

СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИПЕРИЦИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ И РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

В. Н. Леонтьев*, О. И. Лазовская, Д. А. Косяк, Г. Н. Супиченко, Н. А. Коваленко

УДК 535.372

Белорусский государственный технологический университет,
220006, Минск, Беларусь; e-mail: leontiev@belstu.by

(Поступила 9 сентября 2020)

Для использования в качестве стандартного образца из настойки “Диагиперон” выделен гиперин, хроматографическая чистота которого подтверждена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детектированием. Гиперин представлен единственным хроматографическим пиком с временем удержания 23.10 мин, имеющим в масс-спектре характерный сигнал молекулярного иона $[M - H]^+$ с m/z 504.05. В электронных спектрах поглощения настойки “Диагиперон” и экстракта травы зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* в метаноле помимо характерных для гиперина полос при 550 и 590 нм наблюдается полоса поглощения при 665 нм, обусловленная наличием хлорофилла. Показано, что при возбуждении гиперина ($\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм) в спектре испускания настойки “Диагиперон” присутствуют характерные для гиперина полосы при 593 и 640 нм, а в спектре испускания экстракта травы зверобоя продырявленного в метаноле кроме полос испускания гиперина наблюдается незначительная по интенсивности полоса испускания хлорофилла при 670 нм. Установлено, что спектрофотометрическое и спектрофлуориметрическое определение гиперина в настойке “Диагиперон” и в траве зверобоя продырявленного дает схожие результаты, которые соответствуют нормированному содержанию гиперина в исследуемых образцах.

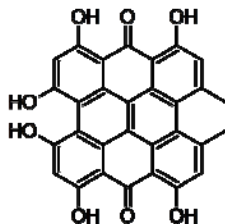
Ключевые слова: гиперин, трава зверобоя продырявленного, электронная спектроскопия, флуоресцентная спектроскопия.

For use as a standard sample, hypericin was isolated from the “Diahyperon” tincture. The chromatographic purity of the hypericin sample was confirmed by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Hypericin is represented by a single chromatographic peak with a retention time of 23.10 min, which has a characteristic signal of the molecular ion $[M - H]^+$ with m/z 504.05 in the mass spectrum. In addition to the band characteristic of hypericin at 550 and 590 nm, the electronic absorption spectra of the “Diahyperon” tincture and a methanolic extract of *Hyperici herba* (*Hypericum perforatum*) show an absorption band at 665 nm due to the presence of chlorophyll. It was shown that upon excitation of hypericin ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm), the emission spectrum of the “Diahyperon” tincture contains bands characteristic of hypericin at 593 and 640 nm. In addition to the hypericin emission bands, the emission spectrum of the methanolic extract of *Hyperici herba* demonstrates a low intensity chlorophyll emission band at 670 nm. It was found that the spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of hypericin in “Diahyperon” tincture and in *Hyperici herba* gives convergent results, which are consistent with the standardized values of the hypericin content in the studied samples.

Keywords: hypericin, *Hyperici herba*, electron spectroscopy, fluorescence spectroscopy.

SPECTROFLUORIMETRIC DETERMINATION OF HYPERICIN IN DRUGS AND VEGETABLE RAW MATERIALS

V. N. Leontiev*, O. I. Lazovskaya, D. A. Kosyak, G. N. Supichenko, N. A. Kovalenko (Belarusian State Technological University, Minsk, 220006, Belarus; e-mail: leontiev@belstu.by)

Введение. Гиперицин (4,5,7,4',5',7'-гексагидрокси-2,2'-диметилнафтодиантрон)

— биологически активное соединение травы зверобоя. Препараты на основе гиперического широко используются в современной медицине в качестве антидепрессантных, противовоспалительных, антибактериальных, противовирусных и фотосенсибилизирующих лекарственных средств [1].

Для решения задач количественного определения гиперического в лекарственных средствах и растительном сырье применяют хроматографические, хроматомасс-спектрометрические и спектрофотометрические методы анализа. Большинство публикаций по выделению и идентификации гиперического и его производных посвящено методам тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с последующим масс-спектрометрическим или спектрофотометрическим детектированием [2—6]. Однако сопоставление полученных экспериментальных данных и их воспроизводимость недостаточны, поскольку при проведении экстракции и идентификации используются колонки с одинаковой привитой фазой, но разных производителей, что ведет к различиям в активности гиперического. В [7, 8] экстракцию и количественное определение гиперического и его производных проводили методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием и последующим подтверждением полученных данных масс-спектрометрией. Обладая высокой чувствительностью, перечисленные методики требуют дорогостоящего оборудования и квалифицированного персонала для проведения сложной пробоподготовки и анализа.

