	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Revize	2

STANOVENÍ OBSAHU GLUKOSINOLÁTŮ METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Metoda je určena pro stanovení glukosinolátů v semenech řepky a v jejich produktech jako jsou řepkové pokrutiny, řepkový šrot apod.

2 Princip

Obsah glukosinolátů se stanoví po jejich extrakci methanolem nebo vroucí vodou, následném čištění, enzymatickou desulfatací na SPE kolonkách s iontoměničovou náplní metodou HPLC na reverzní fázi s použitím gradientové eluce s UV detekcí.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Acetonitril čistoty pro HPLC.
- 2 Methanol čistoty pro HPLC.
- 3 Voda čistá (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 4 Sinigrin kalium monohydrát (allylglukosinolát draselný, Mr = 415,49 g/mol).
- 5 Sinigrin - vnitřní standard.

Jako vnitřní standard se používá monohydrát sinigrinu (4). V případě analýzy brukvovitých druhů, které v přirozené formě sinigrin obsahují, se použije jako vnitřní standard glukotropaeolin (benzylglukosinolát draselný, Mr = 447,52 g/mol).

- 6 Monohydrát sinigrinu, roztok c = 5 mmol/l.
Příprava: Do 25ml odměrné baňky se naváží 0,0519 g monohydrátu sinigrinu (4), rozpustí a doplní po značku vodou (3).
- 7 Monohydrát sinigrinu, roztok c = 20 mmol/l.
Příprava: Do 25ml odměrné baňky se naváží 0,2078 g monohydrátu sinigrinu (4), rozpustí a doplní po značku vodou (3).
- 8 Glukotropaeolin, roztok c = 5 mmol/l.
Příprava: Ve 100ml odměrné baňce se ve vodě rozpustí 233,8 mg glukotropaeolinu (5) a doplní po značku vodou (3).
- 9 Glukotropaeolin, roztok c = 20 mmol/l.
Příprava: Ve 100ml odměrné baňce se ve vodě rozpustí 895,0 mg glukotropaeolinu (5) a doplní po značku vodou (3).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Revize	2

10 Iontoměničové pryskyřice, např.

– DEAE Sephadex A - 25 – suspenze.

Příprava: 10 g pryskyřice DEAE Sephadex A25 (poznámka 3) se promíchá v přebytku roztoku kyseliny octové (17). Směs se nechá usadit a pak se přidá takový objem roztoku kyseliny octové(17), až je objem kapalné fáze dvojnásobný než objem sedimentu.

– Suspenze DEAE Sepharose CL-6B (poznámka 3), iontoměničová pryskyřice, komerčně dostupná a připravená k přímému použití.

– Nebo se použijí SPE kolonky s iontoměničovou pryskyřicí (Discovery SAX, Supelco), 500 mg. Je možné použití i jiných ekvivalentních SPE kolonek.

Příprava iontoměničových kolon: Uřízne se 5 ks Pasteurových pipet (7) 7 cm nad krčkem a do hrdla se vloží zátka ze skelné vaty (6). Pipety se umístí svisle do stojanu a do každé se přidá takové množství suspenze iontoměničové pryskyřice (10), aby v ní po odtoku kapalné fáze zůstalo 500 µl této pryskyřice. Do každé pipety se přidá 1 ml roztoku imidazolformiátu (19) a 2 × propláchne 1 ml vody (3).

11 Sulfatáza, typ H-1, která má větší aktivitu než 0,5 jednotek aktivity na 1 ml vyčištěného roztoku sulfatázy.

12 Čištění sulfatázy.

Naváží se 25 mg sulfatázy (11) s přesností na 0,1 mg a rozpustí ve 2,5 ml vody (3). 500 µl tohoto roztoku se přenesou na každou z pěti připravených Pasteurových pipet připravených podle (10). Každá kolona se promyje 1,5 ml vody (3) a to, co vyteče, se vylije do odpadu. Pak se přidá 1,5 ml roztoku octanu sodného (18) a eluáty se slíjí ze všech pěti kolon do jedné zkumavky.

Eluáty se pak koncentrují a čistí pomocí centrifugačních filtrů. Níže uvedený postup platí pro mikrocentrifugační filtr Ultrafree – CL (8). V případě použití jiného typu je třeba dodržovat návod k použití.

