

УДК 543.426,543.94,615.322

## ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРТЕМИЗИНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ПИРОНИН-Б–МИКРОПЕРОКСИДАЗА-11

© 2019 г. С. В. Мугинова<sup>1</sup>, Е. С. Вахранева<sup>1</sup>, Д. А. Мясникова<sup>2</sup>, Т. Н. Шеховцова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет  
119991 Россия, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, 1, стр. 3

<sup>2</sup>Йокогамский национальный университет, факультет инженерии  
240-8501, Япония, Йокогама, Ходогая-ку, Токивадай 79-5

\*E-mail: tnshekh@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.11.2017 г.

После доработки 10.04.2018 г.

Принята к публикации 10.04.2018 г.

С использованием биомиметика пероксидазной активности микропероксидазы-11 разработана чувствительная, экспрессная и простая флуориметрическая методика определения артемизинина в диапазоне концентраций 0.1–7 мкМ,  $s_r = 0.008$  (при  $c_n$ ,  $n = 5$ ),  $c_{\text{мин}} = 7.1$  нМ ( $3s_0$ ). Определение основано на тушении флуоресценции катионного ксантенового красителя пиронина Б (штерн-фольмеровская константа тушения – 0.101 мкМ<sup>-1</sup>) в присутствии микропероксидазы-11. Разработанная методика апробирована при анализе биологически активной добавки на основе экстракта полыни *Artemisia annua*. Правильность результатов флуориметрического определения артемизинина в биологически активной добавке подтверждена методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии. Применение олигопептида микропероксидазы-11 вместо гемсодержащих белков (гемоглобина, цитохрома *c* и пероксидазы хрена) позволяет сократить продолжительность определения артемизинина в 2 раза при сохранении чувствительности и селективности.

**Ключевые слова:** артемизинин, микропероксидаза-11, пиронин Б, тушение флуоресценции.

**DOI:** 10.1134/S0044450218120071

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения наиболее эффективными средствами для лечения тропической малярии во всем мире являются комбинированные фармацевтические препараты на основе артемизинина и его производных [1]. Артемизинин представляет собой сесквитерпеновый лактон с 1,2,4-триоксановым гетероциклическим ядром (рис. 1, структура I). Этот фрагмент молекулы, так называемый “фармакофор”, содержит эндопероксидный мостик, который определяет антималярийную активность артемизинина [2]. Сырьем для получения артемизинина служит полынь однолетняя *Artemisia annua* L., которую культивируют в Восточной Азии и Африке в медицинских целях [3]. В Российской Федерации полынь *Artemisia annua* L. произрастает на территории Республики Бурятия [4]. За исследования по выделению артемизинина из полыни однолетней, установление его структуры и обнаружение антималярийного действия (1972 г.) китайский фармаколог Ту Юю была удостоена Нобелевской премии по физиологии и медицине в 2015 г.

В последние годы повышенный научный интерес к артемизинину обусловлен его способностью подавлять не только активность малярийного плазмодия, но и раковых клеток, ряда вирусов,

микробов, грибов, а также простейших и гельминтов [5]. Хотя содержащие артемизинин биологические добавки (БАД) и *Artemisia annua* чай пока не рекомендованы к использованию в традиционной медицине в России и за рубежом, отмечен эффективный ответ раковых опухолей у человека *in vitro* [6, 7] и животных *in vivo* [8] на лечение растительными препаратами на основе артемизинина. Есть мнение, что как и в случае малярийного плазмодия, гем опухолевой клетки (точнее Fe(II) в нем) может служить возможным медиатором и молекулярной мишенью артемизинина [2]. В индикаторных системах для химического анализа гемсодержащие белки могут имитировать гем малярийного плазмодия или опухолевой клетки при взаимодействии с артемизинином.

Ранее для чувствительного косвенного флуоресцентного определения артемизинина в плазме крови и моче использовали гемсодержащие белки (гемоглобин и цитохром *c*), а также металлоферменты (пероксидаза хрена и тирозиназа) в сочетании с катионным красителем пиронином Б (ПБ) (рис. 1, структура II) [9–12]. Разработанные методики основаны на тушении флуоресценции ПБ артемизинином при 545–547 нм (в зависимости от природы белка),  $\lambda_{\text{возб}} = 345$  нм. По мнению авторов

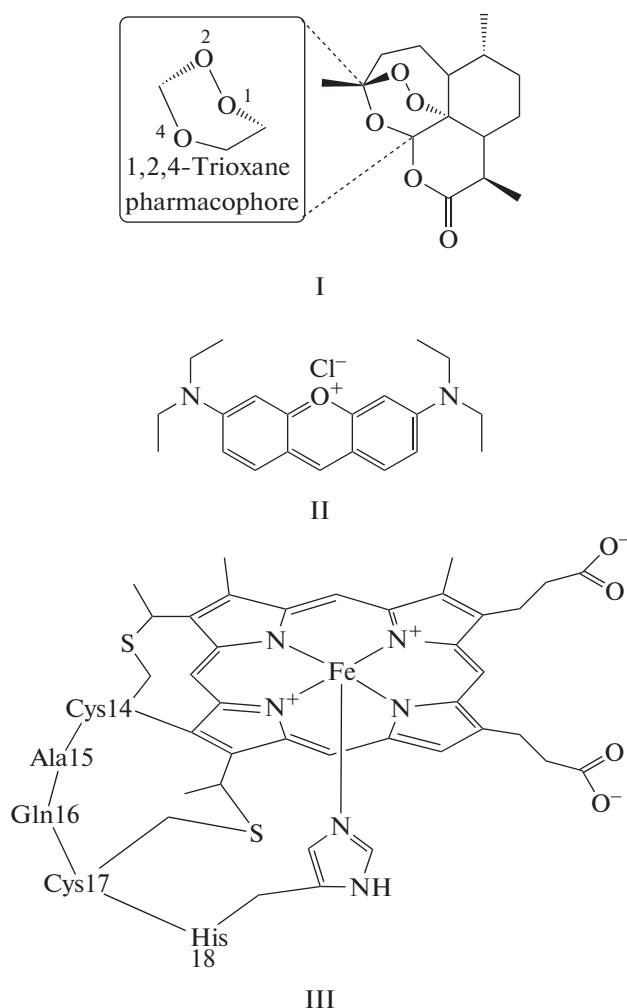


Рис. 1. Графические формулы артемизинина (I) [2], пиронина Б (II) и микропероксидазы-11 (III).