Немногочисленные работы посвящены электроаналитическим методикам определения. Так, в [9] использован метод капиллярного электрофореза для выделения суммы гиперических с их последующим амперометрическим детектированием после окисления аналита на стеклоуглеродном электроде при потенциале +1.1 В. Наиболее простыми и недорогими являются спектрофотометрические методики анализа гиперического и его производных, основанные на поглощении электромагнитного излучения в видимой области спектра [10, 11]. В соответствии с [12] методика количественного определения суммы гиперических в пересчете на гиперический в траве зверобоя продырявленного включает в себя двукратную экстракцию гиперического из измельченного растительного сырья водным тетрагидрофураном, упаривание и растворение сухого остатка в метаноле с последующим измерением экстинкции при $\lambda = 590$ нм. К основным недостаткам спектрофотометрического определения гиперических относятся не очень высокая чувствительность и селективность, обусловленные вкладом других компонентов растительного сырья в аналитический сигнал в используемом диапазоне длин волн.

Известно [13], что гиперический обладает достаточно интенсивной собственной флуоресценцией, поэтому его спектрофлуориметрическое определение может стать альтернативой существующим методам анализа. Флуоресцентные методы обладают более высокой чувствительностью, селективностью, широким диапазоном определяемых концентраций и воспроизводимостью по сравнению со спектрофотометрическими методами. Важны также простота аппаратного оформления и невысокая стоимость оборудования для реализации спектрофлуориметрических методик.

Цель настоящей работы — разработка научно-методических основ количественного определения гиперического в лекарственных средствах и растительном сырье с помощью флуоресцентной спектроскопии. Для этого необходимо получить стандартный образец гиперического из настойки “Диাগиперон”, подобрать оптимальные условия для спектрофлуориметрического определения гиперического в лекарственных средствах и растительном сырье с учетом наличия в экстракте травы зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* значительного количества хлорофилла и сравнить результаты спектрофлуориметрического определения гиперического с данными, полученными по спектрофотометрическим методикам согласно [12, 14].

Эксперимент. Для получения стандартного образца гиперического использовали настойку “Диাগиперон” (НПУП “Диалек”), представляющую собой экстракт травы зверобоя продырявленного в 70 % этаноле. Выделение гиперического проводили методом ТСХ на хроматографических пластинках TLC Silica gel 60 (Merck Millipore) размером 20×20 см. На линию старта непрерывной полосой наносили

280 мкл настойки. В качестве элюента использовали систему этилацетат:уксусная кислота в соотношении 50:5. После завершения хроматографического процесса пластинку сушили на воздухе без доступа света. Затем полосу с $R_f = 0.61$ (гиперицин) соскребали с пластинки и из полученного силикагеля двукратной экстракцией этилацетатом получали раствор стандартного образца гиперицина. Экстракт упаривали досуха на роторном испарителе RV 8 (ИКА) при температуре 35 °С.

Хроматомасс-спектрометрический анализ выделенного гиперицина проводили на хроматомасс-спектрометре Waters Micromass ZQ 2000, оснащенном колонкой Waters Symmetry C18 250×4.6 мм, 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали градиент ацетонитрила (раствор А) и 0.01 М водного раствора ацетата аммония (раствор Б) (А:Б, %: 0 мин — 15:85; 0—5 мин — 30:70; 5—10 мин — 45:55; 10—15 мин — 60:40; 15—20 мин — 75:25; 20—40 мин — 90:10). Скорость потока 1 мл/мин.

Электронные спектры поглощения в диапазоне $\lambda = 450\text{—}800$ нм и экстинкция при 590 нм зарегистрированы на спектрофотометре Specord 200 Plus (Analytik Jena) с применением кювет толщиной 1 см. Спектрофлуориметрические измерения при $\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм и испускания $\lambda_{\text{исп}} = 592$ нм с шириной щелей 2.5 нм проводили на спектрофлуориметре FP-8500 (Jasco).

