

УДК 615.322:543.544.5

DOI: 10.15587/2519-8025.2026.362775

## LC-MS ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ ФІНГЕРПРИНТ ЯК ІНСТРУМЕНТ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН (НА ПРИКЛАДІ *HYPERICUM PERFORATUM L.*)

Т. Г. Маюла

**Aim.** To evaluate the applicability of LC-MS chromatographic fingerprinting as a tool for standardization and authenticity verification of medicinal plant material using *Hypericum perforatum L.* as a model object.

**Materials and methods.** 50% and 80% hydroethanol extracts of dried aerial parts of *H. perforatum* were prepared by ultrasonic extraction (30 min, sample weights 504 mg and 516 mg). Analysis was performed by LC-MS on an Agilent 1260 Infinity II / LC/MSD iQ system; Gemini NX-C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm), gradient elution (0.1% formic acid/acetonitrile), flow rate 0.7 mL/min. Detection was carried out in ESI+ and ESI- modes over the m/z range 100–1000. Total ion current (TIC) chromatograms were recorded and compared by overlay profiling.

**Results.** 12 characteristic peaks were identified in both extracts: phenolic acids (chlorogenic, neochlorogenic, caffeic), flavonoid glycosides (rutin, hyperoside, isoquercitrin), flavan-3-ols (catechin, epicatechin), and quercetin aglycone. Identification was performed at MSI level 2 (tentative annotation). TIC profiles were qualitatively similar (phytoequivalence), with the 80% extract yielding higher signal intensities for key marker compounds.

**Conclusions.** LC-MS fingerprint analysis provides a reproducible chemical profile suitable as a reference standard for batch verification and detection of compositional deviations. The 80% hydroethanol extract is recommended as the optimal system for generating a reference fingerprint of *H. Perforatum*.

**Keywords:** *Hypericum perforatum*; St. John's wort; LC-MS; chromatographic fingerprint; metabolite profiling; medicinal plant standardization; phenolic acids; flavonoid glycosides; chlorogenic acid; herbal medicine authentication

### How to cite:

Maiula, T. (2026). LC-MS chromatographic fingerprinting as a tool for medicinal plant standardization (*Hypericum perforatum L.* as a case study). ScienceRise: Biological Science, 2 (46), 4-9. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2026.362775>

© The Author(s) 2026

This is an open access article under the Creative Commons CC BY license

### 1. Вступ

Лікарські рослини та продукти їх переробки займають значне місце у глобальній системі охорони здоров'я: попит на фітопрепарати стабільно зростає в усьому світі, що зумовлює необхідність стандартизованого контролю їх якості та безпеки [1]. Разом з тим у розвинених країнах спостерігається стійке зростання попиту на фітопрепарати, що представлені як безрецептурні засоби та дієтичні добавки. Водночас розширення ринку супроводжується значними проблемами у сфері безпеки та якості: недостатній регуляторний контроль, відсутність стандартизованих вимог до складу та нестабільність вмісту активних компонентів залишаються актуальними проблемами [1, 2].

*Hypericum perforatum L.* (звіробій звичайний, родина *Hypericaceae*) є одним із найдослідженіших об'єктів сучасної фармакогнозії. Хімічний склад рослини включає кілька класів біологічно активних сполук: нафтодіантрони (гіперіцин, псевдогіперіцин), флоровглюциноли (гіперфорин), флавоноїди (рутин, гіперозид, ізокверцитрин, кверцетин) та фенольні

кислоти (хлорогенова, кофеїнова). Фармакологічний ефект рослини є результатом синергічної дії цього комплексу сполук – зокрема, показано, що рутин посилює антидепресивний ефект екстракту за умови його вмісту не менше 3%. Це принципово ускладнює стандартизацію на основі єдиного маркера і обумовлює потребу у комплексному підході до оцінки якості [3].