Spojené eluáty z pěti kolon se rozlijí do tří filtračních jednotek, v každé se roztok zkoncentruje při centrifugačním zrychlení 2000 g na objem 1 ml. Poté se sulfatáza naředí vodou (3) v objemovém poměru (1 : 1,5). Tento roztok se rozdělí do malých množství a skladuje v mrazničce při –18 °C.


13 Zkouška aktivity sulfatázy.

Příprava roztoku sinigrinu, c = 0,15 mmol/l, pH = 5,8.

Připraví se postupně tři roztoky:

a) Do 500ml odměrné baňky se pipetuje 1 ml kyseliny octové (17) a doplní po značku vodou (3).

b) Do 500ml odměrné baňky se pipetuje 1 ml ethylenamidu a doplní po značku vodou (3).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolatů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

c) 73 ml roztoku, který byl získán v kroku a), se smíchá se 40 ml roztoku, který byl získán v kroku b). Dalším přídatkem roztoku a) nebo b) se nastaví pH této směsi na 5,8.

Do 100ml odměrné baňky se pipetují 3 ml roztoku sinigrinu (6) a doplní roztokem c) po značku.

14 Test aktivity.

Postup: 2 ml tlumivého roztoku sinigrinu (13) se pipetuje do referenční měrné kyvety spektrofotometru nastaveného na vlnovou délku 229 nm a teplotu kyvet 30 °C. V čase $t = 0$ se přidá 50 μ l roztoku sulfatázy (11) a zapne se zapisovač. Chod zapisovače se zastaví, když se absorbance již dále nemění. Sestrojí se tečna procházející bodem $t = 0$ a změří se její směrnice $\Delta A/\Delta t$.

Jednotka aktivity odpovídá vzniku 1 μ molu desulfosinigrinu za minutu při 30 °C a pH = 5,8. Aktivita sulfatázy, vyjádřená v jednotkách aktivity na mililitr roztoku sulfatázy, je vyjádřena vztahem:

$$\Delta A/\Delta t \times V/\Delta E \times 1000/50 \times 10^6, \text{ kde:}$$

$\Delta A/\Delta t$ je směrnice tangenty procházející bodem $t = 0$ v jednotkách absorbance za minutu,

V je reakční objem v litrech (tzn. $2,05 \times 10^{-3}$ l),

ΔE je rozdíl mezi molárními extinkčními koeficienty sinigrinu a desulfosinigrinu při 229 nm, tj.: $\Delta E = \Delta A_0 / (1 \times c)$, přibližně 1500 l/mol/cm, kde

ΔA_0 je rozdíl mezi absorbancí desulfosinigrinu v rovnovážném stavu a absorbancí sinigrinu v čase $t = 0$, 1 je tloušťka vrstvy měřeného roztoku v cm, c je koncentrace desulfosinigrinu v rovnováze v mol/l:

$$c = 2 \times 0,15 \times 10^{-3} \times 0,95/2,05 = 1,39 \times 10^{-4} \text{ mol/l, přičemž se předpokládá, že výtěžek desulfosinigrinu v rovnovážném stavu je roven 0,95.}$$

Zjištěná aktivita přečištěné sulfatázy by měla být vyšší než 0,5 μ mol/min/ml. Může být alternativně vypočtena pomocí následujícího zjednodušeného vztahu:

$$5,7 \times \Delta A / (\Delta t \times \Delta A_0).$$

15 Imidazol, C₃H₄N₂.


16 Kyselina mravenčí, HCOOH, min. 99%.

17 Kyselina octová, CH₃COOH, roztok c(CH₃COOH) = 2 mol/l.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odpipetuje 115 ml kyseliny octové (23) a doplní po značku vodou (3).

