinolát. Zatímco ve vzorku řepky bylo stanovení rušeno interferencemi z matrice, které právě toto stanovení znemožňovaly.

Úspěšnější metodou pro stanovení intaktních glukosinolátů byla metoda HPLC. U této metody bylo použito iontově párové činidlo TBA. Po zjištění podmínek, za kterých se jednotlivé glukosinoláty od sebe dostatečně oddělily, byly tyto podmínky použity i pro stanovení glukosinolátů ve vzorku lyofilizovaných listů řepky. Některé intaktní glukosinoláty byly ve vzorku potvrzeny pomocí metody standardního přídavku. Při optimalizaci metody byly glukosinoláty stanoveny v koncentračním rozsahu od 0,001 mg/ml do 0,05 mg/ml, kdy hodnota LOD se pohybovala v rozmezí od 0,0015 mg/ml do 0,0032 mg/ml a LOQ, která se pohybovala v rozmezí od 0,0049 mg/ml do 0,0106 mg/ml. Výtěžnost metody u prokázaných glukosinolátů se pohybovala od 79,7 do 112,1 %.

Závěrem lze považovat metodu HPLC pro stanovení některých intaktních glukosinolátů ve vzorku řepky za vhodnou a použitelnou.

SEZNAM LITERATURY

- [1] Lee K.Ch.; Cheuk M.W.; Chan W.; Lee A.W.M; Zhao Z.Z.; Jiang Z.H.; Cai Z.: Determination of glucosinolates in traditional Chinese herbs by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2006**, 386(7-8), 2225-2232. DOI: 10.1007/s00216-006-0882-7. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-006-0882-7>
- [2] Redovniković. I. R.; Glivetić T.; Delonga K.; Vorkapić-Furač J.: Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum biologorum*. Croatian society of natural sciences, **2008**, 110(4), 297-310. ISSN 0031-5362.
- [3] Creamer J. S.; Krauss S. T.; Lunte S. M.: Capillary electrophoresis separation of the desamino degradation products of oxytocin. *Electrophoresis*. **2014**, 35(4), 563-569. DOI: 10.1002/elps.201300394. ISSN 01730835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201300394>
- [4] Śmiechowska A.; Bartoszek A.; Namieśnik J.: Determination of Glucosinolates and Their Decomposition Products—Indoles and Isothiocyanates in Cruciferous Vegetables. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **2010**, 40(3), 202-216. DOI: 10.1080/10408347.2010.490489. ISSN 1040-8347. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408347.2010.490489>
- [5] Karcher A.; Melouk H. A.; El Rassi Z.: High-Performance Liquid-Phase Separation of Glycosides. III. Determination of Total Glucosinolates in Cabbage and Rapeseed by Capillary Electrophoresis via the Enzymatically Released Glucose. *Analytical Biochemistry*. **1999**, 267(1), 92-99. DOI: 10.1006/abio.1998.3002. ISSN 00032697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269798930020>
- [6] Johnson I. T.: Glucosinolates: Bioavailability and Importance to Health. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. **2002**, 72(1), 26-31. DOI: 10.1024/0300-9831.72.1.26. ISSN 0300-9831. Dostupné také z: <https://econtent.hogrefe.com/doi/10.1024/0300-9831.72.1.26>
- [7] Prestera T.; Fahey J. W.; Holtzclaw W. D.; Abeygunawardana C.; Kachinski J. L.; Talalay P.: Comprehensive Chromatographic and Spectroscopic Methods for the

