

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



**Сурбеева Елизавета Сергеевна**

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

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
доктор фармацевтических наук, доцент  
**Тернинко Инна Ивановна**

Санкт-Петербург

2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	14
<b>1.1 Применение растительных компонентов в разработке пищевых и фармацевтических продуктов.</b> .....	14
<b>1.2. БАВ растительного происхождения – перспективные лекарственные кандидаты в регуляции метаболических нарушений</b> .....	18
<b>1.3. Сельдерей пахучий – перспективный источник БАВ для разработки функциональных продуктов и лекарственных средств</b> .....	32
<i>1.3.1 Ботаническая характеристика и сырьевая база <i>Apium graveolens</i> L.</i> .....	32
<i>1.3.2 Фитохимический состав и фармакологическая активность сырья сельдерея пахучего</i> .....	33
<b>1.4. ВЭЖХ – один из основных методов анализа растительных БАВ</b> .....	41
<b>Выводы к главе 1</b> .....	46
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	48
<b>2.1 Объекты исследования</b> .....	48
<b>2.2 Предварительный фитохимический скрининг сырья сельдерея пахучего</b> .....	50
2.2.1. Анализ фенольного профиля ботанических форм и сортов сельдерея пахучего методами ВЭТСХ и УФ-спектрофотометрии .....	50
2.2.1.1. <i>ВЭТСХ-анализ фенольных кислот в ботанических формах сельдерея листового</i> .....	50
2.2.1.2. <i>Количественное определение суммы фенолкарбоновых кислот методом УФ-спектрофотометрии в ботанических формах сельдерея листового.</i> .....	50
2.2.1.3. <i>Количественное определение суммы флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии в сортах сельдерея листового.</i> .....	51
2.2.2. <b>Анализ минерального состава сырья сельдерея методом АЭС-ИСП.</b> .....	52
2.2.3. <b>Выделение и анализ полисахаридных фракций ботанических форм <i>Apium graveolens</i> L.</b> .....	53
2.2.3.1. <i>Выделение и очистка</i> .....	53
2.2.3.1. <i>Изучение структурных характеристик полисахаридных фракций</i> .....	55

2.2.3.4. <i>Определение молекулярно-массового распределения фракций ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея</i> .....	57
<b>2.2.4. Анализ липофильных фракций ботанических форм <i>Arium graveolens</i> L методом ГХ/МС</b> .....	57
2.2.5. <i>Количественный анализ содержания сенкиунолида А в липофильной фракции сельдерея пахучего</i> . .....	58
<b>2.3. Разработка и проведение валидационных испытаний ВЭЖХ-методик количественного определения фенольных соединений в сырье сельдерея пахучего</b> .....	59
2.3.1. <i>Разработка и валидация методики количественного определения хлорогеновой кислоты в сырье сельдерея листового для оценки сортовых преимуществ сырья</i> .....	59
2.3.2. <i>Подбор хроматографических условий для анализа кумаринов</i> .....	60
<b>2.4. Разработка фитосубстанций на основе сырья сельдерея пахучего и предпосылки для их изучения и последующего использования</b> . .....	60
2.4.1 <i>Анализ структуры предложения и объемов продаж БАД, содержащих полисахариды природного происхождения</i> .....	60
2.4.2 <i>Исследование приверженности целевой аудитории к использованию продуктов функционального и специализированного питания</i> .....	61
2.4.3. <i>Модификация методики выделения ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея пахучего</i> ..	62
2.4.4. <i>Выбор показателей качества и разработка проекта ТУ фитосубстанции на основе ВРПС и ПВ сельдерея корневого</i> .....	62
2.4.5. <i>Изучение фармакологической активности фитосубстанций ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея пахучего</i> . .....	64
<b>2.5. Разработка фитосубстанции на основе липофильной фракции черешковой ботанической формы сельдерея пахучего</b> .....	64
2.5.1. <i>Прогностическая оценка биологической активности мажоритарных компонентов липофильных фракций сельдерея методом компьютерного моделирования</i> .....	64
2.5.2. <i>Разработка методики выделения липофильной фракции из черешковой ботанической формы сельдерея пахучего</i> . .....	65
2.5.3. <i>Выбор критериев качества и разработка проекта нормативной документации для фитосубстанции липофильной фракции сельдерея черешкового в вазелиновом масле</i> . .....	65
<b>Выводы к главе 2</b> .....	65