18 Octan sodný, CH₃COONa, roztok c(CH₃COONa) = 0,2 mol/l.

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se naváží 13,608 g trihydrátu octanu sodného (22), rozpustí ve vodě (3) a promíchá, pak se doplní vodou po značku a opět promíchá.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2


- 19 Octan sodný, CH_3COONa , roztok $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 0,02 \text{ mol/l}$.
 Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml roztoku octanu sodného (18), doplní vodou (3) po značku. pH se upraví pomocí roztoku kyseliny octové (17) na hodnotu 4.
- 20 Imidazol formiát, roztok $c = 6 \text{ mol/l}$.
 Příprava: Do 100ml odměrné baňky se odpipetuje 22,7 ml kyseliny mravenčí (16), ve které se rozpustí 40,8 g imidazolu (15) a doplní vodou (3) po značku.
- 21 Mobilní fáze.
 Eluent A: acetonitril čistoty HPLC, roztok 20% (v/v) ve vodě čistoty HPLC.
 Eluent B: voda čistoty HPLC.
- 22 Trihydrát octanu sodného, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$.
- 23 Kyselina octová, CH_3COOH , min. 99%,

Poznámky

- 1 Čistota vnitřního standardu se zkontroluje analýzou s využitím HPLC podle této metodiky. Výsledný chromatogram by měl obsahovat pouze jeden hlavní pík, který tvoří nejméně 98 % z celkové plochy všech piků.
- 2 Pro test aktivity sulfatázy je nezbytné mít k dispozici spektrofotometr s teplotou uzavřených kyvet. V případě, že tímto zařízením laboratoř nedisponuje, lze aktivitu připravené sulfatázy hodnotit proměřením CRM nebo IRM zařazeného do každé série.
- 3 Suspenze DEAE Sepharose a DEAE Sephadex jsou pouze příklady vhodných komerčních výrobků. Lze použít i jiné ekvivalentní pryskyřice.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Kapalinový chromatograf vhodný pro gradientovou eluci a nastavení teploty v koloně na 30 °C s UV detektorem, který je schopen měřit při vlnové délce 229 nm.
- 2 Chromatografická kolona typu C18 nebo C8 s velikostí částic 5 μm nebo menší, např.:
 Lichrosorb RP18, $\leq 5 \mu\text{m}$ (150 mm \times 4,6 mm),
 Spherisorb ODS 2, $\leq 5 \mu\text{m}$ (250 mm \times 4 mm nebo 250 mm \times 5 mm),
 Novapak C18, $\leq 4 \mu\text{m}$ (150 mm \times 4 mm),
 Lichrospher RP8, $\leq 5 \mu\text{m}$ (125 mm \times 4 mm),
 Nucleosil C18, $\leq 5 \mu\text{m}$ (200 mm \times 4 mm),
 Supelcosil LC-18-DB, $\leq 5 \mu\text{m}$ (250 mm \times 4,6 mm).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

Účinnost kolony se pravidelně kontroluje nejlépe za použití vhodného matricového CRM s deklarovaným obsahem GSL. Kolona zvláště nesmí snižovat obsah 4-hydroxyglukobrassicinu.

Z hlediska zvýšení životnosti kolony a snížení počtu interferujících píků je vhodné použití předkolony, např. pro Supelcosil LC-18-DB → Supelcoguard LC-18-DB, 5 µm (20 mm × 4 mm).

- 3 Mlýnek na úpravu krmiv nebo mikrodrtič.
- 4 Odstředivka stolní s odstředivým zrychlením min. 5000 g (např. SIGMA, typ 2-16K, Hettich, typ Rotofix 32 nebo jiná vyhovující stanoveným kritériím).
- 5 Vodní lázeň s možností nastavení teploty až na 95 °C.
- 6 Skelná vata.
- 7 Pasteurovy pipety o délce alespoň 13 cm, na konci zúžené.
- 8 Mikrocentrifugační filtry, celulosová membrána, 5000 kDa.
- 9 Sušárna s nucenou cirkulací vzduchu.

5 Postup

5.1 Úprava vzorku


Z čistého, zhomogenizovaného a neupraveného zkušební vzorku semene řepky se vydělí potřebné množství. V případě, že semena byla chemicky ošetřena, promyjí se v dichlormethanu. Stanoví se obsah vlhkosti a těkavých látek. Pokud je tento obsah vyšší než 10 % (m/m), suší se semena v proudu vzduchu při teplotě přibližně 45 °C.

Semena řepky se bezprostředně před vlastní analýzou rozmělní v mlýnku nebo mikrodrtiči (3) po dobu 30 s. Takto jemně pomletý vzorek se promíchá a pak se podrtí ještě po dobu 10 s. Z takto upraveného vzorku se odvažují navážky pro jednotlivá stanovení.

