



HPLC Method for Determination of Hypericin Contained in Polymeric System: Analysis of the Regression Significance, Lack of Fit, and Applicability

Fernanda B. BORGHI-PANGONI, Mariana V. JUNQUEIRA, Larissa L. SILVA & Marcos L. BRUSCHI *

Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Research
and Development of Drug Delivery Systems, Department of Pharmacy,
State University of Maringá, Colombo Avenue, 5790, CEP 87020-900, K80, S22, Maringá, PR, Brazil

SUMMARY. Hypericin (Hyp) is a natural photoactive pigment originated from *Hypericum perforatum* L. which has been extensively studied for many photobiological activities. For the determination of Hyp, an efficient, reproducible and simple reversed-phase high pressure liquid chromatography (HPLC) method was developed and validated, using fluorescence detection. The regression significance, the lack of fit and the residue analysis were evaluated. The standard curve was linear, with a coefficient of determination of 0.9950. The residue analysis showed that the method had significant regression, and did not present lack of fit. The HPLC method was suitable for determination of Hyp and showed to be linear, sensitive, precise, accurate, specific and robust. The method was sensitive for Hyp, displaying limit of quantification of 0.226 $\mu\text{g/mL}$ and limit of detection of 0.074 $\mu\text{g/mL}$. The mean recovery was $93.84 \pm 4.07\%$. In addition, the method showed to be adequate to analyze the Hyp content from polymeric system containing 20% (w/w) of Poloxamer P407, 0.15% (w/w) of Carbopol C934P and 0.01% (w/w) of Hyp and also enabling the determination of Hyp content and evaluation of *in vitro* Hyp release profile.

RESUMEN. La hipericina (Hyp) es un pigmento natural fotoactivo presente en *Hypericum perforatum* L., que se ha estudiado ampliamente para muchas actividades fotobiológicas. Para la determinación de Hyp fue desarrollado y validado un método simple, eficaz y reproducible de cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (HPLC), usando detección de fluorescencia. Se evaluaron la significancia de la regresión, la falta de ajuste y el análisis de residuos. La curva estándar fue lineal, con un coeficiente de determinación de 0,9950. El análisis de residuos demostró que el método tenía una regresión significativa y no presentaba falta de ajuste. El método HPLC resultó adecuado para la determinación de Hyp y mostró ser lineal, sensible, preciso, exacto, específico y robusto. El método es sensible para Hyp, con un límite de cuantificación de 0,226 g/mL y un límite de detección de 0,074 g/mL. La recuperación media fue de $93,84 \pm 4,07\%$. Además, el método demostró ser adecuado para analizar el contenido Hyp en el sistema polimérico que contiene 20% (w/w) de Poloxamer P407, 0,15% (w/w) de Carbopol C934P y 0,01% (w/w) de Hyp y también permite la determinación del contenido de Hyp y evaluación *in vitro* del perfil de liberación en Hyp.

KEY WORDS: HPLC-fluorescence method, hypericin, Hyp content, *in vitro* release, regression significance, validation method.

* Author to whom correspondence should be addressed: E-mail: mlbruschi@uem.br