- Separation and Identification of Intact Glucosinolates. *Analytical Biochemistry*. **1996**, 239(2), 168-179. DOI: 10.1006/abio.1996.0312. ISSN 00032697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269796903127>
- [8] Aires A.; Carvalho R.: Rapid Separation of Indole Glucosinolates in Roots of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* Subsp. *Pekinensis*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *International Journal of Analytical Chemistry*. **2017**, 1-7. DOI: 10.1155/2017/5125329. ISSN 1687-8760. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/ijac/2017/5125329/>
- [9] Halkier B. A.; Gershenzon J.: Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*. **2006**, 57(1), 303-333. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228. ISSN 1543-5008. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>
- [10] Mitchen R. F.: Glucosinolates and their degradation products. Advances in Botanical Research. *Elsevier*. **2001**, 2001, 35, 213-262. Advances in Botanical Research. DOI: 10.1016/S0065-2296(01)35008-5. ISBN 9780120059362. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065229601350085>
- [11] Ishida M.; Hara M.; Fukino N.; Kakizaki T.; Morimitsu Y.: Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science*. **2014**, 64(1), 48-59. DOI: 10.1270/jsbbs.64.48. ISSN 1344-7610.
- [12] Mithen R.: Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation*. **2001**, 34(1), 91-103. DOI: 10.1023/A:1013330819778. ISSN 01676903. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1013330819778>
- [13] Bones A. M.; Rossiter J. T.: The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*. **1996**, 97(1), 194-208. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00497.x. ISSN 0031-9317. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00497.x>
- [14] Hanschen F. S.; Lamy E.; Schreiner M.; Rohn S.: Reactivity and Stability of Glucosinolates and Their Breakdown Products in Foods. *Angewandte Chemie International Edition*. **2014**, 53(43), 11430-11450. DOI: 10.1002/anie.201402639. ISSN 14337851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201402639>

- [15] Vaughn S. F.; Berhow M. A.: Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products*. **2005**, 21(2), 193-202. DOI: 10.1016/j.indcrop.2004.03.004. ISSN 09266690. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669004000494>
- [16] Vig A. P.; Rampal G.; Thind T. S.; Arora S.: Bio-protective effects of glucosinolates – A review. *LWT - Food Science and Technology*. **2009**, 42(10), 1561-1572. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.05.023. ISSN 00236438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643809001510>
- [17] Prieto M. A.; López C. J.; Simal-Gandara J.: Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Functional Food Ingredients from Plants, Elsevier*. **2019**, 2019, , 305-350. Advances in Food and Nutrition Research. DOI: 10.1016/bs.afnr.2019.02.008. ISBN 9780128165676. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452619300233>
- [18] Padilla G.; Cartea M. E.; Velasco P.; De Haro A.; Ordás A.: Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica rapa. *Phytochemistry*. **2007**, 68(4), 536-545. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.11.017. ISSN 00319422. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942206006947>
- [19] Rosa E. A. S.; Heaney R. K.; Fenwick G. R.; Portas C. A. M.: Glucosinolates in Crop Plants. *Horticultural Reviews. Oxford, UK*, **1996**, 2010-07-29, 19, 99-215. DOI: 10.1002/9780470650622.ch3. ISBN 9780470650622. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470650622.ch3>
- [20] Sørensen H.: Glucosinolates: Structure-Properties-Function. Canola and Rapeseed. *Boston, MA: Springer US*. **1990**, 1990, 149-172. DOI: 10.1007/978-1-4615-3912-4_9. ISBN 978-1-4613-6744-4. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-3912-4_9
- [21] Schug E.: Eine Methode zur schnellen und einfachen Bestimmung des Gesamtglucosinolatgehaltes in Grünmasse und Samen von Kruziferen durch die quantitative Analyse enzymatisch freisetzbaren Sulfates. *Fett Wissenschaft Technologie/Fat Science Technology*. **1987**, 89(11), 438-442. DOI:

- 10.1002/lipi.19870891106. ISSN 09315985. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/lipi.19870891106>
- [22] Schnug E.; Haneklaus S.: Indirekte Bestimmung des Gesamtglucosinolatgehaltes von Rapssamen mittels Röntgenfluoreszenzanalyse. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*. **1987**, 326(5), 441-445. DOI: 10.1007/BF00492794. ISSN 0016-1152. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00492794>
- [23] Schnug E.; Haneklaus S.: X-ray fluorescence-spectroscopy - a new method for precise, rapid and simple determination of total glucosinolate content of rapeseed. *Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)*. **1987**, 1528-1534.
- [24] Alexandre E. M. C.; Moreira S. A.; Pinto C. A.; Pintado M.; Saraiva J. A.: Analysis of glucosinolates content in food products. *Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier, **2020**, 2020, 213-250. DOI: 10.1016/B978-0-12-816493-8.00007-X. ISBN 9780128164938. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012816493800007X>
- [25] Slominski B. A.; Campebell L. D.: Gas chromatographic determination of indole glucosinolates—a re-examination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1987**, 40(2), 131-143. DOI: 10.1002/jsfa.2740400205. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740400205>
- [26] Brown P. D.; Morra M. J.; Borek V.: Gas Chromatography of Allelochemicals Produced during Glucosinolate Degradation in Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1994**, 42(9), 2029-2034. DOI: 10.1021/jf00045a037. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00045a037>
- [27] Heaney R. K.; Fenwick G. R.: The analysis of glucosinolates in Brassica species using gas chromatography. Direct determination of the thiocyanate ion precursors, glucobrassicin and neoglucobrassicin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1980**, 31(6), 593-599. DOI: 10.1002/jsfa.2740310612. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740310612>
- [28] Heaney R. K.; Fenwick G. R.: The quantitative analysis of indole glucosinolates by gas chromatography – the importance of the derivatisation conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1982**, 33(1), 68-70. DOI: 10.1002/jsfa.2740330113. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740330113>

- [29] Thies W.: Quantitative Gas Liquid Chromatography of Glucosinolates on a Microliter Scale. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*. **1976**, 78(6), 231-234. DOI: 10.1002/lipi.19760780604. ISSN 0015038X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/lipi.19760780604>
- [30] Kaaushik N.; Agnihotri A.: High-performance liquid chromatographic method for separation and quantification of intact glucosinolates. *Chromatographia*. **1999**, 49(5-6), 281-284. DOI: 10.1007/BF02467557. ISSN 0009-5893. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02467557>
- [31] Doheny-Adams T.; Redeker K.; Kittipol V.; Bancroft I.; Hartley S. E.: Development of an efficient glucosinolate extraction method. *Plant Methods*. **2017**, 13(1). DOI: 10.1186/s13007-017-0164-8. ISSN 1746-4811. Dostupné také z: <http://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-017-0164-8>
- [32] Hrnčířík K.; Velíšek J.; Davidek J.: Comparison of HPLC and GLC methodologies for determination of glucosinolates using reference material. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. **1998**, 206(2), 103-107. DOI: 10.1007/s002170050223. ISSN 1431-4649. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002170050223>
- [33] Michinton I.; Sang J.; Burke D.; Truscott R. J. W.: Separation of desulphoglucosinolates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1982**, 247(1), 141-148. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)84863-3. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300848633>
- [34] Aires A.; Carvalho R.: Rapid Separation of Indole Glucosinolates in Roots of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* Subsp. *Pekinensis*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *International Journal of Analytical Chemistry*. **2017**, 2017, 1-7. DOI: 10.1155/2017/5125329. ISSN 1687-8760. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/ijac/2017/5125329/>
- [35] Hong E.; Kim S. J.; Kim G. H.: Identification and quantitative determination of glucosinolates in seeds and edible parts of Korean Chinese cabbage. *Food Chemistry*. **2011**, 128(4), 1115-1120. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.102. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610015207>

- [36] Björkqvist B.; Hase A.: Separation and determination of intact glucosinolates in rapeseed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1988**, 435, 501-507. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)82214-7. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301822147>
- [37] Berhow M. A.; Polat U.; Glinski J. A.; et al. Optimized analysis and quantification of glucosinolates from *Camelina sativa* seeds by reverse-phase liquid chromatography. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 43, 119-125. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.07.018. ISSN 09266690. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669012003871>
- [38] Betz J. M.; Fox W. D.: High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Glucosinolates in Brassica Vegetables. *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I*. Washington, DC: American Chemical Society, **1993**, 1993-12-20, (March 28), 181-196. ACS Symposium Series. DOI: 10.1021/bk-1994-0546.ch014. ISBN 0-8412-2768-3. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1994-0546.ch014>
- [39] Björkqvist B.; Hase A.: Separation and determination of intact glucosinolates in rapeseed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1988**, 435, 501-507. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)82214-7. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301822147>
- [40] Karcher A.; El Rass Z.: Capillary electrophoresis of glucosinolates and their degradation products. *Electrophoresis*. **1999**, 20(15-16), 3181-3189. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991001)20:15/16<3181::AID-ELPS3181>3.0.CO;2-G.
- [41] Bellotas N.; Sørensen J. C.; Sørensen H.: Micellar electrokinetic capillary chromatography–Synchronous monitoring of substrate and products in the myrosinase catalysed hydrolysis of glucosinolates. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1130(2), 246-252. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.05.079. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306011083>
- [42] Morin P.; Villard F.; Quinsac A.; Dreux M.: Micellar electrokinetic capillary chromatography of glucosinolates and desulfoglucosinolates with a cationic