<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКОГО СКРИНИНГА СЫРЬЯ <i>APIUM GRAVEOLENS L.</i></b> .....	67
<b>3.1 Результаты анализа фенольного профиля сырья сельдерея методами ВЭТСХ и УФ-спектрофотометрии.</b> .....	67
3.1.1. <i>Результаты ВЭТСХ-анализа содержания фенольных кислот в ботанических формах и сортах сельдерея пахучего</i> .....	67
3.1.2. <i>Результаты количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в ботанических формах сельдерея пахучего</i> .....	69
3.1.3. <i>Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в сортах сельдерея листового</i> .....	70
<b>3.2 Результаты изучения минерального состава ботанических форм и сортов сельдерея</b> .....	71
<b>3.3. Результаты скрининга полисахаридных фракций в ботанических формах сельдерея пахучего</b> .....	75
3.3.1. <i>Результаты выделения и очистки полисахаридных фракций</i> .....	75
3.3.2. <i>Результаты анализа примесей в полисахаридных фракциях.</i> .....	76
3.3.3. <i>Результаты изучения структурных характеристик полисахаридных фракций.</i> ...	78
3.3.4. <i>Анализ молекулярно-массового распределения ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея</i>	84
<b>3.4 Результаты анализа липофильных фракций ботанических форм сельдерея методом ГХ/МС</b> .....	85
<b>3.5. Результаты анализа производных бутилфталида в черешковой ботанической форме сельдерея пахучего</b> .....	89
<b>Выводы к главе 3</b> .....	91
<b>ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СЫРЬЯ <i>APIUM GRAVEOLENS L.</i></b> .....	93
<b>4.1. Разработка и валидация методики количественного определения хлорогеновой кислоты в сортах сельдерея листового</b> .....	93
<b>4.2. Оценка сортовых преимуществ листовой ботанической формы сельдерея пахучего по содержанию хлорогеновой кислоты</b> .....	96
<b>4.3. Подбор и верификация хроматографических условий для анализа кумаринов и фуранокумаринов в ботанических формах сельдерея листового</b> .....	99

4.3.1. Выбор условий элюирования и способа пробоподготовки сырья сельдерея	99
4.3.2. Результаты верификации методики анализа содержания кумаринов и фуранокумаринов в ботанических формах сельдерея пахучего	101
Выводы к главе 4	109
<b>ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ СЕЛЬДЕРЕЯ ПАХУЧЕГО</b>	<b>111</b>
5.1. Разработка фитосубстанции на основе водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ сельдерея корневого	113
5.1.1. Результаты анализа рынка продуктов специализированного и функционального питания, содержащих полисахариды природного происхождения.	113
5.1.2. Результаты модификации методики выделения ВРПС и ПВ из корнеплодов сельдерея.	119
5.1.3. Выбор и нормирование параметров качества для фитосубстанции на основе ВРПС и ПВ	120
5.1.4. Результаты оценки фармакологической активности ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея.	123
5.1.5. Концепция разработки порошка для приготовления коктейля на основе фитосубстанции из полисахаридов сельдерея.	125
5.2. Разработка фитосубстанции на основе липофильной фракции черешковой ботанической формы	126
5.2.1. Прогнозирование биологической активности мажоритарных соединений липофильных фракций <i>Arium graveolens L.</i>	126
5.2.2. Выбор оптимальной методики выделения липофильной фракции из черешковой ботанической формы сельдерея пахучего.	129
5.2.3. Выбор и нормирование показателей качества липофильной фракции и разработки проекта НД на ее основе.	131
5.2.4. Концепция разработки мягкой лекарственной формы на основе фитосубстанции липофильной фракции сельдерея черешкового	132
Выводы по главе 5	133
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>135</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	<b>138</b>

<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	140
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А</b> .....	154
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б</b> .....	162
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ В</b> .....	168
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Г</b> .....	179
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Д</b> .....	184
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Е</b> .....	187
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Ж</b> .....	198
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ З</b> .....	200

## 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; Nićetin 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

### 1.1 Применение растительных компонентов в разработке пищевых и фармацевтических продуктов.

Средства растительного происхождения применяются во всем мире для профилактики и терапии различных заболеваний, включая нарушения метаболизма, инфекции, воспалительные реакции, патологии гепатобилиарной системы, сердечно-сосудистые заболевания и др. [1]. При этом для фитопрепаратов характерно все многообразие лекарственных форм. Так, лекарственные средства растительного происхождения представлены лекарственным растительным сырьем (ЛРС) (как моно- так и в составе сборов), новогаленовыми экстрактивными препаратами (настойками, экстрактами), таблетками, сиропами и др.

Разработка функциональных продуктов питания<sup>1</sup> является одним из возможных направлений применения растительных компонентов и относится к приоритетной разработке научно-технического развития Российской Федерации [2]. Данные продукты за счет комплекса функциональных пищевых ингредиентов (полисахариды, биологически активные вещества (БАВ) вторичного биосинтеза: флавоноиды/полифенолы, каротиноиды, витамины, жиры, минеральные вещества и др.) способствуют поддержке и коррекции здоровья человека и направлены на профилактику патологических состояний путем предотвращения или восполнения дефицита питательных веществ в организме [3]. Таким образом, прием функциональных пищевых продуктов повышает качество жизни потребителей и способствует решению социально значимой задачи по обеспечению здоровья нации.

