 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50110.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

## STANOVENÍ OBSAHU GLUKOSINOLÁTŮ METODOU HPLC

### 1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení celkového obsahu glukosinolátů v semeni řepky a v jejích produktech jako jsou řepkové pokrutiny, řepkový šrot apod.


### 2 Princip

Glukosinoláty se extrahují ze vzorku vroucí vodou, následně se čistí a enzymaticky desulfatují na iontoměničích. Vlastní stanovení se provádí metodou HPLC na koloně s reverzní fází za použití gradientové eluce a detekce v UV oblasti.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- 2 Acetonitril, čistota pro HPLC.
- 3 Methanol, čistota pro HPLC.
- 4 Methanol, roztok,  $c(\text{CH}_3\text{OH}) = 70 \%$  (V/V).  
Příprava: Smíchá se 700 ml methanolu (3) a 300 ml vody (1).
- 5 Kyselina octová, 99,0% (m/m),  $\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1,05 \text{ g/ml}$ .
- 6 Kyselina octová, roztok,  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 2 \text{ mol/l}$ .  
Příprava: Do asi 500 ml vody (1) se přidává za stálého míchání 115 ml kyseliny octové (5). Po vytemperování se v 1000ml odměrné baňce doplní vodou (1) po značku.
- 7 Octan sodný trihydrát, roztok,  $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 0,2 \text{ mol/l}$ .  
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží 2,72 g octanu sodného trihydrátu, rozpustí se a doplní vodou (1) po značku.
- 8 Octan sodný trihydrát, roztok,  $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}) = 0,02 \text{ mol/l}$ , pH = 4,0.  
Příprava: 50 ml roztoku octanu sodného (7) se zředí 450 ml vody (1). pH roztoku se upraví na hodnotu 4,0 pomocí roztoku kyseliny octové (6).
- 9 Kyselina mravenčí, 98% (m/m),  $\rho(\text{HCOOH}) = 1,22 \text{ g/ml}$ .
- 10 Imidazol,  $c(\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2) = 99 \%$  (m/m).

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50110.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

- 11 Imidazolformiát, roztok,  $c(\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2) = 6 \text{ mol/l}$ .  
Příprava: Naváží se 204 g imidazolu (10) a rozpustí se ve 113,5 ml kyseliny mravenčí (9). Převede se do 500ml odměrné baňky a doplní vodou (1) po značku.
- 12 Sinigrin monohydrát, roztok,  $c(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{KNO}_9\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 5 \text{ mmol/l}$ .  
Příprava: Naváží se 0,0519 g sinigrin monohydrátu, rozpustí se a doplní ve 25ml odměrné baňce vodou (1) po značku.
- 13 Sinigrin monohydrát, roztok,  $c(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{KNO}_9\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 20 \text{ mmol/l}$ .  
Příprava: Naváží se 0,2078 g sinigrin monohydrátu, rozpustí se a doplní ve 25ml odměrné baňce vodou (1) po značku.
- 14 Glukotropaeolin,  $c(\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{KNO}_9\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 5 \text{ mmol/l}$ .  
Příprava: Naváží se 0,0560 g glukotropaeolinu, rozpustí se a doplní ve 25ml odměrné baňce vodou (1) po značku.
- 15 Glukotropaeolin, roztok,  $c(\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{KNO}_9\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 20 \text{ mmol/l}$ .  
Příprava: Naváží se 0,2238 g glukotropaeolinu, rozpustí se a doplní ve 25ml odměrné baňce vodou (1) po značku.
- 16 DEAE Sephadex A-25, suspenze.  
Příprava: 10 g pryskyřice DEAE Sephadex A-25 se promíchá v přebytku roztoku kyseliny octové (6). Směs se nechá usadit a pak se přidá roztok kyseliny octové (6) tak, aby objem kapalné fáze byl dvakrát větší než objem sedimentu.
- 17 DEAE Sepharose CL-6B.
- 18 Sulfatáza, typ H-1.
- 19 Dichlormethan.
- 20 Certifikovaný referenční materiál: BCR 190R nebo BCR 367.
- 21 Mobilní fáze.  
Eluent A: acetonitril, 20% roztok (V/V).  
Příprava: 200 ml acetonitrilu (2) se smíchá s 800 ml vody (1).  
Eluent B: voda (1).

