

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra botaniky**



**Analýza glukosinolátů v brukvovité zelenině metodou ultra-  
vysokoučinné kapalinové chromatografie s hmotnostní  
detekcí**

Diplomová práce

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Autor:                   | Bc. Kristýna Novotná   |
| Studijní program:        | N1407 Chemie   |
| Studijní obory:          | Učitelství biologie pro střední školy<br>Učitelství chemie pro střední školy |
| Forma studia:            | Prezenční  |
| Vedoucí diplomové práce: | Mgr. Tibor Béres, Ph.D.  |

**Olomouc 2017**

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně a veškeré literární prameny a informační zdroje jsou uvedeny v seznamu literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry botaniky, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci .....

.....

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Tiboru Béresovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, připomínky a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Pavlu Kopeckému za vypěstování materiálu.

Poděkování patří i mým nejbližším za podporu v době studia.

## **Bibliografická identifikace:**

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Jméno a příjmení autora:</b> | Bc. Kristýna Novotná  |
| <b>Název práce:</b>             | Analýza glukosinolátů v brukvovité zelenině metodou ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.  |
| <b>Typ práce:</b>               | Diplomová práce   |
| <b>Pracoviště:</b>              | Katedra botaniky  |
| <b>Vedoucí práce:</b>           | Mgr. Tibor Béres, Ph.D.   |
| <b>Rok obhajoby práce:</b>      | 2017  |
| <b>Abstrakt:</b>                | <p>Tématem diplomové práce je vývoj vhodné metody pro identifikaci a kvantifikaci glukosinolátů v brukvovité zelenině. Byla využita metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS). V rámci práce byly předloženy výsledky vývoje metody, její optimalizace, validace a aplikace v analýze vybraných intaktních glukosinolátů v některých genotypech tuřínu (<i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i>) a vodnice (<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i>) vypěstovaných v roce 2015 a 2016.</p> |
| <b>Klíčová slova:</b>           | <i>Brassicaceae</i> , Glukosinoláty, MS, Tuřín, UHPLC, Vodnice  |
| <b>Počet stran:</b>             | 55  |
| <b>Počet příloh:</b>            | 1   |
| <b>Jazyk:</b>                   | Český   |

## **Bibliographical identification:**

|   |  |
|---|--|
| <b>Author's first name and surname:</b> | Bc. Kristýna Novotná   |
| <b>Title of thesis:</b>                 | Analysis of glucosinolates in cruciferous vegetables by ultra-high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection.  |
| <b>Type of thesis:</b>                  | Master's   |
| <b>Department:</b>                      | Department of Botany   |
| <b>Supervisor:</b>                      | Mgr. Tibor Béres, Ph.D.  |
| <b>The year of presentation:</b>        | 2017   |
| <b>Abstract:</b>                        | <p>The topic of this diploma thesis is the development of a method suitable for analysis of glucosinolates in cruciferous vegetables. Ultra-high performance liquid chromatography separation coupled with tandem mass spectrometric detection (UHPLC-MS/MS) was used. This work presents method development, optimization, validation and determination of selected glucosinolates in some genotypes of swede (<i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i>) and turnip (<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i>) grown in 2015 and 2016.</p> |
| <b>Keywords:</b>                        | <i>Brassicaceae</i> , Glucosinolates, MS, Swede, Turnip, UHPLC   |
| <b>Number of pages:</b>                 | 55   |
| <b>Number of appendices:</b>            | 1  |
| <b>Language:</b>                        | Czech  |

# Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| Úvod.....  | 8         |
| <b>1. Teoretická část.....</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1 Čeleď <i>Brassicaceae</i> .....                                      | 9         |
| 1.1.1 Charakteristika čeledi a zástupci.....                             | 9         |
| 1.1.1.1. Tuřín ( <i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i> ).....   | 10        |
| 1.1.1.2. Vodnice ( <i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i> ).....          | 11        |
| 1.1.2 Obsahové látky.....  | 12        |
| 1.1.2.1. Vitamín C.....  | 12        |
| 1.1.2.2. Kardioaktivní glykosidy .....                                   | 13        |
| 1.1.2.3. Organické kyseliny .....  | 13        |
| 1.1.2.4. Flavonoidy .....  | 13        |
| 1.2 Glukosinoláty .....  | 15        |
| 1.2.1 Chemie glukosinolátů.....  | 17        |
| 1.2.1.1. Obsahové změny při kuchyňské úpravě .....                       | 19        |
| 1.2.2 Toxické vlastnosti glukosinolátů.....                              | 19        |
| 1.2.3 Pozitivní účinky glukosinolátů na lidské zdraví .....              | 20        |
| 1.3 Metody používané k analýze glukosinolátů .....                       | 23        |
| 1.3.1 Kapalinová chromatografie.....                                     | 23        |
| 1.3.2 Hmotnostní spektrometrie.....                                      | 25        |
| 1.3.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí v analýze GLS ..... | 25        |
| <b>2. Materiál a metody .....</b>  | <b>27</b> |
| 2.1 Rostlinný materiál .....   | 27        |
| 2.2 Použité chemikálie .....   | 27        |
| 2.3 Použité přístroje a pomůcky .....                                    | 28        |
| 2.4 Použité metody .....   | 28        |
| 2.4.1 Příprava rostlinného materiálu .....                               | 28        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.4.2 Příprava mobilní fáze pro UHPLC.....                              | 29        |
| 2.4.3 Příprava roztoků glukosinolátových standardů.....                 | 29        |
| 2.4.4 Extrakce glukosinolátů z rostlinného materiálu.....               | 30        |
| 2.4.5 UHPLC-MS/MS analýza .....   | 31        |
| <b>3. Výsledky .....</b>  | <b>32</b> |
| 3.1 Výběr kolony.....   | 32        |
| 3.2 Optimalizace metody UHPLC-MS/MS – separační podmínky .....          | 32        |
| 3.3 Optimalizace metody UHPLC-MS/MS – podmínky MS detekce .....         | 33        |
| 3.4 Validace metody.....  | 35        |
| 3.4.1 Selektivita.....  | 35        |
| 3.4.2 Linearita metody UHPLC-MS/MS .....                                | 35        |
| 3.4.3 Opakovatelnost a reprodukovatelnost metody UHPLC-MS/MS.....       | 37        |
| 3.4.4 Limit detekce a limit kvantifikace metody UHPLC-MS/MS .....       | 37        |
| 3.5 Identifikace glukosinolátů v rostlinném materiálu.....              | 38        |
| 3.6 Stanovení GLS v genotypech tuřínu a vodnic za rok 2015 a 2016 ..... | 40        |
| <b>4. Didaktická část .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>5. Diskuze .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>6. Závěr.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>7. Seznam zkratk .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>8. Literatura.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>Příloha .....</b>  | <b>56</b> |

## Úvod

Za poslední roky se stravovací návyky naší populace mění. Se zdravějším životním stylem přichází ruku v ruce vyšší spotřeba zeleniny a to samozřejmě i brukvovitých rostlin. Brukvovité rostliny jsou rozšířeny téměř kosmopolitně a nemají specifické podmínky zemědělství, tudíž jsou vhodnou pěstitelskou čeledí. Jsou pěstovány nejen jako zdroj zeleniny ale i olejů, koření či k lékařským účelům. V druzích této čeledi jsou obsaženy charakteristické látky, které jsou zdraví prospěšné (Malý, 2003).

Jednou skupinou takovýchto látek jsou glukosinoláty (GLS). Na tyto dříve odsuzované sloučeniny z hlediska možné toxicity, se dnes můžeme dívat z úplně jiného pohledu. Největší předností těchto látek je kromě antimikrobiálních účinků dnes již prokázaná prevence rakoviny. Nově diagnostikovaných onemocnění neustále přibývá a z rakoviny se stává pojem číslo jedna. Bohužel zvyšující čísla rakovinné incidence se týkají i České republiky, která se objevuje už několik let na prvních příčkách kolorektálního karcinomu u mužů (Ferby a Parkin, 2003).

Koncentrace GLS se liší v jednotlivých druzích brukvovitých rostlin, ale také i v genotypech samotných druhů. Bylo by tedy velice přínosné charakterizovat tyto genotypy na základě zastoupení jednotlivých GLS, doporučit vhodný materiál ke šlechtění a pěstováním vysokoobsahových odrůd zajistit alespoň o trochu menší riziko vzniku rakoviny v našem těle.

Diplomová práce je zaměřena na vývoj vhodné validované metody pro analýzu intaktních GLS v brukvovité zelenině, která by byla využitelná pro další studia. Zvolenou metodou na základě dřívějších studií je ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS). Analýza GLS je nejčastěji popisována u brokolice. Naše zeměpisné podmínky ale nejsou pro pěstování brokolice úplně nejvhodnější. Mezi nově objevované brukvovité druhy v potravinářském průmyslu patří tuřín a vodnice, které jsou navíc pěstitelsky nenáročné. I z těchto důvodů byly právě tyto druhy vybrány pro kvantifikaci GLS v této práci.



# 1. Teoretická část

## 1.1 Čeleď *Brassicaceae*

### 1.1.1 Charakteristika čeledi a zástupci

Velmi obsáhlá čeleď *Brassicaceae* neboli brukvovité dříve nazývané křížaté (*Cruciferae*) je řazena do oddělení *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny), třídy *Rosopsida* (vyšší dvouděložné rostliny) a řádu *Brassicales* (brukvotvaré) také nazývány *Capparales* (kaparotvaré). Do tohoto řádu je řazeno 6 čeledí, z nichž nejvýznamnější jsou čeledi *Capparaceae* (kaparovitě) a *Brassicaceae* (brukvovitě) (Novák a Skalický, 2009).

Druhy čeledi *Brassicaceae* jsou jednoleté až vytrvalé rostliny, nejčastěji byliny, pouze výjimečně se můžeme setkat s keří či polokeří. Mezi jejich charakteristické znaky je možné zařadit kořeny s diarchním cévním svazkem a střídavé uspořádání listů. Důležitým systematickým znakem jsou vegetativní orgány s trichomy (Novák, 1961). V pletivech brukvovitých rostlin se nacházejí tzv. myrosinové buňky, protáhlé idioblasty obsahující enzym myrosinasa. Dojde-li k narušení těchto pletiv, myrosinasa začne štěpit thioglykosidy okolních pletivních buněk na cukry a hořčičné silice. Květy této čeledi jsou drobné, sestavené do hroznů a oboupohlavné. Na květním lůžku jsou vytvořena epiteliální hrbolkovitá nektaria. Květ sestává ze čtyř kališních a čtyř korunních lístků. Dále jsou pro tuto čeleď charakteristické dvě vnější tyčinky s kratší nitkou a čtyři vnitřní tyčinky s nitkou delší. Oproti většině krytosemenných rostlin se generativní buňka dělí již v prašném pouzdře na dvě spermatické buňky za vzniku trojbuněčného pylového zrna (Vinter, 2009). Pestík je jednoplodolistý s nepravou placentární přepážkou, dozrávající nejčastěji v šešule či šešulky, ale může dozrát i v nažky či dvoustruky. Podle plodů je též možné rostliny třídit (Rosypal, 2003).

Čeleď brukvovité je rozšířena téměř kosmopolitně, možná právě i proto je do ní řazeno více jak 3000 druhů. Zástupci jsou často významnými zemědělskými plodinami, neboť jsou pěstovány jako zelenina či zdroje koření nebo rostlinných olejů (Novák, 1961). Právě oleje z druhů brukvovitých rostlin jsou na prvním místě ve výrobě jedlých olejů. Proto nesmíme ze zástupců opomenout řepku olejkou (*Brassica napus*) o níž jsou první písemné zmínky z roku 1578 (Volf, 1990). V čeledi *Brassicaceae* se ale najdou i plevelné rostliny. Z nich je důležité zmínit kokošku pastuší tobolku (*Capsella bursa – pastoris*), penízek

rolní (*Thlaspi arvense*) a huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*), který nepatří mezi významné plevely, ale je často využíván jako modelový organismus v oblasti experimentální biologie. Mezi užitkové brukvovité rostliny patří například křen selský (*Armoracia rusticana*), ředkev setá (*Raphanus sativus*) nebo brukev zelná (*Brassica oleracea*), která je pěstována v různých odrůdách. Můžeme zde uvést růžičkovou kapustu (var. *gemmifera*), květák (var. *botrytis*), zelí (var. *capitata*), brokolici (*Brassica botrytis italica*) či tuřín (*Brassica napus* var. *napobrassica*) (Rosypal, 2003). Především tyto druhy jsou zkoumány z hlediska množství a druhů GLS. Některé druhy této čeledi se ale pěstovaly i z lékařských důvodů, např. lžičník lékařský (*Cochlearia officinalis*) či česnáček lékařský (*Alliaria petiolata*) (Kremer, 2004), nebo jako technicky užitečné rostliny. Jako příklad lze uvést boryt barvířský (*Isatis tinctoria*), který obsahuje ve svých kořenech barvivo, dnes se ale již k těmto účelům nevyužívá (Volf, 1990).

#### **1.1.1.1. Tuřín (*Brassica napus* var. *napobrassica*)**

Některé rostliny byly pěstovány tak dávno, že není ani možné zjistit jejich původ. Mezi ně patří právě i tuřín, někdy přezdívaný kolník (obr. 1). První zmínky o něm se datují již z doby před 4 tisíci lety. Ve starší literatuře se často zaměňuje s vodnicí neboli okrouhlicí. Liší se barvou listů a velikostí bulvy, u tuřínu je bulva větší. Rozdíl je ale také ve výživových hodnotách těchto druhů, neboť u tuřínu je mnohem vyšší jak dietetická tak energetická hodnota (Troníčková, 1985). Na rozdíl od vodnice tuřín obsahuje velké množství vápníku (Duda a Střelec, 1986). Vzhledem k tomu, že je tuřín pěstivelsky nenáročný, snadno skladovatelný a má mnohostranné využití se v dřívějších dobách postaral o obživu chudých lidí v nepříznivých dobách. Jsou prokázány i blahodárné vlivy na lidský organismus. Doporučuje se zejména při zánětlivých onemocněních zažívacího traktu či chorobách cévního či žlučového charakteru.

Sázení tuřínů je vhodné v dubnu, kdy sejeme přímo do řádků vzdálených od sebe 40 cm. Nebo si je můžeme předpěstovat na výsevném záhonku a sadbu vysadit až v květnu. V prvním roce tuřín tvoří růžice namodralých zvlněných listů, které jsou slabě ojiněné a kulovitou bulvu. Sklizeň se pohybuje mezi 18 a 20 týdny po výsadbě. Je možné je sklízet až pozdě na podzim hlavně kvůli tomu, že snáší mrazy až do -10°C, díky čemuž je jeho pěstování vhodné i ve vyšších polohách. Samozřejmě jsou různé barevné variety. Mezi

nejchutnější se řadí žluté se žlutou dužinou (*f. rutabaga*). Naopak odrůdy bílé (*f. communis*) se pěstují jako krmivo (Troníčková, 1985).

