



СУРБЕЕВА

Елизавета Сергеевна

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БОТАНИЧЕСКИХ ФОРМ *APIUM GRAVEOLENS L.* КАК СЫРЬЕВОГО ИСТОЧНИКА ПИЩЕВЫХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Санкт-Петербург

2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Тернинко Инна Ивановна

доктор фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Зилфикаров Ифрат Назимович

доктор фармацевтических наук, профессор РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», главный научный сотрудник отдела химии природных соединений

Белоусов Михаил Валерьевич

доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармацевтического анализа

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «17» декабря 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<http://dissovet.spcpu.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.063.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Разработка и анализ лекарственных средств растительного происхождения остается актуальным направлением исследований в связи с приверженностью потребителей к использованию фитотерапии как безопасного, экономически выгодного и традиционного способа лечения. Кроме того, в последние годы наблюдается повышенная тенденция к употреблению правильного и здорового питания, включающего качественные, обогащенные продукты, повышающие уровень качества жизни потребителей, что в совокупности влияет на вектор научных исследований различных стран. Так, разработка продуктов функционального питания входит в перечень приоритетов научно-технического развития Российской Федерации (Указ Президента Российской Федерации от 01.12.2016 г. № 642). По распоряжению правительства РФ от 31.12.2020 № 3684-р. создание функциональных, специализированных продуктов и пищевых ингредиентов включено в программу фундаментальных научных исследований Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы).

Сельскохозяйственные культуры, накапливающие различные группы биологически активных веществ (БАВ), являются потенциальным источником вышеупомянутых продуктов и, с одной стороны, служат пищевыми ингредиентами / компонентами, а с другой, выступают в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) с направленной фармакологической активностью (*Anethum graveolens* L., *Coriandrum sativum* L., *Zea mays* L., *Phaseolus vulgaris* L.).

Перспективным источником фитосубстанций, для разработки как функциональных, специализированных пищевых продуктов, так и лекарственных растительных препаратов можно рассматривать сельдерей пахучий (*Apium graveolens* L.). Благодаря различным морфологическим видам (корневой, черешковый и листовой), а также широкому сортовому ассортименту, сельдерей характеризуется фитохимическим разнообразием, значительной и возобновляемой сырьевой базой. Кроме того, на рынке уже представлены некоторые продукты спортивного и специализированного питания, в состав которых входит сырье сельдерея.

Таким образом, потребность в растительных фитосубстанциях мультивекторной направленности, а также выбор сельдерея пахучего в качестве их источника обуславливают актуальность данного исследования, что согласуется с приоритетными направлениями научно-технического и фундаментального развития.

Степень разработанности темы исследования. Сельдерей пахучий является достаточно хорошо изученным растением, что подтверждается наличием большого количества обзорных и экспериментальных публикаций (Tan T.Y.C., 2023; Alobaidi S., 2024; Kooti W., 2017; Hedayati N., Lin L.Z., 2007; Nicétin M., 2022; Atalar N.A., 2019; Wolski T., 2002; Fazal S.S., 2012; Garg S. K., 1979; Najda, A., 2015; Petrova I., 2014; Sarmanovna T.Z., 2019; Ovodova R. G., 2009; Saini R.K., 2021; Fazal S. S., 2012; Sun Y., 2023; Salimi F., 2022; Singh M., 2023; Shayani R. M., 2022; Mohsenpour M.A, 2023; Grube K., 2019; Powanda M.C., 2015; Jia L., 2020; Ahmed S.S.T., 2022; Lau H., 2021). Кроме того, согласно данным Science Direct и PubMed, за последние 10 лет наблюдается повышение публикационной активности при запросах «celery» и «*Apium graveolens* L.», что говорит о заинтересованности научного сообщества в изучении сырья сельдерея и подтверждает актуальность данного исследования.

Основные направления изучения объекта исследования, представленные в публикациях различных авторов, ориентированы на фитохимический анализ отдельных групп БАВ сельдерея пахучего, включая фенольные соединения, полисахариды, фталиды, фитостеролы, минералы и другие. Тем не менее, в данный момент наиболее полноценно с

фитохимической точки зрения изучены плоды и черешки сельдерея, и в меньшей степени листовая форма. Кроме того, учитывая сортовое разнообразие, можно говорить об отсутствии системности в опубликованных фитохимических исследованиях сырья сельдерея пахучего.

Направления фармакологического действия сырья сельдерея пахучего разных ботанических форм были изучены в ряде доклинических и клинических исследований, которые продемонстрировали наличие различной биологической активности, включая противовоспалительное и антигипертензивное действие, а также способность влиять на метаболические процессы, что подтверждает целесообразность комплексного исследования сельдерея и использования его для разработки фитосубстанций в т.ч. и для специализированного питания.

Цель и задачи диссертационного исследования. Фитохимическое изучение корневой, черешковой и листовой форм *Apium graveolens* L. (с учетом сортового разнообразия) для оценки перспективности разработки фитосубстанций – компонентов лекарственных средств и специализированного питания – и формулирование концепции создания на их основе различных продуктов.

Для реализации поставленной цели необходимо было решение следующих задач:

1. Провести качественный и количественный анализ различных групп БАВ сырья сельдерея в сравнении по ботаническим формам и сортам: фенольных кислот и флавоноидов методами ВЭТСХ и УФ-спектрофотометрии, минерального состава методом АЭС-ИСП, липофильных соединений методом ГХ/МС, полисахаридов методами гравиметрии, ИК-спектрометрии и ВЭТСХ.
2. Разработать и валидировать методику идентификации и количественного определения хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ в листовой ботанической форме сельдерея пахучего и изучить сортовые преимущества сырья по накоплению данного компонента.
3. Подобрать оптимальные хроматографические условия для оценки кумаринов и фуранокумаринов в ботанических формах сельдерея пахучего методом ВЭЖХ.
4. Разработать фитосубстанцию на основе наиболее перспективных полисахаридных фракций с последующей ее стандартизацией и оценкой фармакологической активности на модели лептиндефицитных мышей.
5. Выбрать оптимальный способ выделения липофильной фракции сельдерея черешкового и разработать стандартизованную фитосубстанцию на ее основе.
6. По результатам проведенных исследований оценить перспективность использования сырья сельдерея пахучего в качестве источника потенциальных лечебно-профилактических фитосубстанций. Для отдельных видов сырья сельдерея, охарактеризованных как перспективные, а также для предложенных фитосубстанций, разработать проекты нормативной документации с критериями стандартизации и методиками анализа.

Научная новизна исследования. Впервые, используя комплекс современных методов анализа (ВЭТСХ, УФ-спектрофотометрия, ВЭЖХ, АЭС-ИСП, ГХ/МС), в сравнительном аспекте были проанализированы фенольные и липофильные соединения, полисахариды, минеральный состав различных ботанических форм и сортов сельдерея. Было идентифицировано 12 макро- и микроэлементов и установлено их избирательное распределение по формам и сортам. По результатам изучения распределения полисахаридов были выбраны оптимальные сырьевые источники для их выделения (корневая форма для фракций водорастворимых полисахаридов (ВРПС) и пектиновых веществ (ПВ). Методом ВЭТСХ установлено, что полисахаридные фракции относятся к арабиногалактанам. Липофильные фракции включают около 50 соединений в корнеплодах, 36 и 22 в черешках и

листьях соответственно. С использованием библиотеки масс-спектров NIST-20 было идентифицировано более 60 % веществ, относящихся к классам терпенов, производных бензофурана, жирных кислот, кумаринов, фитостеролов и витаминов. Наибольшим накоплением фармакологически активных соединений (фталиды, фитостеролы, терпены) характеризуются черешковая ботаническая форма. Для мажоритарных соединений, идентифицированных в липофильных фракциях сельдерея, впервые проведена прогностическая оценка фармакологической активности по программе PASS online.

Впервые показано преимущественное накопление отдельных групп БАВ и выбраны оптимальные ботанические формы для выделения их фракций: листовой в качестве источника веществ фенольной природы, корневой для выделения полисахаридов, черешковой – липофильных соединений, в т.ч. и фталидов.

Впервые была проведена оценка сортовых преимуществ сельдерея листового по содержанию хлорогеновой кислоты.

Впервые проведены фармакологические исследования ВРПС и ПВ сельдерея корневого на модели лептиндефицитных мышей. Показано статистически значимое снижение веса и массы жировой ткани у анализируемых животных после приема полисахаридов, что позволяет позиционировать фитосубстанции ВРПС и ПВ как средство для регуляции метаболизма.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана и валидирована методика идентификации и количественного определения хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ в сельдерее листовом, которая была апробирована при оценке сортовых преимуществ. Отличительной особенностью методики является ее экспрессность (быстрое время экстракции, запись хроматограммы), что позволяет применять ее в рутинном контроле качества сырья.

Подобраны оптимальные хроматографические условия для количественного определения кумаринов и фурукумаринов в сырье сельдерея. Методика отличается ресурсосберегаемостью (использование воды в качестве подвижной фазы, сниженная нагрузка на работу насосов, короткое время записи хроматограммы) в сравнении с другими хроматографическими подходами для оценки кумаринов.

Предложены фитосубстанции на основе ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея, а также на основе липофильной фракции сельдерея черешкового. Подобраны и нормированы показатели качества субстанций. Разработаны проекты нормативных документов на перспективные виды сырья («Сельдерея пахучего корнеплоды» «Сельдерея пахучего черешковой разновидности трава») и разработанные фитосубстанции («Водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества корнеплодов *Apium graveolens* L.»; «Липофильная фракция черешковой формы сельдерея пахучего»).

Предложены концепции создания функционального продукта для регуляции метаболизма на основе ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея, а также мягкой лекарственной формы (эмульгеля) на основе липофильной фракции черешков сельдерея.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность кафедр фармацевтической химии и фармакогнозии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (акты внедрения от 24 июня 2024 г.), Школы фармации Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова (акт внедрения от 06 декабря 2023 г.), Воронежского государственного университета (акт внедрения от 08 декабря 2023 г.), и нашли практическое применение в лабораториях Северо-Западного центра по контролю качества лекарственных средств (акт внедрения от 29

ноября 2023 г.) и ООО «Фитолеум» (акт внедрения от 7 декабря 2023 г) (акты представлены в приложении А).