## Poznámky

- 1 *Jako vnitřní standard se používá monohydrát sinigrinu (allylglukosinolát draselný). V případě analýzy vzorků získaných z jiných rostlin čeledi brukvovitých, které mohou v přirozené formě sinigrin obsahovat, se použije jako vnitřní standard glukotropaeolin (benzylglukosinolát draselný) a jako extrakční činidlo methanol (4).*

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50110.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

- 2 *Roztoky vnitřního standardu (12) až (15) se uchovávají jeden týden při teplotě přibližně 4 °C nebo je lze uchovat po delší dobu při teplotě –18 °C.*
- 3 *Čistota vnitřního standardu se zkontroluje HPLC analýzou pomocí této metodiky. Výsledný chromatogram by měl obsahovat pouze jeden hlavní pík, jehož plocha by měla odpovídat nejméně 98 % z celkové plochy všech píků.*
- 4 *Norma ČSN ISO 9167-1 doporučuje pro přípravu iontoměničových kolon použít DEAE Sephadex A-25 nebo suspenzi DEAE Sepharose CL-6B, která je již připravena k přímému použití. Lze použít i SPE kolonky s iontoměničovou pryskyřicí (např. Discovery SAX, Supelco), případně jiné ekvivalentní produkty.*
- 5 *Podle normy ČSN EN ISO 9167-1 by se měla měřit aktivita sulfatázy. Aktivitu připravené sulfatázy je možné hodnotit i proměřením CRM (20).*


#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV/VIS detektorem.
- 2 Analytické váhy s přesností 0,1 mg.
- 3 Vodní lázeň s regulací teploty.
- 4 Stolní chlazená odstředivka, 3900 ot/min.
- 5 Minitřepačka.
- 6 pH-metr.
- 7 Sušárna s nucenou cirkulací vzduchu.
- 8 Mikrocentrifugační filtry (např. Amicon Ultra-4 (5,000 kDa), Ultrafree-CL).
- 9 Pipety dle Pasteura, 13 cm a 18 cm, vnitřní průměr 4 mm, na konci zúžené; se stojanem.
- 10 Skelná vata.
- 11 Automatická pipeta, (20 – 200) µl a (200 – 1000) µl.
- 12 Zkumavky dělené, 10 ml, stojan na zkumavky.
- 13 Lékovky, 3 ml.

#### 5 Postup

##### 5.1 Příprava zkušební vzorku

Čistý vzorek semene řepky se kvartací redukuje na množství potřebné k analýze. Pokud je vlhkost vyšší než 10 % (m/m), semena se vysuší v proudu vzduchu při teplotě přibližně 45 °C. Vzorek se pomele. Postup přípravy je podrobně popsán v JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, kap. 5.7, postup 60130.1 Úprava vzorků olejnin.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50110.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

## Poznámky

- 6 *V případě, že jsou semena namořena, omyjí se v dichlormethanu (19).*
- 7 *Pro mletí semen olejnin se osvědčil kuchyňský kávomlýnek.*

## 5.2 Čištění sulfatázy

### 5.2.1 Příprava iontoměničových kolonek

Připraví se 20 kusů pipet dle Pasteura o délce asi 18 cm, které se okalibrují na objem 0,5 ml. Zúžený konec se ucpe stlačeným kouskem skelné vaty. Takto upravené pipety se umístí kolmo do vhodného stojanu. Do každé pipety se pipetuje tolik Sepharosy (17) (cca 0,65 ml), aby po odtoku kapalně fáze v pipetě zůstalo 0,5 ml pryskyřice. Na každý sloupec se přidá 1 ml roztoku imidazolformiátu (11) a potom 2 × 1 ml vody (1).