Помимо функциональных продуктов питания, актуальной является разработка продуктов специализированного питания<sup>2</sup>, включающего в себя БАДы<sup>3</sup>, лечебное, профилактическое питание и др. Так, согласно распоряжению правительства РФ от 31.12.2020 № 3684-р, утверждена

---

<sup>1</sup>Функциональный пищевой продукт - специальный пищевой продукт, предназначенный для систематического употребления в составе пищевых рационов всеми возрастными группами здорового населения, обладающий научно обоснованными и подтвержденными свойствами, снижающий риск развития заболеваний, связанных с питанием, предотвращающий дефицит или восполняющий имеющийся в организме человека дефицит питательных веществ, сохраняющий и улучшающий здоровье за счет наличия в его составе функциональных пищевых ингредиентов [ГОСТ Р 52349-2005 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения (с Изменением N 1)]

<sup>2</sup> Специализированная пищевая продукция - пищевая продукция, для которой установлены требования к содержанию и (или) соотношению отдельных веществ или всех веществ и компонентов и (или) изменено содержание и (или) соотношение отдельных веществ относительно естественного их содержания в такой пищевой продукции и (или) в состав включены не присутствующие изначально вещества или компоненты (кроме пищевых добавок и ароматизаторов) и (или) изготовитель заявляет об их лечебных и (или) профилактических свойствах, и которая предназначена для целей безопасного употребления этой пищевой продукции отдельными категориями людей [ТРТС021/2011 Технический регламент Таможенного союза "Обезопасности пищевой продукции"(с изменениями на 14 июля 2021 года) Технический регламент Таможенного союза от 09.12.2011 N021/2011].

<sup>3</sup> Биологически активные добавки к пище (БАД) - природные и (или) идентичные природным биологически активные вещества, а также пробиотические микроорганизмы, предназначенные для употребления одновременно с пищей или введения в состав пищевой продукции [ТРТС021/2011 Технический регламент Таможенного союза "Обезопасности пищевой продукции"(с изменениями на 14 июля 2021 года) Технический регламент Таможенного союза от 09.12.2011 N021/2011].

программа фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) [4], которая включает в себя разработку инновационных технологий новых специализированных и функциональных пищевых продуктов, пищевых ингредиентов.

Согласно данным литературы [5], за последние 10 лет наблюдается положительная тенденция динамики рынка БАДов: повышается спрос и количество игроков на рынке. При этом, политическая и экономическая обстановка в стране способствует увеличению доли отечественных производителей, что подтверждает перспективность разработки и вывода на рынок новых специализированных продуктов отечественного производства.

Функциональное и специализированное питание находится на стыке пищевой и фармацевтической индустрий, поскольку относится к пищевым продуктам, но применяется в медицинских целях. В связи с этим, для создания наиболее эффективных и инновационных продуктов целесообразна коллаборация фармацевтической и пищевой промышленности.

Растительное сырье является перспективным источником для создания функциональных продуктов, специализированного питания и в перспективе лекарственных средств за счет содержания различных групп БАВ, включая фенольные соединения, танины, фитостеролы, сапонины, витамины и др. [6], которые можно отнести как к функциональным ингредиентам, так и к фармацевтически активным субстанциям. Актуальность разработки растительных средств также подтверждается высокой приверженностью покупателей к фитопрепаратам: согласно исследованиям Market Research Future [7], наблюдается увеличения роста рынка средств растительного происхождения, повышение потребительских предпочтений среди разных групп населения в отношении натуральных и растительных товаров. Это обуславливается пониженным количеством побочных эффектов фитопрепаратов по сравнению с синтетическими, а, следовательно, лучшей переносимостью, традицией применения, а также относительно низкой стоимостью лекарственных средств растительного происхождения.

Особенное внимание с точки зрения сырьевых источников растительных компонентов привлекают к себе сельскохозяйственные культуры: с одной стороны являющиеся пищевыми продуктами, а с другой – накапливающие различные БАВ, которые могут использоваться в медицинских целях. Кроме того, пищевые культуры имеют широкую сырьевую базу на территории Российской Федерации, что нивелирует часть издержек по его экспорту, а также позволяет сформировать полный цикл производства на территории страны. Важно отметить, что сельскохозяйственные растения характеризуются наличием большого количества сортов, которые отличаются между собой урожайностью и морозостойкостью [8]. Кроме того, на примере культуры *Petroselinum crispum* L. показано [9] зависимость накопления БАВ от сорта растения, что значительно расширяет сырьевые возможности.