Исследования полисахаридных фракций были поддержаны в конкурсе грантов 2023 года для студентов ВУЗов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов ВУЗов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

Методология и методы исследования. Исследование проводилось в период с 2021 по 2024 г. с использованием комплекса современных физико-химических методов анализа, которые соотносятся с поставленными задачами. Фитохимическую оценку проводили хроматографическими (ВЭТСХ, ВЭЖХ-УФ, эксклюзионная ВЭЖХ, ГХ/МС) и спектральными (УФ-спектрофотометрия, ИК-спектрометрия, АЭС-ИСП) методами.

Биологическую активность полисахаридных фракций изучали на мышах серии C57BL/Ks-db +/+m. Прогнозирование биологической активности проводили с использованием веб-ресурса PASS online.

Валидационную оценку аналитической методики осуществляли в соответствии с рекомендациями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Статистическую обработку полученных данных проводили методами математической статистики в соответствии с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» с применением программы Microsoft Excel и GraphPad Prism 9.0.

Теоретическую основу исследования составляли труды зарубежных и отечественных ученых по фитохимическому составу *Apium graveolens* L., а также методикам анализа отдельных групп БАВ. Методология исследования заключалась в фитохимическом изучении разных групп БАВ, накапливающихся в ботанических формах *Apium graveolens* L., выделении мажоритарных соединений, оценке их биологической активности и разработке функциональных продуктов питания с последующей стандартизацией сырья и разработанных продуктов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты сравнительного фитохимического скрининга 3-х форм и 14 сортов *Apium graveolens* L.
2. Валидированная методика идентификации и количественного определения хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ в сортах листовой формы *Apium graveolens* L.
3. Оптимальные хроматографические условия для оценки кумаринов методом ВЭЖХ.
4. Способ выделения полисахаридных фракций сельдерея корневого, их стандартизация и последующая оценка фармакологической активности.
5. Способ получения липофильной фракции черешковой формы *Apium graveolens* L., разработка фитосубстанции на ее основе.

Степень достоверности и апробация работы. Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на научных российских и международных форумах различного уровня: XI, XII, XIII, XIV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2021-2024 гг.); международной научной конференции. «90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (Москва, 2021), III Международной научно-практической интернет-конференции «Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, содержащих компоненты природного происхождения» (г. Харьков, 2021); международной научной конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (г. Томск, 2021 г.), международной научной конференции «От биохимии

растений к биохимии человека» (г. Москва, 2022), XXIV международном Съезде ФИТОФАРМ 2023 (Санкт-Петербург, 2023 г.), 1-ом Международном форуме «Asfen.Forum, новое поколение – 2023» (Астана, 2023 г.), IX и XI международной научно-практической конференции молодых ученых «Современные тенденции технологий развития здоровьесбережения» (Москва, 2021 г., 2023 г.).

Публикации. Результаты основных этапов проведенного исследования опубликованы в ведущих научных изданиях, несут в себе теоретическую и практическую ценность для науки и практики.

По теме диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций, которые также включены в международные наукометрические базы данных Scopus и Web of Science.

Связь задач исследования с планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в рамках тематики государственного задания «Разработка методологической концепции контроля качества лекарственных средств и субстанций природного происхождения с использованием инновационных аналитических методов» (регистрационный номер АААА-А20-120121790032-2 от 17.12.2020) и инициативной темы «Инновационные подходы в стандартизации лекарственных средств синтетического и природного происхождения» (номер гос. регистрации: АААА-А19-119030590044-6, зарегистрирована 05.03.2019).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно: пункту 6 – Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе; и пункту 7 – Изучение биофармацевтических аспектов стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе; изучение влияния экологических факторов на химические и биологические свойства лекарственных растений; оценка экотоксикантов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных средствах.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Сурбеевой Е.С. совместно с научным руководителем д.фарм.н., доц. Тернинко И.И. были сформированы основные направления исследовательской работы, дизайн эксперимента, цель и поставлены задачи для её реализации. Поиск, анализ и систематизацию данных научных публикаций Сурбеева Е.С. осуществляла самостоятельно. Автор лично проводила все этапы экспериментальных работ с последующей интерпретацией и статистической обработкой полученных результатов, их оформлением в виде научных публикаций и формулированием выводов. При подготовке и написании научных трудов по теме диссертации участие автора является преобладающим.

Экспериментальные исследования (АЭС-ИСП, ВЭЖХ, ГХ-МС, ИК- и УФ-спектрофотометрия) проводили с использованием парка оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России». Биологический эксперимент осуществляли на базе Центра экспериментальной фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ.

Доля участия автора составляет не менее 90 %. Диссертация представляет собой самостоятельный научный труд и включает исследования автора за период с 2020 по 2024 годы.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 203 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 54 рисунками и 48 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (3-х глав) и заключения, списка литературы, включающего 144 наименования (116 источников зарубежной литературы) и 8 Приложений.

Глава 1. Обзор литературы

В первой главе обоснована актуальность разработки фитопрепаратов и пищевых, в том числе функциональных, продуктов в соответствии с законодательными решениями о приоритетах научно-технического развития РФ. Показана перспективность применения растительных биологически активных веществ (БАВ) как основных компонентов вышеперечисленных продуктов. Для растительных БАВ, применяемых для коррекции и терапии метаболических нарушений, приведен аналитический обзор в координатах «эффект - механизм действия».

Охарактеризован объект исследования - сельдерей пахучий - как лекарственная и пищевая культура: приведен сравнительный химический состав различных видов сырья, рассмотрены направления его применения. Для основных групп БАВ сельдерея проведен поиск и дана сравнительная оценка методик ВЭЖХ-анализа. Обоснована целесообразность изучения сырья сельдерея в качестве источника пищевых и фармацевтических продуктов, в том числе акцентировано внимание на научных «нишах», требующих дополнительного исследования – отсутствие систематического изучения видов сырья сельдерея и сравнительного фитохимического изучения его сортового многообразия, небольшое количество экспрессных и ресурсоемких методик анализа и др, что в целом подтверждает актуальность исследования.

Глава 2. Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали сырье сельдерея пахучего разных ботанических форм и сортов. Черешки и корнеплоды сельдерея приобретали в магазинах г. Санкт-Петербурга в течение 2020 – 2024 гг. (страны происхождения: Россия, Иран). Кроме того, черешковую и листовую формы сырья выращивали на территории Ленинградской области в Питомнике лекарственных растений СПХФУ (Всеволожский р-н, пос. Лемболово, 60.389368, 30.275313) и на частных территориях в СНТ Ручей (Кировский район, Ленинградской области, 59.831756, 31.031655) и поселке Тайцы (Гатчинский район, Ленинградская область, 59.662913, 30.113873). Сырье заготавливали в июле – сентябре в 2021 – 2023 гг. (ежегодное культивирование).

Фитохимический скрининг групп БАВ в объектах исследования осуществляли с использованием современных физико-химических методов анализа. Профиль фенольных кислот изучали методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на приборе *SAMAG* (Швейцария) используя в качестве реперов стандартные образцы (СО) соответствующих соединений («Sigma Aldrich», США и EDQM, Швейцария). Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в ботанических формах и флавоноидов в пересчете на апигенин в сортах сельдерея (листовая форма) проводили методом УФ-спектрофотометрии на приборе *СФ-2000* (Россия). Элементный состав устанавливали методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) на спектрометре *Optima 8000* (Perkin Elmer, США) в соответствии с рекомендациями ОФС.1.2.1.1.0004.15 и ОФС.1.5.3.0009.15. Выделение полисахаридных фракций из обезжиренного сырья сельдерея проводили путем

последовательной экстракции этанолом (спирторастворимые полисахариды – СРПС), водой (водорастворимые полисахариды - ВРПС) и смесью щавелевой кислоты и оксалата аммония 0,5% (1:1) (пектиновые вещества – ПВ). Полученные извлечения осаждали 96% этанолом, фильтровали и осадок высушивали. Количественный выход полисахаридных фракций оценивали гравиметрически до и после очистки методом Севага. Оценку примесей в полисахаридах проводили методом УФ-спектрофотометрии на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) и методом Кьельдаля в соответствии с ОФС.1.2.3.0011 на автоматическом анализаторе азота с потенциометрическим титратором (BUCHI, Швейцария). Мономерный состав фракций изучали методом ВЭТСХ после гидролиза 2% серной кислотой, оценку структуры осуществляли методом ИК-спектроскопии на Фурье-ИК спектрометре Spectrum-3 (Perkin Elmer, США). Молекулярно-массовое распределение фракций проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Ultimate 3000 с рефрактометрическим детектором RI-101 (Dionex, Thermo, Германия). Выделение липофильных фракций из разных форм сельдерея проводили хлороформом на аппарате Сокслета. Полученные фракции анализировали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ/МС) на газовом хромато-масс-спектрометре Clarus 600T (PerkinElmer, США).

Для оценки сортовых преимуществ сельдерея листового была разработана методика количественного определения хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ. Испытания проводили на высокоэффективных жидкостных хроматографах LicArt 62 (Лабконцепт, Россия) и LC 20 (Shimadzu, Япония), оснащенных диодно-матричным детектором. Для приготовления подвижных фаз использовали трифторуксусную кислоту (HPLC grade, Merck, США) и ацетонитрил (HPLC grade, Fisher Chemical, США). Анализ проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0005. Достоверность предложенной методики доказывали путем проведения валидационных испытаний по таким параметрам, как проверка пригодности хроматографической системы, специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость, внутрилабораторная прецизионность), аналитическая область. Оценку сортовых преимуществ по содержанию хлорогеновой кислоты проводили на сортах, выращенных на двух площадках (СНТ «Ручей» и поселок «Лемболово»).

Для оценки количественного содержания кумаринов в сырье сельдерея пахучего были подобраны хроматографические условия и оптимальный способ пробоподготовки. Для проведения испытаний использовали хроматограф Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой Intersil 5 μm ODS-3 100 \AA 250*4.6 m. В качестве СО использовались CRS скополетина, бергаптена, псоралена, метоксалена и изопимпинеллина (SigmaAldrich, США). Проводили валидационную оценку разработанных условий по следующим параметрам: проверка пригодности хроматографической системы, специфичность, сходимость, предел количественного определения (ПКО) методики.

Для наиболее перспективных полисахаридных фракций – ВРПС и ПВ сельдерея корневого – осуществляли модификацию методики выделения, подбор критериев качества и проводили оценку фармакологической активности в эксперименте с применением генно-модифицированных мышей *C57BL/KsJ-db/db*, страдающих диабетом и ожирением. Динамику массы тела животных изучали с помощью весов CE-323 (ЗАО «Sartorius», Россия), содержание жира в организме оценивали на спектроскопическом импедансометре ImpediVET[®] BIS1 («ImpediMed Inc.», США). Работа проводилась с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях и была согласована биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ

Минздрава России. Для фитосубстанций ВРПС и ПВ сформировали проект ТУ и предложили теоретическую концепцию разработки функционального продукта питания.