Рослинні екстракти є складними багатокомпонентними системами, аналіз яких вимагає застосування сучасних аналітичних методів. Жодна окрема аналітична техніка не забезпечує повного охоплення метаболомного складу екстракту, що зумовлює необхідність використання комбінованих підходів – поєднання рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням [4]. LC-MS у режимах ESI+ та ESI- дозволяє одночасно профілювати широкий спектр полярних вторинних метаболітів, включаючи фенольні кислоти, флавоноїди та їх глікозиди.

Хроматографічний fingerprint-аналіз – підхід, при якому екстракт розглядається як цілісна система, а його хроматографічний профіль є інтегральною ха-

ракетристикомою якості, рекомендований ключовими регуляторними організаціями (FDA, EMA) як пріоритетний інструмент стандартизації лікарської рослинної сировини [5]. На відміну від методів, заснованих на визначенні одного-двох маркерів, fingerprint-аналіз дозволяє оцінювати "хімічну цілісність" (phytoequivalence) препарату, виявляти фальсифікації та домішки [6, 7], а також перевіряти відтворюваність складу між партіями сировини.

Ефективність fingerprint-підходу продемонстрована для широкого кола рослин і препаратів. Зокрема, застосування множинних хроматографічних фінгерпринтів у поєднанні з методами злиття даних (data fusion) дозволило виявити фальсифіковані партії препарату Danshen Dropping Pill та забезпечити контроль lot-to-lot стабільності [8]. Хемометричний аналіз (PCA, LDA) хроматографічних профілів успішно застосовувався для дискримінації дієтичних добавок за складом сировини незалежно від концентрації екстракту [9]. Разом з тим питання формування відтворюваних еталонних LC-MS профілів у контексті практичної стандартизації та верифікації нових партій сировини, зокрема, порівняльний аналіз екстрактів різної полярності як моделей для побудови референтного фінгерпринту, потребує додаткового обґрунтування.

Мета даної роботи – оцінити придатність LC-MS хроматографічного фінгерпринту для стандартизації рослинної сировини *H. perforatum* та визначити оптимальні умови екстракції для формування еталонного профілю.

## 2. Матеріали та методи

Дослідження проводили у 2026 році. Об'єкт дослідження – висушена подрібнена надземна частина *Hypericum perforatum* L. (родина *Hypericaceae*). Ботанічна ідентичність рослинної сировини встановлена відповідно до морфологічних ознак та даних постачальника. Сировина зберігалась за стандартних умов до аналізу.

Екстракцію проводили ультразвуковим методом: 30 хв ультразвукової бані з періодичним перемішуванням. Отримано два типи екстрактів: 50% водно-етанольний (наважка 504 мг) та 80% водно-етанольний (наважка 516 мг) [10]. Після екстракції зразки відфільтровували через мембранний фільтр 0,22 мкм та використовували для аналізу.

Хромато-мас-спектрометричний аналіз проводили на приладі Agilent 1260 Infinity II, детектор LC/MSD iQ (Agilent Technologies, США). Колонка – Gemini NX-C18 (150 × 4,6 мм, 5 мкм, 110 Å; Phenomenex). Рухомі фази: А – 0,1% мурашина кислота у воді; В – ацетонітрил. Швидкість потоку – 0,7 мл/хв, температура колонки – 35°C, об'єм ін'єкції – 1 мкл. Градієнтне елюювання: умови надано в табл. 1.

Мас-спектрометричний аналіз здійснювали в режимах позитивної (ESI+) та негативної (ESI-) електроспрей-іонізації. Реєстрацію проводили в діапазоні m/z 100-1000 в режимі повного сканування (full scan). Для кожного зразка отримували сумарні іонні хроматограми (TIC), порівняння яких здійснювали методом накладання профілів.