Таким образом, исходя из вышесказанного, можно предложить концепцию ступенчатой разработки продуктов на основе сельскохозяйственного сырья, визуализированную на рисунке 1: пищевые культуры являются источниками различных БАВ, на основе которых могут быть созданы и выведены на рынок функциональные продукты питания. Затем, на основе уже полученных продуктов могут быть продолжены исследования, разработаны специализированные продукты и, после проведения доклинических и клинических испытаний, лекарственные средства.

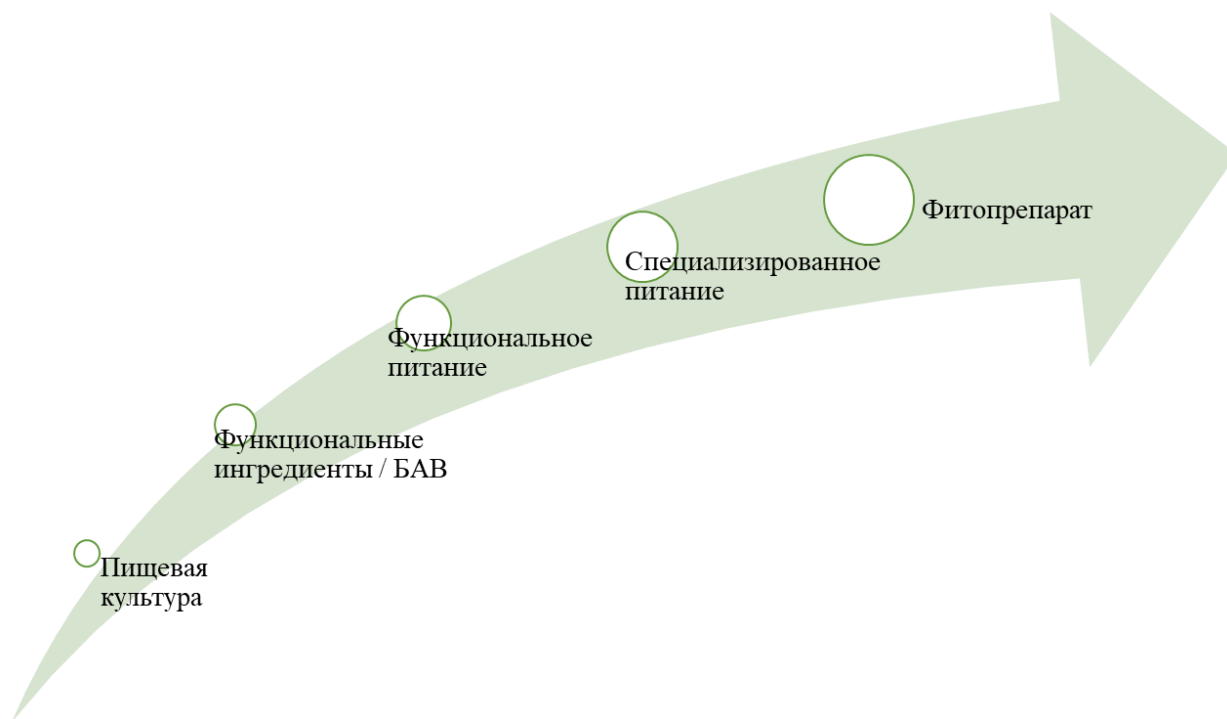


Рисунок 1 – Концепция разработки пищевых и фармацевтических продуктов на основе сельскохозяйственного сырья

В таблице 1 рассмотрены подходы к законодательному регулированию оборота функциональных, специализированных продуктов и лекарственных средств (ЛС) растительного происхождения, которые могут быть разработаны на основе пищевых сельскохозяйственных культур.



Таблица 1 – Сравнительная характеристика нормативной регуляторной базы потенциальных продуктов на основе растительного сырья

Характеристика	Вид продукта		
	Функциональная продукция	Специализированная продукция	Лекарственные средства
Регламентирующие документы	ГОСТ Р 51074-2003 Продукты пищевые [10]; Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [11]		Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 N 61-ФЗ [13]
	ГОСТР 55577 — 2013 Продукты пищевые функциональные. Информация об отличительных признаках и Эффективности [12].		
Примеры продукции	Коктейли, батончики, снеки, каши, супы и др. продукты, содержащие функциональные пищевые ингредиенты в количествах не менее 15% от суточной нормы потребления	пищевая продукция для детского питания; пищевая продукция для диетического лечебного и диетического профилактического питания; пищевая продукция для питания спортсменов, беременных и кормящих женщин; БАД.	фармацевтическая субстанция растительного происхождения (растительная фармацевтическая субстанция); лекарственный растительный препарат; Лекарственное растительное сырье
Регистрирующий орган	Роспотребнадзор		Минздрав
Срок регистрации	бессрочно		Бессрочно (кроме зарегистрированных впервые)
Реестр	Реестр продуктов питания [14]	Единый реестр свидетельств о государственной регистрации [15]	Государственный реестр лекарственных средств [16]