Для мажоритарных компонентов липофильной фракции черешков сельдерея, выбранной в качестве наиболее перспективной для дальнейших исследований, прогнозировали биологическую активность с применением веб-ресурса Pass online. Осуществляли подбор оптимальных условий для экстракции липофильных веществ из сельдерея черешкового, устанавливали и нормировали критерии качества фракции, формировали проект НД и концепцию разработки мягкой лекарственной формы на ее основе.

Все количественные результаты химического эксперимента обрабатывали статистически с учетом рекомендаций ОФС.1.1.0013 и использованием программы Microsoft Excel. Статистическую обработку результатов биологического эксперимента проводили с помощью программы GraphPad Prism 9.0 (США).

Глава 3. Результаты фитохимического скрининга сырья *Apium graveolens L.*

Фенольный профиль различных форм и сортов сельдерея пахучего, изученный методами ВЭТСХ и УФ-спектрофотометрии, представлен на рисунках 1-2 и в таблице 1.

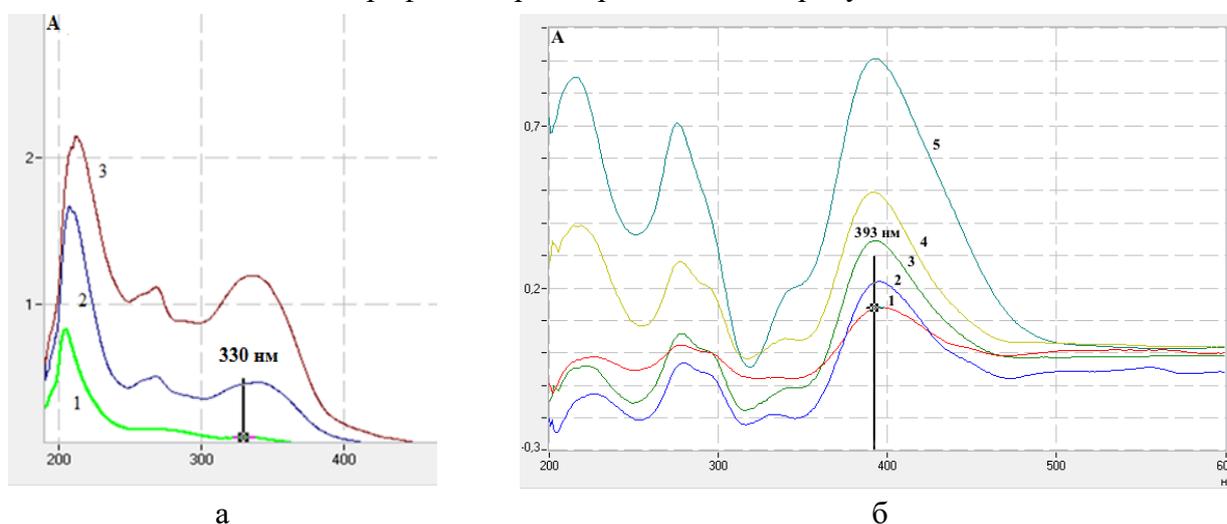


Рисунок 1 – УФ-спектры (а) извлечений из сырья сельдерея пахучего: 1– корневой; 2– черешковый; 3– листовой; (б) извлечений из сортов сельдерея листового: 1– «Самурай», 2– «Парус», 3 - «Нежный», 4– «Захар», 5– СО апигенина (0,0104 мг/мл)

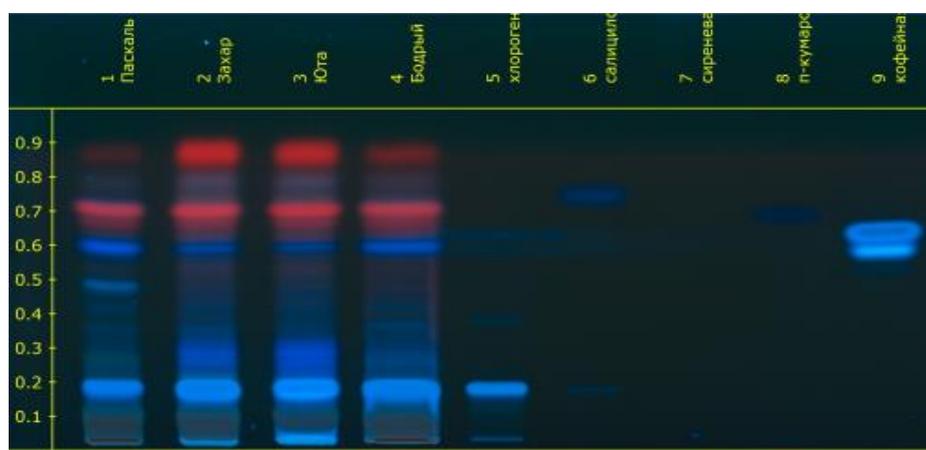


Рисунок 2 – Хроматограмма фенолкарбоновых кислот разных сортов сельдерея листового ($\lambda = 366$ нм): 1 – извлечение из сорта «Паскаль»; 2 – извлечение из сорта «Захар»; 3 – извлечение из сорта «Юта»; 4 – извлечение из сорта «Бодрый»; растворы стандартных образцов (СО) с концентрацией 1 мг/мл: 5 – хлорогеновой кислоты; 6 – салициловой кислоты; 7 – сиреневой кислоты; 8 – п-кумаровой кислоты; 9 – кофейной кислоты.

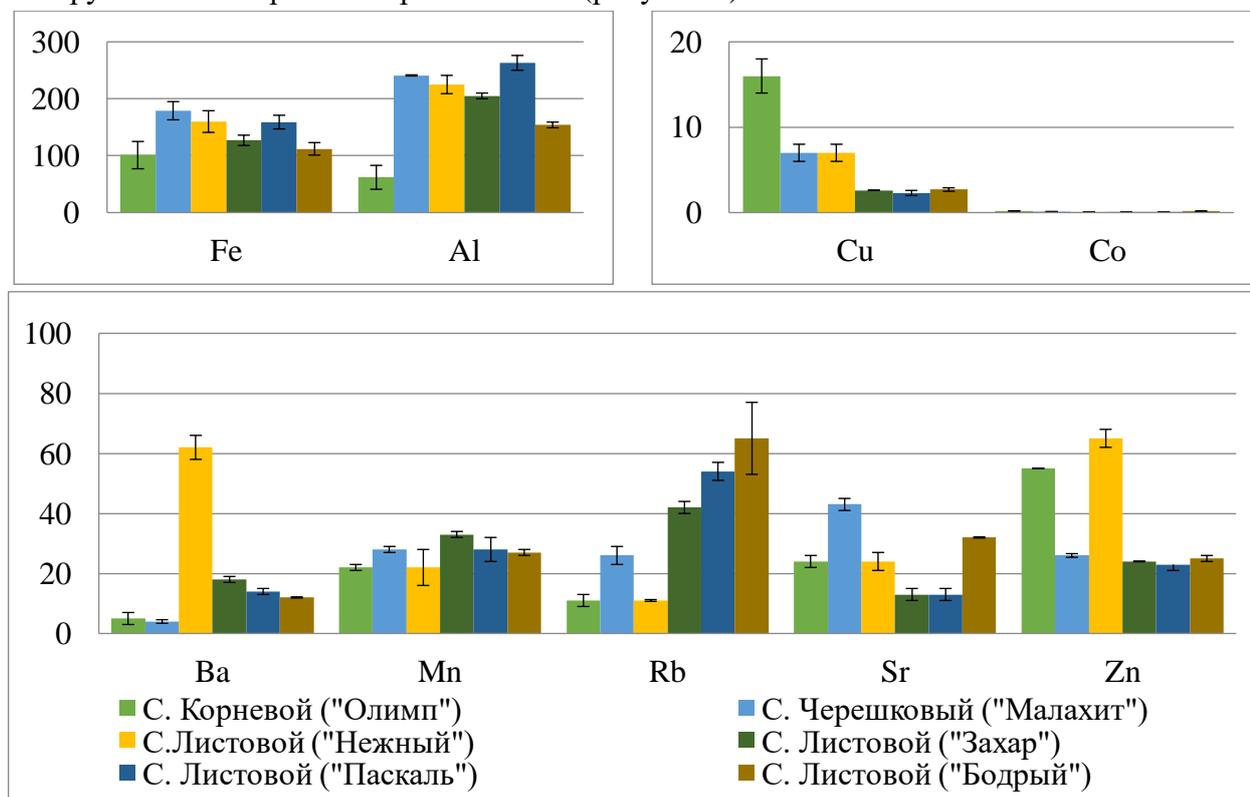
Таблица 1. Результаты количественной оценки веществ фенольной природы в сырье сельдерея пахучего

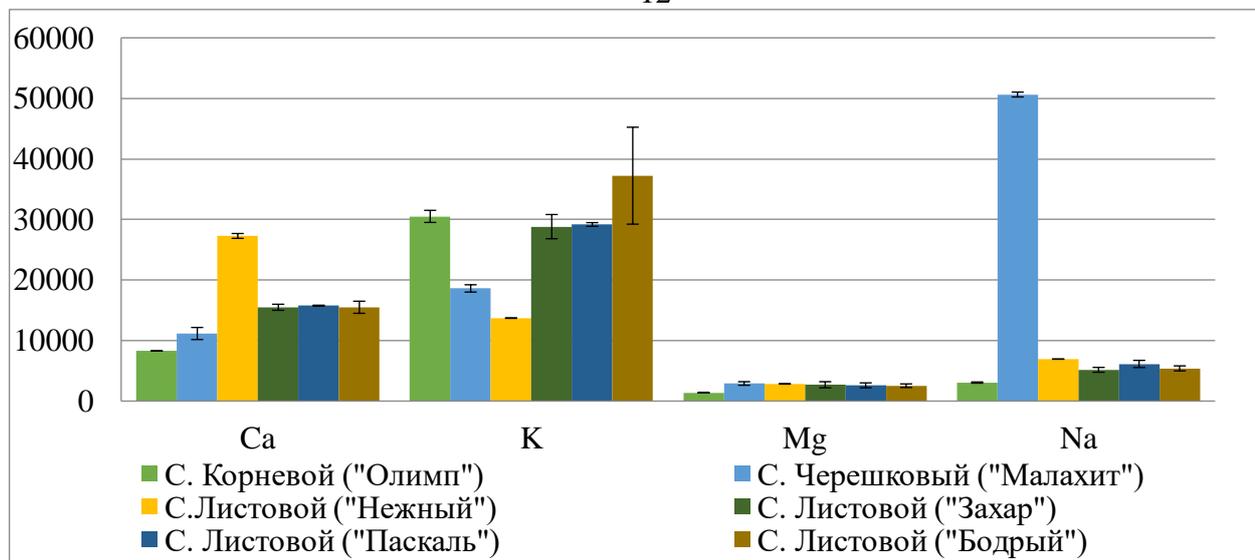
Объект исследования	Содержание, % (n = 5)
Суммы гидроксикоричных кислот (в пересчете на хлорогеновую кислоту)	
Сельдерей корневой (сорт «Олимп»)	0,44 ± 0,05 %
Сельдерей черешковый (сорт «Малахит»)	2,07 ± 0,12 %
Сельдерей листовой (сорт «Нежный»)	6,05 ± 0,23 %
Суммы флавоноидов (в пересчете на апигенин) в сельдерее листовом	
сорт «Нежный»	1,4 ± 0,1 %
сорт «Захар»	2,0 ± 0,2 %
сорт «Самурай»	0,57 ± 0,01 %
сорт «Парус»	1,1 ± 0,2 %