5.2 Extrakce glukosinolátů

Do skleněných zkumavek s označením A a B se duplicitně naváží 200 mg pomletého vzorku s přesností 0,1 mg. Zkumavky se umístí do vodní lázně (5) nastavené na teplotu 95 °C.

Po 1 min se do každé zkumavky přidají 2 ml vařící vody (3). Poté se do zkumavky A ihned přidá 200 µl roztoku sinigrinu (6) a do zkumavky B se přidá 200 µl roztoku sinigrinu (7). Zkumavky se ohřívají dalších 10 min, přičemž se s nimi v pravidelných intervalech třepe. Jejich obsah se protřepe i po vyjmutí z lázně a pak se odstředí na odstředivce při zrychlení 5000 g po dobu 3 min. Supernatanty z jednotlivých zkumavek se převedou do dalších dvou zkumavek s označením A' a B'. Ke zbylému sedimentu po první extrakci se znovu přidají 2 ml vařící vody (3). Zkumavky se znovu zahřívají ve vodní lázni při 95 °C po dobu 10 min za pravidelného míchání. Po jejich vyjmutí se opět jejich obsah protřepe a odstředí při zrychlení 5000 g po dobu 3 min. Supernatanty z této druhé extrakce se spojí se supernatanty z první extrakce ve zkumavkách A' a B'. Spojené supernatanty se doplní

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Revize	2

vodou (3) na objem 5 ml a promíchají se. Takto připravené extrakty mohou být skladovány v temnu při – 18 °C po dobu 2 týdnů.

5.3 Čištění a desulfatace

Čištění a desulfatace probíhá na SPE kolonkách s iontoměničovou pryskyřicí (10). Do těchto kolon se převede 1 ml ze spojených extraktů. Přidá se 2 × 1 ml roztoku octanu sodného (18) a poté se aplikuje 75 µl roztoku zředěné a přečištěné sulfatázy (12), která se nechá na koloně působit přes noc při laboratorní teplotě. Sběrná nádoba určená pro jímání odpadních eluentů ze všech kolon se nahradí držákem s otevřenými lékovkami k jímání eluentů z jednotlivých kolonek odděleně. Pro eluci desulfoglukosinolátů se použije voda (3). Aplikace 1 ml tohoto elučního činidla probíhá ve dvou následných krocích. Eluáty se jímají do stejných lékovek. Po řádném promíchání se bezprostředně použijí k vlastnímu chromatografickému měření nebo se mohou skladovat v temnu při – 18 °C po dobu 1 týdne.


Pokud se analyzuje matrice, která obsahuje sinigrin, paralelně s reálným vzorkem se provádí slepý pokus. Použije se stejný postup včetně úpravy vzorku podle 5.1., ovšem bez přidání vnitřního standardu, aby byl kvantitativně určen sinigrin přítomný ve zkušebním vzorku.

5.4 Chromatografické stanovení

Zkušební vzorky se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému. Uvedené podmínky jsou doporučené, mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

Tabulka 1. Příklad podmínek chromatografického stanovení.

Kolona	Supelcosil LC – 18 DB (25 cm × 4,6 mm, 5µm)
Předkolona	Supelguard LC-18-DB (2cm × 4mm, 5µm)
Mobilní fáze	A (21)
	B (21)
Průtok	(0,8 – 1) ml/min
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	(20 – 40) µl
Detekce	229 nm
Doba analýzy	cca 40 min
Doba promytí před nástřikem	10 min

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Revize	2

Tabulka 2. Příklad časového průběhu gradientu

Čas (min)	A (%)	B (%)	Průtok (ml/min)
0	20	80	0,8
5	20	80	0,8
10	40	60	0,8
22	50	50	1
35	80	20	1
40	80	20	1

Po ukončení analýzy se kolona promývá 10 min 20% acetonitrilem (eluent A) pro ustanovení rovnováhy a promytí kolony.

6 Vyjádření výsledků

Pořadí eluce píků jednotlivých glukosinolátů na koloně typu C₁₈ při vhodném elučním gradientu je znázorněno na obrázku č. 1. V tabulce č. 4 je přehled jednotlivých GSL.