## **1.2. БАВ растительного происхождения – перспективные лекарственные кандидаты в регуляции метаболических нарушений**

В настоящее время фокус мирового научного сообщества направлен на изучение фармакологической активности БАВ природного происхождения в терапии и профилактике метаболических нарушений, включая ожирение, сахарный диабет 2 типа, неалкогольную жировую болезнь печени и другие заболевания, так как данная группа патологий является актуальной проблемой здравоохранения во многих странах, в том числе в Российской Федерации. По данным ВОЗ [17], на 2022 г. 43% взрослого населения имели избыточный вес, а 16% страдали ожирением, что составляет 2,5 млрд и 890 млн человек соответственно. Это говорит о высокой актуальности разработки средств терапии и профилактики метаболических нарушений. Согласно клиническим рекомендациям [18] лечение ожирения основано, прежде всего, на немедикаментозной терапии: формировании пищевых привычек и регулярной физической нагрузке. Метаболические нарушения корректируются пищевым поведением пациента, при этом рацион может быть дополнен приемом функциональных и специализированных продуктов питания. Медикаментозное лечение ограничено небольшим количеством синтетических препаратов (орлистат, сибутрамин, лираглустин), применение которых возможно только по назначению врача, сопряжено с рядом негативных побочных эффектов и рекомендовано пациентам, не достигшим значимого результата (снижение 10% массы тела за месяц) посредством немедикаментозной терапии. Одним из современных подходов к терапии ожирения является применение семаглутида, относящегося к агонистам рецепторов глюкагоноподобного пептида-1. Клинические исследования демонстрируют высокую эффективность применения семаглутида, выраженную в клинически значимом снижении массы тела пациентов, а также безопасность препарата, которая позволяет применять его в долгосрочной терапии [19]. Однако, применение данного препарата является дорогостоящим.

Растительные БАВ широко распространены в качестве источников специализированных продуктов питания пациентов с метаболическими нарушениями. Тем не менее, данные вещества не включены в клинические рекомендации, что прежде всего может быть обусловлено низкой доказательной базой клинической эффективности данных веществ. С целью анализа «структура-действие» [20-73] растительных БАВ в отношении метаболических нарушений был проведен литературный обзор экспериментальных статей, в подавляющем количестве основанных на результатах доклинических исследований. Поиск данных осуществляли на основе публикаций в наукометрических базах Science Direct, Pubmed, Google Scholar, глубина поиска – 5-15 лет. Обобщенные данные, представленные в таблице 2 и на рисунке 2, дают возможность заключить, что флавоноиды, алкалоиды, фталиды, фитостеролы и полисахариды проявляют активность в отношении отдельных элементов патогенеза ожирения и ассоциированных с ним заболеваний.