Таблиця 1

Програма градієнтного елюювання

Час, хв	А, %	В, %	С, %	Потік, мл/хв	Тиск, bar
Старт	95,0	5,0	0,0	0,700	400
3,00	80,0	20,0	0,0	–	–
3,30	70,0	30,0	0,0	–	–
16,00	5,0	95,0	0,0	–	–
17,00	5,0	95,0	0,0	–	–
20,00	95,0	5,0	0,0	–	–
22,00	95,0	5,0	0,0	–	–

Примітка: А – 0,1% мурашина кислота у воді; В – ацетонітрил; С – не використовувався

Ідентифікацію компонентів проводили методом попередньої (tentative) ідентифікації шляхом порівняння значень m/z основних іонів та часів утримування з даними наукової літератури для *H. perforatum*. Підтвердження референтними стандартами не проводилось. Рівень ідентифікації відповідає рівню 2 (putatively annotated compounds) відповідно до класифікації MSI [11].

## 3. Результати дослідження та їх обговорення

LC-MS аналіз 50% та 80% водно-етанольних екстрактів *H. perforatum* дозволив отримати відтворювані TIC-хроматограми в режимах ESI+ та ESI-, які відображають інтегральний хімічний профіль до-

сліджуваної рослинної сировини. На рис. 1, 2 наведено хроматограми обох екстрактів відповідно.

Порівняння накладених хроматограм (рис. 3, 4) демонструє якісну подібність профілів обох екстрактів при відмінностях в інтенсивності ключових піків. Використання двох режимів іонізації (ESI+ та ESI-) забезпечує комплементарне охоплення метаболітів різних класів – підхід, що суттєво розширює інформаційний вміст фінгерпринту порівняно з однорежимним аналізом [4]. В табл. 2 наведено результати аналізу мас-спектрів 12 основних піків, ідентифікованих у обох екстрактах. Набір виявлених сполук узгоджується з відомим хімічним складом *H. perforatum* та з класифікацією хімічних маркерів лікарських рослин [3].

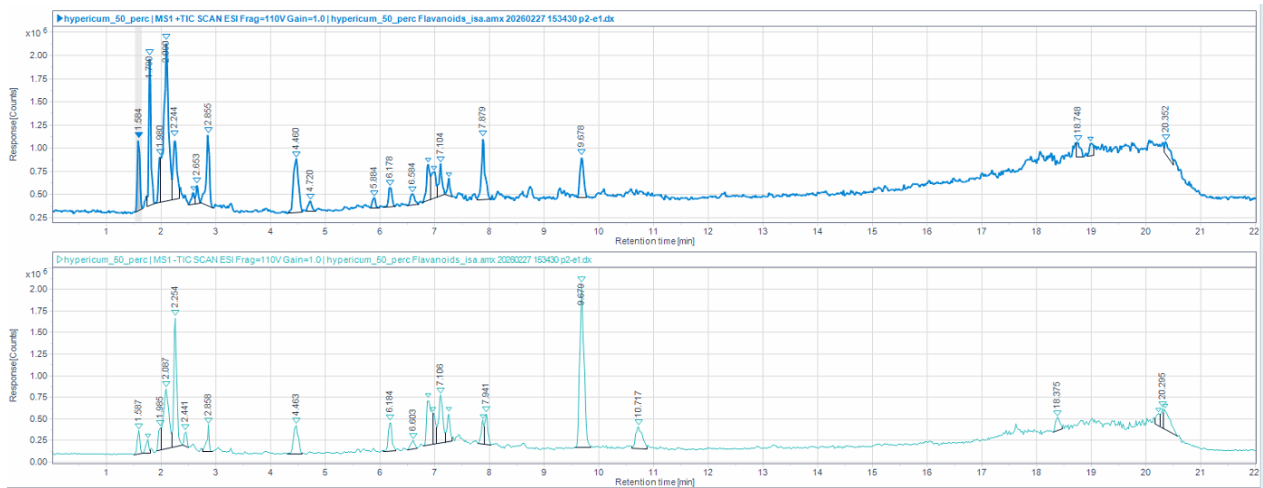


Рис. 1. ТІС-хроматограма 50% етанольного екстракту *H. perforatum* у режимах ESI+ та ESI-