### 5.2.2 Čištění sulfatázy

S přesností 0,1 mg se naváží 100 mg sulfatázy (18), rozpustí se v 10 ml vody (1) a 0,5 ml tohoto roztoku se nanese na každou z dvaceti připravených iontoměničových kolonek. Každá kolonka se promyje 1,5 ml vody (1), eluát se odstraní. Dále se na kolonku nanese 1,5 ml roztoku octanu sodného (7) a eluáty se jímají do připravených zkumavek.


Získané eluáty se pak koncentrují a čistí pomocí centrifugačních filtrů. Níže uvedený postup platí pro mikrocentrifugační filtr Amicon Ultra-4 (5,000 kDa). V případě použití jiného typu se dodrží příslušný návod k použití.

Spojené eluáty z 20 kolon se rozdělí do 12 mikrocentrifugačních filtrů, tj. 2,5 ml roztoku do každého. V každém z nich se roztok koncentruje na odstředivce při 3900 ot/min na objem přibližně 1 ml. Zakoncentrovaná sulfatáza se spojí dohromady a naředí vodou (1) v objemovém poměru 1 : 1,5. Vzniklý roztok se rozdělí po malých objemech do lékovek a skladuje se v mrazničce při –18 °C tak, aby bylo možno rozmrazit vždy jen množství potřebné pro přímé použití.

## 5.3 Extrakce glukosinolátů

Glukosinoláty se extrahují ze vzorku vroucí vodou.

Do skleněných zkumavek s označením A a B se duplicitně naváží 200 mg pomletého zkušební vzorku s přesností 0,1 mg. Zkumavky se umístí do vodní lázně o teplotě 95 °C a po 1 min se do každé ze zkumavek přidají 2 ml vařící vody (1). Poté se do zkumavky A ihned přidá 200 µl roztoku sinigrinu (12) a do zkumavky B 200 µl roztoku sinigrinu (13). Zkumavky se zahřívají 10 min, přičemž se pravidelně potřepávají. Po vytažení z lázně se obsah zkumavek protřepe a odstředí se 5 min na odstředivce při 3900 ot/min. Supernatanty se ze zkumavek převedou do dvou 10ml dělených zkumavek s označením A' a B'. Ke zbylému sedimentu po první extrakci se přidají znovu 2 ml vařící vody (1). Zkumavky se opět zahřívají ve vodní lázni při 95 °C po dobu 10 min za pravidelného potřepávání. Po vyjmutí z vodní lázně se jejich obsah protřepe a odstředí 5 min rychlostí 3900 ot/min. Supernatanty z druhé extrakce se spojí

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50110.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

se supernatanty z první extrakce ve zkumavkách označených A' a B'. Spojené extrakty se doplní vodou na objem 5 ml a promíchají se na minitřepačce. Tyto extrakty se mohou skladovat 2 týdny při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.4 Příprava iontoměničových kolon, čištění extraktu a desulfatace

Pro čištění extraktu vzorku se použijí zkrácené pipety dle Pasteura (13 cm). Zúžené konce pipet se ucpou stlačením kousku skelné vaty a pipety se umístí do stojanu. Pod pipety se postaví sběrná nádoba určená pro jímání odpadu. Do každé pipety se převede 0,5 ml dobře promíchané suspenze DEAE Sephadex A-25 (16) a nechá se usadit. Po odtoku kapalně fáze se pipety propláchnou  $2 \times 1$  ml imidazolformiátu (11) a následně se promyjí  $2 \times 1$  ml vody (1). Na takto připravenou kolonu se nanese 1 ml extraktu vzorku tak, aby nedošlo k rozvíření povrchu pryskyřice. Přidá se  $2 \times 1$  ml roztoku octanu sodného (8) a poté se na sloupec aplikuje 75  $\mu\text{l}$  roztoku přečištěné sulfatázy (18), která se nechá na koloně působit přes noc při laboratorní teplotě.