Показано (рисунок 1а, таблица 1), что листовая форма сельдерея содержит значительно большее количество гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую, чем черешковая и корневая, что делает ее объектом выбора в качестве источника фенольных соединений. При этом фенольный профиль сортов сельдерея листового (рисунок 2, таблица 1) демонстрирует различный качественный и количественный состав, что обуславливает актуальность оценки сортовых преимуществ сырья. Исследования суммы флавоноидов в пересчете на апигенин среди сортов сельдерея листового (рисунок 1б, таблица 1) показали, что наиболее перспективными являются сорта «Нежный» и «Захар», которые накапливают (2,0 ± 0,2) % и (1,4 ± 0,1) % флавоноидов соответственно.

Таким образом, листовая форма сельдерея была выбрана как наиболее перспективная в качестве источника веществ фенольной природы, а разнообразный фитохимический профиль ее сортов обуславливает актуальность дальнейшей оценки сортовых преимуществ.

Методом АЭС-ИП в ботанических формах и сортах *Apium graveolens* L. было обнаружено 12 макро- и микроэлементов (рисунок 3).





б

Рисунок 3 – Микроэлементный (а) и макроэлементный (б) состав сельдерея (мг/кг)

Мажоритарными микроэлементами сельдерея являются железо и цинк, накопление которых отличается в разных формах и сортах растения. Содержание железа максимально в сельдерее черешковом (около 180 мг/кг), а также в листьях сортов «Нежный» и «Паскаль» (около 160 мг/кг). Наибольшее накопление цинка характерно для корнеплодов (около 50 мг/кг) и листьев сорта «Нежный» (около 65 мг/кг).

Среди макроэлементов наблюдается высокое накопление кальция в листьях сельдерея (около 27 г/кг растения в сорте «Нежный»). Накопление магния максимально в черешках и листьях сельдерея (от 2,5 до 3 г/кг). Наибольшее содержание калия установлено в листьях сорта «Бодрый» и в корнеплодах растения.

Природные полисахариды – одна из основных групп биополимеров в растительном сырье, которые проявляют поливекторную активность и широко применяются. Результаты органолептической оценки и количественной характеристики выхода полисахаридных фракций из сырья сельдерея представлены в таблицах 2-3.

Таблица 2. Органолептическая характеристика полисахаридных фракций корнеплодов

Фракция	До очистки		После очистки	
СРПС		Мелкокристаллический порошок светло-коричневого цвета с сильным сладким запахом		Аморфный порошок светло-бежевого цвета без запаха
ВРПС		Кристаллический порошок темно-коричневого цвета со светлыми вкраплениями со сладким запахом		Аморфный порошок с вкраплениями прозрачных кристаллов светло-коричневого цвета без запаха
ПВ		Кристаллический порошок светло-коричневого цвета со слабым сладким запахом		Аморфный волокнистый порошок светло-бежевого цвета без запаха

Таблица 3. Количественное содержание полисахаридных фракций в формах сельдерея до и после очистки

	Корневая форма		Черешковая форма		Листовая форма	
	$\bar{X} \pm \Delta X\%$ (n=3)					
	До очистки	После очистки	До очистки	После очистки	До очистки	После очистки
СРПС	2,56±0,39	1,98±0,20	3,04±0,22	1,52±0,11	4,74±0,49	1,89±0,18
ВРПС	16,36±1,35	8,18±0,68	4,20±0,28	2,00±0,14	15,76±0,25	7,88±0,57
ПВ	8,23±0,69	3,38±0,80	4,97±0,24	1,99±0,09	2,95±0,29	1,48±0,15
Сумма	27,15±1,52	13,54±1,07	12,21±0,43	5,51±0,04	23,45±0,62	11,25±0,62

Показано, что наибольший выход отмечен для фракций ВРПС ($8,18 \pm 0,68\%$) и ПВ корнеплодов сельдерея ($3,38 \pm 0,80\%$). Оценку наличия примесей низкомолекулярных соединений в полисахаридных фракциях проводили методом УФ-спектрофотометрии. В качестве критерия приемлемости было выбрано отсутствие поглощения в диапазоне длин волн 210-700 нм, характерных для фенольных соединений и пигментов. Результаты определения азотсодержащих соединений методом Кьельдаля показали уменьшение количества примеси белка после очистки методом Севага, однако их полного удаления достигнуть не удалось. Тем не менее, данный способ очистки приводит к значительным улучшениям органолептических свойств полисахаридов (таблица 3), что обуславливает актуальность его применения.

Результаты изучения мономерного состава полисахаридных фракций после гидролиза методом ВЭТСХ представлены на рисунке 4.

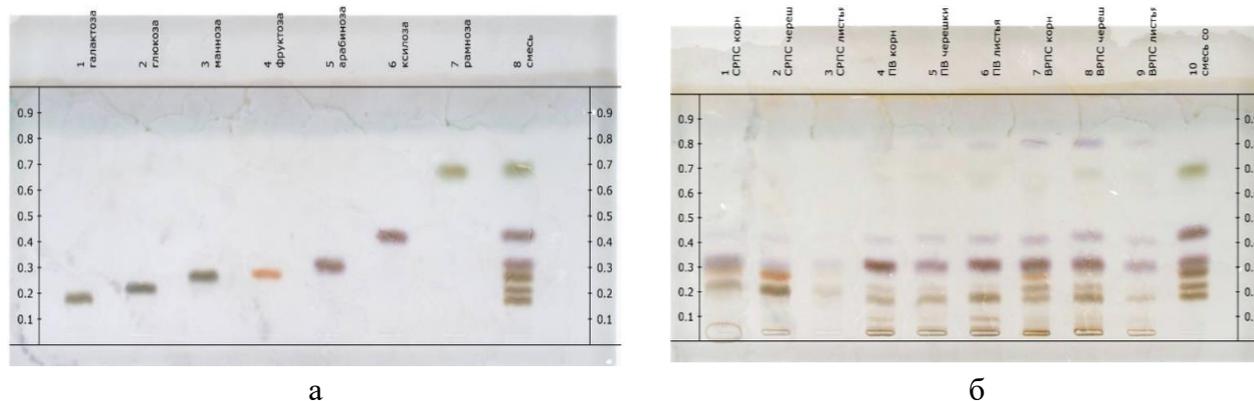


Рисунок 4 – Хроматограммы растворов СО моносахаров ($C = 1$ мг/мл) (а): 1 – галактоза, 2 – глюкоза, 3 – манноза, 4 – фруктоза, 5 – арабиноза, 6 – ксилоза, 7 – рамноза, 8 – смесь СО и гидролизатов полисахаридных фракций сельдерея пахучего (б): 1-3 – СРПС корнеплодов, черешков, листьев соответственно, 4-6 – ПВ корнеплодов, черешков, листьев соответственно, 7-9 – ВРПС корнеплодов, черешков, листьев соответственно, 10 – смесь СО

Установлено, что мажоритарными мономерами во фракциях ПВ и ВРПС являются арабиноза и галактоза. При этом фракции ВРПС корнеплодов демонстрируют комплексный состав (галактоза, глюкоза, фруктоза, арабиноза, ксилоза, рамноза), тогда как на треках фракций СРПС корнеплодов и черешков наблюдаются полосы, соответствующие глюкозе, фруктозе и арабинозе. Фракция СРПС листьев характеризуется следовым количеством моносахаров.

Изучение структурных особенностей полисахаридных фракций проводили методом ИК-спектроскопии. ИК-спектр на примере фракций ВРПС представлен на рисунке 5.

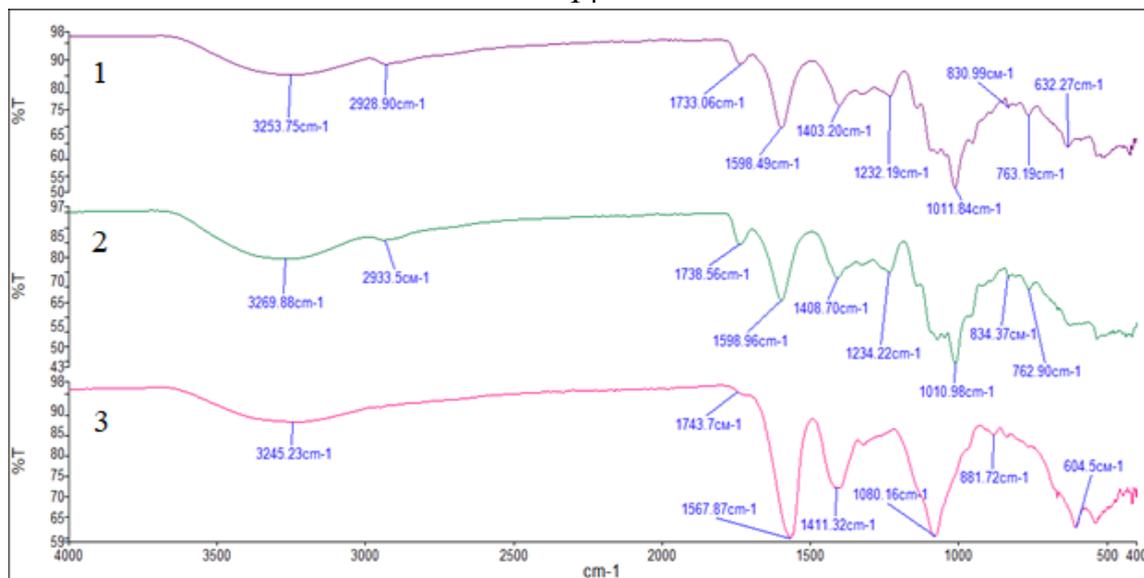


Рисунок 5 – ИК-спектры ВРПС корнеплодов (1), черешков (2) и листьев (3) сельдерея пахучего

Результаты анализа показали наличие колебаний, характерных для карбоксильной группы, циклов моносахаров и гликозидной связи в полисахаридных фракциях разных форм сельдерея.