работ [9–12], биомолекулы служили катализаторами реакции окисления ПБ артемизинином, который выступал в роли субстрата-окислителя подобно  $H_2O_2$ . Заметим, что артемизинин при указанных выше условиях не флуоресцирует. Спектр поглощения его водного раствора с концентрацией 10 мкМ характеризуется интенсивным максимумом поглощения вне ближней УФ-области ( $\lambda < 200$  нм), прилегающим к нему плечом ( $\epsilon_{220} \sim 10^3$ ) и очень слабым “хвостом” в области  $>300$  нм [13].

Для настоящего исследования мы выбрали микропероксидазу-11 (МП) из лошадиного сердца, водорастворимый олигопептид, полученный протеолитическим расщеплением цитохрома *c*. Каталитический центр МП представляет собой железопорфирин с ковалентно связанными с ним одинацатью аминокислотными остатками (рис. 1, структура III) [14]. Микропероксидазу-11 успешно применяют для определения  $H_2O_2$  в амперометрических биосенсорах [15] и оптических биосенсорах на основе поверхностного плазмонного резонанса

[16]. Основное преимущество МП перед цитохромом *c* и другими гемсодержащими белками (гемоглобином, пероксидазой хрена) состоит в стерически незатрудненном пространственном окружении гема, что, по нашему мнению, должно облегчать подход молекулы артемизинина к железу(II). Благодаря применению МП совместно с ПБ мы рассчитывали улучшить аналитические характеристики методик флуориметрического определения артемизинина, в том числе и недавно разработанной нами методики на основе системы Mn(II)–додецилсульфат натрия–ПБ [17]. Исследования по созданию чувствительных и простых оптических аналитических систем для определения артемизинина в фармацевтических препаратах, БАДах, экстрактах и растительном сырье по-прежнему актуальны в связи с потребностью экспрессного контроля качества указанных объектов.

Цель настоящего исследования состояла в разработке методики флуоресцентного определения артемизинина с использованием системы ПБ–МП и апробация ее при анализе БАД на основе экстракта полыни *Artemisia annua*. Дополнительный научный интерес представляло сравнение аналитических возможностей МП и использованных ранее гемсодержащих белков и металлоферментов для флуоресцентного определения артемизинина в системах с ПБ, оценка возможности их взаимозаменяемости.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Исходные вещества.** Из-за низкой растворимости артемизинина в воде (1.21 мг/мл при 37°C [18]) его исходные 5 мМ растворы готовили растворением навесок препарата (Сигма, США) в этаноле, метаноле и диметилсульфоксиде (ДМСО) (ч. д. а., Химмед, Россия) в посуде из темного стекла. Исходные растворы артемизинина хранили при 4°C и использовали в течение 5 дней. Рабочие 3 и 30 мкМ растворы артемизинина готовили разбавлением исходных растворов водой и использовали в день приготовления. Для приготовления всех водных растворов использовали деионизированную воду, очищенную на установке Миллипор (Франция), с удельным сопротивлением не более 18.2 МОм см (25°C).

Для обеспечения мономерной формы ПБ в водном растворе и предотвращения возможной агрегации красителя [19] его рабочий 30 мкМ раствор готовили ежедневно растворением в воде навески твердого препарата (ОАО “Опытно-экспериментальный завод” ИРЕА, Москва). Качество препарата ПБ проверяли методом ТСХ путем нанесения 1%-ного водного раствора красителя на нормально-фазовую силикагелевую пластинку со стеклянной подложкой Аналтех (Ньюарк, США), подвижная фаза – смесь *n*-бутанол–вода– $CH_3COOH$  (10 : 2 : 1, по объему) [20]. После полного высыхания ТСХ-пластинки на воздухе получали одно пятно розового цвета с  $R_f = 0.81$ . Отсутствие ионов

Fe(III) в препарате ПБ подтверждали качественной реакцией с  $\text{NH}_4\text{SCN}$ . Рабочий 50 мкМ раствор МП готовили растворением твердого препарата двуназиевой соли МП из лошадиного сердца ( $M_r = 1861.92$ , р/4.7; Сигма, США) в 10 мМ фосфатном буферном растворе (ФБР) с рН 7.0 и использовали в день приготовления. Концентрацию раствора МП устанавливали спектрофотометрически,  $\epsilon_{395} = 1.76 \times 10^5$  [21]. Твердый препарат МП хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Универсальный буферный раствор (УБР) готовили смешением 0.04 М растворов уксусной, борной и ортофосфорной кислот с добавлением необходимого количества 0.2 М раствора NaOH в зависимости от требуемого рН. Цитратный, цитратно-фосфатный буферные растворы и ФБР (0.1 М и 10 мМ) готовили, как описано в работе [22]. Применяли 11.2 М раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  без стабилизатора (Мерк, Германия), точную концентрацию которого устанавливали спектрофотометрически,  $\epsilon_{230} = 72.7$  [23]. Рабочие растворы  $\text{H}_2\text{O}_2$  с меньшими концентрациями готовили ежедневно разбавлением концентрированного раствора водой. Рабочие 0.1 М растворы глюкозы и фруктозы готовили растворением навесок их твердых препаратов (Сигма, США) в воде и использовали в день приготовления. Рабочие растворы солей Fe(III), Co(II), Cu(II) и Mg(II) с концентрацией ионов металлов 1 мг/мл готовили разбавлением водой государственных стандартных образцов № 7766-2000, 7784-2000, 7764-2000 и 7767-2000 (Экоаналитика, Россия) соответственно. Рабочий раствор Fe(II) (1 мг/мл) готовили разбавлением водой стандартизованного по дихромату калия раствора соли Мора.