#### 1.1.1.2. Vodnice (*Brassica rapa* var. *rapa*)

Jak již bylo řečeno, ve staré literatuře se vodnice a tuřín ztotožňují, ačkoli nemají společného prarodiče. Stejně jako tuřiny měly vodnice před příchodem brambor veliký význam pro obživu lidí i jako krmivo pro dobytek. Pěstování je totiž také nenáročné na teplo či půdní podmínky. Důležité je, že má i krátkou vegetační dobu (Troníčková, 1985). Vodnicové bulvy mají opravdu vysoký obsah draslíku, přibližně 420 mg na 100 g biomasy. Zajímavé je, že po její konzumaci se zvyšuje chuť k jídlu, což je pravděpodobně zapříčiněno sirnými éterickými oleji, díky nimž se vylučuje větší množství žaludečních šťáv (Duda a Střelec, 1986).

Vodnice (obr. 1) se může set přímo na stanoviště v období od března do září. Tato dvouletá rostlina v prvním roce vytvoří růžice zelených hladkých listů s kulovitou či protáhlou bulvou s celou škálou barev. Povrch bulvy může být bílý, šedý, žlutý, oranžový, nafialovělý či černý. Dužina je hodně vodnatá, což je také jeden z rozdílů mezi tuřínem a vodnicí. Sklízet je možné již za 6 týdnů, ale pro skladování se sklízí až plně vyvinuté kořeny ze srpnových či zářijových výsevů. Rozlišujeme tři typy odrůd, tedy vodnice podzimní (*f. communis*), teltovské (*f. teltowiensin*) a májové (*f. majalis*), které se sklízí ještě na jaře (Troníčková, 1985). Zajímavostí mezi vodnicemi je druh nazývaný Shogrin, který je pěstovaný především pro jedlé listy (Botanika, 2007).



**Obr. 1:** Zleva vodnice (*Brassica rapa* var. *rapa*), zprava tuřín (*Brassica napus* var. *napobrassica*) (Ferrie et al., 2015).

## 1.1.2 Obsahové látky

Brukvovité rostliny jsou důležité i z hlediska velkého obsahu různorodých chemických látek, z nichž některé jsou pro lidský organismus naprosto nezbytné. Druhy brukvovitých rostlin obsahují různé vitamíny, z nichž obsahově nejvýznamnějším je vitamín C, dále kardioaktivní glykosidy, organické kyseliny, flavonoidy ale především také GLS, které budou podrobněji popsány v další kapitole (Jahodář, 2006).

### 1.1.2.1. Vitamín C

Vitamín C, známý též pod názvem kyselina askorbová, je nejznámějším vitamínem. Možná je to právě i proto, že byl ze všech vitamínů jako první objeven, strukturně charakterizován i poprvé laboratorně syntetizován. O jeho významu hovoří i čísla celosvětové produkce, neboť vitamínu C se vyrobí přes 40 milionů kilogramů ročně (McMurry, 2007). Je obsažen především v zelenině a ovoci. Optimální denní příjem se pohybuje v rozmezí 30 až 50 mg (Wenke, 1990). Při dlouhodobém nedostatku vitamínu C v lidské stravě se může projevit onemocnění zvané kurděje (skorbut), které způsobuje poškození tvorby kolagenu (Voet a Voet, 1995). Tato nemoc vede ke krvácení dásní, rány se špatně hojí a v době objevování světa byla u námořníků i velká úmrtnost na tuto chorobu (McMurry, 2007).

Kyselina askorbová je důležitá pro hydroxylační reakce organismu. Je nezbytná například pro syntézu noradrenalinu z dopaminu nebo pro vznik hydroxyprolinu a hydroxylyzinu v kolagenu. Má antioxidační účinky, je rozpustná ve vodě a spolu s vitamínem E chrání buněčné membrány a lipoproteiny LDL (nízkodenzitní lipoproteiny) před oxidací (Racek et al., 1999). Kyselina askorbová se také uplatňuje při mobilizaci železa v organismu a má aktivační vliv při přeměně kyseliny listové na koenzym F. V lékařství se používá především k léčení již zmíněné avitaminózy (kurdějí), ale její příznivý léčebný účinek se dostavuje i při popáleninách, při šoku, při hojení ran či zlomenin. Terapeutické využití vitamínu C je tedy opravdu široké (Šantavý et al., 1975).

#### **1.1.2.2. Kardoaktivní glykosidy**

V literatuře se často setkáme i s názvy kardiotonické či srdeční glykosidy. Tyto látky inhibují činnost sodnodraselné iontové pumpy, čímž se zvýší koncentrace sodíkových iontů uvnitř buňky, což má za následek mobilizaci iontů vápníku. Léčebné dávky těchto látek mohou vyvolat účinnější svalové stahy. Této skutečnosti se využívá pro léčbu arytmií či městnavých selhání srdce, při kterých nelze provést léčbu chirurgicky (Mann, 1996). Jako kardiotonika se nejčastěji používají glykosidy obsažené v listech náprstníku (*Digitalis lanata*), acokanthery (*Acocanthery ouabaio*) a v semenech keřů krutikvětu (*Strophantus*) (Wenke, 1990). Ovšem ve větších (toxických) dávkách mohou srdeční glykosidy způsobit porušení iontové rovnováhy svalových buněk a vyvolat arytmií či srdeční zástavu. I z tohoto důvodu se v Africe připravovaly jedy na šípy z těchto látek (Mann, 1996). V čeledi *Brassicaceae* jsou kardoaktivní glykosidy nejvíce obsažené v rodu *Erysimum*, například v trýzeli malokvětém je větší množství těchto látek (Jahodář, 2006).

#### **1.1.2.3. Organické kyseliny**

Obsah organických kyselin v druzích čeledi brukvovitých je nezanedbatelný. Nejvíce jsou v nich zastoupeny kyselina jablečná a citronová, glukuronová či tartronová, která je důležitou prevencí obezity a arterosklerózy, neboť brzdí přeměnu glycidů na tuky a cholesterol (Malý, 2003). Naopak kyselina eruková přítomná především v řepce olejce způsobuje při vyšším příjmu zdravotní riziko a její obsah v oleji se snižuje na minimum (Jahodář, 2006).

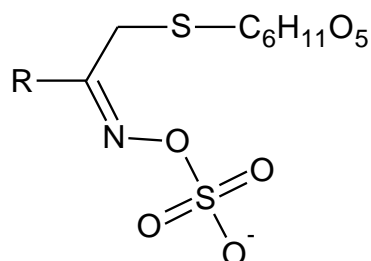
#### **1.1.2.4. Flavonoidy**

Flavonoidy se řadí mezi přírodní barviva. Jsou to žluté až oranžové látky květů, listů a plodů. Z chemického hlediska jsou to deriváty flavanu, tedy 2-fenylchromanu, a patří k nejrozšířenějším sekundárním metabolitům rostlin. V literatuře se často setkáme i s názvem flavonoidy. Tyto látky jsou tvořeny třemi jednotkami  $C_6-C_3-C_6$ , kdy jsou  $C_3$  můstkem propojeny dva aromatické systémy.

Jsou známy různé typy flavonoidních sloučenin, které se liší svou strukturou a také vlastnostmi a účinky na živočišný organismus. Mezi takové základní typy patří například flavanony, flavony, flavonoly či antokyany (Macholán, 2003; Opletal, 2016). Flavanony jsou přítomné ve vysokých koncentracích hlavně v citrusových plodech, v menší koncentraci se mohou vyskytovat například i v rajčatech či v mátě. Flavony se řadí mezi méně významné flavonoidy. Jsou obsažené zejména v celeru a petrželi. Naopak flavonoly jsou v rostlinách nejvíce obsaženou skupinou flavonoidů. Nejvýznamnějšími látkami z této skupiny jsou quercetin a kaempferol. Nejbohatšími zdroji flavonolů je cibule, kapusta, brokolice, pórek či borůvky. Antokyany jsou pigmenty epidermální tkáně květů a plodů. V závislosti na pH se vyskytují v různých chemických podobách. Nejvíce jsou antokyany obsaženy v ovoci, ale jejich zastoupení v listové a košťálové zelenině není taktéž zanedbatelné. Větší množství těchto látek je nalezeno v ředkvičkách, zelí, lilku či fazolích (Manach et al., 2004).

## 1.2 Glukosinoláty

GLS neboli thioglukosidy jsou skupinou sekundárních metabolitů, které se nacházejí výlučně v dvouděložných rostlinách. Dominantní skupinou ohledně GLS je čeleď brukvovitých rostlin *Brassicaceae*. Tato skupina je tedy významná i pro konzumaci GLS člověkem. Průměrný denní příjem GLS v České republice je 10 mg na osobu (Velíšek a Hajšlová, 2009). GLS jsou z chemického hlediska  $\beta$ -thioglukosidy N-hydroxysulfáty, známé také jako S-glukopyranosyl thiohydroximát či Z-N-hydroximinosulfát, s postranním řetězcem a atomy síry vázanými na  $\beta$ -D-glukopyranózu (Fahey et al., 2001). Obecná struktura GLS je na obr. 2.



**Obr. 2:** Základní struktura GLS.

Postranní řetězce GLS určují jejich biologické, chemické a fyzikální vlastnosti, dále také produkty, které vzniknou při jejich rozkladu. Postranní řetězce jsou odvozeny jen z několika aminokyselin (fenylalanin, tryptofan, tyrosin a methionin). V dnešní době je známo přes 100 GLS. I tuto chemickou rozmanitost zajišťuje pestrost postranního řetězce R. Na základě jeho struktury se GLS dělí do chemických tříd:

- alifatické s dvojnou vazbou
- alifatické s hydroxy skupinou
- sirné s methylthioskupinou v postranním řetězci
- aromatické
- indolové

**Tab. 1:** Tabulka GLS tříd se zástupci a strukturou jejich postranního řetězce R.

| Název GLS                                    | Struktura R | Název GLS   | Struktura R |
|--|-------------|---|-------------|
| <i>Alifatické s dvojnou vazbou</i>           |             | <i>Indolové</i>   |             |
| <b>sinigrin*</b><br>prop-2-enyl              |             | <b>gluco Brassic*</b><br>indol-3-ylmethyl                   |             |
| <b>gluconapin*</b><br>but-3-enyl             |             | <b>4-hydroxygluco Brassic*</b><br>4-hydroxyindol-3-ylmethyl |             |
| <b>gluco Brassicanapin*</b><br>pent-4-enyl   |             | <b>1-methoxygluco Brassic*</b><br>1-methoxyindol-3-ylmethyl |             |
| <i>Aromatické</i>                            |             | <i>Sírné</i>  |             |
| <b>gluco Tropaeolin*</b><br>benzyl           |             | <b>glucoerucin*</b><br>4-(methylsulfanyl)butyl              |             |
| <b>gluconasturtiin*</b><br>2-phenylethyl     |             | <b>gluco Raphanin*</b><br>4-(methylsulfinyl)butyl           |             |
| <i>Alifatické s hydroxy skupinou</i>         |             |   |             |
| <b>progoitrin*</b><br>2(R)-hydroxybut-3-enyl |             | <b>gluconapoleiferin</b><br>2-hydroxypent-4-enyl            |             |

\* GLS, které byly součástí studie v této diplomové práci.

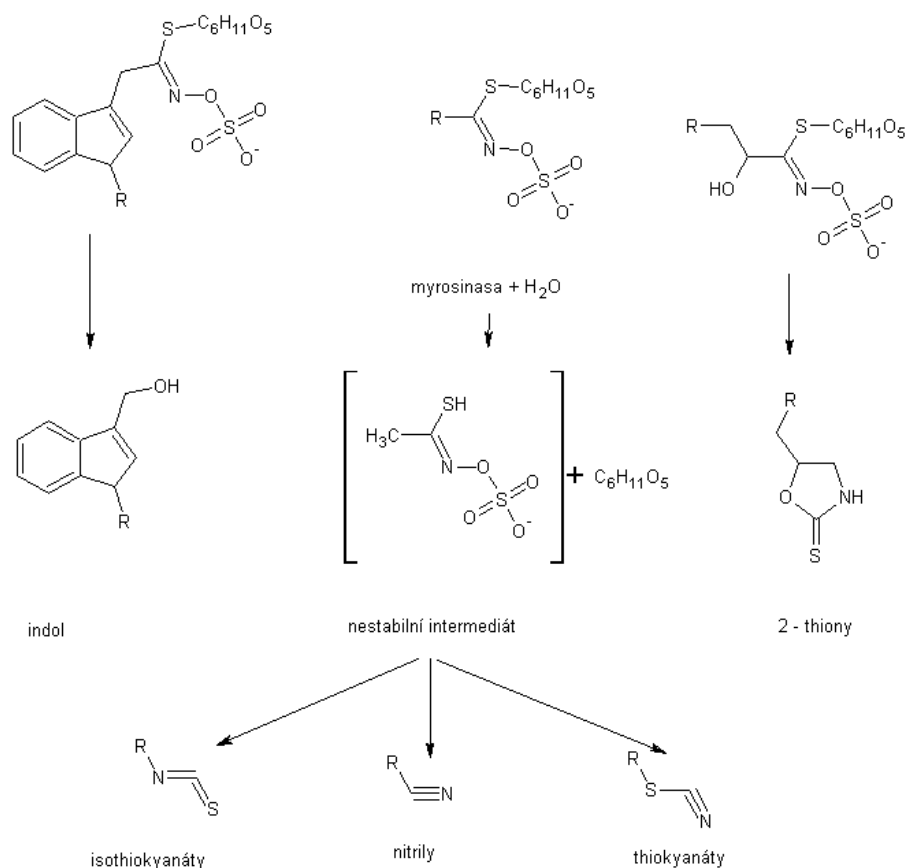
V přírodě se obecně GLS vyskytují jako draselné soli (Velíšek a Hajšlová, 2009). Jak již bylo řečeno, nejčastěji jsou tyto chemické látky spojovány s brukvovitými rostlinami, ale typické jsou také pro řád *Capparales*, *Violales* a *Tropaeolales* (Opletal, 2016). Složení GLS je typické pro každou rostlinu, je tedy stanoveno genetickými dispozicemi. Celkový obsah GLS závisí kromě vrozených předpokladů i na vnějších faktorech, jako například na klimatických podmínkách či napadení škůdci (Velíšek a Hajšlová, 2009). V několika studiích zabývajících se vzájemným působením genotypu a klimatických podmínek, se objevují závěry, že genetika má na obsah GLS mnohem výraznější vliv (Kang et al., 2006; Brown et al., 2002). Koncentrace GLS je také různá pro určité části rostlin, veliké množství se jich nachází v semenech (až 60 g·kg<sup>-1</sup>) (Velíšek a Hajšlová, 2009).