Ráno se odstraní sběrná nádoba určená k jímání odpadních eluátů a pod jednotlivé kolony se umístí 3ml lékovky. Pro eluci desulfoglukosinolátů se použije voda (1). Na kolony se nanáší ve dvou krocích vždy po 1 ml a oba eluáty se jímají do stejné lékovky. Po důkladném promíchání obsahu lékovek se eluáty použijí bezprostředně k vlastní chromatografické analýze, případně se mohou skladovat 1 týden při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.5 Slepý pokus


Slepý pokus se provádí v případě, že je potřeba (např. nově vyšlechtěná odrůda nebo jiná plodina) ověřit, zda daný typ vzorku neobsahuje glukosinolát, který se používá jako vnitřní standard. Slepý pokus se připraví stejným postupem, ale bez přídavku roztoku vnitřního standardu.

#### 5.6 Stanovení metodou HPLC s UV/VIS detektorem

Pro vlastní stanovení se použije metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detektorem. Jednotlivé desulfoglukosinoláty se separují gradientovou elucí na chromatografické koloně s reverzní fází typu C18 nebo C8 a s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ , např. Supelcosil LC-18 DB s předkolonou Metaguard Intersil ODS. Detekují se při 229 nm. Příklad možného nastavení chromatografických podmínek, včetně nastavení gradientového programu, uvádějí tabulky č. 1 a č. 2. Chromatogram získaný při analýze vzorku řepky BCR 190R za uvedených podmínek je na obrázku č. 1.

#### Poznámky

8 *Příklady dalších vhodných komerčně dostupných chromatografických kolon jsou uvedeny v ČSN EN ISO 9167-1.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50110.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2


9 Z hlediska zvýšení životnosti chromatografických kolon a snížení počtu interferujících piků je vhodné použít předkolony.

**Tabulka č. 1. Příklad nastavení chromatografických podmínek.**

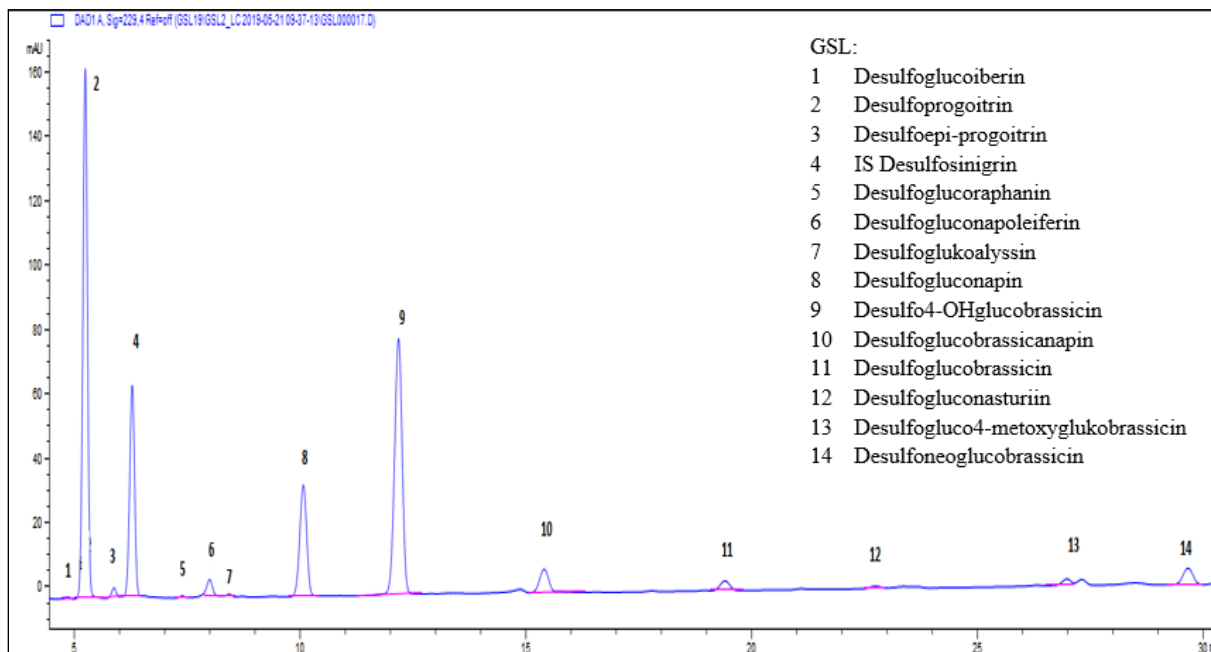
Kolona	Supelcosil LC-18 DB (25 cm × 4,6 mm, 5 μm)
Předkolona	Metaguard Intersil ODS-2 (4,6 mm, 5 μm)
Mobilní fáze	A: Acetonitril, 20% roztok ve vodě (21)
	B: Voda (1)
Průtok	1 ml/min
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	3 μl
Detekce	229 nm
Doba analýzy	35 min