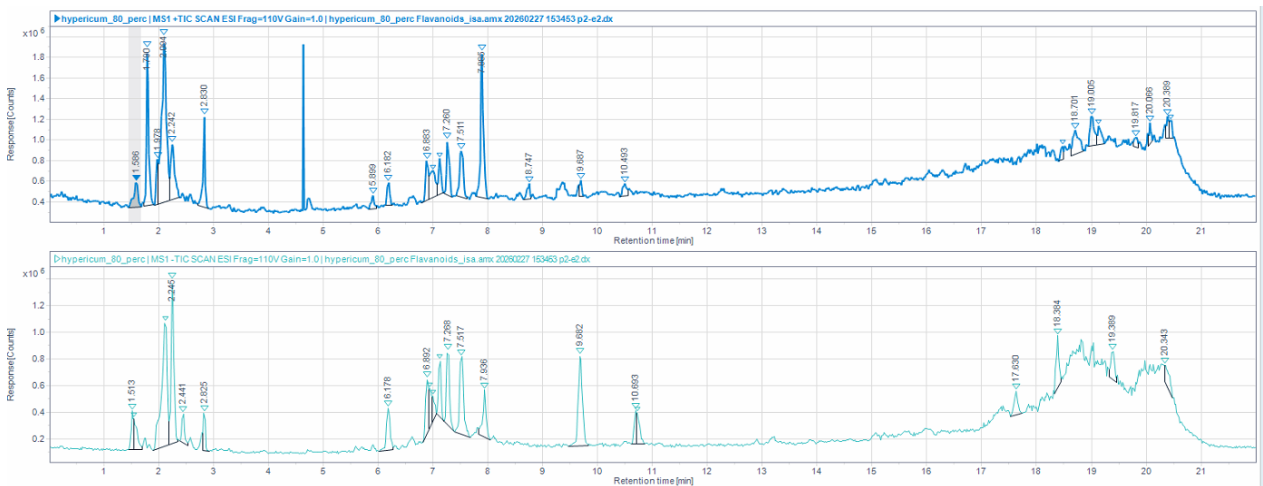


Рис. 2. ТІС-хроматограма 80% етанольного екстракту *H. perforatum* у режимах ESI+ та ESI-