Obsah každého glukosinolátu, vyjádřený v μmol na 1 g sušiny výrobku se vypočítá ze vztahu

$$\frac{A_g}{A_s} \times \frac{n}{m} \times K_g \times \frac{100}{100 - w}$$

kde

A_g je plocha píku odpovídající desulfoglukosinolátu v jednotkách integrátoru,

A_s je plocha píku odpovídající desulfosinigrinu v jednotkách integrátoru,


K_g je faktor reakce desulfoglukosinolátu uvedený pro jednotlivé GSL (tab. 3),

m je hmotnost zkušební vzorku (g),

n je množství vnitřního standardu přidaného do zkumavky (mmol),

w je obsah vlhkosti a těkavých látek v analytickém vzorku vyjádřený v % vlhkosti.

(podle ČSN EN ISO 665 Olejnatá semena – Stanovení obsahu těkavých látek)


	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Revize	2

Koeficienty odezvy pro jednotlivé GSL

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

Tabulka 3.

Jednotlivé glukosinoláty	Koeficienty odezvy (K _g)
Desulfoglukoiberin	1,07
Desulsoprogoitrin	1,09
Desulfoepi-progoitrin	1,09
Desulfosinigrin	1,00
Desulfoglukoraphanin	1,07
Desulfoglukonapoleiferin	1,00
Desulfoglukoalyssin	1,07
Desulfoglukonapin	1,11
Desulfo 4-OH glukobrassicin	0,28
Desulfoglukobrassicinapin	1,15
Desulfoglukotropeolin	0,95
Desulfoglukobrassicin	0,29
Desulfoglukonasturiin	0,95
Desulfo-4-CH ₃ glukobrassicin	0,25
Desulfoneoglukobrassicin	0,20
Jiné desulfoglukosinoláty	1,00

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	9
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Revize	2

Poznámky

- 4 Výsledek se uvádí jako aritmetický průměr sumy dvou paralelních stanovení za předpokladu splnění hodnot opakovatelnosti. Pokud tomu tak není, stanovení se opakuje opět paralelně. Pokud i v tomto případě rozdíl paralelních stanovení přesáhne hodnotu opakovatelnosti vztáženou na obsah sumy GSL ve vzorku, bere se za výsledek aritmetický průměr 4 uskutečněných stanovení.
- 5 Obsah těkavých látek v semeni řepky se stanoví dle ČSN EN ISO 665. Do vysušené a převážené kovové laboratorní misky s víčky (váženky) se naváží 5 g celých semen řepky. Váženky se vzorkem se umístí do sušárny. Vzorek se suší 4 h při (103 ± 2) °C. Potom se váženky umístí do exsikátoru a po zchlazení na laboratorní teplotu se zváží s přesností 0,001 g. Vlhkost a obsah těkavých látek vyjádřené v procentech hmotnosti vzorku se vypočítá podle vztahu