### 1.2.1 Chemie glukosinolátů

V rámci cytoplasmy jsou GLS chemicky stabilní, ovšem jen do doby než dojde k narušení tkáně a GLS se dostanou do kontaktu s myrosinase (Mithen et al., 2000). K porušení buněk může dojít následkem biotických faktorů, jako například býložravci či penetrací hub (Hansch et al., 2014). Myrosinase, globulární glykoprotein, je složena z několika izoenzymů. Její výskyt není omezen jen na rostlinné buňky, ale její přítomnost byla zjištěna i u některých mikroorganismů, hub i v tkáních živočichů. Jakmile dojde ke styku GLS s myrosinase dochází k hydrolýze. Rychlost s jakou bude reakce probíhat, závisí na enzymové aktivitě, která závisí na mnoha okolnostech, například na pH prostředí, teplotě, části či druhu rostliny (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Prvním krokem hydrolýzy je štěpení thioglukosidové vazby myrosinase. Při této reakci vzniká z GLS ekvimolární množství glukózy, sulfátů a aglykonů. Vzhledem k tomu, že aglykony jsou velice nestabilní, dochází k dalším reakcím, při nichž vznikají thiokyanáty, nitrily a isothiokyanáty. Průběh reakce je samozřejmě závislý na reakčních podmínkách, ale také na struktuře postranního řetězce (obr. 3) (Mithen et al., 2000). Zmíněný průběh je typický pro alifatické GLS. V případě 2-hydroxyalkenylových GLS vznikají spontánně cyklizující isothiokyanáty. Jako názorný příklad lze uvést strumigenní goitrin vzniklý z progoitrinu. Jiný průběh je při hydrolýze indolového glukobrassicinu, kdy vzniká navíc 3-indolyliisothiokyanát, z kterého následně ve vodném prostředí vzniká 3-hydroxymethylindol. Tato látka je zajímavá tím, že v rostlinném pletivu reaguje s kyselinou L-askorbovou na askorbigen. Ten se v žaludku rozkládá zpět na kyselinu L-askorbovou a jiné produkty, které mají antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti (Velíšek a Hajšlová, 2009).



**Obr. 3:** Schéma hydrolyzy GLS (převzato a upraveno z Opletal, 2016).

Přítomnost kyseliny L-askorbové ovlivňuje i hydrolyzu jiných GLS. Důležité je, že je jedním z faktorů aktivace myrosinasy. Vrátime-li se tedy zpět k vlivům ovlivňujícím průběh hydrolyzy, je třeba zmínit účinek pH a teploty, neboť je nutné na ně brát zřetel při posuzování pozitivních či toxických účinků u produktů. Podíváme-li se na pH, při nižší hodnotě (kyselé prostředí) vznikají zejména nitrily. Ale v bazičtějším prostředí se rovnováha posune ve prospěch isothiokyanátů. Druhý faktor, teplota, se uplatňuje zejména během tepelného zpracování zeleniny (Velíšek a Hajšlová, 2009).

### **1.2.1.1. Obsahové změny při kuchyňské úpravě**

Za poslední dobu se změnám obsahových látek při klasických kuchyňských úpravách v zelenině věnovala poměrně velká pozornost. Z hledáčku neunikly ani GLS v brukvovité zelenině (Verkerk et al., 2009). Při tepelné úpravě často dochází k obsahové změně GLS. Důležité je, že při přesáhnutí teploty 80 °C je narušena činnost myrosinasy a nedochází k rozkladu GLS (Kuchyňková, 2007). Podrobněji budou změny popsány u jednotlivých druhů úprav.

Blanšírování se často využívá jako předběžná úprava před dalším zpracováním. Cílem je získat měkčí strukturu potraviny, dosáhnout snížené enzymové aktivity a tím také prodloužit možnou dobu uskladnění (Verkerk et al., 2009). Při této krátké tepelné úpravě dochází ke snížení hladiny GLS (Wennberg et al., 2006; Ciešlik et al., 2007). Při vaření ve vodě, kdy je zelenina obklopena vařící vodou ze všech stran, dochází k obrovským ztrátám GLS. Nejen tepelnou úpravou, ale také z důvodu, že jsou některé GLS a jejich produkty rozpustné ve vodě. Naopak při vaření v páře k takové velké ztrátě nedochází, naopak jsou změny minimální. Což je pravděpodobně výsledkem toho, že zelenina nepřichází do kontaktu s vodou. Ke kondenzaci vody dochází totiž až po dlouhé době (Verkerk et al., 2009). Další klasickou kulinární úpravou je smažení, kdy dochází k tepelné úpravě tukem za teploty 150 – 190 °C (Kuchyňková, 2007). Song a Thornalley (2007) dospěli k názoru, že při této úpravě se zabrání působení myrosinasy ihned a tudíž dochází k minimálním změnám v hladině GLS. Za zmínku ještě určitě stojí tepelná úprava v mikrovlnné troubě. Autoři článku Song a Thornalley (2007) a Verkerk a Dekker (2004) se shodli na závěru, že i při této tepelné přípravě zůstává obsah GLS v zelenině téměř konstantní. Ve druhém zmíněném článku dokonce popisují při určitých časových a energetických podmínkách GLS nárůst. Ale ke ztrátám v obsahu GLS dochází i v podmínkách snížené teploty, například při mrazení či chlazení (Verkerk et al., 2009).

### **1.2.2 Toxické vlastnosti glukosinolátů**

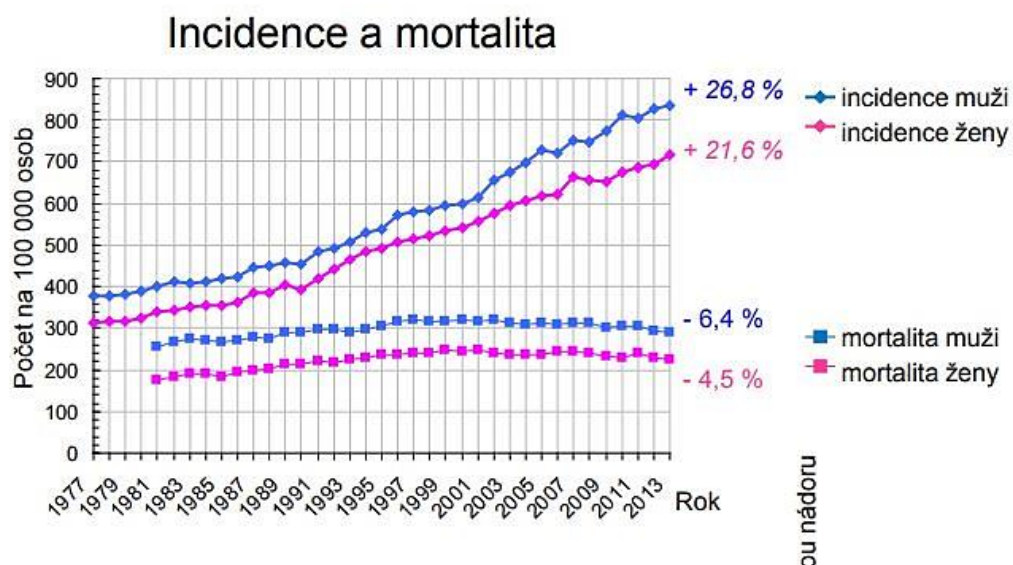
Jak již bylo řečeno, samotné GLS nejsou pravděpodobně zdraví škodlivé. Toxicita GLS je ovlivněna typem produktu po GLS degradaci. V případě, že dochází k rozkladu alifatických GLS, vznikají isothiokyanáty, které jsou slabě strumigenní a některé vykazují antimikrobní a insekticidní působení (Velíšek a Hajšlová, 2009). Pokud z GLS vznikají

nitrily, jsou ohroženy játra a ledviny. Vznikají-li kyany, je ovlivněna činnost štítné žlázy. Silnými strumigenními sloučeninami jsou goitriny, které snižují sekreci tyroxinu, což má za následek snížení růstu a vede až k hyperplasii a hypertrofii štítné žlázy (Tůmová, 2006). Jako příklad GLS, ze kterých vznikají tyto toxické goitriny, lze uvést gluconapin, glucobrassicinapin či progoitrin. Při hydrolýze progoitrinu kromě jiných produktů vzniká L-5-vinyl-2-oxazolidinthion, který má nejsilnější antithyreoidní účinky. Ve velkém množství bývá přítomen v semenech brukvovitých rostlin. Ale například v listech kapusty je tak zanedbatelné množství, že nemůže mít pro živý organismus negativní účinky (Davídek et al., 1983). Z nestabilních indolových a aromatických isothiokyanátů vzniká tzv. thiokyanátový anion. Tato látka také narušuje činnost štítné žlázy a též může dojít ke vzniku strumy (zvětšení štítné žlázy) až k funkčnímu poškození (Velíšek a Hajšlová, 2009).

O toxických vlastnostech GLS se mluvilo zejména v polovině minulého století, kdy se řešil problém s krmivou pro hospodářská zvířata. U nevhodně krmených zvířat může docházet právě k poškození štítné žlázy a jater. Nicméně i tento problém se podařilo vyřešit a nyní je k dispozici nová odrůda řepky se sníženým obsahem GLS. Ovšem u člověka tyto strumigenní účinky v souvislosti s běžně konzumovaným množstvím brukvovité zeleniny nikdy prokázány nebyly (Velíšek a Hajšlová, 2009).

### **1.2.3 Pozitivní účinky glukosinolátů na lidské zdraví**

Naprosto nezastupitelné místo mají GLS na poli rakovinné prevence, tedy že snižují riziko tvorby rakoviny vyvolané příjmem karcinogenů (Velíšek a Hajšlová, 2009). Incidence (tj. počet nově diagnostikovaných případů onemocnění za dané časové období v přepočtu ke sledované populaci) rakovinných onemocnění neustále roste (Vorlíček et al., 2012). Její růst mezi lety 1977 a 2013 můžeme vidět společně s poměrně ustálenou mortalitou na grafu č. 1.



**Graf č. 1:** Incidence a mortalita mezi lety 1977 a 2013 v přepočtu na 100 000 osob. (<http://www.svod.cz/publikace/60.pdf>)

Obecně lze některým typům rakoviny částečně předejít konzumací zeleniny a ovoce. Výsledky mluví jasně, je-li do složení stravy zařazena zelenina, snižuje se riziko vzniku nádorů orgánů trávicí soustavy, plic, močového měchýře nebo například prsu. Za dostatečné množství prevenční konzumace zeleniny je považováno 400-800 g denně (Vorlíček et al., 2012).

Zmínky o snížení možnosti vzniku rakoviny na základě konzumace GLS jsou již z roku 1983 (Fenwick et al., 1983). Nejvíce sledovanými látkami, které takto preventivně působí, jsou isothiokyanáty. Ty inhibují nebo až blokují tumorogenezi. Mechanismus tohoto procesu není ještě dostatečně objasněn, ale jsou dvě možnosti, jak isothiokyanáty a jejich metabolity toxické účinky karcinogenů inhibují. Jednou možností je interference se skupinou enzymů náležících k enzymové fázi I, jako jsou cytochrom P-450-dependentní monooxygenasy. Možností druhou je indukce detoxikačních enzymů fáze II, například glutathiontransferas (Opletal, 2016). Protirakovinné účinky má většina hydrolytických produktů glucoiberinu, progoitrinu a sinigrinu (Park et al., 2013).

Velký zájem přitahují zejména indolové GLS. Tento typ GLS je přítomen téměř ve všech běžně konzumovaných brukvovitých rostlinách. Například z glucobrassicinu může ve výsledku vzniknout 5,11-dihydroindolo[3,2-*b*]karbazol inhibující určité karcinogeny, které poškozují DNA (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Článků nahlížejících na GLS jako možnost rakovinné prevence je nepřehledné množství (McDanell a McLean, 1988; Zhang et al., 1992; Fahey et al., 2001). Protirakovinná aktivita byla zkoumána například i u vodnic (Chung et al., 2016). V roce 2016 vyšla GLS studie druhu *Lobularia libyca*, z které vyplývá, že nejvíce citlivé jsou vůči GLS kolorektální rakovinné buňky, dále jaterní, ale u plicních nádorových buněk byla naopak zaznamenána velká rezistence (Al-Gendy et al., 2016). Další studie poukazuje na velkou účinnost 3-butenylisothiokyanátu proti rakovině prostaty (Arora et al., 2016). Na základě studií je Česká republika zemí s nejvyšší incidencí kolorektálního karcinomu u mužů ze všech zemí Evropské unie (Ferby a Parkin, 2003).

Kromě protirakovinné aktivity jsou ale u GLS také prokázány antimikrobiální účinky. Hypotézy o souvislosti množství GLS s antibakteriálním působením byly vysloveny již dříve (Dubuis et al., 2005). Produkty GLS *Lobularia libyca* vykazovaly antibakteriální aktivitu proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a proti gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa*. V této studii byla prokázána i antifungální účinnost k *Candida albicans* (Al-Gendy et al., 2016). Druh bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byl použit i pro podrobnější studii antibakteriálních účinků isothiokyanátů (Kaiser et al., 2017). Zajímavostí je nový výzkum, ve kterém byl dokázán stimulační vliv GLS na tvorbu kostních buněk u potkanů (Jeong et al., 2015).

### 1.3 Metody používané k analýze glukosinolátů

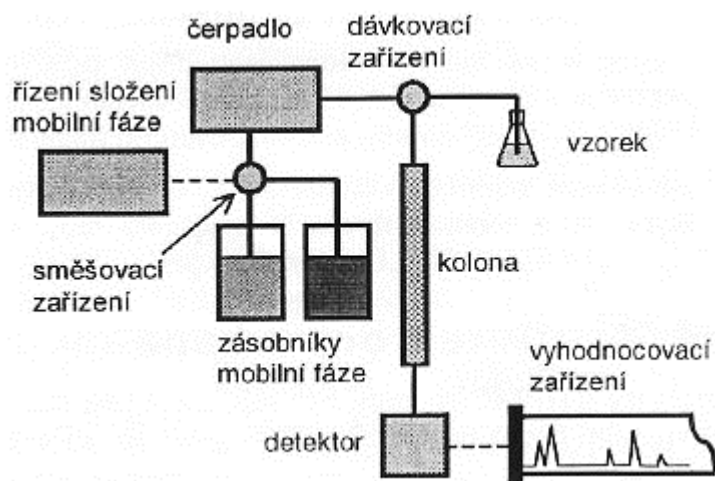
GLS představují skupinu látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (rozpuštnost, polarita atd.). K jejich analýze se nejčastěji využívají chromatografické metody. Obecně se chromatografie z analytického hlediska řadí mezi instrumentální separační metody. Již z tohoto zařazení lze usoudit, že se při této metodě separují složky obsažené ve vzorku. Vzorek je přiváděn mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze: fáze nepohyblivá stacionární a fáze pohyblivá mobilní. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze a posléze je unášen pohybem mobilní fáze přes stacionární. Může docházet k záchytu (retenci) složek na stacionární fázi. Čím silněji jsou látky stacionární fázi poutány, tím déle se na ní zdržují. Tímto způsobem se jednotlivé složky původního vzorku od sebe oddělí. Chromatografické metody se dělí podle skupenství mobilní fáze (chromatografie kapalná, plynová), uspořádání fáze stacionární (kolonová, papírová, tenkovrstvá chromatografie) nebo podle toho, který z fyzikálně-chemických jevů při separaci převládá (chromatografie rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnná, gelová či afinitní) (Klouta, 2003).

K identifikaci a kvantifikaci GLS byla zejména dříve oblíbená plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Tato metoda byla použita například pro studium GLS u ředkviček *Raphanus sativus* (Carlson et al., 1985), křenu *Armoracia lapathifolia* (Matile a Grob, 1980) či u druhu *Lobularia libyca* (Al-Gendy et al., 2016). Analýza pomocí GC vyžaduje enzymatické štěpení GLS, což prodlužuje zpracování vzorku a tudíž může docházet k zanášení chyb. Možná právě i z tohoto důvodu je v dnešní době více oblíbená kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS), kterou lze stanovit intaktní GLS.