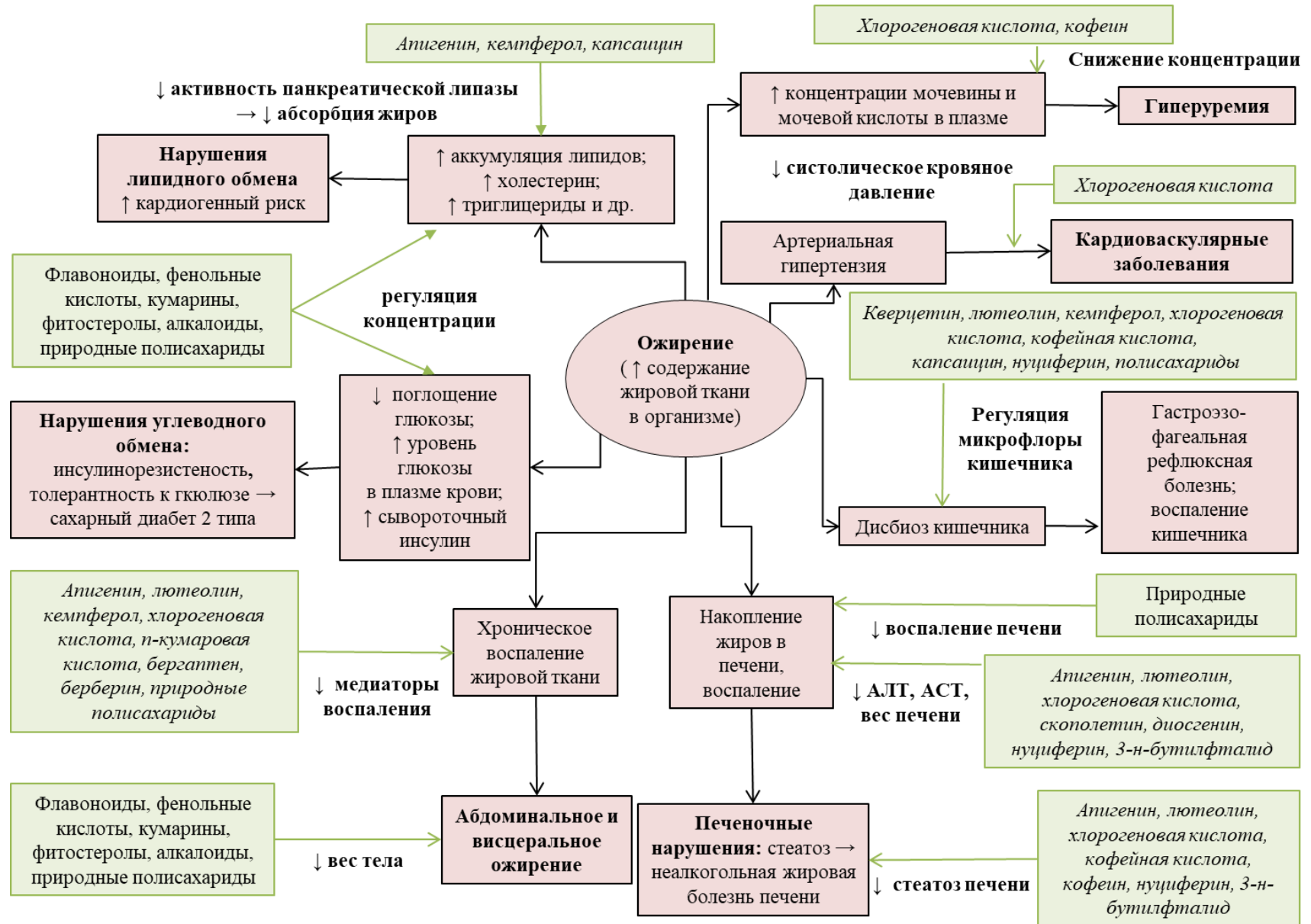
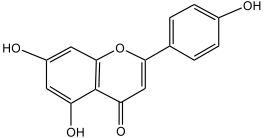
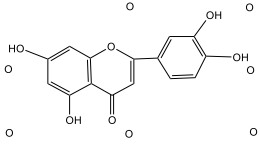
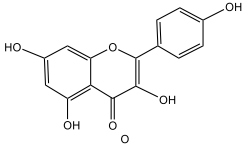
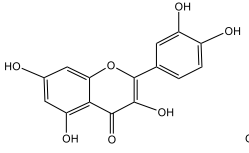
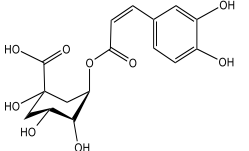


Рисунок 2 – Схема механизма действия растительных БАВ на различные звенья нарушения метаболизма

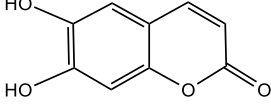
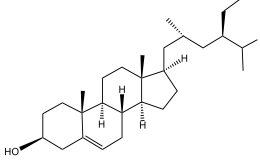
Таблица 2 – Обзор фармакологической активности БАВ различных групп в отношении ожирения и метаболического синдрома

Наименование, структура БАВ	Предполагаемый механизм действия	Влияние на метаболические нарушения	И.
<b>Фенольные соединения</b>			
<b>Флавоноиды</b>			
<p><i>Апигенин</i> 5,7-дигидрокси-2-(4-гидрофенил)хромен-4-он</p> 	<p>Апигенин + нефосфолирированный преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT-3) → ↓ фосфолирирование STAT-3 (индуцированное ожирением) → ↓ экспрессия гамма-рецептора, активирующего пролифератор пероксисомы (PPAR-γ) (PPAR-γ2)</p>	<p>↓ вес тела; ↓ висцеральная жировая ткань; ↓ дифференцировка адипоцитов</p>	20
	<p>Апигенин + панкреатическая липаза → комплекс с водородными связями → обратимое ингибирование панкреатической липазы</p>	<p>↓ активность панкреатической липазы → ↓ адсорбция жиров; синергическое ингибирование с орлистатом.</p>	21
	<p>Апигенин + PPAR-γ (PPAR-γ3) → ↑ PPAR-γ активация → ↑ поляризация макрофагов M1 и M2; ↓ интерлейкина (ИЛ)-12, фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α), ИЛ-6; ИЛ-1β; аланинаминотрансфераза (АЛТ); аспаргатаминотрансфераза (АСТ)</p>	<p>↓ индуцированное ожирением воспаление; ↓ общий холестерин и триглицериды</p>	22
	<p>↓ ИЛ-1β и ИЛ-18; ингибирование активности ксантиноксидазы; ↓ мочевая кислота; ↓ активные формы кислорода; ↓ АЛТ; ↓ АСТ</p>	<p>↓ вес печени; ↓ стеатоз печени; ↓ вес тела; ↓ аккумуляция липидов, ↓ уровень триглицеридов; ↑ чувствительность к инсулину</p>	23