**Аппаратура.** Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Шимадзу RF 5301 (Япония,  $l = 1$  см, ширина входной и выходной щелей – 5 нм). Для регистрации спектров поглощения растворов и изучения кинетики реакции использовали спектрофотометр Шимадзу UV mini-1240A (Япония,  $l = 1$  см) с погрешностью  $\pm 0.0003$  опт. ед. Измеряли рН буферных растворов на рН-метре–иономере Эксперт–001 (Россия) с погрешностью  $\pm 0.01$  ед. рН. Для проведения экстракции использовали шейкер ELMIS-3.16L (Латвия). Для фиксирования времени проведения реакций использовали секундомер фирмы Агат (Россия), погрешность  $\pm 0.2$  с. Для отбора определенных объемов растворов реагентов применяли микродозаторы Биохит (Финляндия) и Эппендорф (США).

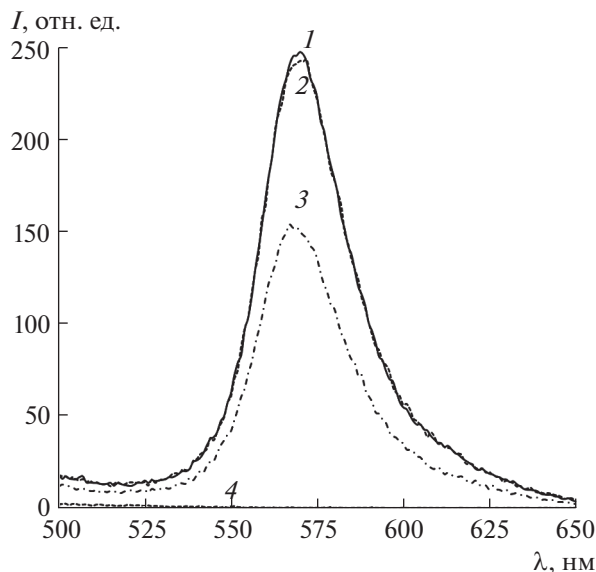
**Методика выполнения реакции между пиронином Б и артемизинином в присутствии микропероксидазы-11.** В пробирку емк. 5 мл последовательно вносили 75–1200 мкл 30 мкМ раствора ПБ, 12.5–500 мкл 50 мкМ раствора МП, 0–100 мкл 30 мкМ водно-органического раствора артемизинина (95 : 5, по объему), 0–100 мкл органического растворителя (метанол, этанол или ДМСО) так, чтобы объем органического растворителя оставался постоянным и равным 100 мкл, и необходимое количество буфер-

ного раствора с рН 3.5–6.8 до конечного объема 3.0 мл. Раствор перемешивали, переливали в кювету, выдерживали 1 мин и либо регистрировали спектры флуоресценции в интервале длин волн 500–650 нм, либо измеряли величины интенсивности флуоресценции в отсутствие ( $I_0$ ) и в присутствии ( $I$ ) артемизинина ( $\lambda_{\text{фл}}/\lambda_{\text{возб}} = 569/345$  нм). При проведении контрольного опыта вместо раствора артемизинина вводили такой же объем органического растворителя. Для расчета погрешности отношений интенсивностей флуоресценции ( $I_0/I$ ) здесь и далее применяли программу GraphPad.

**Методика определения артемизинина в модельных растворах методом градуировочной зависимости.** В пробирку емк. 5 мл последовательно вносили 200 мкл 30 мкМ раствора ПБ; 240 мкл 50 мкМ раствора МП; 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 мкл 30 мкМ или 10, 50 мкл 3 мкМ этанольного раствора артемизинина; затем такой объем этанола, чтобы его общий объем в системе оставался постоянным (100 мкл), после чего объем реакционного раствора доводили до 3.00 мл с помощью УБР с рН 5.9. Раствор перемешивали, переливали в кювету, выдерживали 1 мин и измеряли интенсивность флуоресценции ( $\lambda_{\text{фл}}/\lambda_{\text{возб}} = 569/345$  нм) в отсутствие и в присутствии артемизинина. По полученным данным рассчитывали отношение интенсивностей и строили градуировочную зависимость в координатах  $I_0/I - c_{\text{артемизинин}}$  (мкМ).

**Подготовка БАД к анализу.** Для извлечения артемизинина из образца БАД использовали экстракцию этанолом [17]. Белый порошок из капсул БАД помещали в фарфоровую ступку и тщательно растирали. Затем навеску порошка (0.2540 г) растворяли в 20.0 мл этанола в течение 2 ч при постоянном встряхивании на шейкере. Не растворившиеся в этаноле целлюлозу и стеарат магния (вспомогательные компоненты БАД) отфильтровывали через фильтр марки “синяя лента”. Далее 30 мкл фильтрата разбавляли этанолом до 1.5 мл. Аликвоты полученного раствора вводили в реакционную смесь.