surfactant. *Journal of High Resolution Chromatography*. **1992**, 15(4), 271-275. DOI: 10.1002/jhrc.1240150412. ISSN 0935-6304. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jhrc.1240150412>

- [43] Bringmann G.; Kajahn I.; Neusüß C.; Pelzing M.; Laug S.; Unger M.; Holzgrabe U.: Analysis of the glucosinolate pattern of *Arabidopsis thaliana* seeds by capillary zone electrophoresis coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*. **2005**, 26(7-8), 1513-1522. DOI: 10.1002/elps.200410255. ISSN 01730835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200410255>
- [44] Michaelsen S.; Møller P.; Sørensen H.: Factors influencing the separation and quantitation of intact glucosinolates and desulphoglucosinolates by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1992**, 608(1-2), 363-374. DOI: 10.1016/0021-9673(92)87144-W. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739287144W>
- [45] Lee I.; Boyce M. C.; Breadmore M. C.: Quantitative determination of glucoraphanin in Brassica vegetables by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica Chimica Acta*. **2010**, 663(1), 105-108. DOI: 10.1016/j.aca.2010.01.043. ISSN 00032670. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326701000125X>
- [46] Trenerry V.; Caridi D.; Elkins A.; Donkor O.; Jones R.: The determination of glucoraphanin in broccoli seeds and florets by solid phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*. **2006**, 98(1), 179-187. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.002. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605005686>
- [47] Lechtenberg M.; Hensel A.: Determination of glucosinolates in broccoli-based dietary supplements by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2019**, 78, 138-149. DOI: 10.1016/j.jfca.2019.02.007. ISSN 08891575. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157518311396>
- [48] Bianco G.; Pascale R.; Lelario F.; Bufo S. A.; Cataldi T. R. I.: The Investigation of Glucosinolates by Mass Spectrometry. *Glucosinolates. Cham: Springer*

International Publishing, **2016**, 2016-8-26, January 2016, 1-32. Reference Series in Phytochemistry. DOI: 10.1007/978-3-319-26479-0_12-1. ISBN 978-3-319-26479-0. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-26479-0_12-1

- [49] Kuszczewicz B.; Iori R.; Piekarska A.; Namieśnik J.; Bartoszek A.: Convenient identification of desulfoglucosinolates on the basis of mass spectra obtained during liquid chromatography-diode array-electrospray ionisation mass spectrometry analysis: Method verification for sprouts of different Brassicaceae species extracts. *Journal of Chromatography A*. **2013**, 1278, 108-115. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.075. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967313000435>
- [50] Sleno L.; Volmer D. A.: Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **2004**, 39(10), 1091-1112. DOI: 10.1002/jms.703. ISSN 1076-5174. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.703>
- [51] Mitchell Wells J.; McLuckey S. A.: Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins. *Biological Mass Spectrometry*. Elsevier, **2005**, 2005, 148-185. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)02005-7. ISBN 9780121828073. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687905020057>
- [52] Zimmermann N. S.; Gerendás J.; Krumbein A.: Identification of desulphoglucosinolates in Brassicaceae by LC/MS/MS: Comparison of ESI and atmospheric pressure chemical ionisation-MS. **2007**, 51(12), 1537-1546. DOI: 10.1002/mnfr.200700103. ISSN 16134125. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.200700103>
- [53] Olsson K.; Theander O.; Åman P.; Pelzing M.; Laug S.; Unger M.; Holzgrabe U.: ¹H-N.M.R., ¹³C-N.M.R., and mass spectra of glucosinolates and related compounds. *Carbohydrate Research*. **1977**, 58(1), 1-8. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)83397-2. ISSN 00086215. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500833972>