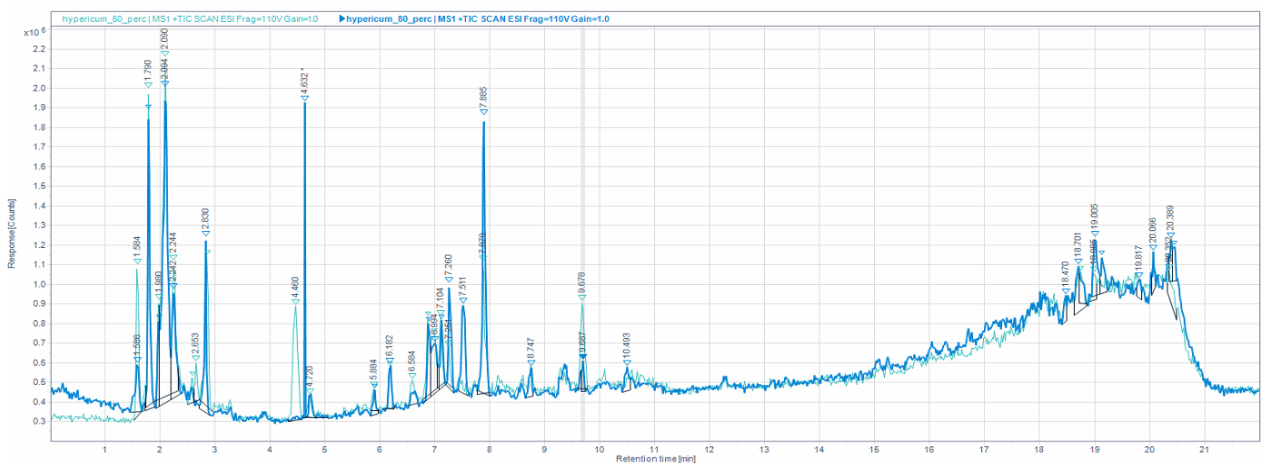


Рис. 3. Накладені ТІС+ хроматограми 50% та 80% екстрактів

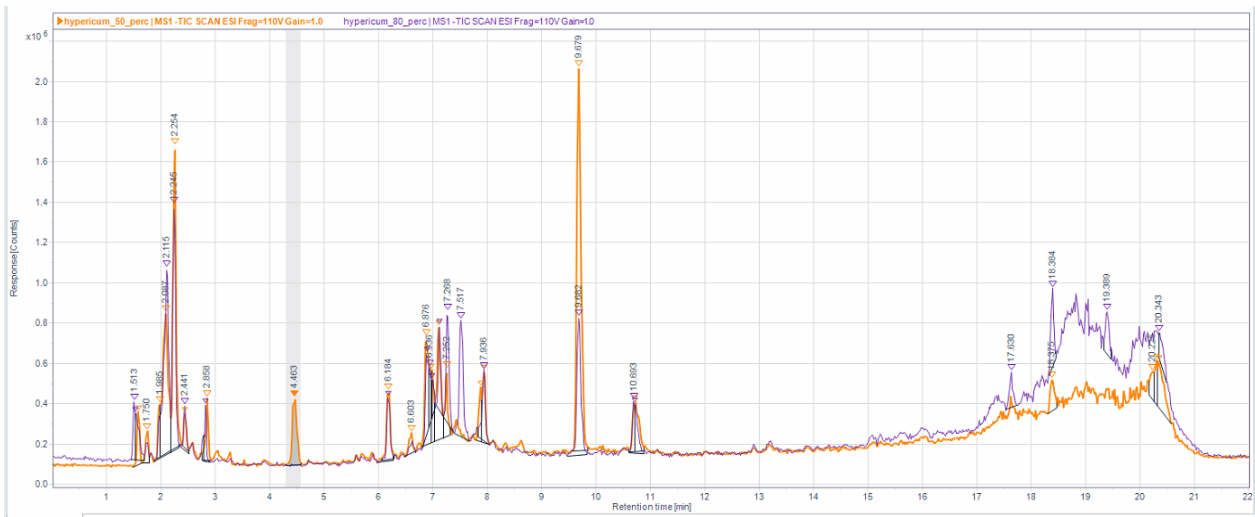


Рис. 4. Накладені TIC- хроматограми 50% та 80% екстрактів

Таблиця 2

Основні піки LC-MS хроматограм екстрактів *Hypericum perforatum L.* та їх tentative ідентифікація

№ піку	tR (хв)	Режим	m/z (основні)	Tentative ідентифікація	Обидва екстракти
1	2.09	ESI-	179, 191	Кофеїнова / хлорогенова к-та	Так
2	2.26	ESI-	191, 192, 383	Хлорогенова / неохлорогенова к-та	Так
3	2.09	ESI+	138, 139, 163	Гідроксикоричні кислоти (фрагм.)	Так
4	4.47	ESI-	354, 389, 399, 467	Похідні хлорогенової к-ти	Так
5	6.19	ESI+	163, 286, 355, 393	Флавоноїд / похідне хлорогенова к-та	Так
6	6.19	ESI-	353, 354, 707	Хлорогенова к-та / димер	Так
7	6.88	ESI-	191, 353, 354, 691	Ізомер хлорогенової к-ти	Так
8	7.11	ESI-	289, 290, 579	Катехін / епікатехін	Так
9	7.25	ESI+	611, 612, 613	Рутин (диглікозид кверцетину)	Так
10	7.52	ESI-	463, 464, 577, 927	Гіперозид / ізокверцитрин	Так
11	7.89	ESI+	325, 326, 465	Флавоноїдний моноглікозид	Так
12	9.68	ESI+/-	303, 304, 301, 302	Кверцетин (аглікон)	Так