**Методика определения артемизинина в БАД методом добавок.** В пробирку емк. 5 мл вводили последовательно 200 мкл 30 мкМ раствора ПБ, 240 мкл 50 мкМ раствора МП, 10 мкл анализируемого раствора и 10 мкл стандартного раствора артемизинина в качестве добавки (концентрации в реакционной смеси 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 мкМ). Суммарный объем реакционной смеси после ее разбавления УБР с рН 5.9 составлял 3.0 мл. Градуировочную зависимость строили в координатах  $(I_0/I - 1) - c_{\text{артемизинин}}$  (мкМ) в диапазоне концентраций артемизинина 0.5–2.5 мкМ. Погрешность определения артемизинина методом добавок оценивали методом экстраполяции, как указано в работе [24]. Правильность определения артемизинина в БАД подтверждали методом ВЭЖХ–



**Рис. 2.** Спектры флуоресценции системы ПБ–МП в отсутствие (1, 2) и в присутствии артемизинина (3) и МП (4). Условия реакции: УБР, pH 6.0,  $c_{\text{ПБ}} = 2 \text{ мкМ}$  (1–3),  $c_{\text{МП}} = 5 \text{ мкМ}$  (1–4),  $c_{\text{артемизинина}} = 5 \text{ мкМ}$  (3),  $c_{\text{этанолола}} = 5 \text{ об. \%}$  (1–3), продолжительность реакции 2 мин;  $\lambda_{\text{возб}} = 345 \text{ нм}$ .

масс-спектрометрии (МС), используя описанную нами ранее методику [17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор условий регистрации флуоресценции в системе пиронин Б–микропероксидаза–11–артемизинин.** Действие артемизинина на флуоресцентный сигнал ПБ в присутствии МП исследовали в условиях, описанных для цитохрома *c* [9]. Спектры флуоресценции реакционных растворов смеси ПБ–МП в отсутствие и в присутствии 5 мкМ артемизинина (рис. 2) регистрировали после облучения их светом с длиной волны 345 нм, как рекомендовано для систем с применением других биомолекул [9–12]. Как видно из рис. 2 (спектр 1), в условиях нашего эксперимента максимум свечения ПБ лежит при 569 нм, т.е. батохромно сдвинут относительно полосы испускания красителя 545–547 нм [9–12]. На наш взгляд, этот сдвиг может быть обусловлен применением твердого препарата ПБ другого производителя. При добавлении артемизинина к смеси ПБ–МП в УБР (pH 6.0) интенсивность флуоресценции ПБ в максимуме уменьшается на 90 усл. ед. по сравнению с контрольным опытом (в отсутствие артемизинина и в присутствии этанола) (рис. 2, спектры 2 и 3). В интервале длин волн 550–590 нм, в котором ПБ интенсивно флуоресцирует, МП уменьшает флуоресценцию красителя не более чем на 2 усл. ед. в отсутствие собственного излучения (рис. 2, спектры 2 и 4 соответственно). Это свидетельствует о перспективности использования системы ПБ–МП для разработки методики определе-

ния артемизинина по тушению флуоресценции ПБ ( $\lambda_{\text{фл}}/\lambda_{\text{возб}} = 569/345 \text{ нм}$ ). Отметим, что при возбуждении флуоресценции ПБ при длине волны 552 нм, соответствующей характеристическому максимуму его поглощения в водном и водно-спиртовых растворах [25, 26], интенсивности флуоресценции ПБ в максимуме (574 нм) в отсутствие и в присутствии артемизинина различались не более чем на 15 усл. ед. при прочих равных условиях. Таким образом, для возбуждения флуоресценции ПБ в целях определения артемизинина лучше использовать излучение с  $\lambda_{\text{возб}} = 345 \text{ нм}$ , которое соответствует значительно менее интенсивному по сравнению с основным (552 нм) максимуму поглощения красителя. Более того, возбуждение свечения в системе ПБ–МП–артемизинин при 345 нм позволяет адекватно сравнивать степень тушения флуоресценции ПБ артемизинином в присутствии олигопептида и исследованных ранее белков [9–12].

При выборе условий (pH и природа буферного раствора, концентрации ПБ и МП, природа и содержание органического растворителя в растворе артемизинина и время реакции), при которых тушение флуоресценции ПБ артемизинином в присутствии МП наиболее эффективно, придерживались методики, описанной в “Экспериментальной части”. Работу проводили при постоянной концентрации артемизинина в реакционном растворе, равной 5 мкМ. Оптимальными считали параметры, при которых достигались наибольшая степень тушения флуоресценции ПБ, характеризуемая отношением  $I_0/I$ , и высокая воспроизводимость результатов. Работу проводили при комнатной температуре для обеспечения постоянной степени агрегации МП.

**Выбор pH и природы буферного раствора.** Как видно из представленной на рис. 3 зависимости  $I_0/I$  от pH, степень тушения флуоресценции ПБ артемизинином в УБР максимальна в диапазоне pH 5.3–6.2, однако наилучшая воспроизводимость результатов измерений достигалась при pH 5.9 ( $s_r = 0.003$ ,  $n = 5$ ). Кроме того, при pH 5.9 величина  $I_0/I$  возрастает в ряду буферных растворов: ФБР (1.13) = цитратный (1.13) < цитратно-фосфатный (1.26) < УБР (1.47). Таким образом, в качестве рабочего буферного раствора обоснованно выбрали УБР с pH 5.9.