#### 1.3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je chromatografická metoda s mobilní fází tvořenou kapalinou. Kapalinové chromatografy sestávají z několika částí (obr. 4). V pořadí první je zásobník s mobilní fází, která protéká celým přístrojem. Další důležitou částí je pumpa, jejíž prací je protlačit kapalinu přes kolonu, která klade velký odpor. Vzhledem k tomu, že jsou nežádoucí rušivé tlakové rázy, nelze používat jednočinné pístové pumpy, ale je zapotřebí čerpadel dvojčinných. Velice často používaná pumpa funguje na bázi injekční

stříkačky, která je poháněna elektromotorem. Mobilní fáze proudí trubicí, na níž je plastový či gumový segment (septum), který slouží k pipetovému přenosu vzorku do mobilní fáze. Odborně je tento oddíl označován jako dávkovací zařízení. Dříve bylo toto zařízení často zastoupeno injekčním systémem, který je ale čím dál více nahrazován obtokovým dávkovacím systémem. Mobilní fáze společně se vzorkem se po nástřiku dostanou ke koloně. Kolona představuje trubicí vyplněnou stacionární fází s velkým povrchem. Právě tato část chromatografu by se dala považovat za nejpodstatnější, neboť zde dochází k onomu chromatografickému dělení. Různé kolony se mezi sebou mohou lišit délkou, vnitřním průměrem i náplní. Klasické kolony jsou poměrně krátké, délka se pohybuje zpravidla kolem 10, 15 či 25 cm. K rychlým separacím se využívají velmi krátké kolony (jen 3 cm). Aby nedocházelo ke znečištění kolony, mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo přímo před kolonu se umísťuje ochranná předkolona. Posledním oddílem je detektor, díky němuž získáme informace o složení vzorku. Záznamem analýzy je chromatogram, kde vidíme chromatografické píky, které vyjadřují závislost signálu detektoru na čase. Důležitou vlastností detektoru je selektivita pro analyty a menší citlivost k mobilní fázi. Nejběžněji používanými jsou detektory fotometrické, refraktometrické či fluorescenční. Mohou se ale využívat i jiné typy jako FTIR detektor, elektrochemické detektory nebo hmotnostní spektrometr, který má nezastupitelný význam (Klouda, 2003; [http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek\\_skripta.pdf](http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek_skripta.pdf)).



**Obr. 4:** Schéma kapalinového chromatografu (Klouda, 2003).



### 1.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je separační metoda, při níž dochází k separaci molekulových iontů a fragmentů analyzované látky. Nejprve dojde k odpaření vzorku. Dalším krokem je ionizace (Klouda, 2003). Vzorek je ve vakuu ionizován chemicky, působením elektrostatického pole nebo nárazem elektronů. Při ionizaci vznikají ionty (fragmentsy), které jsou separovány v elektromagnetickém poli (Holzbecher a Churáček, 1987) a tudíž dochází k jejich rozdělení na základě podílu jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Další částí hmotnostního spektrometru je detektor. Nejčastěji využívaným detektorem je elektronový násobič. Jeho životnost je sice pouze jeden rok, ale tuto nevýhodu vyvažuje vysokou citlivostí (Klouda, 2003). Záznamem MS je hmotnostní spektrum, které označuje závislost množství iontů na jejich hmotnostním čísle (Holzbecher a Churáček, 1987). Spojením hmotnostních spektrometrů získáme tandemové hmotnostní spektrometry (MS/MS). Při první reakci vznikají ionty, z nichž je separován ion požadovaný. Analyzovány jsou až ionty, které vzniknou reakcí z tohoto požadovaného iontu (Klouda, 2003). Detekce při MS často probíhá v režimu SRM (Selected reaction monitoring). Tato neskenovací technika prováděná na zařízení s trojitým kvadrupólem využívá ke zvýšení selektivity fragmentaci. Právě pro tyto experimenty se využívá dvou hmotnostních spektrometrů (Lange et al., 2008).

### 1.3.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí v analýze GLS

Intaktní GLS pomocí této metody byly analyzovány u druhů *Brassica elongata*, *Brassica botteri* a *Brassica cazzae* (Montaut et al., 2017) a u brokolice a květáku (Tian et al., 2005). Metoda LC-MS byla použita i při kvantifikaci GLS po různých kuchyňských úpravách u brukvovité zeleniny (Park et al., 2013) nebo u brukvovitých rostlin známých jako hyperakumulátory těžkých kovů (Montaut et al., 2017). Výhodou této metody je kromě možnosti spolehlivé identifikace, především selektivita a citlivost detekce.

Metoda HPLC (vysoceúčinná kapalinová chromatografie) je předchůdkyně metody UHPLC (ultra-vysoceúčinná kapalinová chromatografie). Při UHPLC se k oddělení složek směsi využívá mnohem vyššího tlaku, což je zapříčiněno používáním menších částic (až 2  $\mu\text{m}$ ). Ale právě díky této malé velikosti částic, dosahuje tato metoda mnohem

rychlejší analýzy, má vyšší rozlišení a propustnost a je tedy daleko účinnější. (Cabooter a Desmet, 2012)

Pro studium intaktních GLS byla využita metoda UHPLC-MS, např. při profilování GLS u rodu *Arabidopsis* (Glauser et al., 2012) nebo identifikaci bioaktivních látek včetně GLS u druhu *Raphanus sativus* var. *caudatus* (Sangthong et al., 2017). Pomocí této metody bylo analyzováno 49 intaktních GLS v běžně konzumované brukvovité zelenině ve Spojených státech amerických (Sun et al., 2016).

## **2. Materiál a metody**

### **2.1 Rostlinný materiál**

GLS v této diplomové práci byly analyzovány u genotypů tuřínu a vodnice z genofondové kolekce brukvovitých zelenin udržovaných na Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Olomouci. Tuříny a vodnice byly vysety v druhé polovině března a sadba byla předpěstována do fáze 4-5 pravých listů ve skleníku. Následně byly rostliny vysázeny na pokusný pozemek do sponu 50 x 50 cm a zakryté netkanou textilií, která byla po 3 týdnech odstraněna. Rostliny byly standardně kultivované (plečkování, okopávání) a pravidelně zalévané. V době sklizňové zralosti (po 18-20 týdnech od výsadby) byly rostliny sklizeny.

### **2.2 Použité chemikálie**

Acetonitril ( $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich, Německo)

Kyselina mravenčí (98%, Fluka, USA)

Methanol ( $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich, Německo)

Voda (Sigma Aldrich, Švýcarsko)

Standardy GLS ( $\geq 97\%$ , Phytoflan, Německo)

- glucobrassicinapin (CAN)
- glucobrassicin (BRA)
- glucoerucin (ERU)
- gluconapin (NAP)
- gluconasturtiin (NAS)
- glucoraphanin (RAPH)
- progoitrin (PRO)
- sinigrin (SIN)

## **2.3 Použité přístroje a pomůcky**

Analytické váhy KERN ALJ 220-4 (KERN, Německo)

Centrifuga (Labnet, USA)

Erlenmayerovy baňky

Chromatografická kolona Acquity UPLC® HSS 50 mm x 2,1 mm; velikost částic 1,7 μm (Waters, Ireland)

Chromatografická kolona Acquity UPLC® CSH 50 mm x 2,1 mm; velikost částic 1,7 μm (Waters, Ireland)

Chromatografická kolona Acquity UPLC® CSH 100 mm x 2,1 mm; velikost částic 1,7 μm (Waters, Ireland)

Hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem TSQ Quantum ACCESS MAX (Thermo Fisher Scientific, USA)

Kulový mlýnek MM 400 (Retsch, Německo)

Lyofilizátor BETA 1-8 LD Plus (Christ, Německo)

Membránový nylonový filtr 0,22 μm (Labicom, ČR)

Mikrozkumavky 2 ml (Eppendorf, Německo)

Sestava kapalinového chromatografu Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Ultrazvuková lázeň (ARGO LAB, Německo)

Vortex (Velp Scientifica, Itálie)

Zkumavka PP s víčkem BRAND (Thermo Fisher Scientific, USA)

## **2.4 Použité metody**

### **2.4.1 Příprava rostlinného materiálu**

Vzorky tuřínů a vodnic byly ve formě tenkých plátků odebrány z pěti zdravých bulev, tak aby byly v analyzovaném materiálu zastoupeny všechny jedlé části bulvy. Tyto plátky byly spojeny do jednoho směsného vzorku. Rostlinný materiál tuřínů a vodnic byl lyofilizován do konstantní hmotnosti po dobu 72 hodin. Vysušený materiál byl homogenizován v kulovém mlýnku po dobu 3 minut při frekvenci vibrací  $25\text{ s}^{-1}$  a uchován v plastových zkumavkách při laboratorní teplotě.

### 2.4.2 Příprava mobilní fáze pro UHPLC

Pro chromatografickou separaci GLS byla připravena mobilní fáze A obsahující 0,05% HCOOH ve vodě (v/v), smícháním 250  $\mu$ l 98% kyseliny mravenčí s vodou v 500ml odměrné baňce. Pro koncentraci 0,025% HCOOH ve vodě (v/v) bylo rozpuštěno 125  $\mu$ l kyseliny mravenčí ve vodě v 500 ml baňce. Koncentrace 0,1% HCOOH ve vodě (v/v) byla připravena rozpuštěním 500  $\mu$ l kyseliny mravenčí ve vodě také v 500 ml baňce. Stejným způsobem byly připraveny mobilní fáze B obsahující 0,025%, 0,05%, 0,1% HCOOH v ACN (v/v), ovšem voda byla zaměněna za acetonitril.

### 2.4.3 Příprava roztoků glukosinolátových standardů

Z nakoupených práškových GLS uchovávaných při teplotě -18 °C byly připraveny 10 mM zásobní roztoky. U jednotlivých GLS byla vypočítána navážka pro 1 ml roztoku pomocí empirického vztahu  $m = c \cdot V \cdot M$ . Standardy byly naváženy a pomocí trojčlenky byly vypočítány hodnoty přídavek vody. Tyto roztoky byly taktéž uchovávány při teplotě -18 °C.

Pro vývoj metody a optimalizaci separačních a detekčních podmínek byla připravena 0,1 mM směs všech osmi GLS standardů. 1 ml této směsi byl nachystán smícháním 10  $\mu$ l z každého 10 mM roztoku GLS a 920  $\mu$ l vody.

Pro určení lineárního dynamického rozsahu jednotlivých GLS byla připravena kalibrační řada 13 roztoků GLS směsi v rozmezí hodnot koncentrace 0,001  $\mu$ M až 1000  $\mu$ M. Nejprve bylo nachystáno 200  $\mu$ l 1000  $\mu$ M zásobního roztoku smíchání 20  $\mu$ l z každého 10 mM GLS roztoku a 40  $\mu$ l vody. Dále byly roztoky připraveny do inzertů vialek dle tab. 2. Po každém naředění byl výsledný roztok před použitím pro přípravu dalšího roztoku řádně protřepán na vortexu. Takto přichystaná kalibrační řada mohla být analyzována pomocí UHPLC-MS/MS.

**Tab. 2:** Ředění kalibračních roztoků.

| <b>c [μM]</b> | <b>V<sub>1</sub> [μl]</b> | <b>c<sub>1</sub> [μM]</b> | <b>V<sub>2</sub> [μl]</b> |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>1000</b>   | 100                       | 1000                      | 0                         |
| <b>500</b>    | 50                        | 1000                      | 50                        |
| <b>100</b>    | 10                        | 1000                      | 90                        |
| <b>50</b>     | 10                        | 500                       | 90                        |
| <b>10</b>     | 10                        | 100                       | 90                        |
| <b>5</b>      | 10                        | 50                        | 90                        |
| <b>1</b>      | 10                        | 10                        | 90                        |
| <b>0,5</b>    | 10                        | 5                         | 90                        |
| <b>0,1</b>    | 10                        | 1                         | 90                        |
| <b>0,05</b>   | 10                        | 0,5                       | 90                        |
| <b>0,01</b>   | 10                        | 0,1                       | 90                        |
| <b>0,005</b>  | 10                        | 0,05                      | 90                        |
| <b>0,001</b>  | 10                        | 0,01                      | 90                        |

c ... hodnota koncentrace výsledného kalibračního roztoku

c<sub>1</sub> ... hodnota koncentrace kalibračního roztoku použitého pro ředění

V<sub>1</sub> ... objem kalibračního roztoku o koncentraci C<sub>1</sub> přidávaný k objemu vody V<sub>2</sub>

V<sub>2</sub> ... objem vody

#### **2.4.4 Extrakce glukosinolátů z rostlinného materiálu**

Extrakce GLS z rostlinného materiálu byla provedena podle Lee et al. (2013) s malými obměnami. Jako extrakční činidlo byla zvolena směs 75% CH<sub>3</sub>OH a 0,1% HCOOH. Ta byla připravena ve 100 ml baňce přidáním 100 μl kyseliny mravenčí k 75 ml methanolu a doplněním po rysku vodou. Pro extrakci bylo naváženo 25 mg homogenizovaného materiálu do ependorfové zkumavky a k němu byl přidán 1 ml extrakčního roztoku. Směs byla protřepána na vortexu, po dobu 15 minut byla sonifikována v ultrazvuku a poté 10 minut odstředována v centrifuze. Vzorek bylo třeba naředit desetinásobně. Do nových zkumavek bylo nachystáno 900 μl extrakčního solventu, ke kterému bylo připipetováno 100 μl supernatantu připraveného vzorku. Zkumavky byly vortexovány a obsah byl pomocí injekční stříkačky přes nylonové filtry přefiltrován do inzertů ve vialkách. Takto připravené vzorky byly analyzovány metodou UHPLC-MS/MS.

#### **2.4.5 UHPLC-MS/MS analýza**

Pro analýzu GLS v genotypch tuřinu a vodnice byla použita metoda UHPLC-MS/MS. Separace negativně nabitých GLS byla provedena za použití následujících podmínek gradientové eluce. Analýza byla nastavena na 12 minut. Po první 0,5 min byl podíl mobilní fáze B během 5,5 min zvýšena ze 2% na 45%. Poté během 0,5 min byl navýšen na 100%, kde byl udržován po dobu 2 min. Následně byl podíl mobilní fáze B snížen během 0,1 min na 2%, na nichž byl ponechán až do konce analýzy. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,200 ml/min a objem injektovaného vzorku na 5  $\mu$ l. Teplota na koloně byla udržována na 25 °C.

Data z detekce MS byly zaznamenány v režimu SRM. Parametry MS byly následující: teplota zdroje 320 °C, teplota desolvatačního plynu (dusík) 350 °C, tlak sprejovacího plynu o hodnotě 45 psi, tlak sušícího plynu o hodnotě 15 psi, tlak ochranného plynu 1 psi a hodnota délky skenu 1 s, kapilární napětí 3500 V, napětí na vstupu 50 V a kolizní energie 25 V vyjma glucoraphaninu, u kterého byla hodnota kolizní energie 30 V.