Установлено, что оптимальными фракциями для дальнейшего изучения являются ВРПС и ПВ корневой формы сельдерея, что обусловлено значительным выходом, сравнительно низким содержанием в них примесей низкомолекулярных соединений, а также ввиду структурных особенностей молекул, включающих наличие уоновых кислот и преобладание в составе молекул галактозы и арабинозы.

Для целевого изучения структуры выбранных полисахаридных фракций проводили оценку молекулярно-массового распределения, которое показало, что молекулы ВРПС и ПВ являются полидисперсными (отношение среднемассовой молекулярной массы к среднечисловой более 1); общая молекулярная масса ВРПС составила 1,12 кДа, ПВ – 1,48 кДа. Наблюдается бимодальное распределение фракций (максимально – 34000 Да). Количество звеньев в цепи образцов составляет менее 1500. В обоих образцах наблюдается большое количество примесей низкомолекулярных сахаров (моно- и олигосахаридов) – порядка 32 % во фракции ВРПС и 28 % в фракции ПВ, что влияет на реологические свойства растворов полисахаридов (уменьшение вязкости). Однако их присутствие может быть обоснованным в составе ВРПС и ПВ как источник быстрых углеводов при регуляции микрофлоры кишечника.

Хлороформные извлечения, представляющие собой липофильную фракцию, выделенные из трех ботанических форм сельдерея пахучего были проанализированы методом ГХ/МС. На хроматограммах (представлено на примере сельдерея черешкового на рисунке 6) наблюдалось наличие пиков около 50 соединений в корнеплодах, 36 и 22 в черешках и листьях соответственно. С использованием библиотеки масс-спектров NIST-20 было идентифицировано более 60 % веществ, относящихся к классам терпенов, производных бензофурана, жирных кислот, кумаринов, фитостеролов и витаминов (рисунок 7). В качестве оптимального источника липофильных соединений можно предложить черешковую ботаническую форму сельдерея пахучего, содержащую наибольшее количество групп БАВ, перспективных для медицинского применения.

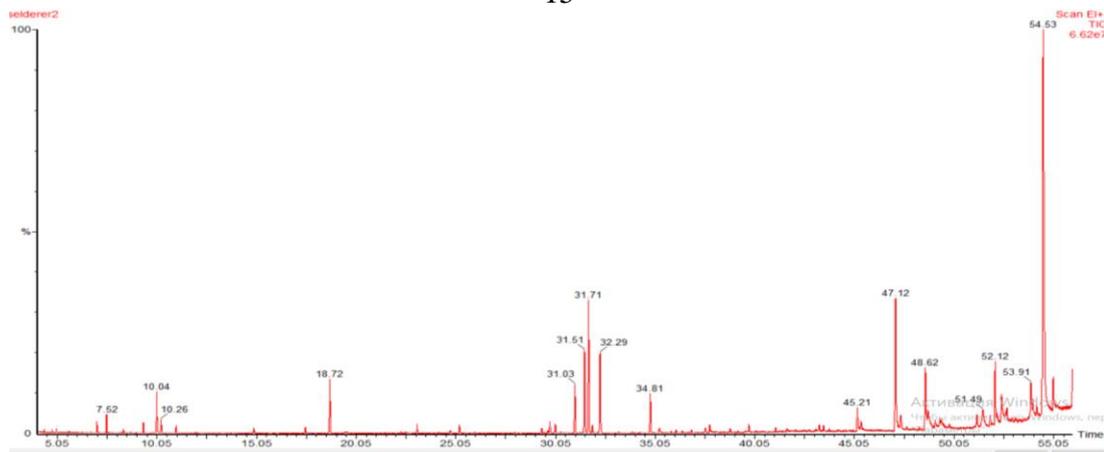


Рисунок 6 – Хроматограмма липофильной фракции сельдерея черешкового

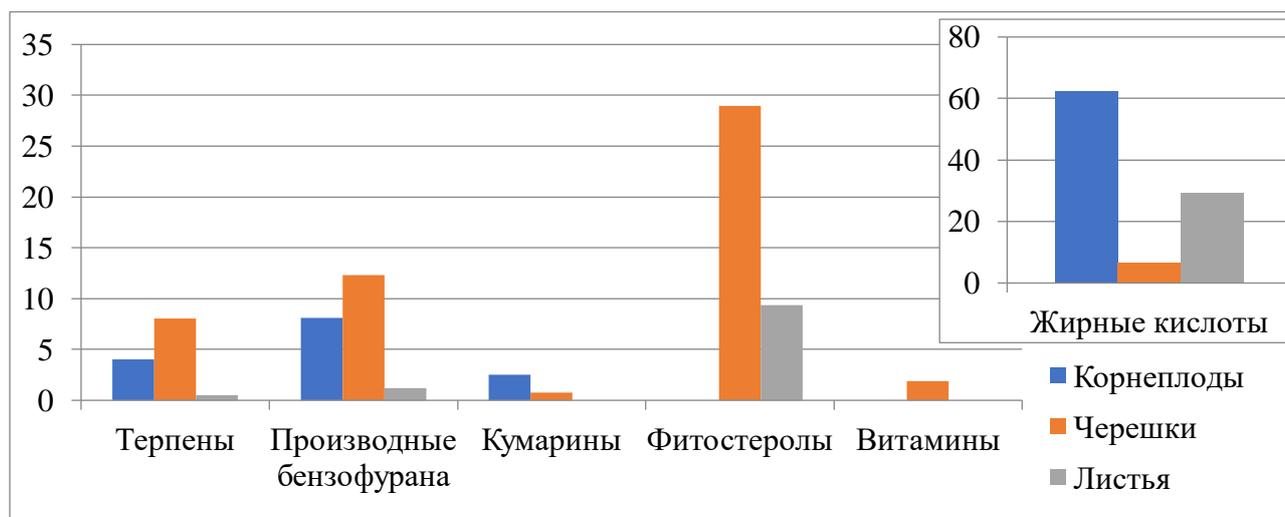


Рисунок 7 – Сравнительное содержание групп БАВ (%) в липофильных фракциях сельдерея пахучего

Глава 4. Разработка и валидация аналитических методик контроля качества сырья *Apium graveolens* L.

С целью изучения сортовых преимуществ по накоплению фенольных соединений, а также для дальнейшей стандартизации сырья, была разработана и валидирована методика определения хлорогеновой кислоты. Преимущества предложенной методики состоят в ее экспрессности (достаточно быстрая пробоподготовка, время хроматографирования – менее 30 минут), высокой разделительной способности (наблюдается разрешение более 1,5 между мажоритарными пиками многокомпонентной растительной фракции), использование распространенной колонки и доступных растворителей, что важно при воспроизведении методики в рутинном анализе.

Результаты валидационных испытаний показали, что методика проходит проверку пригодности хроматографической системы, является специфичной, линейной, правильной и прецизионной. Оценка аналитической области методики показала, что диапазон концентраций хлорогеновой кислоты, в пределах которого обеспечивается требуемая линейность, правильность и прецизионность составляет от 0,001 мг/мл до 0,025 мг/мл. Хроматограммы извлечений из сырья, культивируемого на разных площадках, представлены на примере сорта «Нежный» (рисунки 8-9).

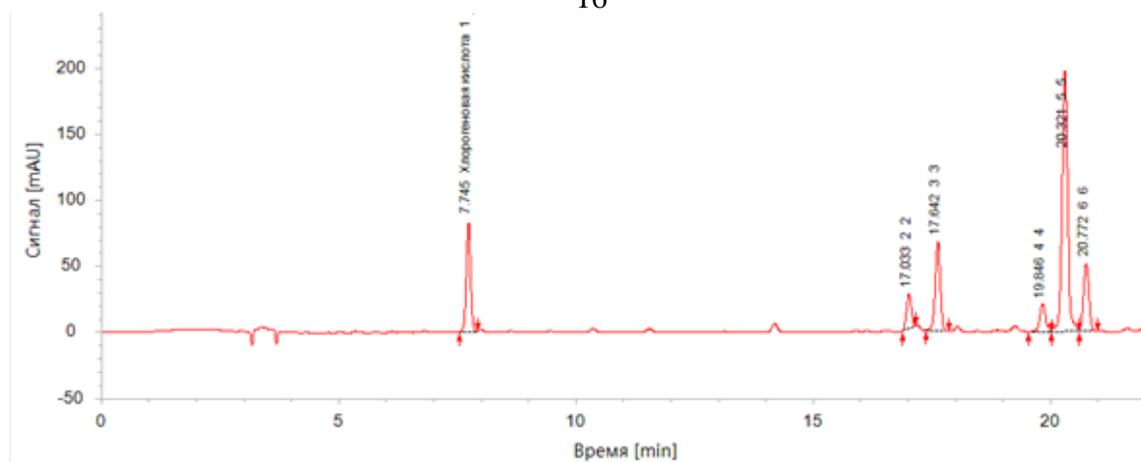


Рисунок 8 – Хроматограмма испытуемого раствора извлечения сельдерея сорта «Нежный» (место заготовки - СНТ Ручей)