**Выбор природы и содержания органического растворителя.** Поскольку ПБ [26] и МП [27] чувствительны к присутствию органического растворителя в системе, изучили зависимость интенсивности флуоресценции ПБ от природы органического растворителя, использованного для приготовления исходного раствора артемизинина. В работе применяли 30 мкМ рабочие растворы артемизинина, содержащие 5 об. % одного из органических растворителей (метанол, этанол или ДМСО). Растворимость артемизинина (мг/мл)

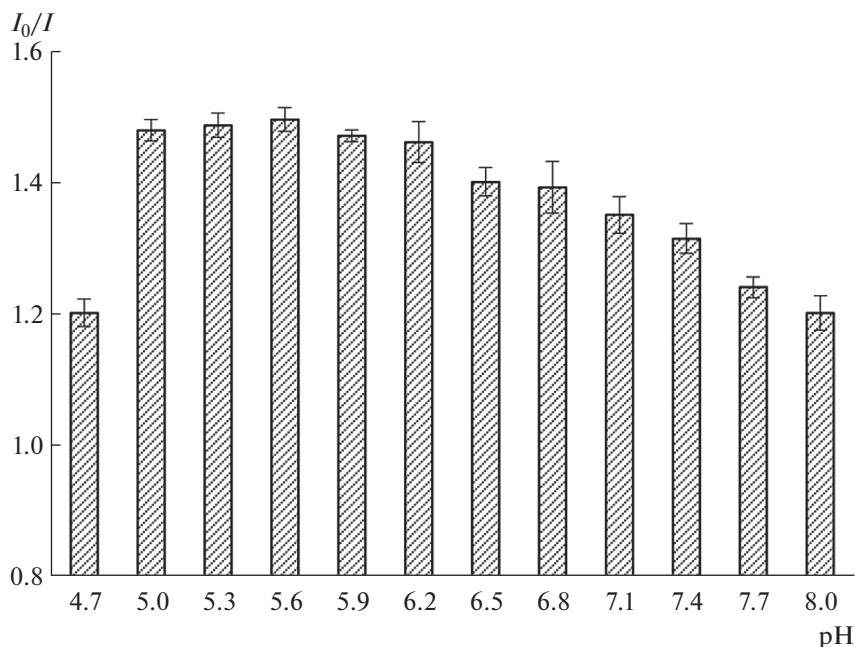


Рис. 3. Зависимость величины  $I_0/I$  в системе ПБ–МП от pH. Условия реакции: УБР,  $c_{\text{ПБ}} = 2$  мкМ,  $c_{\text{МП}} = 5$  мкМ,  $c_{\text{артемизинина}} = 5$  мкМ, продолжительность реакции 2 мин;  $\lambda_{\text{фл}}/\lambda_{\text{возб}} = 569/345$  нм;  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ .

при 25°C повышается в ряду: ДМСО (10) < метанол (12.8) < этанол (28.3) [28, 29]. Ранее влияние природы органического растворителя на степень тушения флуоресценции ПБ артемизинином в системах с белками [9–12] не изучали. Установили, что наилучшим растворителем для артемизинина является этанол, применение которого обеспечивает не только самый высокий сигнал контрольного опыта ( $I_0 = 247 \pm 2$  усл. ед.,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ), но и наибольшую степень тушения флуоресценции красителя. Так, отношение  $I_0/I$  возрастает в ряду растворителей: метанол (1.24) < ДМСО (1.31) < этанол (1.61).

При увеличении содержания этанола в рабочем растворе артемизинина в диапазоне 5–100 об. % степень тушения флуоресценции ПБ артемизинином практически не изменяется, однако ухудшается воспроизводимость результатов. В дальнейшем использовали рабочие растворы артемизинина, содержащие 5 об. % этанола.

**Выбор концентраций пиронина Б и микропероксидазы-11.** В качестве оптимальной выбрали концентрацию красителя 2 мкМ, выше которой величина  $I_0/I$  постоянна (рис. 4, столбцы серого цвета). При концентрациях красителя менее 2 мкМ сигналы в отсутствие и в присутствии артемизинина значимо не различаются. При концентрации МП 4 мкМ значение отношения  $I_0/I$  довольно велико (1.61) и достаточно для разработки методики определения артемизинина, основанной на тушении флуоресценции ПБ. Кроме того, величина  $I_0/I$  хорошо воспроизводима,  $s_r = 0.009$ ,  $n = 3$  (рис. 4, столбцы белого цвета).

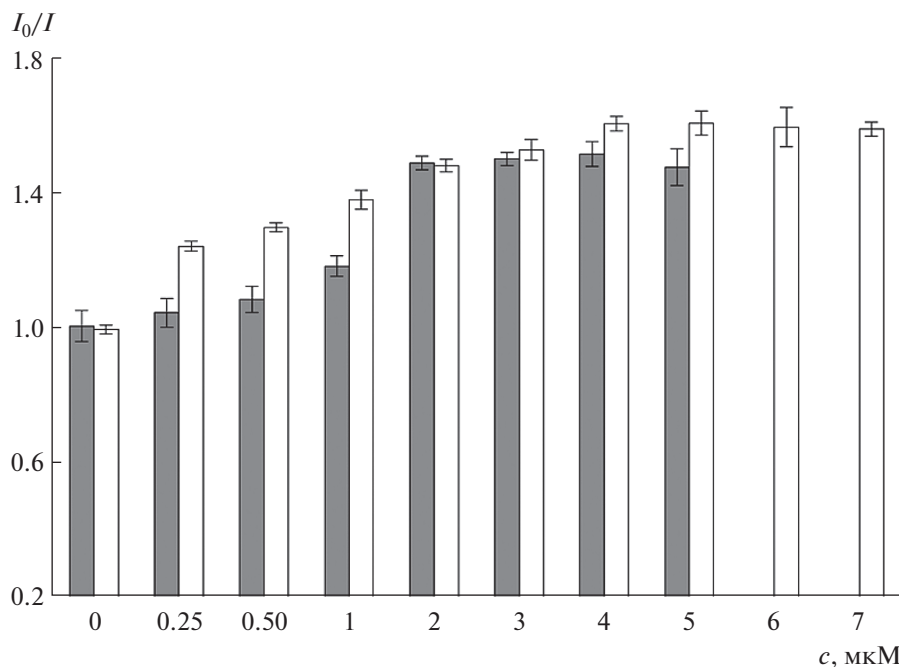
**Выбор времени проведения реакции.** Величина  $I_0/I$  уже за 1 мин достигает максимального значения (1.55) и далее в течение 10 мин значимо не изменяется. В течение изученного интервала времени сигнал контрольного опыта остается постоянным. В качестве удобного времени проведения реакции выбрали 1 мин, при этом достигаются максимальная воспроизводимость результатов ( $s_r = 0.009$ ,  $n = 3$ ) и высокая экспрессность анализа.