### **3. Výsledky**

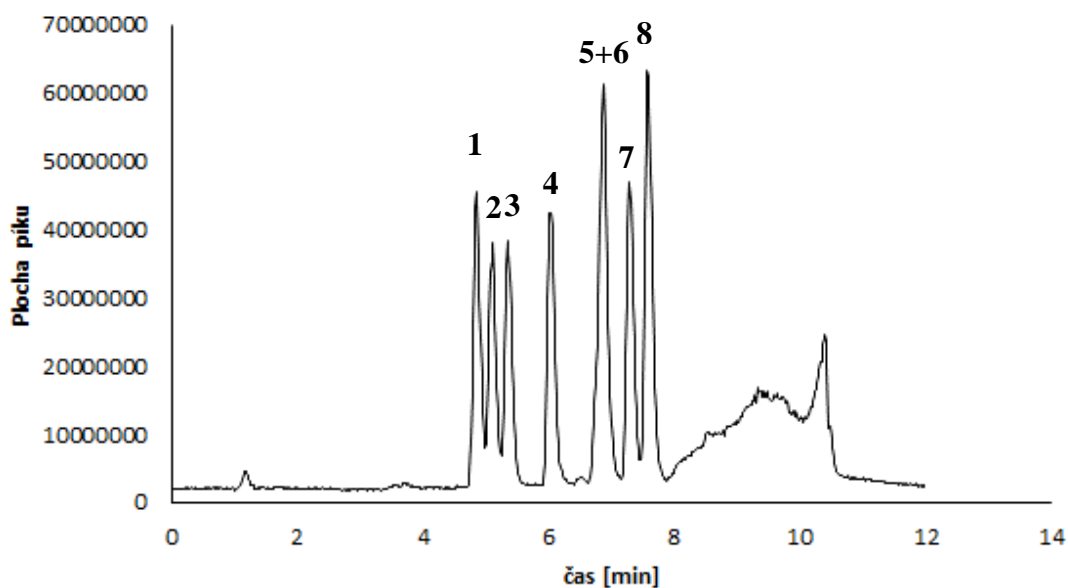
#### **3.1 Výběr kolony**

Pro chromatografickou analýzu GLS byly testovány 2 typy kolon stejné délky 50 mm, CSH (Charged Surface Hybrid) a HSS (High Strength Silica). Obě tyto kolony by podle výrobce měly být vhodné pro separaci látek kyselé povahy. Rozdílem mezi CSH a HSS kolonou jsou chybějící ethylenové můstky na nosiči u HSS kolony. Při použití kolony HSS, bylo z chromatogramu patrné, že první tři látky nebyly účinně separovány. Naopak u analýzy pomocí kolony CSH, nebyly dostatečně odděleny pouze první dvě látky. U každého z těchto měření bylo také zjištěno, že látky glucoerucin a glucobrassicinapin koeluuji. Pro studium GLS v této diplomové práci byla tudíž na základě těchto závěrů vybrána chromatografická kolona CSH. Pro dokonalou separaci a tedy ještě delší retenci ale byla zakoupena tato kolona v delším provedení (100 mm).

#### **3.2 Optimalizace metody UHPLC-MS/MS – separační podmínky**

Optimální koncentrace kyseliny mravenčí (0,025%, 0,05%, 0,1% v/v) v mobilních fázích byla hodnocena na základě naměřených chromatogramů. Hodnotícím kritériem byla účinnost separace a rozlišení mezi sousedícími chromatografickými píky. Mezi jednotlivými měřeními nebyly zjištěny výraznější rozdíly a tak na základě literatury byla za optimální považována koncentrace kyseliny mravenčí v mobilních fázích 0,05%.

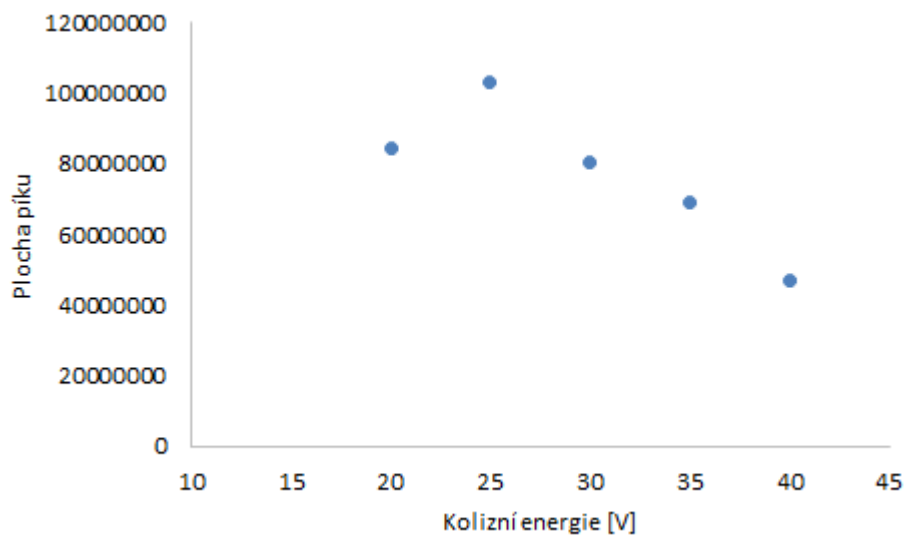




**Obr. 5:** Chromatogram separace standardů GLS za optimálních podmínek (mobilní fáze A: 0,05% HCOOH v H<sub>2</sub>O (v/v); mobilní fáze B: 0,05% HCOOC v ACN (v/v); CSH kolona 100 mm x 2,1 mm, velikost částic 1,7 μm): 1-glucoraphanin, 2-progoitrin, 3-sinigrin, 4-gluconapin, 5-gluco brassicanapin, 6-glucoerucin, 7-gluco brassicin, 8-gluconasturtiin

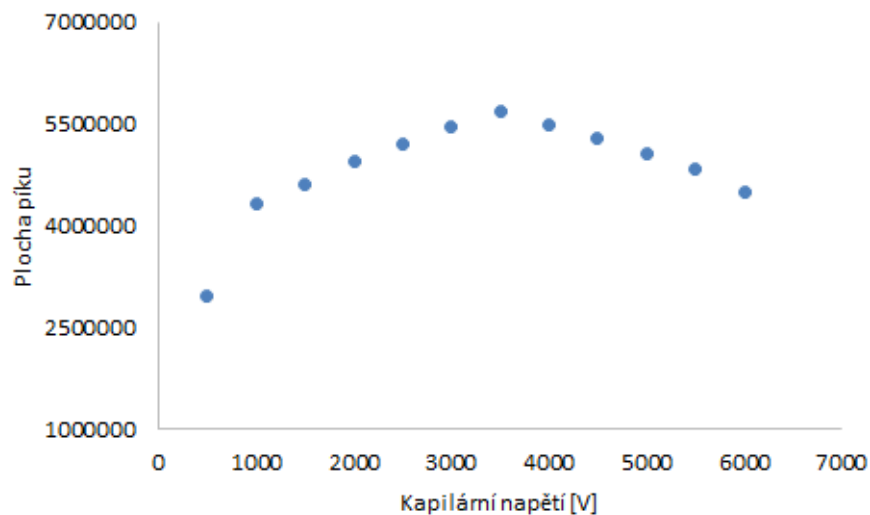
### 3.3 Optimalizace metody UHPLC-MS/MS – podmínky MS detekce

Jednou z podmínek, která zásadně ovlivňuje citlivost tandemové MS detekce je kolizní energie. Ta byla optimalizována v rozsahu 20 V až 40 V po přírůstcích 5 V (graf 2). Na základě grafického vyjádření závislosti plochy chromatografických píků na kolizní energii byla pro glucoraphanin vybrána optimální hodnota kolizní energie 30 V, u všech ostatních GLS byla detekce nejcitlivější při hodnotě 25 V.



**Graf 2:** Závislost plochy píku na hodnotě kolizní energii u gluconasturtiinu.

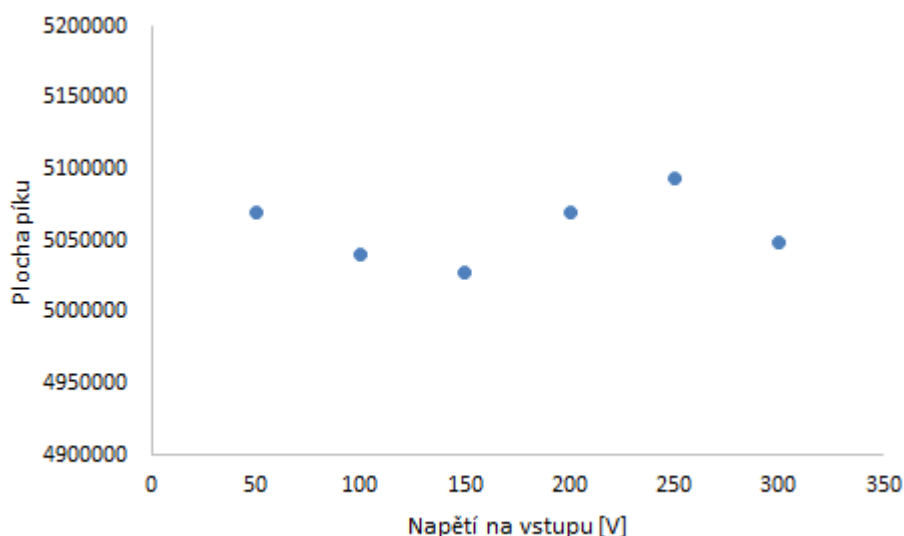
Optimální kapilární napětí bylo stanoveno měřením v rozmezí hodnot 500 V až 6000 V (přírůstky 500 V) (graf 3). Pro detekci všech GLS byla vybrána hodnota 3500 V.



**Graf 3:** Závislost plochy píku na hodnotě kapilárního napětí u gluconapinu.

Optimalizace parametru napětí na vstupu byla provedena měřením v rozsahu 50 V až 300 V (přírůstky 50 V) (graf 4). Rozdíl u všech GLS ve výsledcích mezi jednotlivými

hodnotami napětí byl nepatrný. Na základě tohoto zjištění byla vybrána optimální hodnota parametru napětí na vstupu 50 V pro detekci všech GLS.



**Graf 4:** Závislost plochy píku na hodnotě napětí na vstupu pro glucobrassicin.

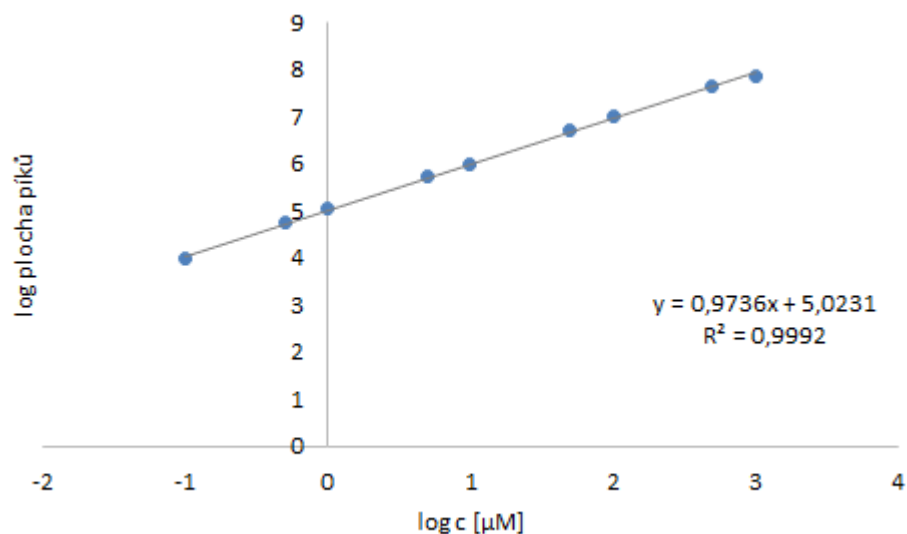
### 3.4 Validace metody

#### 3.4.1 Selektivita

Před každým měřením byl analyzován slepý vzorek připraven podle postupu reálných vzorků vyjma přítomnosti rostlinného materiálu, aby se potvrdila nepřítomnost interferujících píků, které by mohly ovlivnit identifikaci a kvantifikaci GLS.

#### 3.4.2 Linearita metody UHPLC-MS/MS

Linearita studované metody byla sledována v rozsahu hodnot koncentrací 0,001  $\mu\text{M}$  až 1000  $\mu\text{M}$  (13 koncentračních hladin). U každé koncentrace byl vzorek nastříknut třikrát a linearita byla ověřena na základě průměru těchto tří hodnot. Linearita byla vyhodnocena lineární regresní analýzou závislosti logaritmických hodnot ploch píků na logaritmických hodnotách koncentrace. Z grafického znázornění linearity bylo patrné, že původní koncentrační rozmezí je příliš široké. Pro každý GLS byl tedy vymezen vhodný lineární rozsah. Grafické vyhodnocení linearity pro glucobrassicin můžeme vidět na grafu 5.



**Graf 5:** Lineární závislost plochy píku na koncentraci u glucobrassicinu.

Lineární dynamický rozsah pro jednotlivé GLS, včetně rovnic kalibračních křivek a korelačních koeficientů jsou uvedeny v tab. 3. Na základě korelačních koeficientů, můžeme konstatovat, že vyhovují požadavkům validace metody ( $R^2 \geq 0,99$ ).

**Tab. 3:** Lineární dynamický rozsah, rovnice kalibračních křivek a korelační koeficienty pro jednotlivé GLS.

| GLS                | Lineární dynamický rozsah [µM] | Rovnice kalibrační křivky | Korelační koeficient $R^2$ |
|--------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Glucoraphanin      | 0,05 – 100                     | $y = 0,9576x + 5,3282$    | 0,9960                     |
| Progoitrin         | 0,1 – 1000                     | $y = 0,8729x + 5,196$     | 0,9951                     |
| Sinigrin           | 0,1 – 1000                     | $y = 0,8639x + 5,2168$    | 0,9959                     |
| Gluconapin         | 0,1 – 1000                     | $y = 0,8733x + 5,285$     | 0,9955                     |
| Glucobrassicinapin | 0,1 – 100                      | $y = 0,9611x + 4,869$     | 0,9969                     |
| Glukoerucin        | 0,05 – 500                     | $y = 0,9399x + 5,2731$    | 0,9907                     |
| Glucobrassicin     | 0,1 – 1000                     | $y = 0,9736x + 5,0231$    | 0,9992                     |
| Gluconasturtiin    | 0,05 - 1000                    | $y = 0,8856x + 5,5573$    | 0,9974                     |

### 3.4.3 Opakovatelnost a reprodukovatelnost metody UHPLC-MS/MS

Při měření linearity GLS mohla být stanovena opakovatelnost v rámci měření v jednom dni (intraday) a reprodukovatelnost v rámci měření během 2 týdnů (interday). Výsledné hodnoty relativních směrodatných odchylek (RSD) opakovatelnosti a reprodukovatelnosti při hodnotách koncentrace 0,1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  jsou zaznamenány v tab. 4.

