	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50280.1 – Stanovení obsahu hypericinu	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU HYPERICINU

1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení obsahu hypericinu v nati a květech třezalky tečkované a třezalky skvrnité.

2 Princip

Ze vzorku se extrakcí chloroformem odstraní chlorofyl. Následuje vlastní extrakce hypericinu acetonem. Obsah hypericinu v extraktu se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 590 nm.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Chloroform.
- 2 Aceton.
- 3 Methanol.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- 2 Extrakční přístroj vhodné konstrukce (např. dle Twisselmana) s extrakční baňkou o objemu 250 ml.
- 3 Extrakční patrona.
- 4 Elektricky vyhřívané topné hnízdo.
- 5 Skleněné varné kuličky.
- 6 Vata obvazová, odtučněná.
- 7 Rotační vakuová odparka.
- 8 Odměrná baňka, 25 ml.
- 9 Spektrofotometr.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50280.1 – Stanovení obsahu hypericinu	Vydání	1
		Revize	1

5 Postup

5.1 Příprava zkušebního vzorku

Postup přípravy zkušebního vzorku je popsán v JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, kap. 5.10, postup 60160.1 Úprava vzorků speciálních plodin. Vzorek se mele vždy bezprostředně před vlastním stanovením a během mletí nesmí docházet k jeho zahřívání.


5.2 Extrakce a spektrofotometrické stanovení

Na filtrační papír se naváží 1,0 g zkušebního vzorku s přesností 0,001 g. Filtrační papír se vzorkem se vloží do papírové patrony a ta se umístí do extrakčního přístroje. Extrahuje se chloroformem (1) tak dlouho, až patronou stéká zpět bezbarvý chloroform. Získaný extrakt se odstraní. Patrona se vzorkem se nechá vysušit na vzduchu v digestoři. Mezitím se extrakční přístroj promyje ethanolem a acetonem a připraví se čistá extrakční baňka. Patrona se vloží zpátky do extrakčního přístroje a vzorek se extrahuje acetonem (2), dokud nevymizí červená barva a zpět nestéká čirý aceton. Extrakt se odpaří na vakuové rotační odparce do sucha. Odparek se rozpustí v methanolu (3) a převede se kvantitativně do 25ml odměrné baňky. Baňka se doplní methanolem (3) po značku a promíchá. Extrakt se zfiltruje, přičemž se první 2 ml filtrátu odstraní. Z filtrátu se poté odebere 5 ml a znovu se naředí methanolem (3) v 25ml odměrné baňce.

V připraveném extraktu se změří absorbance při vlnové délce 590 nm v kyvetě o optické délce 1 cm. Na slepý pokus se použije čistý methanol a měření se provede za stejných podmínek.

Poznámky

- 1 Podle Českého lékopisu 2009 se hypericin extrahuje směsí vody a tetrahydrofuranu v poměru 2 : 8 (V/V). Po odstranění extrakční směsi se odparek rozpustí v methanolu a hypericin se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 590 nm. Pro výpočet obsahu hypericinu se podle ČL 2009 použije specifická absorbance 1% roztoku hypericinu, měřená v 1cm kyvetě, jejíž hodnota je 870.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50280.1 – Stanovení obsahu hypericinu	Vydání	1
		Revize	1

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah hypericinu x ve vzorku se vyjádří v hmotnostních procentech a vypočítá se podle vztahu

$$x = \frac{A}{A_{1cm}^{1\%} \times l} \times \frac{V}{m} \times R$$

kde A je absorbance měřeného roztoku při 590 nm,

$A_{cm}^{1\%}$ specifická absorbance 1% roztoku hypericinu, měřená v 1 cm kyvetě, jejíž hodnota je 718,

l tloušťka absorbující vrstvy v cm, kyveta 1 cm,

V objem odměrné baňky do níž byl převeden odparek v ml (tj. 25 ml),

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g,

R korekce na ředění před vlastním měřením,

$$R = V_A / V_m$$

V_A celkový objem po naředění v ml,

V_m objem extraktu pipetovaný pro naředění v ml.

7 Literatura

- 1 Novotný, F.: JPP Metodiky chemických rozborů pro hodnocení kvality odrůd III, ÚKZÚZ, Brno, 2006.
- 2 Český lékopis 2009, 2. díl. Hyperici herba - Třezalková nať; Grada Publishing, a.s., Praha, 2009; str.2294-2295.