Таким образом, выбраны следующие условия определения артемизинина на основе тушения флуоресценции ПБ в присутствии МП: УБР с pH 5.9, концентрации ПБ и МП 2 и 4 мкМ соответственно, содержание этанола в рабочем растворе артемизинина 5 об. %, время проведения реакции – 1 мин.

**Флуориметрическое определение артемизинина в модельных растворах.** В выбранных условиях реакции разработали методику определения артемизинина. Градуировочная зависимость описывается уравнением:

$$I_0/I = (0.101 \pm 0.003)c + (1.060 \pm 0.010) \\ (n = 8, P = 0.95), r = 0.997; \\ s_r (\text{при } c_n) = 0.008 (n = 5).$$

Сопоставление диапазонов определяемых концентраций (ДОК) и значений  $c_{\text{мин}}$  для разработанной методики и приведенных в литературе (табл. 1) показало, что системы на основе ПБ с применением белков и их миметиков позволяют определять артемизинин практически в одном и том же диапазоне концентраций. Это свидетельствует о потен-



**Рис. 4.** Зависимость величины  $I_0/I$  в системе ПБ–МП от концентраций ПБ и МП. Условия реакции: УБР, pH 5.9,  $c_{ПБ} = 2$  мкМ (столбцы серого цвета),  $c_{МП} = 5$  мкМ (столбцы белого цвета),  $c_{артемизинина} = 5$  мкМ, продолжительность реакции 2 мин;  $\lambda_{фл}/\lambda_{возб} = 569/345$  нм;  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ .

циальной возможности применения любого из имеющихся в наличии реагентов.

Прямопропорциональная зависимость в координатах Штерна–Фольмера,  $I_0/I - c_{артемизинина}$  свидетельствует о существовании в растворе флуорофора одного типа. График отсекает на оси ординат отрезок, равный единице, а его наклон соответствует штерн-вольмеровской константе тушения  $0.101$  мкМ $^{-1}$ .

**Селективность определения артемизинина.** Селективность разработанной методики изучали при постоянной концентрации артемизинина (1 мкМ) и варьируемых концентрациях посторонних компонентов:  $H_2O_2$  (продукт разложения артемизинина под действием УФ-излучения [30]), ионов металлов – Fe(II), Fe(III), Mn(II), Cu(II), Mg(II), а также глюкозы и фруктозы (наполнителей порошков и таблеток). Перечисленные компоненты способны взаимодействовать с артемизинином [31]

и/или влиять на эффективность действия МП [14–16]. Полагали, что посторонний компонент не мешает определению, если в присутствии артемизинина относительная погрешность отношения  $I_0/I$  ( $\Delta$ , %) изменяется менее чем на  $\pm 5\%$  по сравнению с этой величиной в его отсутствие. Из табл. 2 видно, что это условие выполняется в присутствии всех изученных веществ, но при их различных концентрационных соотношениях с артемизинином. Пероксид водорода мешает определению артемизинина уже при 2-кратном избытке. Однако  $H_2O_2$ , так же, как и ионы переходных металлов при концентрациях, превышающих указанные в табл. 2, не могут присутствовать в БАДах и фармацевтических препаратах на основе артемизинина. Мешающее действие глюкозы и сахарозы, ограниченно растворимых в этаноле при комнатной температуре, можно устранить на этапе пробоподготовки БАД.

**Таблица 1.** Аналитические характеристики методик флуориметрического определения артемизинина с использованием ПБ в растворе

Система	ДОК, мкМ	$c_{мин},^* \text{ нМ}$	Объект анализа (время реакции)	Литература
ПБ–Цитохром $c$	0.07–1.1	7.2	Плазма крови, моча (2 мин)	[9]
ПБ–Гемоглобин	0.15–1.1	7.2	Тот же	[10]
ПБ–Пероксидаза хрена	0.14–1.3	27	»	[11]
ПБ–Тирозиназа	0.14–0.84	2.6	»	[12]
ПБ–МП	0.1–7	7.1	БАД (1 мин)	Данная работа

\* Рассчитан по  $3s_0$ -критерию.

**Таблица 2.** Селективность флуоресцентного определения артемизинина ( $c = 1 \text{ мкМ}$ ) с использованием системы ПБ–МП

Посторонний компонент	$c_{\text{опр. в-ва}} : c_{\text{постор. компонент}} \text{ (М)}$	$\Delta^*, \% (n = 5)$	
		знак	величина
Fe(II)	1 : 10	+	4.8
Fe(III)	1 : 10	+	4.5
Co(II)	1 : 20	+	4.0
Mn(II)	1 : 20	+	4.1
Cu(II)	1 : 15	+	4.9
Mg(II)	1 : 30	–	4.7
Фруктоза	1 : 50	–	4.6
Глюкоза	1 : $10^3$	+	4.7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 : 2	+	4.9

\* Относительная погрешность приведена с учетом увеличения/уменьшения сигнала при введении постороннего вещества.