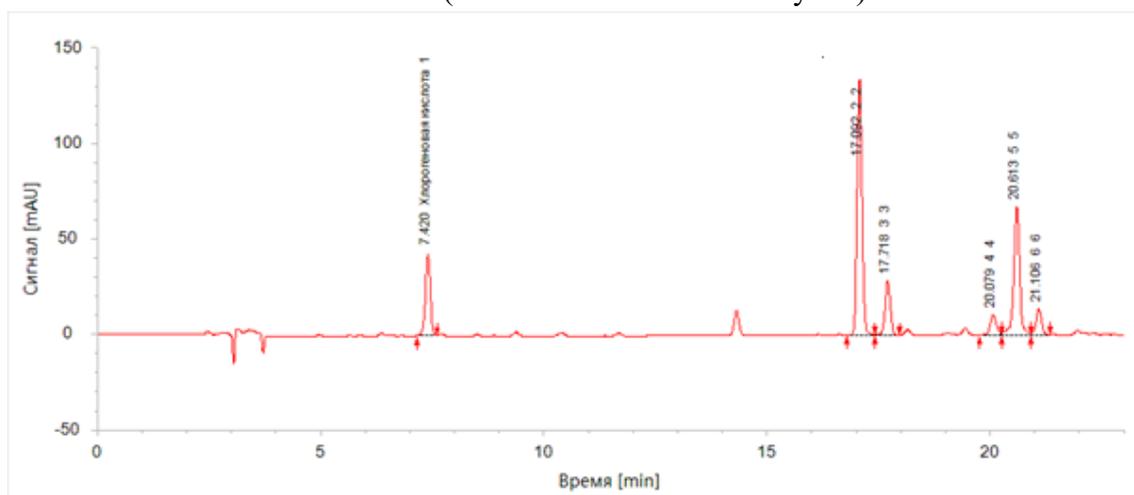


Рисунок 9 – Хроматограмма испытуемого раствора извлечения сельдерея сорта «Нежный» (место заготовки - пос. Лемболово)

Как видно из хроматограмм представленных на рисунках 8-9, качественный состав фенольных соединений относительно статичен и не отличается в зависимости от сорта и места произрастания. Так, наибольшие площади пиков наблюдаются у веществ №2 и №5 (предположительно, гликозидов апигенина, что подтверждается спектральными характеристиками) для всех испытуемых образцов. Пики соединений №3, №4 и №6 также наблюдались на хроматограммах всех исследуемых растворов в разных соотношениях. Количественный состав основных веществ сильно отличался в зависимости от места произрастания, а также между сортами (в 2-5 раз).

Анализ сортовых преимуществ (по содержанию хлорогеновой кислоты) листовой формы сельдерея, выращенной на двух локациях, представлен в таблице 4 и на рисунке 10.

Таблица 4. Количественное содержание хлорогеновой кислоты в сортах сельдерея

Название сорта сельдерея листового	Содержание хлорогеновой кислоты, % (n=5)	
	СНТ Ручей	пос. Лемболово
«Нежный»	0,464 ± 0,012	0,111 ± 0,008
«Бодрость»	0,382 ± 0,012	0,074 ± 0,006
«Ванюша»	0,190 ± 0,030	0,040 ± 0,010
«Летний бум»		0,179 ± 0,030
«Юта»		0,175 ± 0,014
«Пучковый»		0,129 ± 0,030

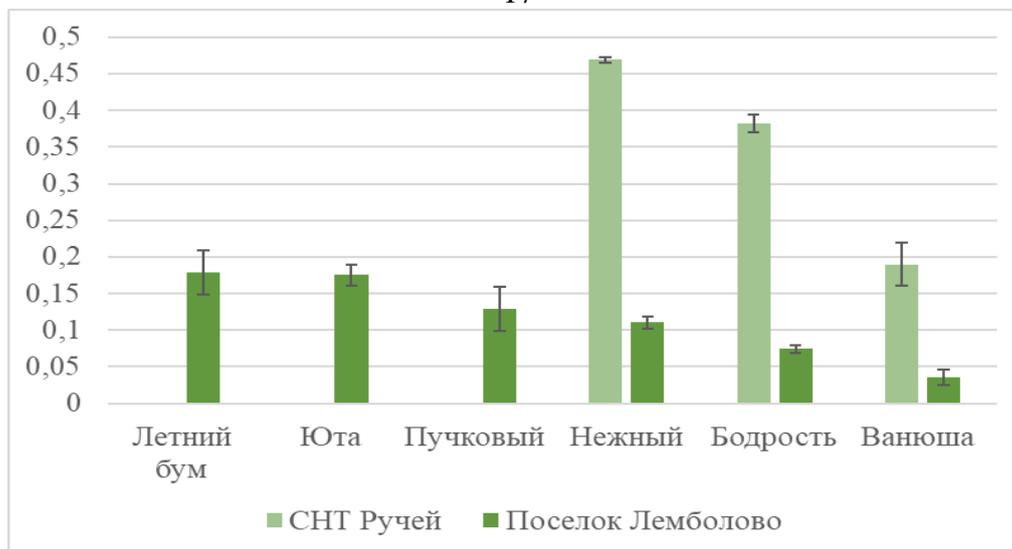


Рисунок 10 – Содержание хлорогеновой кислоты в разных сортах сельдерея листового (произрастание – СНТ Ручей и поселок Лемболово)

Установлено, что содержание хлорогеновой кислоты и других БАВ фенольного происхождения (гликозидов флавоноидов) отличается в зависимости от места произрастания растения, а также от конкретного сорта. Наибольшее содержание хлорогеновой кислоты продемонстрировал сорт «Нежный», выращенный в СНТ Ручей ($0,464 \pm 0,012$) %, а наименьшее – сорт «Ванюша», выращенный в питомнике поселка Лемболово ($0,040 \pm 0,010$) %. При этом наибольшее накопление хлорогеновой кислоты в растениях, культивируемых на площадке Лемболово, наблюдается в сортах «Летний бум» и «Юта» ($0,179 \pm 0,030$) % и ($0,175 \pm 0,014$) % соответственно). Продемонстрированная корреляция между сортами, выращенными на разных локациях, дает возможность заключить, что на накопление БАВ фенольного характера влияют как конкретный сорт сырья, так и агротехнические условия.

Растения семейства *Ariaceae* характеризуются накоплением веществ класса кумаринов, что обуславливает необходимость их анализа. Были подобраны условия пробоподготовки сырья и элюирования стандартного и испытуемых растворов для количественного определения бергаптена, псоралена, метоксалена и скополетина методом ВЭЖХ при совместном присутствии. Выполнена верификация предложенной методики, результаты которой показали, что она является пригодной, специфичной и сходимой. Предел количественного определения кумаринов составил от $0,00006$ мг/мл до $0,0002$ мг/мл в зависимости от анализируемого соединения. Результаты количественного определения бергаптена, псоралена, метоксалена и скополетина в сырье сельдерея отражены таблице 5. Хроматограммы приведены на рисунке 11.

Таблица 5. Количественная оценка кумаринов в сырье сельдерея различных формах

Кумарин	Содержание (%) в ботанической форме		
	Корневая	Черешковая	Листовая
Скополетин	$0,0040 \pm 0,0010$	-	-
Псорален	$0,0070 \pm 0,0008$	-	-
Метоксален	$0,0034 \pm 0,0005$	-	-
Бергаптен	$0,0101 \pm 0,0007$	$0,0210 \pm 0,0008$	$0,0055 \pm 0,0006$
Сумма	$0,0245 \pm 0,0010$	$0,0210 \pm 0,0008$	$0,0055 \pm 0,0006$

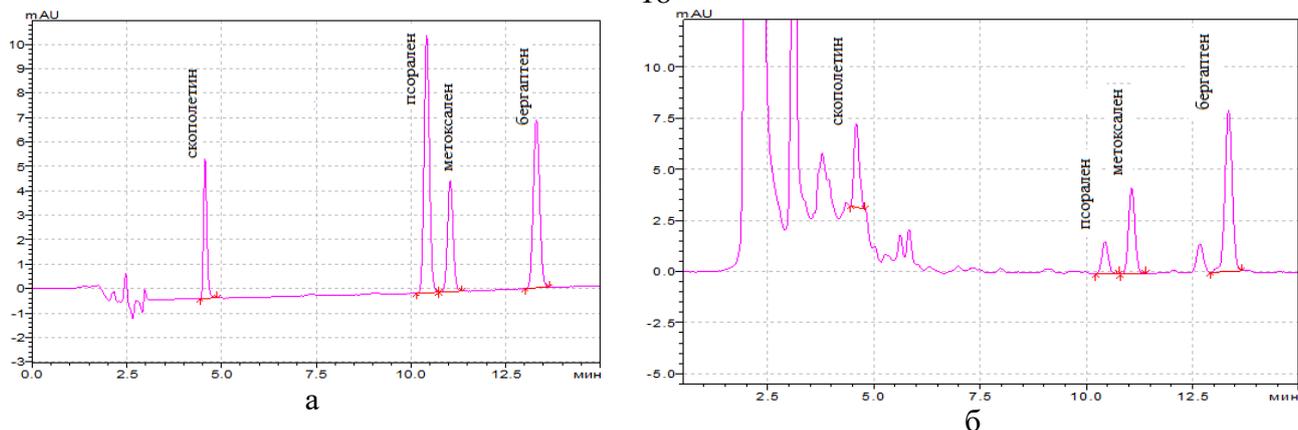


Рисунок 11 – Хроматограммы (а) смеси СО скополетина (0,0005 мг/мл), псоралена (0,0005 мг/мл), метоксалена (0,0003 мг/мл) и бергаптена (0,001 мг/мл) и (б) испытуемого раствора сельдерея корневого

Как видно из данных таблицы, качественный состав кумаринов отличается в разных формах сельдерея, а наибольшим разнообразием представителей данной группы БАВ характеризуются корнеплоды, что коррелирует с результатами скрининга липофильных фракций методом ГХ/МС. Необходимо отметить, что производные кумарина не отличаются мажоритарным накоплением в сырье сельдерея. Но, учитывая выраженную фармакологическую активность данных соединений, их контроль (с точки зрения токсичности пищевых ингредиентов), изучение накопления и выделение (с точки зрения получения лекарственных компонентов) являются важным фитохимическим аспектом.

Глава 5. Разработка продуктов на основе сырья сельдерея пахучего.

Полисахариды природного происхождения являются перспективными соединениями для создания на их основе функциональных и специализированных продуктов питания, а также лекарственных средств, что обуславливает актуальность разработки фитосубстанций на основе ВРПС и ПВ корневой формы сельдерея пахучего. Для улучшения эффективности выделения полисахаридных фракций были подобраны оптимальные условия экстракции (ВРПС: двукратная экстракция водой 1:20, 2 часа; ПВ: двукратная экстракция 0,5% раствором щавелевой кислоты и оксалата аммония (1:1) 1:20, 2 часа). Для стандартизации полученных соединений были выбраны показатели качества и нормированы экспериментальным путем (описание, растворимость, рН, подлинность (ТСХ), примеси низкомолекулярных соединений), а также регламентированы требованиями ГФ РФ (остаточные органические растворители) и ТР ТС-21 (микробиологическая чистота, тяжелые металлы). Результаты исследования показали, что ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея соответствуют установленным нормам и поэтому могут быть использованы для биологического эксперимента, результаты которого представлены на рисунках 12-13.