**Tab. 4:** Opakovatelnost a reprodukovatelnost metody při vybraných koncentracích GLS.

| c [ $\mu\text{M}$ ] | RSD[%] RAPH     |                 | RSD[%] PRO      |                 | RSD[%] SIN      |                 |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                     | <i>intraday</i> | <i>interday</i> | <i>intraday</i> | <i>interday</i> | <i>intraday</i> | <i>interday</i> |
| <b>0,1</b>          | 3,1             | 16,1            | 1,8             | 7,7             | 4,7             | 13,0            |
| <b>5</b>            | 4,0             | 10,8            | 3,4             | 3,8             | 1,7             | 4,7             |
| <b>100</b>          | 1,7             | 5,1             | 2,0             | 10,0            | 0,7             | 5,1             |
| c [ $\mu\text{M}$ ] | RSD[%] NAP      |                 | RSD[%] CAN      |                 | RSD[%] ERU      |                 |
|                     | <i>intraday</i> | <i>interday</i> | <i>intraday</i> | <i>interday</i> | <i>intraday</i> | <i>interday</i> |
| <b>0,1</b>          | 10,3            | 19,6            | 7,1             | 10,8            | 1,8             | 8,4             |
| <b>5</b>            | 1,8             | 7,4             | 0,6             | 8,6             | 1,2             | 3,4             |
| <b>100</b>          | 1,0             | 1,8             | 1,1             | 6,5             | 2,5             | 7,5             |
| c [ $\mu\text{M}$ ] | RSD[%] BRA      |                 | RSD[%] NAS      |                 |                 |                 |
|                     | <i>intraday</i> | <i>interday</i> | <i>intraday</i> | <i>interday</i> |                 |                 |
| <b>0,1</b>          | 4,9             | 11,9            | 5,4             | 12,1            |                 |                 |
| <b>5</b>            | 4,5             | 7,8             | 0,8             | 5,4             |                 |                 |
| <b>100</b>          | 1,3             | 3,5             | 1,5             | 2,3             |                 |                 |

Z tabulky lze vyčíst, že nejvyšší hodnoty relativních směrodatných odchylek jsou převážně v nižších koncentracích. Zároveň můžeme konstatovat, že hodnoty relativních směrodatných odchylek jsou u měření v rámci 14 dní mnohem vyšší.

### 3.4.4 Limit detekce a limit kvantifikace metody UHPLC-MS/MS

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) pro jednotlivé GLS (tab. 5) byly určeny na základě metody popsané v Araujo et al. (2009). Nejprve byla kalibrační křivka

vyjádřena v logaritmickém tvaru  $\log(Y) = b + a \cdot \log(X)$ . Pro výpočet LOD a LOQ nás zajímala hodnota  $a$ . Vzhledem ke třem koncentračním nástřikům při určení linearitu, byly tři kalibrační křivky a tedy i tři hodnoty  $a$ . Z těchto tří hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka (STDEV) a průměrná hodnota (AVG). Výsledky byly dosazeny do vzorců k výpočtu LOD a LOQ.

$$LOD = 3 \cdot \left( \frac{STDEV}{AVG} \right)$$

$$LOQ = 10 \cdot \left( \frac{STDEV}{AVG} \right)$$

**Tab. 5:** Hodnoty limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ) u jednotlivých GLS.

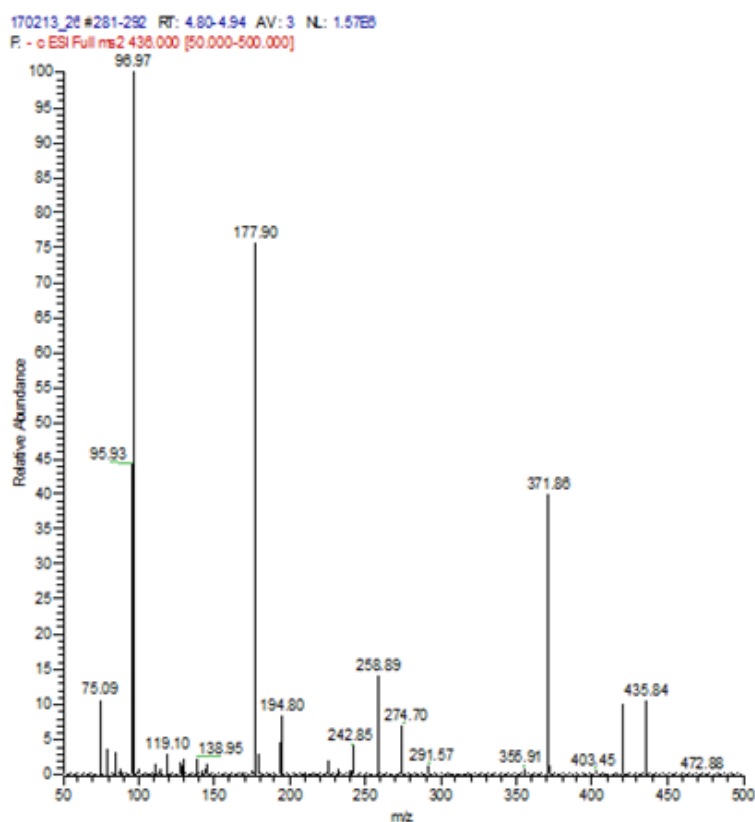
| GLS                | LOD [ $\mu\text{mol/L}$ ] | LOQ [ $\mu\text{mol/L}$ ] |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| Glucoraphanin      | 0,03                      | 0,11                      |
| Progoitrin         | 0,03                      | 0,09                      |
| Sinigrin           | 0,03                      | 0,09                      |
| Gluconapin         | 0,12                      | 0,39                      |
| Glucobrassicinapin | 0,05                      | 0,16                      |
| Glukoerucin        | 0,02                      | 0,06                      |
| Glucobrassicin     | 0,01                      | 0,04                      |
| Gluconasturtiin    | 0,03                      | 0,11                      |

Limit detekce stanovovaných GLS se pohybuje v rozmezí hodnot 0,01 až 0,12  $\mu\text{mol/l}$ , limit kvantifikace v rozmezí hodnot 0,04 až 0,39  $\mu\text{mol/l}$ . Nejvyšší hodnota limitu detekce a kvantifikace je u gluconapinu.

### 3.5 Identifikace glukosinolátů v rostlinném materiálu

GLS byly v kolizní cele při hodnotě kolizní energie 20 V fragmentovány na produktové ionty. Tímto způsobem byla získána kolizní spektra jednotlivých GLS (obr. 5). Na základě spekter byly pro každý GLS vybrány dva fragmenty s nejvyšší intenzitou, které byly použity pro kvantifikaci GLS. Dva hlavní fragmentové ionty všech 8 GLS, které byly využity pro další měření, jsou uvedeny v tab. 6. Identifikace GLS v rostlinném

materiálu tedy proběhla na základě shody retenčních časů a kolizních spekter s autentickými standardy.



**Obr. 5:** Hmotnostní spektrum s fragmenty glucoraphaninu. Hlavní fragmenty (97, 178, 372) jsou v souladu s uvedenými fragmenty v literatuře (Glauser et al., 2012).

**Tab. 6:** Vybrané fragmenty pro jednotlivé glukosinoláty.

| Název GLS               | Retenční čas<br>[min] | <i>m/z</i> | Fragmenty |
|-------------------------|-----------------------|------------|-----------|
| <b>Glucoraphanin</b>    | 4,87                  | 436        | 178, 97   |
| <b>Progoitrin</b>       | 5,16                  | 388        | 97, 75    |
| <b>Sinigrin</b>         | 5,38                  | 358        | 97, 75    |
| <b>Gluconapin</b>       | 6,08                  | 372        | 97, 75    |
| <b>Glucobrassicapin</b> | 6,79                  | 386        | 97, 75    |
| <b>Glucoerucin</b>      | 6,88                  | 420        | 259, 97   |
| <b>Glucobrassicin</b>   | 7,31                  | 447        | 259, 97   |
| <b>Gluconasturtiin</b>  | 7,60                  | 422        | 259, 97   |

### 3.6 Stanovení GLS v genotypch tuřinu a vodnic za rok 2015 a 2016

Ke stanovení jednotlivých GLS v genotypch tuřinu a vodnice vypěstovaných v letech 2015 a 2016 byla použita validovaná metoda UHPLC-MS/MS. Kvantifikace byla provedena za externí kalibrace, neboť při identifikaci GLS nebyl ani jeden shledán jako vhodný interní standard. Každé měření proběhlo ve třech opakováních. Jednotlivé genotypy jsou evidovány pod kódy 09H2800001 až 09H2800012 (dále jen pod označením 01-12) a navíc odrůda tuřinu Sweet vypěstována pouze v roce 2016. Výsledné naměřené hodnoty GLS pro genotypy tuřinu a vodnice za oba měřené roky jsou v následujících tabulkách (tab. 7 a 8). Některé genotypy byly pěstovány pouze v jednom roce.

**Tab. 7:** Hodnoty koncentrace [ $\mu\text{mol/g}$ ] GLS vyjádřeny na suchou hmotu (DW) v genotypch vodnice se směrodatnou odchylkou.

| Odrůda        | Rok  | RAPH | PRO        | SIN | NAP        | CAN        | ERU        | BRA        | NAS        |
|---------------|------|------|------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Croppa</b> | 2015 | X    | 0,24       | X   | 0,50       | 0,37       | X          | 0,08       | 0,35       |
| <b>04</b>     |      |      | $\pm 0,04$ |     | $\pm 0,12$ | $\pm 0,03$ |            | $\pm 0,03$ | $\pm 0,05$ |
| <b>Croppa</b> | 2016 | N    | 16,72      | X   | 4,62       | 0,63       | 0,30       | 0,28       | 0,89       |
| <b>04</b>     |      |      | $\pm 1,11$ |     | $\pm 0,93$ | $\pm 0,07$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,09$ |
| <b>Aspin</b>  | 2015 | N    | 0,35       | X   | 0,15       | 0,22       | X          | 0,60       | 0,73       |
| <b>05</b>     |      |      | $\pm 0,02$ |     | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ |            | $\pm 0,03$ | $\pm 0,02$ |

N ... přítomnost GLS byla prokázána, ale není možné určit jeho množství, < LOQ

X ... přítomnost GLS nebyla prokázána, < LOD



**Tab. 8:** Hodnoty koncentrace [ $\mu\text{mol/g}$ ] GLS vyjádřeny na suchou hmotu (DW) v genotypech tuřínů se směrodatnou odchylkou.

| <b>Odrůda</b> | <b>Rok</b> | <b>RAPH</b> | <b>PRO</b> | <b>SIN</b> | <b>NAP</b> | <b>CAN</b> | <b>ERU</b> | <b>BRA</b> | <b>NAS</b> |
|---------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>01</b>     | 2015       | 1,96        | 3,33       | X          | 1,45       | 0,27       | 0,17       | 0,44       | 6,43       |
|               |            | $\pm 0,09$  | $\pm 0,09$ |            | $\pm 0,38$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,17$ |
| <b>01</b>     | 2016       | 0,06        | 6,41       | X          | 0,62       | 0,57       | 1,44       | 1,96       | 2,28       |
|               |            | $\pm 0,01$  | $\pm 0,32$ |            | $\pm 0,58$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,06$ | $\pm 0,15$ | $\pm 0,17$ |
| <b>02</b>     | 2015       | 2,22        | 5,56       | X          | 3,23       | X          | 0,88       | 0,09       | 2,33       |
|               |            | $\pm 0,13$  | $\pm 0,20$ |            | $\pm 0,88$ |            | $\pm 0,06$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,09$ |
| <b>02</b>     | 2016       | 0,11        | 11,91      | N          | 11,62      | N          | 2,75       | 0,11       | 1,17       |
|               |            | $\pm 0,01$  | $\pm 0,74$ |            | $\pm 0,26$ |            | $\pm 0,17$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,09$ |
| <b>03</b>     | 2015       | N           | 5,34       | X          | 2,49       | 0,92       | X          | 0,52       | 1,64       |
|               |            |             | $\pm 0,24$ |            | $\pm 0,57$ | $\pm 0,06$ |            | $\pm 0,08$ | $\pm 0,05$ |
| <b>06</b>     | 2016       | N           | 13,80      | X          | 11,25      | 1,18       | 0,32       | 0,25       | 1,76       |
|               |            |             | $\pm 1,90$ |            | $\pm 0,44$ | $\pm 0,23$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,06$ | $\pm 0,27$ |
| <b>07</b>     | 2015       | 3,10        | 8,43       | X          | 1,04       | N          | 1,63       | 0,62       | 1,78       |
|               |            | $\pm 0,14$  | $\pm 0,26$ |            | $\pm 0,39$ |            | $\pm 0,08$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,03$ |
| <b>07</b>     | 2016       | 0,35        | 9,75       | X          | 0,85       | X          | 1,61       | 0,30       | 0,38       |
|               |            | $\pm 0,05$  | $\pm 0,28$ |            | $\pm 0,23$ |            | $\pm 0,04$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ |
| <b>08</b>     | 2015       | 4,75        | 15,46      | X          | 11,71      | X          | 0,31       | 0,15       | 5,66       |
|               |            | $\pm 0,33$  | $\pm 0,57$ |            | $\pm 0,22$ |            | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,33$ |
| <b>08</b>     | 2016       | 0,32        | 9,15       | N          | 6,44       | X          | 2,14       | 0,13       | 2,38       |
|               |            | $\pm 0,01$  | $\pm 0,40$ |            | $\pm 2,00$ |            | $\pm 0,11$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,05$ |
| <b>09</b>     | 2015       | 0,93        | 6,23       | X          | 0,27       | N          | N          | 0,39       | 2,29       |
|               |            | $\pm 0,06$  | $\pm 0,44$ |            | $\pm 0,07$ |            |            | $\pm 0,03$ | $\pm 0,14$ |
| <b>09</b>     | 2016       | 0,07        | 8,10       | N          | 0,85       | N          | 1,06       | 0,51       | 1,35       |
|               |            | $\pm 0,02$  | $\pm 0,46$ |            | $\pm 0,23$ |            | $\pm 0,05$ | $\pm 0,09$ | $\pm 0,07$ |
| <b>10</b>     | 2015       | 1,35        | 7,42       | X          | 0,72       | N          | 0,06       | 0,28       | 2,28       |
|               |            | $\pm 0,06$  | $\pm 0,22$ |            | $\pm 0,20$ |            | $\pm 0,01$ | $\pm 0,04$ | $\pm 0,16$ |
| <b>10</b>     | 2016       | 0,08        | 12,20      | N          | 0,95       | 0,41       | 2,09       | 0,41       | 2,52       |
|               |            | $\pm 0,01$  | $\pm 0,78$ |            | $\pm 0,28$ | $\pm 0,05$ | $\pm 0,12$ | $\pm 0,04$ | $\pm 0,21$ |
| <b>12</b>     | 2015       | 0,61        | 10,34      | X          | 0,59       | 0,54       | 0,51       | 0,54       | 2,14       |
|               |            | $\pm 0,02$  | $\pm 0,60$ |            | $\pm 0,11$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,05$ | $\pm 0,04$ |

|              |      |       |       |   |       |       |       |       |       |
|--------------|------|-------|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>12</b>    | 2016 | 0,18  | 18,84 | N | 1,40  | 0,89  | 1,31  | 1,62  | 1,62  |
|              |      | ±0,01 | ±0,88 |   | ±0,38 | ±0,08 | ±0,09 | ±0,12 | ±0,09 |
| <b>Sweet</b> | 2016 | 0,57  | 3,71  | X | 5,90  | 0,35  | 1,18  | 0,04  | 1,35  |
|              |      | ±0,02 | ±0,28 |   | ±0,93 | ±0,03 | ±0,30 | ±0,02 | ±0,19 |

N ... přítomnost GLS byla prokázána, ale není možné určit jeho množství, < LOQ

X ... přítomnost GLS nebyla prokázána, < LOD

Na základě naměřených dat (tab. 7 a 8), můžeme konstatovat, že obecně v genotypch vodnice je většinou menší množství GLS než v genotypch tuřínu. Nejvýrazněji je tento aspekt vidět u glucoraphaninu, který nebylo možné v genotypch vodnice oproti tuřínům kvantifikovat. Dominantním GLS u většiny genotypů byl progointrin. Ten byl nejvíce zastoupen v odrůdě 12 a nejméně v 05. Přítomnost sinigrinu byla prokázána pouze u několika genotypů, ale u nich jeho koncentrace nedosahovala limitu kvantifikace. Gluconapin měl nejvyšší koncentraci u odrůdy 08 a nejnižší u 09. Koncentrace glucobrassicinapinu byla celkově u všech genotypů nízká. U odrůd 02, 05, 07, 08 a 09 nebylo jeho množství kvantifikováno ani v jednom roce. Koncentrace glucoerucinu a glucobrassicinu měly též nízké hodnoty u všech genotypů. Gluconasturtiin byl nejvíce zastoupen u odrůdy 01 a nejméně u 04.