$$w = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

kde je


m_0 hmotnost váženky (g),

m_1 hmotnost váženky se vzorkem řepky před sušením (g),

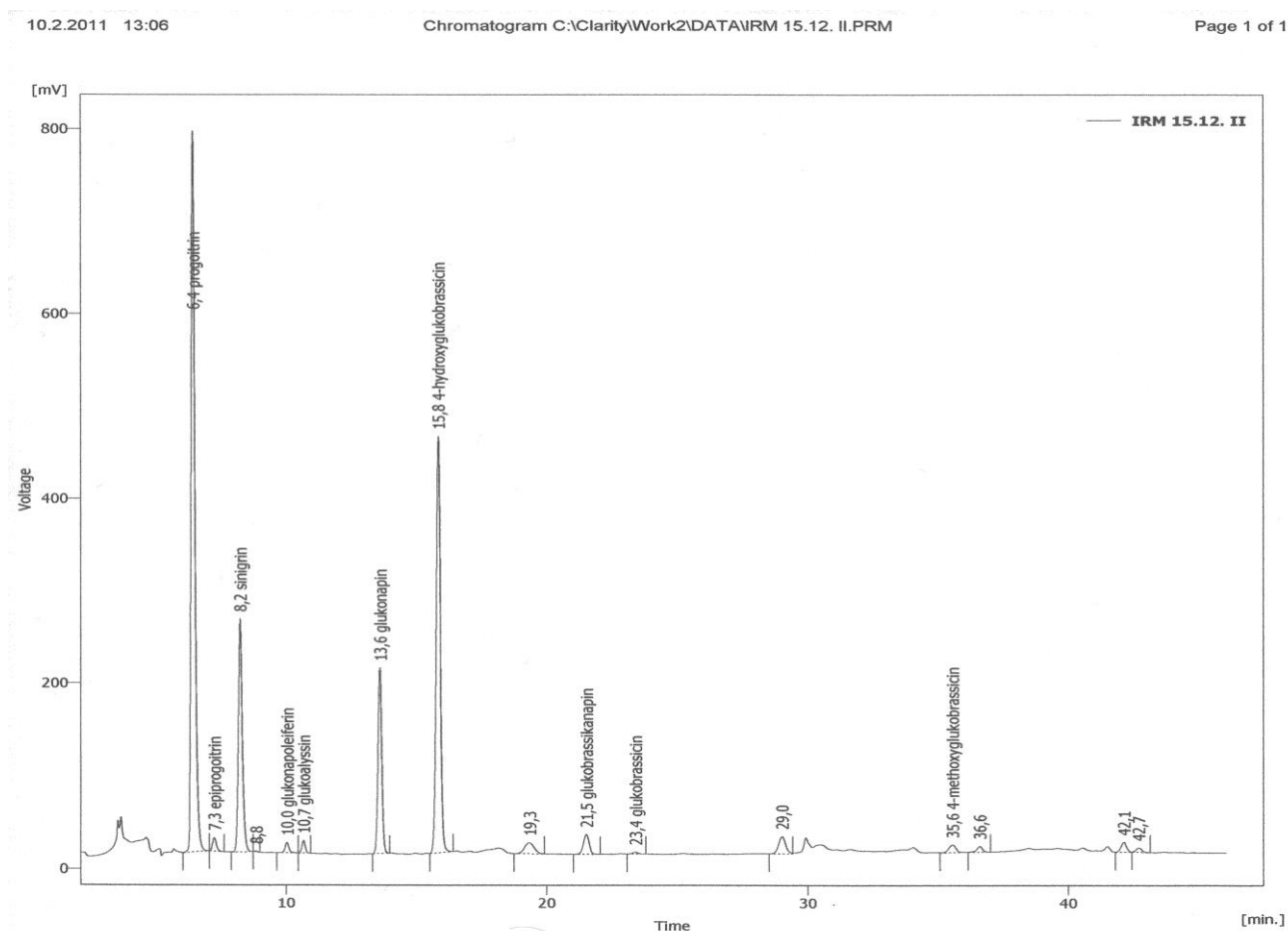
m_2 hmotnost váženky se vzorkem řepky po sušení (g).


7 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 9167-1 – Semeno řepky – Stanovení obsahu glukosinolátů – Část 1: Metoda vysokovýkonné kapalinové chromatografie

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	10
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

Obrázek 1. Příklad typického chromatogramu – analýza glukosinolátů.



	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	11
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10540.1 – Stanovení obsahu glukosinolátů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	2

Tabulka 4. Přehled GSL u řepky olejky.

Alk(en)yl glukosinoláty	R-
Hlavní	
1) Progoitirin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$
2) Glukonapin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
3) Glukobrassicinapin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
Ve stopovém množství	
4) Sinigrin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$
5) Napoleiferin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$
6) Sinalbin	p-HO-C ₆ H ₄ -CH ₂ -
7) Glukoerucin	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
8) Glukoibervirin	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
9) Glukoiberin	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
10) Glukoraphanin	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
11) Glukoalyssin	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
12) Glukonasturiin	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
Indolyl glukosinoláty	
Hlavní	
13) 4-hydroxybrassicin	4-hydroxy-3-indolylmethyl
Ve stopovém množství	
14) Glukobrassicin	3-indolylmethyl-
15) Neoglukobrassicin	N-methoxy-3-indolylmethyl-
16) 4-methoxyglukobrassicin	4-methoxy-3-indolylmethyl-

Hlavní alkenyl glukosinolát - progoitirin představuje (30 – 80) % celkového obsahu GSL v řepkovém semeni.