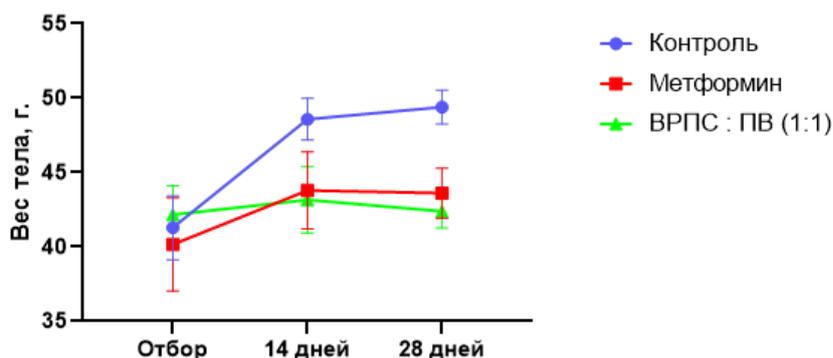


Рисунок 12 – Динамика массы тела в испытуемых группах животных (синий – контроль, красный – метформин, зеленый – смесь ВРПС и ПВ)

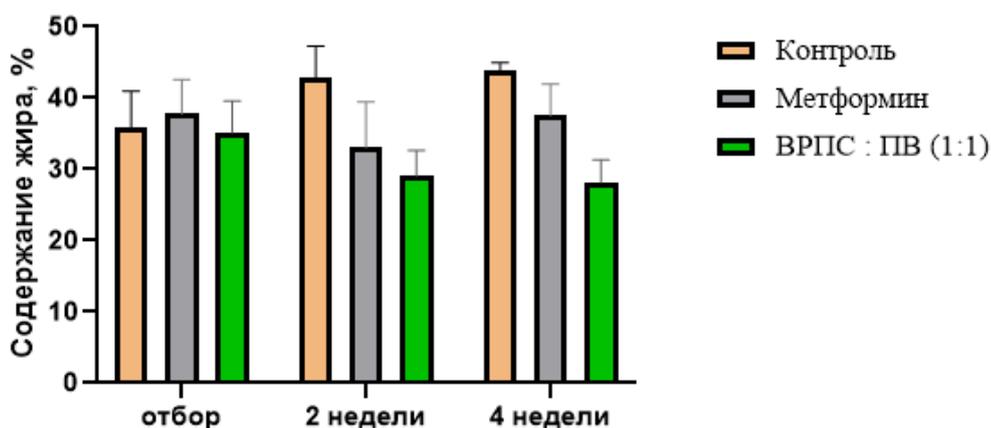


Рисунок 13 – Результаты анализа содержания массы жира в организме исследуемых групп животных (оранжевый – контроль, серый – метформин, зеленый – смесь ВРПС и ПВ)

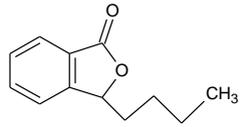
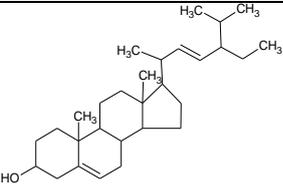
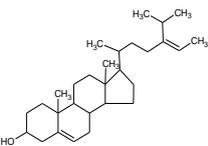
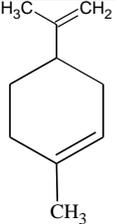
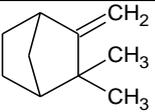
Как видно из представленных данных, прием полисахаридов сельдерея положительно влиял на динамику массы тела животных, страдающих аномальным ожирением и диабетом. Так, после 2 недель приема ВРПС и ПВ масса тела мышей была на 11,1 % меньше, чем в контрольной группе, а через 4 недели – на 14,2 %. Кроме того, содержание жира в организме у животных, получающих полисахаридные фракции сельдерея, статистически значимо уменьшилось в отношении контрольной группы (на 13,8 % через 2 недели и на 15,5 % через 4 недели приема). Полученные результаты говорят о перспективности применения ВРПС и ПВ сельдерея пахучего в комплексной терапии и профилактике ожирения и других метаболических нарушений, что делает актуальным разработку специализированных пищевых и лекарственных продуктов на их основе.

Для фитосубстанции на основе полисахаридных фракций сельдерея была предложена концепция разработки функционального продукта – порошка для приготовления коктейля, который может быть использован в качестве регулятора метаболизма. Теоретический подбор вспомогательных веществ для порошка включает наполнитель, консервант, подсластитель и антислеживающий агент. Кроме того, был разработан дизайн вторичной упаковки коктейля. Предложенный продукт (проектное название – «Arislim») отличается рядом преимуществ, поскольку имеет натуральный растительный состав, экспериментальное подтверждение фармакологической эффективности, а сырье сельдерея может быть культивировано в Краснодарском крае, что позволяет реализовать полный цикл производства внутри страны.

Результаты фитохимического скрининга позволяют позиционировать черешковую форму сельдерея как богатый источник фитостеролов, производных бутилфталида и терпенов – БАВ, обладающих различными фармакологическими эффектами. Для формулирования вектора дальнейших исследований проводили компьютерное прогнозирование биологической активности основных компонентов липофильной фракции черешкового сельдерея с использованием веб-ресурса PASS-online (таблица 6).

Таблица 6. Прогнозирование биологической активности мажоритарных соединений липофильной фракции сельдерея с использованием программы PASS-online

Название вещества	Структурная формула	Вид биологической активности	Pa	Pi
Сенкиунолид (фталиды)		Противоэкзематическая активность	0,776	0,024
		Противозудная, антиаллергическая активность	0,572	0,017
		Противогрибковая активность	0,514	0,028
		Противопротозойная активность	0,452	0,032

Бутилфталид (фталиды)		Противоэксзематическая активность	0,758	0,028
		Регулятор липидного обмена	0,558	0,029
		Противозудное, антиаллергическая активность	0,549	0,023
		Агонист апоптоза	0,508	0,039
		Противогрибковая активность	0,485	0,03
Стигмастерол (стеролы)		Дерматологическая активность	0,81	0,004
		Противоэксзематическая активность	0,806	0,017
		Противопсориатическая активность	0,751	0,004
		Агонист апоптоза	0,753	0,011
		Противозудная активность	0,705	0,008
Изо- фусостерол (стеролы)		Противоэксзематическая активность	0,793	0,02
		Противозудная активность	0,752	0,005
		Противогрибковая активность	0,634	0,015
		Противопсориазная активность	0,621	0,009
		Противовоспалительная активность	0,575	0,037
D-лимонен (терпены)		Противоэксзематическая активность	0,896	0,005
		Дерматологическая	0,716	0,007
		Противопсориатическая активность	0,641	0,007
		Противовоспалительная активность	0,61	0,029
		Противогрибковая активность	0,582	0,02
Камфен (терпены)		Противоэксзематическая активность	0,882	0,006
		Дерматологическая активность	0,726	0,006
		Педикулицидная активность	0,631	0,004
		Противопсориатическая активность	0,585	0,012

Результаты исследования показали, что вещества групп фталидов, фитостеролов и терпенов обладают как системными, так и местными эффектами. При этом для всех рассмотренных соединений наблюдается вероятность наличия тех или иных дерматологических эффектов, включая противоэксземное, противопсориатическое, противовоспалительное и др., что говорит о перспективности разработки мягкой лекарственной формы на основе липофильной фракции сельдерея.

Для обеспечения максимальной эффективности экстракции данных веществ, был предложен оптимальный способ выделения липофильной фракции из черешков сельдерея: растворитель выбора - хлороформ, в соотношении 1:15 (сырье : экстрагент), полнота выделения достигается за 3 цикла. Полученные извлечения объединяли и упаривали на ротационном испарителе, получая выход сухого остатка 3,3 % от массы сырья. Полученный остаток растворяли в вазелиновом масле, выбранном в качестве носителя фитосубстанции. Концентрация липофильной фракции в полученном растворе составила 2,0 %. Для стандартизации фитосубстанции раствора липофильной фракции в вазелиновом масле были подобраны следующие параметры качества: описание, растворимость, подлинность, количественное определение, перекисное число, плотность, нормы были установлены экспериментально путем контроля 3 серий фракций. Показатели «Остаточные органические растворители» и «Микробиологическая чистота» были нормированы согласно ГФ РФ.

Результаты разработки фитосубстанции на основе липофильной фракции сельдерея позволили сформировать концепцию готового продукта на ее основе. Ввиду природы

основных компонентов фракции, перспективной лекарственной формой выступает эмульгель, так как повышает биодоступность активных соединений. Теоретический состав эмульгеля (проектное название – «Apiskin») включает липофильную фракцию, гелеобразователь, эмульгатор в составе масляной фазы, а также воду очищенную, эмульгатор и консервант в составе водной фазы. Для проекта был разработан дизайн упаковки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Критический анализ массива научных данных показал актуальность разработки лекарственных средств, функционального и специализированного питания на основе растительных ингредиентов, что согласуется с нормативно-правовыми документами Российской Федерации в части приоритетного развития науки и технологий. Выбор сельдерея пахучего в качестве сырьевого источника данных продуктов оправдан его достаточной и возобновляемой сырьевой базой, сортовым разнообразием, а также широким фитохимическим составом.

1. Фитохимический скрининг фенольного профиля ботанических форм сельдерея пахучего методами ВЭТСХ и УФ-спектрофотометрии показал, что наибольшим накоплением суммы фенольных кислот и флавоноидов характеризуется листовая ботаническая форма ($6,05 \pm 0,23$) % и ($2,0 \pm 0,2$) % соответственно), что делает ее объектом выбора в качестве источника данной группы БАВ. Оптимальным маркерным соединением для проведения контроля качества была выбрана хлорогеновая кислота в связи с ее преобладающим накоплением в сырье. По результатам оценки минерального профиля ботанических форм и сортов *Apium graveolens* L. было обнаружено 12 макро- и микроэлементов, среди которых накопление кальция преобладало в листьях (27 мг на 1 кг), а накопление магния – в черешках и листьях (от 2,5 до 3 г/кг). Фитохимический скрининг полисахаридных фракций ботанических форм сельдерея пахучего позволил определить ВРПС ($8,18 \pm 0,68$ % после очистки) и ПВ ($3,38 \pm 0,80$ % после очистки) сельдерея корневого как наиболее перспективные для дальнейшего изучения в связи с высоким выходом фракций. Хлороформные извлечения ботанических форм сельдерея были проанализированы в сравнительном аспекте методом ГХ/МС. С использованием библиотеки масс-спектров NIST-20 были идентифицированы вещества, относящиеся к классам терпенов, производных бензофурана, жирных кислот, кумаринов, фитостеролов и витаминов. В качестве оптимального источника липофильных соединений была выбрана черешковая ботаническая форма сельдерея пахучего, содержащая наибольшее количество групп БАВ.