**Определение артемизинина в БАД** выполняли методом добавок по методике, приведенной в “Экспериментальной части”. Уравнение градуировочной зависимости:  $(I_0/I - 1) = (0.280 \pm 0.004)c + (0.358 \pm 0.007)$  ( $n = 5, P = 0.95$ ),  $r = 0.9991$ .

Результаты флуориметрического определения артемизинина в БАД методом добавок ( $108 \pm 13 \text{ мг/капсула}$ ;  $s_r$  не превышает 0.03;  $n = 5, P = 0.95$ ) и альтернативным методом ВЭЖХ–МС [17] ( $110 \pm 5 \text{ мг/капсула}$ ;  $n = 4, P = 0.95$ ), а также заявленные производителем данные (100 мг/капсула) хорошо согласуются между собой. Критерий Стьюдента показал незначимое различие средних значений содержания артемизинина, найденных флуоресцентным и хроматографическим методами:  $t_{\text{расч}} = 1.035 (P = 0.95, f = 7) < t_{\text{крит}} = 2.365 (P = 0.95, f = 7)$ , что свидетельствует о правильности анализа. Время анализа БАД, включающего 2.5-часовую пробоподготовку, не превышает 6 ч.

\* \* \*

Таким образом, разработана экспрессная флуориметрическая методика определения артемизинина с использованием системы пиронин Б–микрпероксидаза-11, которая по чувствительности и селективности сопоставима с ранее описанными методиками на основе тушения артемизинином флуоресценции пиронина Б в присутствии гемсодержащих белков [9–12] и комплекса Mn(II)–додецилсульфат натрия [17]. Для проведения флуоресцентной реакции и одного измерения аналитического сигнала в растворе требуется не более 2 мин. Это выгодно отличает разработанную методику от наиболее чувствительных методик определения артемизинина методом ВЭЖХ с хемилюминесцентным детектированием, в которых используют до- или послеклоночную дериватизацию артемизинина, что значительно увеличивает продолжительность анализа [32, 33]. Методики определения артемизинина на основе ВЭЖХ–МС [33, 34] чувствительны, селективны и экспрессны, но

требуют дорогостоящего оборудования. Нижняя граница определяемых концентраций артемизинина по предложенной методике по крайней мере в 4 и 10 раз ниже этой величины для спектрофотометрических методик с использованием 30-минутной реакции щелочной дериватизации артемизинина в присутствии ДМСО [35] и системы из трех сопряженных реакций [36] соответственно. Только применение графитового электрода, модифицированного *in situ* полимеризованной молекулярно-импринтированной мембраной [37], позволяет определять артемизинин на уровне концентраций, в десять раз меньших, чем  $c_n$  по предложенной флуоресцентной методике.

*Авторы выражают благодарность к. х. н., научному сотруднику кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова А.Н. Ставрианиди за помощь в проведении анализа БАД методом ВЭЖХ–МС.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-03-05-064а).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *World Health Organization.* Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance: status report. Geneva: World Health Organization, 2017. 11 p.
2. *O'Neill P.M., Barton V.E., Ward S.A.* The molecular mechanism of action of artemisinin – the debate continues // *Molecules.* 2010. V. 15. № 3. P. 1705.
3. *Ellman A.* Cultivation of *Artemisia annua* in Africa and Asia // *Outlooks on Pest Management.* 2010. V. 21. № 2. P. 84.
4. *Соктоева Т.Э., Рыжова Г.Л., Дычко К.А., Хасанов В.В., Жигжитжапова С.В., Раднева Л.Д.* Содержание артемизинина в экстрактах *Artemisia annua L.*, полученных разными методами // *Химия растит. сырья.* 2011. № 4. С. 131.
5. *Ho W.E., Peh H.Y., Chan T.K., Wong W.S.* Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial // *Pharmacol. Ther.* 2014. V. 142. № 1. P. 126.
6. *Yang X., XZ W.* Main anti-tumor angiogenesis agents isolated from Chinese herbal medicines // *Mini Rev. Med. Chem.* 2015. V. 15. № 12. P. 1011.