Растворы гиперицина для построения калибровочной зависимости в интервале концентраций $(0.20\text{—}2.06) \cdot 10^{-6}$ М готовили последовательным разбавлением раствора стандартного образца (в метаноле) с концентрацией $4.12 \cdot 10^{-6}$ М. Экстракт травы зверобоя продырявленного в метаноле получали по методике [12].

Результаты и их обсуждение. Выделенный гиперицин растворяли в метаноле и регистрировали электронный спектр поглощения полученного раствора (рис. 1). Наблюдаются характерные для гиперицина полосы поглощения с максимумами при 550 и 590 нм, что соответствует данным [11, 15]. Подтверждением хроматографической чистоты стандартного образца являются хроматограмма и масс-спектр (рис. 2) выделенного гиперицина. Гиперицин представлен единственным хроматографическим пиком с временем удержания 23.10 мин, имеющим в масс-спектре характерный сигнал молекулярного иона $[M - H]^+$ с m/z 504.05.

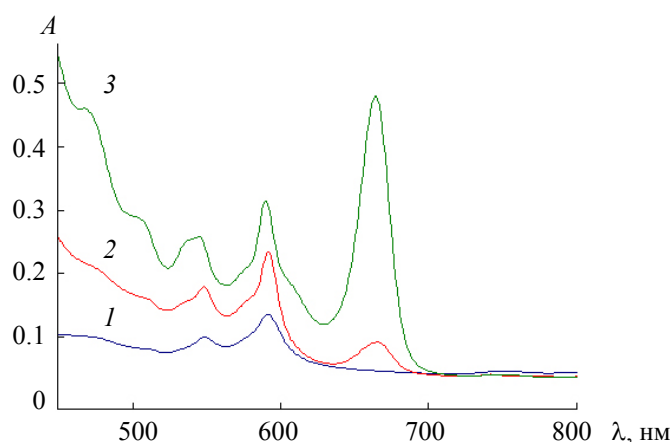


Рис. 1. Электронные спектры поглощения: 1 — раствор выделенного гиперицина в метаноле; 2 — настойка “Диাগиперон”; 3 — экстракт травы зверобоя продырявленного в метаноле

В электронных спектрах поглощения настойки “Диাগиперон” и экстракта травы зверобоя продырявленного в метаноле (рис. 1) помимо характерных для гиперицина полос наблюдается полоса поглощения с $\lambda_{\text{max}} = 665$ нм, обусловленная присутствием хлорофилла [15—17]. Интенсивная полоса поглощения хлорофилла может частично накладываться на аналитическую полосу гиперицина и искажать результаты спектрофотометрического определения гиперицина в экстрактах растительного сырья.

Для оценки влияния хлорофилла на флуоресценцию гиперицина зарегистрированы спектры испускания экстракта травы зверобоя продырявленного в метаноле при различных длинах волн возбуждения (рис. 3, а). В спектрах испускания наблюдаются максимумы при 592 и 640 нм, характерные для гиперицина [15, 18, 19], а также максимум при 670 нм, обусловленный наличием хлорофилла [20, 21]. Анализ полученных спектров испускания позволил выбрать длину волны возбуждения гиперицина

470 нм как оптимальную для количественного определения гиперидина в лекарственных средствах и растительном сырье, так как при данной $\lambda_{\text{возб}}$ флуоресценция хлорофилла сводится к минимуму. В [22—25] также использована $\lambda_{\text{возб}} = 470\text{—}476$ нм для регистрации спектров испускания гиперидина. Как видно из рис. 3, б, в спектре испускания настойки “Диাগиперон” флуоресценция хлорофилла не наблюдается.