В ранній частині хроматограми ( $t \approx 2.1-2.3$  хв) в режимі ESI- спостерігаються іони  $m/z$  179 та 191, характерні для кофеїнової та хлорогенової кислот відповідно. Іон  $m/z$  353-354 ( $t \approx 4.5$  хв) відповідає хлорогеновій кислоті ( $[M-H]^- = 353$ ). Ці фенольні кислоти є компонентами, що традиційно використовуються як хімічні маркери для контролю якості рослинної сировини – зокрема, хлорогенова кислота входить до переліку маркерів традиційної китайської медицини для кількох видів лікарських рослин [3].

У середній частині хроматограми виявлено пари іонів  $m/z$  353/354 та 707/708 у режимі ESI-. Значення  $m/z$  707 може відповідати нековалентному димеру або подвійно зарядженому іону хлорогенової кислоти - явище, характерне для концентрованих фенольних матриць і пов'язане з особливостями ESI іонізації [4]. У ESI+ режимі зареєстровано іони  $m/z$  163 та 286, характерні для фрагментів гідроксикоричних кислот та флавоноїдних агліконів.

Найбільш діагностично значущим є пік при  $t \approx 7.25$  хв з іонами  $m/z$  611-612 у ESI+ режимі, що відповідає молекулярній масі рутину ( $MW = 610$

г/моль,  $[M+H]^+ = 611$ ). Рутин є одним із ключових синергічних компонентів *H. perforatum*, що в комплексі з іншими флавоноїдами та нафтодіантронами забезпечує антидепресивну дію екстракту [12]. Флавоноїдний комплекс *H. perforatum* – включаючи рутин, гіперозид та ізокверцитрин – також проявляє виражену антиоксидантну активність *in vitro*, опосередковану здатністю до зв'язування вільних радикалів та відновлення іонів металів змінної валентності [13]. Іони  $m/z$  463-464 ( $t \approx 7.5$  хв) відповідають гіперозиду або ізокверцитрину, а  $m/z$  303-304 у пізній частині хроматограми – аглікону кверцетину. Детальна хімічна характеристика цих сполук та їхній вміст у *H. perforatum* описані в літературі [12].

Флаван-3-оли (катехін та епікатехін,  $m/z$  289-290, ESI-,  $t \approx 7.1$  хв) зафіксовані в обох екстрактах, що підтверджує їх присутність у складі *H. perforatum* і узгоджується з наявними фітохімічними даними [13, 14].

Отримані хроматографічні профілі відповідають критеріям chromatographic fingerprint у розумінні концепції phytoequivalence [7]: вони демонструють

"sameness" – якісну подібність характерного набору компонентів при природній варіабельності кількісних співвідношень між умовами екстракції. Такий підхід, де профіль оцінюється як інтегральна характеристика, а не набір окремих піків, є більш інформативним порівняно з методами на основі єдиного маркера [6, 7]. Показово, що навіть без окремого компонента-лідера екстракти *H. perforatum* зберігають фармакологічну активність завдяки синергічній взаємодії флавоноїдів, гіперіцинів та проантоціанідинів [14].

Порівняльний аналіз підтвердив, що 80% водно-етанольний екстракт забезпечує вищу екстракційну ефективність для флавоноїдних глікозидів і похідних фенольних кислот, що проявляється у вищій інтенсивності піків у середній та пізній частинах хроматограми. З огляду на це 80% екстракт рекомендується як оптимальна система для формування еталонного фінгерпринту *H. perforatum*, придатного для подальшого порівняльного аналізу нових партій сировини.