7. *Das A.K.* Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds // *Ann. Med. Health Sci. Res.* 2015. V. 5. № 2. P. 93.
8. *Breuer E., Efferth T.* Treatment of iron-loaded veterinary sarcoma by *Artemisia annua* // *Nat. Prod. Bioprospect.* 2014. V. 4. № 2. P. 113.
9. *Chen L., Yin H., Yang Z., Zhang K., Liu L., Shen H.* Fluorescence determination of artemisinin using cytochrome *c* as catalyst and pyronine B as indicator // *Chin. J. Anal. Chem.* 2006. V. 36. № 2. P. 173.
10. *Chen L., Zhang Y., Yin H., Liu L., Yang Z., Shen H.* Fluorescence determination of artemisinin using hemoglobin as catalyst and pyronine B as substrate // *Wuhan Univ. J. Natural Sci.* 2006. V. 11. № 3. P. 704.
11. *Chen L., Liu L., Shen H.* Spectrofluorimetric determination of artemisinin with pyronine B as the substrate for horseradish peroxidase // *Chin. Sci. Bulletin.* 2005. V. 50. № 17. P. 1834.
12. *Chen L., Yin H., Yang Z., Zhang K., Liu L., Shen H.* Fluorescence determination of artemisinin using tyrosinase as catalyst and pyronine B as monitor // *Chin. J. Anal. Chem.* 2005. V. 23. № 8. P. 1047.
13. *Marconi G., Monti S., Manoli F., Esposti A.D., Mayer B.* A circular dichroism and structural study of the inclusion complex artemisinin- $\beta$ -cyclodextrin // *Chem. Phys. Lett.* 2004. V. 383. № 5–6. P. 566.
14. *Marques H.M.* Insights into porphyrin chemistry provided by the microperoxidases, the haempeptides derived from cytochrome *c* // *Dalton Trans.* 2007. № 39. P. 4371.
15. *Yarmann A., Neumann B., Bosserd M., Gajovich-Eichelmann N., Scheller F.W.* Peroxidase-dependent analyte conversion by the heme prostetic group, the heme peptide microperoxidase-11 and cytochrome *c* on chitosan capped gold nanoparticles modified electrodes // *Biosensors.* 2012. V. 2. № 2. P. 189.
16. *Miyazaki C.M., Shimizu F.M., Mejía-Salazar J.R., Jr O.N.O., Ferreira M.* Surface plasmon resonance biosensor for enzymatic detection of small analytes // *Nanotechnology.* 2017. V. 28. № 14. P. 145501.
17. *Muginova S.V., Vakhrameva E.S., Myasnikova D.A., Kazarian S.G., Shekhovtsova T.N.* Fluorescence-based artemisinin sensing using pyronin B-doped cellulose film reconstituted from ionic liquid // *Anal. Lett.* 2018. V. 51. № 6. P. 870.
18. *Jung M., Lee K., Kendrick H., Robinson B.L., Croft S.L.* Synthesis, stability, and antimalarial activity of new hydrolytically stable and water-soluble (+)-deoxyartelinic acid // *J. Med. Chem.* 2002. V. 45. № 2. P. 4940.
19. *Gür B., Meral K.* The effect of poly(vinyl alcohol) on the photophysical properties of pyronin dyes in aqueous solution: A spectroscopic study // *Spectrochim. Acta A.* 2013. V. 101. № 1. P. 306.
20. *Titford M.* Comparison of historic Grüber dyes with modern counterparts using thin layer chromatography // *Biotech. Histochem.* 2007. V. 82. № 4–5. P. 227.
21. *Oyadomari M., Kabuto M., Wariishi H., Tanaka H.* Manganese (II) oxidation by microperoxidase-11 in hydrophilic organic media // *Biochem. Eng. J.* 2003. V. 15. № 3. P. 159.
22. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 429 с.
23. *Gaspar S., Popescu I.C., Gazaryan I.G., Bautista A.G., Sakharov I.Y., Mattiasson B., Csoregi B.* Biosensors based on novel plant peroxidases; a comparative study // *Electrochim. Acta.* 2000. V. 46. № 2. P. 255.
24. *Bruce G.R., Gill P.S.* Estimates of precision in a standard additions analysis // *J. Chem. Educ.* 1999. V. 76. № 6. P. 805.
25. *Onganer Y., Quitevis E.* Effect of solvent on nonradiative in xanthene dyes: pyronin B in alcohols and alcohol-water mixtures // *J. Phys. Chem.* 1992. V. 96. № 20. P. 7996.
26. *Toprak M., Arik M.* An investigation of energy transfer between coumarin 35 and xanthene derivatives in liquid medium // *Turk. J. Chem.* 2010. V. 34. № 2. P. 285.
27. *O'Reilly N., Magner E.* The effect of solvent on the catalytic properties of microperoxidase-11 // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. V. 13. № 12. P. 5304.
28. *Liu Y., Lu H., Pang F.* Solubility of artemisinin in seven different pure solvents from (283.15 to 323.15) K // *J. Chem. Eng. Data.* 2009. V. 54. № 3. P. 762.
29. <https://www.caymanchem.com/pdfs/11816.pdf> (01.01.2018)
30. *Amponsaa-Karikari A., Kishikawa N., Ohba Y., Nakashima K., Kuroda N.* Determination of artemisinin in human serum by high-performance liquid chromatography with on-line UV irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection // *Biomed. Chromatogr.* 2006. V. 20. № 11. P. 1157.
31. *Денисов Е.Т., Солодова С.Л., Денисова Е.Г.* Радиальная химия артемизинина // *Усп. химии.* 2010. Т. 79. № 11. С. 1065. (*Denisov E.T., Solodova S.L., Denisova E.G.* Radical chemistry of artemisinin // *Russ. Chem. Rev.* 2010. V. 79. № 11. P. 981.)
32. *Green M.D., Mount D.L., Todd G.D., Capomacchia A.C.* Chemiluminescent detection of artemisinin. Novel endoperoxide analysis using luminol without hydrogen peroxide // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 695. № 2. P. 237.
33. *Wang M., Park C., Wu Q., Simon J.E.* Analysis of artemisinin in *Artemisia annua L.* by LC-MS with selected ion monitoring // *J. Agric. Food. Chem.* 2005. V. 53. № 18. P. 7010.
34. *Liu C-Z., Zhou H-Y., Zhao Y.* An effective method for the fast detection of artemisinin in *Artemisia annua L.* by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 581. № 2. P. 298.
35. *Bharati A., Sabat S.C.* A spectrophotometric assay for quantification of artemisinin // *Talanta.* 2002. V. 52. № 3. P. 1033.
36. *Sreevidya T.V., Narayana B.* Spectrophotometric determination of artemisinin and dihydroartemisinin // *Indian J. Chem. Tech.* 2008. V. 15. № 1. P. 59.
37. *Bai H., Wang C., Chen J., Peng J., Cao Q.* A novel sensitive electrochemical sensor based on in situ polymerized molecularly imprinted membranes at graphene modified electrode for artemisinin determination // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 64. № 2. P. 352.