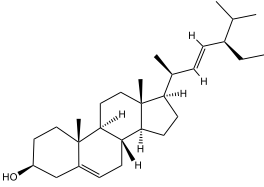
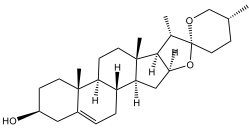
<p><i>Лютеолин</i> 2-(3,4-дигидрокси- фенил)-5,7-ди- гидроксихромен-4- он</p> 	<p>↓ экспрессия матричной рибонуклиновой кислоты (мРНК) маркеров воспаления; ↓ макрофаги CD11c+; моноцитарный хемотаксический фактор (MCP-1); ФНО-α; ИЛ-6;</p> <p>↓ уровни лептина и резистина в плазме, соотношение лептин/адипонектин; ↓ ФНО-α, MCP-1, ИЛ-6, макрофагальный воспалительный белок-1β (MIP-1β), ингибитор активации плазминогена 1 типа (PAI-1);</p> <p>↓ экспрессия генов, связанных с инфильтрацией макрофагов; ↓ гипертрофия островков поджелудочной железы</p>	<p>↓ воспаление жировой ткани; ↓ резистентность к инсулину</p> <p>↓ вес тела; ↓ масса белой жировой ткани; ↓ свободные жирные кислоты в печени и плазме; ↓ резистентность к инсулину; ↑ уровень инсулина в плазме; ↑ уровня глюкозы натощак</p>	<p>24</p> <p>25</p>
<p><i>Кемпферол</i> 3,5,7-тригидрокси- 2-(4- гидроксифенил) хромен-4-он</p> 	<p>↓ экспрессия мРНК ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6, MCP-1</p> <p>↓ соотношение <i>Firmicutes</i> / <i>Bacteroidetes</i> ;</p> <p>кемпферол + остатки Lys42 и Tyr404 в активном центре панкреатической липазы → комплекс посредством водородных связей → ↓ связывание субстрата с активным центром фермента</p> <p>↓ активность пируваткарбоксилазы → ↓ глюконеогенез в клетках HepG2 и первичных гепатоцитах,</p>	<p>↓ вес тела; ↓ эпидермальное накопление жира; ↓ размер адипоцитов; ↓ уровни триглицеридов; холестерина; глюкозы в плазме крови; регуляция микрофлоры кишечника; ↓ воспаление кишечника</p> <p>↓ активность панкреатической липазы (обратимое ингибирование) → ↓ адсорбция жиров; синергическое ингибирование с орлистатом.</p> <p>↑ чувствительность к инсулину; ↓ выработка глюкозы в печени</p>	<p>26</p> <p>27</p> <p>28</p>

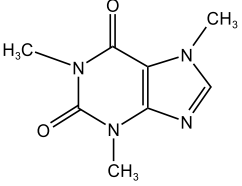
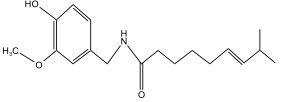
<p><i>Кверцетин</i> 2-(3,4-дигидро- оксифенил)-3,5,7- тригидрокси- хромен-4-он</p> 	<p>Встраивание в сигнальные пути генов термогенеза (белок-разобщитель первого типа (UCP1), пролифератор пероксисомы-γ-ко-активатора-1α (PGC1α и др.); ↓ популяция <i>Firmicutes</i>; ↑ популяция <i>Bacteroidetes</i></p> <p>↑ транслокация транспортера глюкозы 4 и сигнал протеинкиназы В; ↓ инфильтрация тучных клеток и макрофагов в жировых тканях; ↓ лептин; ↓ ИЛ-6; MCP-1; активация аденозин-5'-монофосфат-активируемой протеинкиназы (АМРК).</p>	<p>↑ эффект «побурения» адипоцитов; ↑ термогенеза в белой жировой ткани; ↓ масса тела; ↓ вес белой жировой ткани ↓ уровень холестерина; ↓ дисбиоз микрофлоры кишечника</p> <p>↓ вес тела; ↑ чувствительность к инсулину; ↑ поглощение глюкозы в жировых тканях</p>	<p>29</p> <p>30</p>
<b>Фенольные кислоты</b>			
<p><i>Хлорогеновая кислота</i> (1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3-(3,4-дигидроксифенил)проп-2-еноил]окси-1,4,5-тригидроксициклопексан-1-карбоновая кислота</p> 	<p>↑ UCP1; PGC-1α; ↓ триацилглицерин</p> <p>↓ популяции <i>Lachnospiraceae</i> и <i>Oscillospira</i>; ↑ разнообразие микробиоты кишечника; ↓ АЛТ; ↓ отложение коллагена и инфильтрация воспалительных клеток в левом желудочк;</p> <p>изменение экспрессии мРНК липогенеза; ↓ АЛТ; ↓ АСТ</p> <p>↓ <i>Desulfovibrionaceae</i>, <i>Ruminococcaceae</i>, ↑ <i>Lachnospiraceae</i>, <i>Erysipelotrichaceae</i>, <i>Bacteroidaceae</i>, <i>Lactobacillaceae</i></p>	<p>↑ эффект «побурения» адипоцитов; ↑ трансдифференцировка белых адипоцитов 3T3-L1 в бежевые адипоциты; ↓ толерантность к глюкозе;</p> <p>↓ висцеральный жир; ↓ воспаление и отложение жира в печени; ↓ fat deposition in liver; ↓ basal blood glucose concentrations; ↓ систолическое АД;</p> <p>↓ вес тела; ↓ вес печени; ↓ общий холестерин; ↓ триглицериды; регуляция липидного профиля; ↓ дисбиоз микрофлоры кишечника;</p>	<p>31</p> <p>32</p> <p>33</p>