Při porovnání jednotlivých ročníků je zajímavé, že například u genotypu vodnice 04 byla hodnota koncentrace v roce 2015 pouze 0,24  $\mu\text{mol/g}$ , ale v roce 2016 činila již 16,72  $\mu\text{mol/g}$ . Velký rozdíl koncentrací je patrný i gluconapinu v odrůdě 02, kde v roce 2015 bylo kvantifikováno množství 3,23  $\mu\text{mol/g}$  ale v roce 2016 už 11,62  $\mu\text{mol/g}$ .

## 4. Didaktická část

Vzhledem k mému studiu učitelského oboru, by bylo vhodné zařadit do této práce i pohled na zpracovaná témata z učitelského pohledu. Možnosti pro zařazení do výukového procesu se nabízí rovnou dvě.

Pro hodiny biologie určitě nelze pominout výuku brukvovitých rostlin. Zejména z důvodu, že všichni studenti tuto čeleď zajisté velice dobře znají. Zelenina z čeledi *Brassicaceae* je jednou z nejvíce zastoupených čeledí na jídelním stole. Žáci se s čeledí mohou setkat již v 7. ročníku na základní škole. Určitě by bylo vhodné, aby žáci uměli určit základní znaky této skupiny a nejznámější zástupce. Na středních školách by této čeledi mohlo být věnováno více času. Rozhodně by zmínka o některých druzích měla zaznít už při obecné botanice zejména u rostlinných orgánů a jejich metamorfóz. Samotnou čeleď už by studenti na středních školách měli umět správně zařadit do systému.

Možností druhou je hodina chemie a výuka chromatografie. Toto téma není běžně probíráno. Dovoluji si říci, že na základních školách je většinou opomíjeno úplně a na středních školách bez chemického zaměření též. Pokud je toto téma zařazeno, pak většinou v rámci přírodovědných bloků. Zmínka o analytické chemii by měla zaznít s určitostí na základní i střední škole. A vedle zkumavkových důkazových reakcí, je dle mého názoru chromatografické dělení též velmi efektní a může žáky výborně motivovat. V příloze této diplomové práce je příprava hodiny k chromatografickému tématu na střední škole se zařazením ukázkového experimentu.

## 5. Diskuze

Tato diplomová práce je zaměřena na studium intaktních GLS v brukvovité zelenině. Na základě nejnovějších studií byla jako metoda pro analýzu intaktních GLS použita UHPLC-MS/MS (Jeong et al., 2015; Sangthong et al., 2017). Cílem práce byla separace negativně nabitých GLS, neboť GLS jsou anionty. Stejně přistupovali i v jiných studiích GLS (Tian et al., 2005; Glauser et al., 2012; Lee et al., 2013).

Jedním z prvních kroků práce byl vývoj této metody a optimalizace podmínek separace a detekce. Nejprve byla vybrána vhodná kolona. Na základě testování kolony HSS a CSH jsme dospěli k závěru, že vhodnější kolonou je CSH. Ovšem pro vlastní analýzu jsme vybrali kolonu delší. Náš výběr kolony i její délky korespondoval s Glauser et al. (2012), kde označili kolonu CSH jako vynikající k retenci a separaci GLS. Tento výsledek podložili studií, v níž při separaci kolonou CSH byly stejné výsledky při použití TFA i aditiva s nízkou iontovou silou jako je kyselina mravenčí (Fountain a Hewitson, 2011). Podmínky metody, které byly optimalizovány v této práci, byly vyhodnoceny na základě nejcitlivější detekce. Maldini et al. (2012) při optimalizaci kolizní energie, došli k jiným výsledkům. Kolizní energie se u společně studovaných GLS pohybovala v rozmezí 24 V až 38 V. Stejný výsledek můžeme přisoudit pouze sinigrinu a gluconapinu s kolizní energií o hodnotě 24 V a 27 V, které přibližně souhlasí s našimi 25 V. Ovšem u všech ostatních je rozdíl větší, což může být způsobeno rozdílnou instrumentací.

Pro validaci metody, je důležité zjistit její lineární dynamický rozsah. Hodnoty výsledných korelačních koeficientů jsou podobné jako u Tian et al. (2005), Rochfort et al. (2008) nebo Maldini et al. (2012) u nichž ale vyšly o něco lépe. Při studiu linearity metody v Glauser et al. (2012) dokonce dosáhli hodnot korelačních koeficientů nad 0,999. Ovšem je důležité zdůraznit, že v této diplomové práci byl oproti zmíněným studiím použit k zjištění linearity metody mnohem větší rozsah koncentrací (2-3 řády oproti našim testovaným 6 řádům). Metoda byla testována i na přesnost měření v rámci dne a v rámci 14 dní. Hodnota opakovatelnosti v rámci měření v jednom dni se pohybovala v rozmezí 10%. Reprodukovatelnost za období 14 dní se pohybovala až do 20%, což lze vysvětlit velkým časovým rozmezím. Stoupající tendence byly patrné i v Maldini et al. (2012) kde určili přesnost intraday kolem 6%, ale přesnost interday v rámci 3 dní už 8%. Stejnou hodnotu opakovatelnosti (intraday) jako v této práci popsal ve svých výsledcích i Tian et al. (2005). V rámci diplomové práce byly určeny i detekční

a kvantifikační limity pro jednotlivé GLS. Limit detekce se pohyboval v rozmezí hodnot od 0,01  $\mu\text{mol/l}$  do 0,12  $\mu\text{mol/l}$  a limit kvantifikace od 0,04  $\mu\text{mol/l}$  do 0,39  $\mu\text{mol/l}$ . Nejvyšší hodnoty LOD a LOQ byly pro gluconapin. Což částečně souhlasí s Maldini et al. (2012) kde je ze studovaných GLS nejvyšší hodnota LOD po glucocheirolinu u gluconapinu. Při porovnání hodnot výsledků mých a ze zmíněné studie, je vidět, že mezi LOD a LOQ v mé práci jsou větší rozestupy.

Před samotným stanovením GLS v rostlinném materiálu, byla provedena fragmentace standardů GLS. Námi získané hodnoty pro osm GLS se s ostatními vesměs shodovaly (Glauser et al., 2012). Dle Tian et al. (2005) se u všech jimi studovaných GLS objevoval výrazný pík při  $m/z$  97 ( $[\text{SO}_3\text{H}]^-$ ). S čímž na základě našich výsledků lze jen souhlasit. Nebo v jiném článku u glucoraphaninu byl další výrazný pík označen stejně jako v této práci při hodnotě  $m/z$  178, což může být zapříčiněno kombinovanou ztrátou  $\text{SO}_3$  skupiny a neutrální ztrátou glukózy. Ve stejné studii se ale objevily i nějaké rozdíly. Při fragmentaci byl určen hlavní pík u glucoerucinu při hodnotě  $m/z$  178. U nás byl tento fragment nevýrazný, ale naopak převládaly píky při hodnotě  $m/z$  259 a 97 (Maldini et al., 2012).

Nejčastěji je pro studium GLS v brukvovité zelenině využívána brokolice (*Brassica botrytis italica*) (Brown et al., 2002; Park et al., 2013) nebo rod *Arabidopsis* (Glauser et al., 2012). V diplomové práci byly ke kvantifikaci využity genotypy tuřinu a vodnice, které nejsou v České republice již příliš známé. Přitom mají opravdu vysokou energetickou hodnotu a oproti tolik vyzdvihované brokolici jsou v našich podmínkách pěstitelsky méně náročné. V posledních letech vyšlo pár studií o GLS ve vodnicích (*Brassica rapa* var. *rapa*). Ať už jde také o analýzu, jaké GLS jsou v tomto druhu zastoupeny nejvíce (Lee et al., 2013) nebo studie zjišťující nové pozitivní účinky na lidské zdraví (Jeong et al., 2015). Dříve než byla provedena samotná kvantifikace, byla provedena identifikace GLS v rostlinném materiálu. V tuřinech a vodnicích bylo nalezeno všech osm studovaných GLS (glucobrassicinapin, glucobrassicin, glucoerucin, gluconapin, glukonasturtiin, glucoraphanin, progoitrin i sinigrin). Lee et al. (2013) pozitivně identifikovali navíc i glukonapoleiferin, glukobetherin, hydroxyglukobrassicin, methoxyglukobrassicin a neoglukobrassicin. Ovšem v rámci studie neidentifikovali oproti nám sinigrin a glucoraphanin. Vzhledem k pozitivní identifikaci všech GLS, nebyl vybrán ani jeden jako vnitřní standard. Kvantifikace GLS byla tedy provedena za externí

kalibrace, stejně jako v jiných případech (Lee et al., 2013). Ale vzhledem k tomu, že GLS je velké množství, v některých pracích se objevily možnosti kvantifikace za interní kalibrace. Například He et al. (2012) využili jako vnitřní standard glucotropaleoin.

Nakonec byla provedena samotná kvantifikace GLS v jednotlivých genotypech tuřínů a vodnic. Rozmezí hodnot koncentrací se pohybovalo u vodnic mezi 0,08 a 16,72  $\mu\text{mol/g}$ , u tuřínů 0,04 a 18,84  $\mu\text{mol/g}$ . Když byly porovnány výsledky obecně mezi tuřínů a vodnicemi na základě jednotlivých koncentrací, je na první pohled vidět, že větší množství GLS je většinou v genotypech tuřínů. Navíc u genotypů vodnice nebyl kvantifikován glucoraphanin. Na základě těchto výsledků by se dalo předpokládat, že jsou tuřínů zdraví prospěšnější než vodnice. Pro zjištění množství GLS u vodnic, jsme měli k dispozici pouze dva genotypy – Croppa a Aspin, přičemž pouze u odrůdy Croppa byla možnost kvantifikace GLS za oba hodnocené roky. Při kvantifikaci tuřínů, byly výsledky velmi rozmanité, což potvrzuje tvrzení, že obsah GLS v rostlině ovlivňuje její genetická výbava. Cartea et al. (2012) se ve své studii zabývali množstvím GLS v listech jednotlivých odrůd tuřínů. Hodnoty koncentrace vyjádřeny na suchou hmotu (DW) se pohybovaly v rozmezí 9,7 a 47,2  $\mu\text{mol/g}$ . Za nejvíce obsažený GLS v listech tuřínů považovali gluconapin. V našem případě, je ale celková koncentrace GLS v bulvě mnohem menší. Stejně tak, nelze určit gluconapin jako dominantní GLS. Jeho hodnoty koncentrace jsou napříč odrůdami spíše průměrné. Vyšší hodnoty koncentrace GLS v tuřínových listech jsou popsány i jinými autory (Francisco et al., 2011). Tato skutečnost podporuje již vyřčené zákonitosti ohledně různé koncentrace GLS v různých částech rostlin (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Dle Francisco et al. (2011) jsou koncentrace alifatických GLS ovlivněny výhradně genotypem, a naopak hlavní vliv pro množství indolových GLS tvoří podmínky prostředí. Na základě našich výsledků, se ale s tímto tvrzením nedá zcela souhlasit. Neboť v rámci dvou let, je jasné, že podmínky prostředí byly alespoň trochu odlišné. Ovšem variabilita u indolového glucobrassicinu v rámci jedné odrůdy za dva roky je mnohem menší než variabilita mezi různými odrůdami. Ale z celkového pohledu v rámci měření za období dvou let, jsou rozdíly patrné. Tudíž lze potvrdit, že koncentrace GLS v rostlině je kromě genetiky závislá i na podmínkách prostředí. Bohužel ale nelze najít celkový trend pro všechny GLS, z kterého by se mohly vyvozovat konkrétní závěry. V tomto ohledu by bylo třeba zahrnout do výzkumu alespoň ještě jeden rok, což ale v rámci této diplomové

práce nebylo možné. Ale na základě zjištěných výsledků je zřejmé, že kromě genetického vlivu a podmínek prostředí ovlivňují množství GLS i jiné faktory, například biotický stres.

## 6. Závěr

V této diplomové práci jsou předloženy výsledky studia GLS v brukvovité zelenině. Prvním cílem práce byl vývoj vhodné metody pro analýzu GLS. Na základě literatury byla využita metoda ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS). Nejprve byly testovány 2 typy kolon, přičemž byla vybrána kolona CSH, která separovala lépe. Podmínky separace byly optimalizovány na základě tří různých koncentrací kyseliny mravenčí v mobilních fázích. Dále byly optimalizovány podmínky detekce: kolizní energie, kapilární napětí a napětí na vstupu. Metoda UHPLC-MS/MS byla validována zejména na základě linearit a limitu detekce LOD a limitu kvantifikace LOQ. Ověřena byla i přesnost v rámci dne (opakovatelnost) a reprodukovatelnost v rámci 14 dní. Pomocí této validované a optimalizované metody jsme se v rámci diplomové práce snažili o charakterizaci genotypů tuřínů a vodnic vypěstovaných v roce 2015 a 2016 na základě zastoupení jednotlivých GLS (RAPH, PRO, SIN, NAP, CAN, ERU, BRA, NAS). GLS v reálných vzorcích byly identifikovány na základě shody retenčních časů a hlavních fragmentů s autentickými standardy. Vzhledem k pozitivní identifikaci všech GLS, byla provedena kvantifikace za externí kalibrace. Při porovnání zjištěných hodnot koncentrace na suchou hmotu mezi tuříny a vodnicemi, bylo zjištěno, že v tuřínech je množství GLS větší. Při porovnávání jednotlivých odrůd mezi sebou, nebyla žádná na základě měření v rámci dvou let, shledána jako výrazně GLS bohatší. GLS sinigrin, ve většině vzorků nebyl prokázán vůbec, pouze u některých vzorků byla prokázána přítomnost ale bez možnosti kvantifikace. Hodnoty koncentrací při srovnání roku 2015 a 2016 nevykazují jednoznačný trend, z kterého by se daly vyvozovat konkrétní závěry. Je ale naprosto jasné, že množství GLS závisí nejen na genetice ale i na podmínkách prostředí.