Перспективним розвитком підходу є застосування хемометричних методів, зокрема PCA та LDA, для кількісної оцінки схожості між фінгерпринтами [7, 8], а також інтеграція LC-MS профілювання з методами машинного навчання для передбачення біологічної активності ідентифікованих компонентів, що уже застосовувалось авторами у дослідженні [15]. Показано, що PCA-LDA класифікація хроматографічних профілів дозволяє дискримінувати зразки за складом сировини навіть за умови значної варіації концентрації екстракту [9], що відкриває можливості для автоматизованої верифікації нових партій у режимі рутинного контролю.

**Обмеження дослідження.** Ідентифікацію проводили без підтвердження референтними стандартами (tentative identification, рівень 2 за MSI [4, 11]). Відсутній кількісний аналіз компонентів та статистичний аналіз міжпартійної варіабельності. Умови воєнного стану в Україні обмежили доступ до ряду аналітичних стандартів, що безпосередньо вплинуло на можливість підтвердження ідентифікації.

**Перспективи подальших досліджень.** Підтвердження ідентифікації компонентів із використанням аналітичних стандартів; кількісний аналіз маркерних сполук; розширення підходу на інші лікарські рослини; верифікація фінгерпринтів *H. perforatum* різного географічного походження; застосування хемометричного аналізу для побудови класифікаційних моделей.

#### 4. Висновки

1. LC-MS аналіз у режимах ESI+ та ESI- дозволив отримати відтворювані хроматографічні профілі (fingerprints) 50% та 80% водно-етанольних ек-

трактів *H. perforatum*, в яких ідентифіковано 12 характерних піків, що відповідають фенольним кислотам, флавоноїдним глікозидам, флаван-3-олам та агліконам кверцетину.

2. Якісний склад обох екстрактів є подібним (phytoequivalence); 80% водно-етанольний екстракт забезпечує вищу інтенсивність сигналів маркерних сполук і рекомендується як оптимальна система для формування еталонного LC-MS фінгерпринту *H. perforatum*.

3. Хроматографічний fingerprint-аналіз є ефективним інструментом стандартизації рослинної сировини, придатним для порівняльної верифікації нових партій, виявлення відхилень у складі та оцінки автентичності - підхід можливий для масштабування на будь-які лікарські рослини із відомим хімічним складом.

#### Конфлікт інтересів

Автор декларує, що не має конфлікту інтересів стосовно даного дослідження, в тому числі фінансового, особистісного характеру, авторства чи іншого характеру, що міг би вплинути на дослідження та його результати, представлені в даній статті.

#### Фінансування

Дослідження виконано за підтримки Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України в рамках гранту Simons Foundation для українських установ № SFI-PD-Ukraine-00017453. Хроматографічний аналіз виконано на базі Науково-виробничого центру фітопрепаратів "Добрадія" ТОВ "НАУКОВО-СЕРВІСНА ФІРМА "ОТАВА" (Київ, Україна).

#### Подяки

Автор висловлює подяку лікарю Скрипчуку Володимирі Івановичу ("HERBAL MEDICINE") за надані зразки рослинної сировини, а також ТОВ "НАУКОВО-СЕРВІСНА ФІРМА "ОТАВА" за проведення хроматографічного аналізу.

#### Доступність даних

Дані будуть надані за обґрунтованим запитом.

#### Використання засобів штучного інтелекту

Автор підтверджує, що не використовував технології штучного інтелекту при створенні представленої роботи.

#### Внесок авторів

**Тарас Геннадійович Маюла:** концептуалізація, методологія, збір даних, аналіз, написання рукопису.

#### Література

1. Wang, H., Chen, Y., Wang, L., Liu, Q., Yang, S., Wang, C. (2023). Advancing herbal medicine: enhancing product quality and safety through robust quality control practices. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1265178>
2. Noviana, E., Indrayanto, G., Rohman, A. (2022). Advances in Fingerprint Analysis for Standardization and Quality Control of Herbal Medicines. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.853023>
3. Zhang, J., Liu, S., Sun, L., Liu, C., Chen, Y., Liu, Y. (2026). Application of mass spectrometry in the study of the material basis of Chinese herbal decoctions. *Results in Chemistry*, 21, 103100. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2026.103100>
4. Wolfender, J.-L., Marti, G., Thomas, A., Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382, 136–164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.091>