**Tabulka č. 2. Příklad časového průběhu gradientu.**

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)	Průtok (ml/min)
0	20	80	1
5	10	90	1
25	90	10	1
35	10	90	1,5

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50110.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

Obrázek č. 1. Chromatogram reálného vzorku řepky (BCR 190R).



## 6 Výpočet a vyjádření výsledků

Pořadí eluce píků jednotlivých glukosinolátů na koloně typu C18 při vhodném elučním gradientu je znázorněno na obrázku č. 1. Obsah každého glukosinolátu se vypočítá podle vztahu

$$x_i = \frac{A_g}{A_s} \times \frac{n}{m} \times K_g$$

kde  $x_i$  je obsah jednotlivého glukosinolátu v  $\mu\text{mol/g}$  vzorku,

$A_g$  plocha píku odpovídající desulfoglucosinolátu v jednotkách integrátoru,


$A_s$  plocha píku odpovídající desulfosinigrinu v jednotkách integrátoru,

$K_g$  koeficient odezvy desulfoglucosinolátu (tabulka č. 3),

$m$  hmotnost zkušební vzorku v g,

$n$  množství vnitřního standardu přidaného do zkumavky v  $\mu\text{mol}$ .

Výsledek se uvádí jako aritmetický průměr součtu všech glukosinolátů získaný ze dvou paralelních stanovení za předpokladu, že jsou splněny požadavky pro opakovatelnost.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50110.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2


**Tabulka č. 3. Odezvové faktory pro jednotlivé GSL uvedené v ČSN EN ISO 9167-1.**

Glukosinolát (GSL)	Zkratka GSL	Koeficienty odezvy (Kg)
Desulfoglukoiberin	IBE	1,07
Desulfoprogoitrin	PRO	1,09
Desulfoepi-progoitrin	EPRO	1,09
Desulfosinigrin	SIN	1,00
Desulfoglukoraphanin	RAF	1,07
Desulfoglukonapoleiferin	GNL	1,00
Desulfoglukoalyssin	ALY	1,07
Desulfoglukonapin	GNA	1,11
Desulfo 4-OH glukobrassicin	4-OH	0,28
Desulfoglukobrassicinapin	GBN	1,15
Desulfoglukotropeolin	TRO	0,95
Desulfoglukobrassicin	GBC	0,29
Desulfoglukonasturiin	NAS	0,95
Desulfo-4-CH <sub>3</sub> glukobrassicin	4-CH <sub>3</sub>	0,25
Desulfoneoglukobrassicin	NEO	0,20
Jiné desulfoglukosinoláty		1,00

### Poznámky

10 Uvedené koeficienty odezvy byly stanoveny experimentálně a byly přijaty na základě dohody mezi laboratořemi, které se zúčastnily zkoušek stanovení GSL pro zpracování normy ČSN EN ISO 9167-1.



 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	9
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50110.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

11 *Celkový obsah glukosinolátů, vyjádřený v  $\mu\text{mol/g}$  vzorku, se rovná součtu obsahu jednotlivých glukosinolátů, jejichž plocha píku je větší než 1 % součtu ploch všech píků.*

## 7 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 9167-1. Semeno řepky – Stanovení obsahu glukosinolátů – Část 1: Metoda vysokovýkonné kapalinové chromatografie, ČNI 1998.
- 2 Šulová, R.: Stanovení glukosinolátů metodou HPLC – Ověření změny extrakčního činidla, interní materiál ÚKZÚZ, NRL-RO Brno, 2004.
- 3 ČSN EN ISO 9167 Semeno řepky a pokrmy z řepky – Stanovení obsahu glukosinolátů – Metoda využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, 2019.