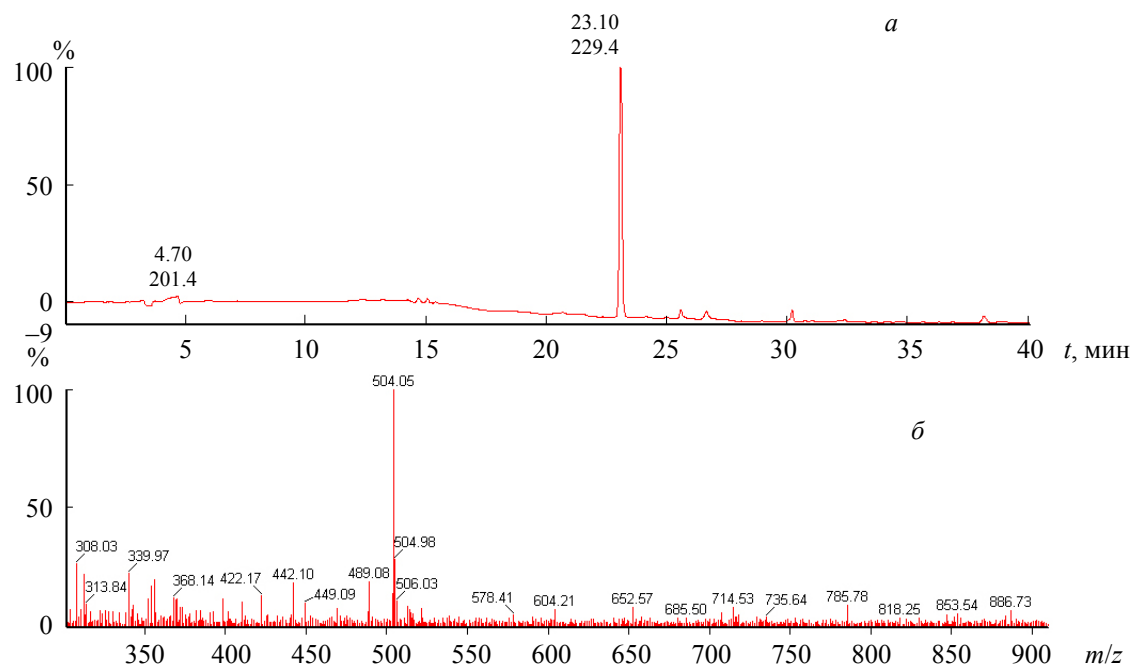


Рис. 2. Хроматограмма (а) и масс-спектр (б) выделенного гиперидина

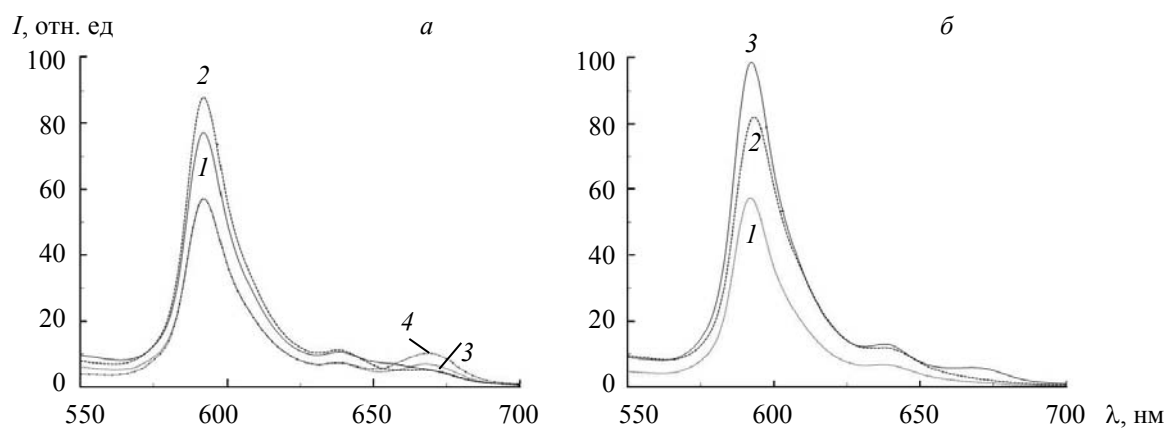


Рис. 3. Спектры испускания: а — экстракт травы зверобоя продырявленного в метаноле при $\lambda_{\text{возб}} = 450$ (1), 470 (2), 490 (3) и 510 нм (4); б — раствор стандартного образца гиперидина (1), настойка “Диাগиперон” (2) и экстракт травы зверобоя продырявленного в метаноле (3) при $\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм

Для количественного определения гиперидина в настойке “Диাগиперон” и в траве зверобоя продырявленного построена калибровочная зависимость интенсивности флуоресценции растворов гиперидина в метаноле от его концентрации (рис. 4). По полученным интенсивностям аналитического сигнала при $\lambda_{\text{исп}} = 592$ нм с учетом разбавлений определено содержание гиперидина в образцах (табл. 1). Для сравнения результатов количественного определения гиперидина, полученных методом флуоресцентной спектроскопии, применяли спектрофотометрические методики анализа настойки