5. Assessment report on *Hypericum perforatum* L., herba Final – Revision 1. European Medicines Agency. EMA/HMPC/244315/2016 (2022). Committee on Herbal Medicinal Products. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-hypericum-perforatum-l-herba-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-hypericum-perforatum-l-herba-revision-1_en.pdf)
6. Heinrich, M., Jalil, B., Abdel-Tawab, M., Echeverria, J., Kulić, Ž., McGaw, L. J. et al. (2022). Best Practice in the chemical characterisation of extracts used in pharmacological and toxicological research – The ConPhyMP – Guidelines12. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.953205>
7. Riswanto, F. D. O., Windarsih, A., Lukitaningsih, E., Rafi, M., Fadzilah, N. A., Rohman, A. (2022). Metabolite Fingerprinting Based on 1H-NMR Spectroscopy and Liquid Chromatography for the Authentication of Herbal Products. *Molecules*, 27 (4), 1198. <https://doi.org/10.3390/molecules27041198>
8. Sima, I. A., András, M., Sárbu, C. (2017). Chemometric Assessment of Chromatographic Methods for Herbal Medicines Authentication and Fingerprinting. *Journal of Chromatographic Science*, 56 (1), 49–55. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx080>
9. Bārzdiņa, A., Paulausks, A., Bandere, D., Brangule, A. (2022). The Potential Use of Herbal Fingerprints by Means of HPLC and TLC for Characterization and Identification of Herbal Extracts and the Distinction of Latvian Native Medicinal Plants. *Molecules*, 27 (8), 2555. <https://doi.org/10.3390/molecules27082555>
10. Ion, V., Ielciu, I., Cârje, A.-G., Muntean, D. L., Crişan, G., Păltinean, R. (2022). *Hypericum* spp. – An Overview of the Extraction Methods and Analysis of Compounds. *Separations*, 9 (1), 17. <https://doi.org/10.3390/separations9010017>
11. Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A. et al. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3 (3), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
12. Nobakht, S. Z., Akaberi, M., Mohammadpour, A. H., Tafazoli Moghadam, A., Emami, S. A. (2022). *Hypericum perforatum*: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25 (9), 1045–1058. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.65112.14338>
13. Kilibarda, S., Jović, M. D., Milinčić, D. D., Vuković, S., Trifković, J. Đ., Pešić, M. B., Kostić, A. Ž. (2025). Phytochemical Profile and Biological Activities of Rtanj's *Hypericum perforatum* Infusion Tea and Methanolic Extracts: Insights from LC-MS/MS and HPTLC–Bioautography. *Plants*, 14 (9), 1377. <https://doi.org/10.3390/plants14091377>
14. Güzel, M. A., Kolaç, T., Menevşe, İ. N., Dündar, M., Zengin, R., Güzel, A., Uğur, Y. (2026). Integrated chemical and biological characterization of *Hypericum perforatum* extract using LC-MS/MS and in vitro functional assays. *Scientific Reports*, 16 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-026-36793-8>
15. Maiula, T. G., Bieda, O. A., Pylaieva, T. V., Yarmoluk, S. M. (2025). In silico modeling and prediction of antidiabetic potential of bioactive compounds from *Galega officinalis* L. non-alkaloid extract. *Biopolymers and Cell*, 41 (4), 309–317. <https://doi.org/10.7124/bc.000b29>

*Received 07.04.2026*

*Received in revised form 28.04.2026*

*Accepted 21.05.2026*

*Published 29.05.2026*

**Тарас Геннадійович Маюла**, аспірант, відділ біомедичної хімії, Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03143

**E-mail:** [tarikmayula@gmail.com](mailto:tarikmayula@gmail.com)

**ORCID:** <https://orcid.org/0009-0000-6931-994X>