2. Разработана и валидирована методика определения хлорогеновой кислоты - перспективного функционального ингредиента – в сырье *Apium graveolens* L. листовой ботанической формы и проведена оценка сортовых преимуществ растений, выращенных на двух локациях с различными агротехническими условиями. Предложенная методика отличается экспрессностью, ресурсосберегаемостью и высокой разделительной способностью. Результаты валидационных испытаний показали, что методика проходит проверку пригодности хроматографической системы, является специфичной, линейной, правильной и прецизионной. Аналитическая область методики составляет от 0,001 мг/мл до 0,025 мг/мл. Результаты оценки сортовых преимуществ сельдерея показали, что количественное содержание хлорогеновой кислоты и других БАВ фенольного происхождения (гликозидов флавоноидов) отличается в зависимости от места произрастания сырья, а также от конкретного сорта растения. Наибольшее накопление хлорогеновой кислоты продемонстрировал сорт «Нежный», выращенный в СНТ Ручей ($0,464 \pm 0,012$ %), а наименьшее – сорт «Ванюша», выращенный в питомнике поселка Лемболово ($0,040 \pm 0,010$ %). При этом наибольшее накопление хлорогеновой кислоты в растениях, культивируемых

на площадке Лемболово, наблюдается в сортах «Летний бум» и «Юта» ($0,179 \pm 0,030$ % и $0,175 \pm 0,014$ % соответственно). Показана корреляция между сортами, выращенными на разных локациях, что дает возможность заключить, что на накопление БАВ фенольного характера в сельдерее листовом влияют как конкретный сорт сырья, так и агротехнические условия.

3. Разработана оптимальная экспрессная методика определения количественного содержания бергаптена, псоралена, метоксалена и скополетина методом ВЭЖХ при совместном присутствии. Предложенные условия позволяют продлить эксплуатацию узлов прибора, являются воспроизводимыми и позволяют добиться разделения всех анализируемых соединений. Результаты анализа кумаринов и фуранокумаринов в сырье сельдерея показали, что наличие данных веществ достаточно низкое (менее 0,05%), что позволяет сделать вывод о безопасности сырья в отношении токсического действия кумаринов и фуранокумаринов при их применении в качестве потенциальных источников как функциональных пищевых продуктов так и лекарственных средств.

4. Для выбранных по результатам фитохимического скрининга фракций полисахаридов корневой ботанической формы были подобраны критерии контроля качества и проведен частичный анализ субстанций по следующим параметрам: описание, подлинность, растворимость, остаточные органические растворители, примеси низкомолекулярных и азотсодержащих соединений. Изучена фармакологическая активность смеси (1:1) ВРПС и ПВ в отношении ожирения на модели лептиндефицитных мышей, которая продемонстрировала способность полисахаридов снижать массу тела и количество жировой ткани в организме.

5. Прогнозирование фармакологической активности мажоритарных компонентов липофильной фракции черешков сельдерея пахучего, которое продемонстрировало противоаллергический, антипсориазный и другие дерматологические эффекты, позволило сформировать дальнейший вектор исследований в отношении создания фитосубстанции для лечения дерматологических заболеваний. Была разработана оптимальная методика выделения, проведен контроль качества фитосубстанции в вазелиновом масле по выбранным критериям: описание, растворимость, подлинность, количественное определение, остаточные органические растворители, перекисное число, плотность.

6. Таким образом, проведен комплексный сравнительный анализ ботанических форм и сортов сельдерея. Показано, что каждая ботаническая форма позиционируется как отдельный вид лекарственного растительного сырья (ЛРС) с различными маркерными группами БАВ / соединениями и фармакологической направленностью. В качестве источника компонентов для функционального, специализированного питания и лекарственных средств, выбраны полисахаридные фракции корневой и липофильная фракция черешковой ботанической формы сельдерея пахучего. Предложены концепции создания порошка для приготовления коктейля на основе полисахаридных фракций для коррекции метаболических нарушений и мягкой лекарственной формы (эмульгеля) на основе липофильной фракции для терапии дерматологических заболеваний. По результатам комплексного исследования разработаны проекты нормативной документации с критериями стандартизации и методиками анализа на «Сельдерея пахучего корнеплоды», «Сельдерея пахучего черешковой разновидности трава», «Водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества корнеплодов *Apium graveolens* L.» и «Липофильная фракция черешковой формы сельдерея пахучего в вазелиновом масле».

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Сурбеева, Е.С.** Скрининг липофильных фракций ботанических форм Сельдерея пахучего методом ГХ/МС / **Е.С. Сурбеева, Н. Ю. Сипкина, С. И. Комова, У.А. Ефремова,**

- И.И. Тернинко // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т 11, № 3 – С. 181-194. – DOI 10.33380/2305-2066-2022-11-3-181-194
2. **Сурбеева, Е.С.** Анализ сортовых преимуществ листовой формы *Apium graveolens* L. по содержанию хлорогеновой кислоты / **Е. С. Сурбеева**, У.А. Ефремова, В.С. Шуракова, Е.В. Вишняков, И.И. Тернинко // Разработка и регистрация лекарственных средств. –2024. – Т. 13, № 2. – С.142-153. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1779>
3. **Сурбеева, Е.С.** Выделение, очистка и фитохимический скрининг полисахаридных фракций ботанических форм *Apium graveolens* L. / **Е. С. Сурбеева**, С.И. Комова, В.С. Шуракова, К.С. Неведюк, У.А. Ефремова, Н.А. Криштанова, Э.П. Санаева, И.И. Тернинко // Химия растительного сырья. – 2024. – № 2. – С. 126–137. DOI: 10.14258/jcprpm.20240214032.
- Прочие публикации:**
4. **Сурбеева, Е.С.** Сравнительный анализ минерального состава различных сортов и видов сырья *Apium graveolens* L. как средства диетического питания / **Е.С. Сурбеева**, И.И. Тернинко, Ю.Э. Генералова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2021. – Т. 33, №3. – С. 32-40
5. **Сурбеева, Е.С.** Сравнительная идентификация фенольных соединений разных сортов сельдерея пахучего листового / **Е. С. Сурбеева**, И.И. Тернинко // Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, которые содержат компоненты природного происхождения: Материалы III Международной научно-практической интернет-конференции. – Харьков, 2021. – С. 185-186
6. **Сурбеева, Е.С.** Сравнительный фитохимический анализ сырья *Apium graveolens* L. как потенциального источника биологически активных веществ для коррекции избыточной массы тела / **Е. С. Сурбеева**, И.И. Тернинко // Сборник материалов XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2021. – С. 124-129.
7. **Сурбеева, Е.С.** Сравнительная оценка количественного содержания фенольных соединений *Apium graveolens* L., способствующих снижению массы тела / **Е.С. Сурбеева** // Сборник материалов международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы». – Москва, 2021. – С. 479-485
8. **Сурбеева, Е.С.** Сравнительный количественный анализ суммы гидроксикоричных кислот в разных видах и сортах сырья *Apium graveolens* L. / **Е. С. Сурбеева**, И.И. Тернинко // Сборник материалов международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы». – Томск, 2021. – С. 65-67
9. **Сурбеева, Е.С.** Сравнительный анализ содержания апигенина в различных сортах сельдерея листового / **Е. С. Сурбеева**, Ю.Э. Генералова, С.И. Комова, И.И. Тернинко // Сборник материалов IX Международной научной конференции молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». – Москва, 2021. – С. 389-397
10. **Сурбеева, Е.С.** Получение и очистка фракций полисахаридов из корнеплодов *Apium graveolens* L. / **Е. С. Сурбеева**, С.И. Комова, И.И. Тернинко // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург, 2022. – С. 270-274.
11. **Сурбеева, Е.С.** Изучение состава липофильной фракции черешков сельдерея пахучего методом ГХ-МС / **Е. С. Сурбеева**, С.И. Комова, У.А. Ефремова // Сборник материалов международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека». – Москва, 2022. – С. 257-263

12. **Surbeeva, E.S.** Analysis of the *Apium graveolens* root's polysaccharide hydrolyzates by HPTLC / **E.S. Surbeeva**, S.I. Komova, K.S. Nevedyuk, V.S. Shurakova, I. I. Terninko // The 5th Belt & Road International Conference on Traditional Medicine and 2022 Symposium on the Chinese Medicinal Materials. –China, 2022. – P. 110-111
13. **Сурбеева, Е.С.** Разработка фитосубстанции на основе полисахаридных фракций сельдерея пахучего как потенциального компонента специализированного питания / **Е. С. Сурбеева**, И.И. Тернинко // Материалы 1-го Международного форума «Asfen.Forum, новое поколение – 2023». – Алмата, 2023. – С. 203.
14. **Surbeeva, E.S.** Application of HPLC-analysis to assess the varietal advantages of food crops on the example of odorous celery / **E.S. Surbeeva**, S.I. Komova, K.S. Nevedyuk, V.S. Shurakova, I. I. Terninko // 24th International Congress of Phytopharm. – St. Petersburg, 2023. – P. 103.
15. Ефремова У.А. Количественное определение сенкиунолида а в липофильной фракции сельдерея черешкового методом ВЭЖХ / У.А. Ефремова, **Е.С. Сурбеева**, Д.А. Слободенюк, И.И. Тернинко // Сборник материалов XI Международной научной конференции молодых ученых «Современные тенденции развития здоровьесбережения». – Москва, 2023. – С. 207-211

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЭС-ИП - атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой

БАВ - биологически активные вещества

БАД - биологически активные добавки

ВРПС – водорастворимые полисахариды

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ГХ/МС - газовая хроматография с масс-спектрометрией

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

ПВ – пектиновые вещества

ПФ – подвижная фаза

СО - стандартный образец

СРПС – спирторастворимые полисахариды