“Диাগиперон” [14] и травы зверобоя продырявленного [12] (табл. 1). В вышеуказанной нормативной документации удельный показатель поглощения гиперидина при 590 нм в этаноле составляет 718, в метаноле 870. При этом приводятся коэффициенты молярного поглощения гиперидина в пределах $(4.0\text{—}4.6) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в этаноле [22, 26, 27] и $(3.4\text{—}5.2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в метаноле [28]. Спектрофотометрическое и спектрофлуориметрическое определение гиперидина в настойке “Диাগиперон” и в траве зверобоя продырявленного дает схожие результаты, которые соответствуют нормированному содержанию гиперидина в исследуемых образцах согласно [12, 14].

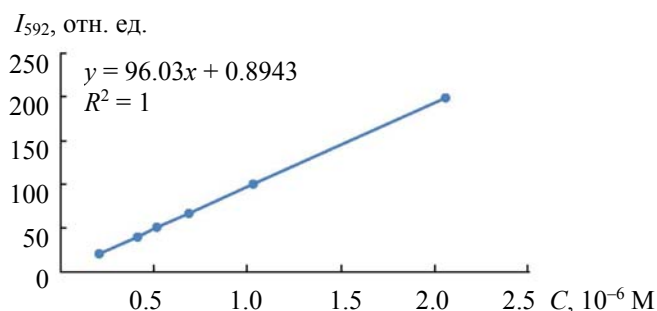


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции растворов гиперидина в метаноле от его концентрации

Т а б л и ц а 1. Результаты количественного определения гиперидина в настойке “Диাগиперон” и в траве зверобоя продырявленного

Гиперидинсодержащий образец	Спектрофлуориметрия		Спектрофотометрия
	$C, \text{ M}$	$X, \%$	$X, \%$
Настойка “Диাগиперон”	$3.25 \cdot 10^{-4}$	0.018 ± 0.0006	0.016 ± 0.0015
Трава зверобоя продырявленного	$5.33 \cdot 10^{-5}$	0.084 ± 0.0009	0.086 ± 0.0012

Примечание: C — молярная концентрация гиперидина в настойке/экстракте; X — содержание гиперидина в настойке/экстракте; результаты представлены как среднее значение трех независимых измерений \pm стандартное отклонение.

Заклучение. С применением хроматографически чистого гиперидина, полученного из настойки “Диাগиперон” методом тонкослойной хроматографии, подобраны условия спектрофлуориметрического определения гиперидина в гиперидинсодержащих образцах, которые исключают влияние хлорофилла. Спектрофотометрическое определение гиперидина, выполненное по фармакопейным методикам, показало, что полученные значения содержания гиперидина в настойке “Диাগиперон” и в траве зверобоя продырявленного соответствуют нормированным. Сходство результатов, полученных двумя спектральными методами, свидетельствует о том, что хлорофилл не оказывает влияния на количественное определение гиперидина. Таким образом, флуоресцентная спектроскопия может быть использована в качестве альтернативного метода для количественного определения гиперидина в лекарственных средствах и растительном сырье.

Работа выполнена в рамках задания “Разработать методику спектрофлуориметрического определения гиперидина в лекарственных средствах” подпрограммы “Фармакология и фармация” Государственной программы научных исследований “Химические технологии и материалы” на 2016—2020 гг. (Беларусь).