## 7. Seznam zkratek

|             |  |
|-------------|--|
| AVG         | průměrná hodnota   |
| BRA         | glucobrassicin   |
| CAN         | glucobrassicinapin   |
| CSH         | Charged Surface Hybrid   |
| DNA         | deoxyribonukleová kyselina   |
| DW          | suchá hmotnost   |
| ERU         | glucoerucin  |
| FTIR        | infračervený detektor s Fournierovou transformací                            |
| GC-MS       | plynová chromatografie s hmotnostní detekcí                                  |
| GLS         | glukosinolát   |
| HPLC        | vysokoúčinná kapalinová chromatografie                                       |
| HSS         | High Strength Silica   |
| LC-MS       | kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí                               |
| LDL         | nízkodenzitní lipoprotein  |
| LOD         | limit detekce  |
| LOQ         | limit kvantifikace   |
| MS          | hmotnostní spektrometrie   |
| NAP         | gluconapin   |
| NAS         | gluconasturtiin  |
| PRO         | progoitrin   |
| RAPH        | glucoraphanin  |
| RSD         | relativní směrodatná odchylka  |
| SD,STDEV    | směrodatná odchylka  |
| SIN         | sinigrin   |
| SRM         | Selected reaction monitoring   |
| TFA         | kyselina trifluoroctová  |
| UHPLC-MS/MS | ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí |

## 8. Literatura

- Al-Gendy AA, Nematallah KA, Zaghoul SS, Ayoub NA (2016) Glucosinolates profile, volatile constituents, antimicrobial, and cytotoxic activities of *Lobularia libyca*. *Pharmaceutical Biology* 54:3257-3263
- Araujo P (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr B* 877:2224-2234
- Arora R, Kumar R, Mahajan J, Vig AP, Singh B, Singh B, Arora S (2016) 3-Butenyl isothiocyanate: a hydrolytic product of glucosinolate as a potential cytotoxic agent against human cancer cell lines. *J Food Sci Technol* 53(9):3437-3445
- Bartušek M, Pazourek J *Základy metod analytické chemie*. [http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek\\_skripta.pdf](http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek_skripta.pdf) (Staženo 12.2.2017)
- Botanika (2007) *Ilustrovaný abecední atlas: 10 000 zahradních rostlin s návodem, jako je pěstovat*. Slovart, Praha. 1020 s.
- Brown AF, Yousef GG, Jeffery EH, Klein BP, Wallig MA, Kushad MM, Juvik JA (2002) Glucosinolate profiles in broccoli: Variation in levels and implications in breeding for cancer chemoprotection. *J Amer Soc Hort Sci* 127(5):807-813
- Cabooter D, Desmet G (2012) General overview of fast and high-resolution approaches in liquid chromatography. In: Guillaume D, Veuthey JL (2012) *UHPLC in life sciences*. Royal Society of chemistry, London. 447 s.
- Carlson DG, Daxenbichler ME, VanEtten CH (1985) Glucosinolates in radish cultivars. *J Amer Soc Hort Sci* 100(5):634-638
- Cartea ME, de Haro A, Obregón S, Soengas P, Velasco P (2012) Glucosinolate variation in leaves of *Brassica rapa* crops. *Plant Food Hum Nutr* 67:283-288
- Cieślik E, Leszczyńska T, Filipiak-Florkiewicz A, Sikora E, Pisulewski PM (2007) Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables. *Food Chemistry* 105:976-981
- Davídek J, Janíček G, Pokorný J (1983) *Chemie potravin*. SNTL, Praha. 629 s.

Dubuis PH, Marazzi C, Städler E, Mauch F (2005) Sulphur deficiency causes a reduction in antimicrobial potential and leads to increased disease susceptibility of oilseed rape. *J Phytopathology* 153:27-36

Duda M, Střelec V (1986) Lahôdková zelenina. Příroda, Bratislava. 217s.

Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P (2001) The chemical diversity and distribution of glukosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51

Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ (1983) Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 18(2):123-201

Ferby J, Parkin DM (2003) GLOBOCAN: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Press.

Ferrie S, Harrar S, Lord M, McPhee M, Nixon D, Rutherford T, Thompson S (2015) V hlavní roli zelenina: pěstování, zdraví, krása, ruční práce, kuchyně. Tarsago, Praha. 319 s.

Fountain KJ, Hewitson HB (2011) Improving mass load capacity for basic compounds using charged surface hybrid (CSH) technology columns. *LC GC February*:56-57

Francisco M, Cartea ME, Soengas P, Velasco P (2011) Effect of genotype and environmental conditions on health-promoting compounds in *Brassica rapa*. *J Agric Food Chem* 59(6):2421-2431

Glauser G, Schweizer F, Turlings TCJ, Reymond P (2012) Rapid profiling of intact glucosinolates in *Arabidopsis* leaves by UHPLC-QTOFMS using a charged surface hybrid column. *Phytochem Anal* 23:520-528

Hansch FS, Lamy E, Schreiner M, Rohn S (2014) Reactivity and stability of glukosinolates and their breakdown products in food. *Angew Chem Int Ed* 53:11430-11450

He H, Ping L, Bonnema G, Dekker M, Verkerk R (2012) Genetic variation in glukosinolate content within *Brassica rapa* vegetables. *Acta Hort* 944:129-140

Holzbecher Z, Churáček J (1987) Analytická chemie. SNTL, Praha. 663 s.

- Chung IM, Rekha K, Rajakumar G, Thiruvengadam M (2016) Production of glucosinolates, phenolic compounds and associated gene expression profiles of hairy root cultures in turnip (*Brassica rapa* spp. *rapa*). *Biotech* 6:175-191
- Jahodář L (2006) *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Nakladatelství Karolinum, Univerzita Karlova, Praha. 258 s.
- Jeong J, Park H, Hyun H, Kim J, Kim H, Oh HI, Hwang HS, Kim DK, Kim HH (2015) Effects of glucosinolates from Turnip (*Brassica rapa* L.) root on bone formation by human osteoblast-like MG-63 cells and in normal young rats. *Phytother Res* 29:902-909
- Kaiser SJ, Mutters NT, Blessing B, Günther F (2017) Natural isothiocyanates express antimicrobial activity against developing and mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fitoterapia* 119:57-63
- Kang JY, Ibrahim KE, Juvik JA, Kim DH, Kang WJ (2006) Genetic and environmental variation of glucosinolate content in Chinese cabbage. *HortScience* 41(6):1382-1385
- Klouda P (2003) *Moderní analytické metody*. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava. 132 s.
- Kremer BP (2004) *Léčivé rostliny: spolehlivé určování podle fotografií a popisů*. Beta-Dobrovský, Praha. 222 s.
- Kuchyňková Š (2007) *Změny obsahových látek v brukvovité zelenině při různé kulinární úpravě*. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno.
- Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 4:222
- Lee JG, Bonnema G, Zhang N, Kwak JH, de Vos RCH, Beekwilder J (2013) Evaluation of glucosinolate variation in a collection of turnip (*Brassica rapa*) germplasm by the analysis of intact and desulfo glucosinolates. *J Agric Food Chem* 61:3984-3993
- Macholán L (2003) *Sekundární metabolity*. 2.dopl.vyd., Masarykova univerzita, Brno. 150 s.
- Maldini M, Baima S, Morelli G, Scaccini C, Natella F (2012) A liquid chromatography-mass spectrometry approach to study "glucosinoloma" in broccoli sprouts. *J Mass Spectrom* 47:1198-1206

- Malý I (2003) Pěstujeme květák, zelí a další košťálové zeleniny. Grada, Praha. 87 s.
- Manach C, Scalbert A, Morand Ch, Rémésy Ch, Jiménez L (2004) Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727-747
- Mann JH (1996) Jedy, drogy, léky. Academia, Praha. 203 s.
- Matile P, Grob K (1980) Capillary GC of glucosinolate-derived horseradish constituents. *Phytochemistry* 19:1789-1793
- McDanell R, McLean AEM (1988) Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicin): A review. *Food and Chemical Toxicology* 26:59-70
- McMurry J (2007) Organická chemie. VUTIUM, Brno. 1176 s.
- Mithen RF, Dekker M, Verkerk R, Rabot S, Johnson IJ (2000) The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human food. *J Sci Food Agric* 80:967-984
- Montaut S, Guido BS, Grison C, Rollin P (2017) Identification of glucosinolates in seeds of three *Brassicaceae* species known to hyperaccumulate heavy metals. *Chem Biodiversity* 14(3)
- Národní onkologický registr, ÚZIS ČR (2016) Data o nádorových onemocnění za období 1977-2013. <http://www.svod.cz/publikace/60.pdf> (Staženo 17.7.2017)
- Novák FA (1961) Vyšší rostliny: tracheophyta. ČSAV, Praha. 941 s.
- Novák J, Skalický M (2009) Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika. Powerprint, Praha. 327 s.
- Opletal L (2016) Přírodní látky a jejich biologická aktivita. Nakladatelství Karolinum, Univerzita Karlova, Praha. 698 s.
- Park MH, Valan Arasu M, Pak NY, Choi YJ, Lee SW, Al-Dhabi NA, Kim JB, Kim SJ (2013) Variation of glucoraphanin and glucobrassicin: anticancer components in *Brassica* during processing. *Food Sci Technol* 33(4):624-631
- Racek J et al. (1999) Klinická biochemie. Galén, Praha. 317 s.

- Rochfort SJ, Trenerry VC, Imsic M, Panozzo J, Jones R (2008) Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glucosinolates based on MS<sup>n</sup> fragmentation. *Phytochemistry* 69:1671-1679
- Rosypal S (2003) Nový přehled biologie. Scientia, Praha. 797 s.
- Sangthong S, Weerapreeyakul N, Lehtonen M, Leppanen J, Rautis J (2017) High-accuracy mass spektrometry for identification of sulphurcontaining bioactive constituents and flavonoids in extracts of *Raphanus sativus* var. *caudatus* Alef (Thai rat-tailed radish). *Journal of Functional Foods* 31:237-247
- Song L, Thornalley PJ (2007) Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of *Brassica* vegetables. *Food and Chemical Toxicology* 45:216-224
- Sun JH, Zhang ML, Chen P (2016) GLS-Finder: A platform for fast profiling of glucosinolates in *Brassica* vegetables. *J Agric Food Chem* 64:4407-4415
- Šantavý F et al. (1975) Biochemie pro studující medicíny. Avicenum, Praha. 670 s.
- Tian Q, Rosselot RA, Schwartz SJ (2005) Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spektrometry. *Anal Biochem* 343:93-99
- Troníčková E (1985) Zelenina. ARTIA, Praha. 223 s.
- Tůmová E (2006) Přírodní toxické látky ve výživě hospodářských zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha. 43 s.
- Velíšek J, Hajšlová J (2009) Chemie potravin II. Osis, Tábor. 623 s.
- Verkerk R, Dekker M (2004) Glucosinolates and myrosinase activity in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var *capitata* f. *rubra* DC.) after various microwave treatments. *J Agric Food Chem* 52:7318-7323
- Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, Schrijver RD, Hansen M, Gerhäuser C, Mithen R, Dekker M (2009) Glucosinolates in *Brassica* vegetables: The influence of the food supply chain in intake, bioavailability and human health. *Mol Nutr Food Res* 53:219-265

Vinter V (2009) Rostliny pod mikroskopem: základy anatomie cévnatých rostlin. Univerzita Palackého, Olomouc. 200 s.

Voet D, Voet JG (1995) Biochemie. Victoria Publishing, Praha. 1325 s.

Volf F (1990) Poľnohospodárska botanika. Príroda, Bratislava. 500 s.

Vorlíček J, Abrahámová J, Vorlíčková H (2012) Klinická onkologie pro sestry. Grada Publishing, a.s., Praha. 448 s.

Wenke M (1990) Farmakologie: učebnice pro lékařské fakulty. Avicenum, Praha. 597 s.

Wennberg M, Ekvall J, Olsson K, Nyman M (2006) Changes in carbohydrate and glucosinolate composition in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) during blanching and treatment with acetic acid. Food Chemistry 95:226-236

Wilkes A (1990) Moje první knížka pokusy. Dorling Kindersley Limited, London. 48 s.

Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. Proc Natl Acad Sci 89:2399-24

## **Příloha**

*Podklad pro přípravu na výuku.*

**Téma:** Analytické metody: Chromatografie

**Předmět:** Chemie

**Ročník:** 3.

**Výukové cíle:**

1. Žák zařadí chromatografii mezi separační metody.
2. Žák definuje separační metody.
3. Žák vysvětlí princip chromatografie.
4. Žák vyjmenuje základní typy chromatografie.

**Klíčové kompetence:**

Kompetence k učení – žák operuje s odbornými pojmy, samostatně pozoruje výsledky a vyvozuje závěry experimentu

Kompetence komunikativní – žák se vyjadřuje souvisle, reaguje na názory spolužáků

**Analýza prekonceptů:**

1. Jak dělíme analytické metody?
2. Co zkoumají kvalitativní metody?
3. Co zkoumají kvantitativní metody?

**Základní termíny:** separace, chromatografie, mobilní a stacionární fáze, chromatogram, retenční čas, pík

**Vyučovací metody, organizační formy výuky, práce s učebnicí či pracovními listy:**

Informačně receptivní metoda výuky

Názorně demonstrační metoda výuky

Hromadná forma výuky

**Průřezová témata:** environmentální výchova

**Mezipředmětové vztahy, možnosti integrace učiva:** biologie

**Motivační momenty výuky:** experiment

**Materiální didaktické prostředky – pomůcky:** kádinka, filtrační papír, fixy, voda

**Použité zdroje:**

Wilkes A (1990) Moje první knížka pokusy. Dorling Kindersly Limited, London. 48 s.

Klouda P (2003) Moderní analytické metody, Nakl. Pavel Klouda, Ostrava. 132 s.



## **Strukturovaný obsah učiva:**

### ANALYTICKÉ METODY

#### Kvantitativní analýza

- instrumentální metody
  - separační metody (chromatografie)
  - optické metody (spektrofotometrie, polarimetrie)
  - elektrochemické metody (polarografie, potenciometrie)

*Separační metody* – oddělení složek směsi

*Chromatografie* – dělení směsí na základě 2 nemísitelných fází

- nepohyblivá stacionární fáze
- pohyblivá mobilní fáze

*Princip metody:* Vzorek je unášen mobilní fází přes fázi stacionární. Některé složky vzorku mohou být stacionární fází zachyceny, jejich pohyb se zdrží. Na základě této skutečnosti se jednotlivé složky vzorku separují.

*Základní pojmy:*

- retenční čas = zpoždění složek vzorku oproti mobilní fází
- chromatograf = přístroj k chromatografii
- chromatogram = záznam z chromatografu (píky)

*Rozdělení chromatografie:*

podle skupenství mobilní fáze

- plynová chromatografie GC
- kapalinová chromatografie LC

podle uspořádání stacionární fáze

- kolonová
- plošná: papírová

podle principu separace

- rozdělovací
- adsorbční

## **Experiment:**

*Pomůcky:* kádinka, lžička, filtrační papír, barevné fixy

*Chemikálie:* voda, kuchyňská sůl

*Pracovní postup:*

- do kádinky nalijeme trochu vody (asi do 2cm)
- do vody vmícháme půl lžičky soli
- na čtverec filtračního papíru ve výšce 4 cm od spodního okraje uděláme barevnými fixami několik skvrn
- filtrační papír stočíme tečkami dovnitř a vložíme do kádinky

*Výsledek:* Vsakováním vody do filtračního papíru se rozpouští inkoust ve skvrnách a je unášen vzhůru. Různá barviva se pohybují různou rychlostí a dochází tedy k jejich oddělení. Ve výsledku je možné pozorovat pestrobarevné pruhy.