- [1] M. Y. Mir, S. Hamid, A. N. Kamili, Q. P. Hassan. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, **28**, N 4 (2019) 357—373
- [2] V. A. Huck-Pezzei, L. K. Bittner, J. D. Pallua, H. Sonderegger, G. Abel, M. Popp, G. K. Bonn, C. W Huck. *Anal. Methods*, **5**, N 3 (2013) 616—628
- [3] A. Agapouda, A. Booker, T. Kiss, J. Hohmann, M. Heinrich, D. Csupor. *J. Pharm. Pharmacol.*, **71**, N 1 (2019) 15—37
- [4] R. Doležal, I. Houdková, H. Kalász, R. Andryš, M. Novák, N. V. Maltsevskaya, N. Karásková, K. Kolář, E. Novotná, K. Kuča, J. Ž. Karasova. *Anal. Lett.*, **52**, N 11 (2019) 1788—1812
- [5] S. Puri, G. Handa, A. K. Kalsotra, V. K. Gupta, A. S. Shawl, O. P. Suri, G. N. Qazi. *J. Chromatogr. Sci.*, **44**, N 4 (2006) 177—180
- [6] W. Li, J. F. Fitzloff. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **765**, N 1 (2001) 99—105
- [7] A. Zotou, Z. Loukou. *Chromatographia*, **54**, N 3-4 (2001) 218—224
- [8] A. G. Jensen, C. Cornett, L. Gudiksen, S. H. Hansen. *Phytochem. Anal.*, **11**, N 6 (2000) 387—394
- [9] U. Rückert, K. Eggenreich, W. Likussar, R. Wintersteiger, A. Michelitsch. *Phytochem. Anal.*, **17**, N 3 (2006) 162—167
- [10] В. А. Куркин, О. Е. Правдивцева. *Хим.-фарм. журн.*, **42**, № 10 (2008) 39—42
- [11] Н. А. Коваленко, Г. Н. Супиченко, В. Н. Леонтьев, О. В. Стасевич. *Тр. БГТУ*, № 4 (2013) 224—227
- [12] А. А. Шеряков. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Общие и частные фармакопейные статьи, Минск (2007) 346—348
- [13] Q. Liu, F. Wackenhut, O. Hauler, M. Scholz, S. zur Oven-Krockhaus, R. Ritz, P. M. Adam, M. Brecht, A. J. Meixner. *J. Phys. Chem. A*, **124**, N 12 (2020) 2497—2504
- [14] ФСЦП РБ 2563-18. Диагиперон
- [15] D. Skalkos, E. Gioti, C. D. Stalikas, H. Meyer, T. G. Papazoglou, G. Filippidis. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **82**, N 2 (2006) 146—151
- [16] R. J. Ritchie. *Photosynth. Res.*, **89**, N 1 (2006) 27—41
- [17] P. Delcanale, C. Hally, S. Nonell, S. Bonardi, C. Viappiani, S. Abbruzzetti. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **19**, N 3 (2020) 324—331
- [18] M. Bublik, C. Head, P. Benharash, M. Paiva, A. Eshraghi, T. Kim, R. Saxton. *Photomed. Laser Surg.*, **24**, N 3 (2006) 341—347
- [19] A. Kubin, H. G. Loew, U. Burner, G. Jessner, H. Kolbabeck, F. Wierrani. *Pharmazie*, **63**, N 4 (2008) 263—269
- [20] T. I. Na Ayudhya, F. T. Posey, J. C. Tyus, N. N. Dingra. *J. Chem. Educ.*, **92**, N 5 (2015) 920—923
- [21] M. Saleem, N. Ahmad, H. Ali, M. Bilal, S. Khan, R. Ullah, M. Ahmed, S. Mahmood. *Laser Phys.*, **27**, N 12 (2017), <https://doi.org/10.1088/1555-6611/aa8cd7>
- [22] L. Liebes, Y. Mazur, D. Freeman, D. Lavie, G. Lavie, N. Kudler, S. Mendoza, B. Levin, H. Hochster, D. Meruelo. *Anal. Biochem.*, **195**, N 1 (1991) 77—85
- [23] С. В. Дирда, О. В. Слободянюк, В. М. Ящук, М. Ф. Гамалія, П. В. Єрмак. *Клін. та експерим. патол.*, **11**, № 1 (2012) 51—54
- [24] A. Uzdensky, V. Iani, L. W. Ma, J. Moan. *Med. Laser Appl.*, **21**, N 4 (2006) 271—276
- [25] Н. А. Коваленко, А. В. Янцевич, Г. Н. Супиченко, В. Н. Леонтьев. *Тр. БГТУ*, № 4 (2015) 207—210
- [26] D. S. English, K. Das, K. D. Ashby, J. Park, J. W. Petrich, E. W. Castner. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, N 48 (1997) 11585—11590
- [27] G. H. Constantine, J. Karchesy. *Pharm. Biol.*, **36**, N 5 (1998) 365—367
- [28] A. Wirz. Analytical and Phytochemical Investigations on Hypericin and Related Compounds of *Hypericum perforatum*, Zurich, ETH Zurich (2000) 54—56