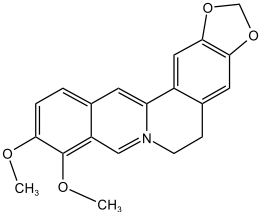
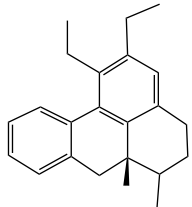
<p><i>Кофейная кислота</i> (Е)-3-(3,4-дигидроксифенил)проп-2-еноловая кислота</p> 	<p>↑ активность бурой жировой ткани → ↑ энергетический метаболизм → ↓ аккумуляция жира ↑ популяция <i>Muribaculaceae</i>; ↓ популяция <i>Lachnospiraceae</i></p>	<p>↓ масса тела ; ↑ расход энергии; ↑ уровень ЛПВП; ↓ сывороточный инсулин; ↓ дисбиоз микрофлоры кишечника;</p>	34
<p><i>n-кумаровая кислота</i> (Е)-3-(4-гидроксифенил)проп-2-еновая кислота</p> 	<p>↓ экспрессия белков, связанных с липогенезом; ↓ АЛТ; АСТ; ↓ ФНО-α; ↓ ИЛ-6; ↓ внутриклеточные жировые капли ↓ накопление капель липидов; ↑ аутофагия; ↓ АЛТ</p>	<p>↓ масса тела; ↓ масса печени; ↓ дисбиоз микрофлоры кишечника; ↓ стеатоз печени; ↓ вес тела; ↓ вес печени; ↑ чувствительность к инсулину; ↓ общий холестерин; ↓ триглицериды;</p>	35
<p><i>n-кумаровая кислота</i> (Е)-3-(4-гидроксифенил)проп-2-еновая кислота</p> 	<p>↓ уровень плазменного резистина, адипокина, лептина; ↓ экспрессия мРНК генов ФНО-α, ИЛ-6, МСР-1; ↓ размер адипоцитов; ↓ накопление капель липидов;</p>	<p>↓ инсулинорезистентность; ↓ вес белой жировой ткани; ↑ экскреция липидов с калом → ↓ вес печени;</p>	37
<p><i>Скополетин</i> 7-гидрокси-6-метоксихромен-2-он</p>	<p>↑ чувствительность гипоталамуса к лептину → ↑ экспрессия проопиомеланокортина (РОМС), активация АМРК.</p>	<p>↓ вес тела; ↑ чувствительность к инсулину; ↓ ежедневное потребление пищи</p>	38
<b>Кумарины</b>			
<p><i>Скополетин</i> 7-гидрокси-6-метоксихромен-2-он</p>	<p>↓ лептин; ↓ ФНО-α; ↓ ИЛ-6; ↓ МСР-1; ↓ размер адипоцитов; ↓ АЛТ; ↓ АСТ</p>	<p>↓ масса тела; ↓ висцеральный жир; регуляция липидного обмена;</p>	39
<p><i>Скополетин</i> 7-гидрокси-6-метоксихромен-2-он</p>	<p>↑ экспрессия переносчика глюкозы плазматической мембраны типа 4 (PM-GLUT4) → ↑ поглощение глюкозы;</p>	<p>↑ чувствительность к инсулину; ↓ гипергликемия;</p>	40

	<p>↑ активность липогенных ферментов; ↑ активность антиоксидантных ферментов печени; ↓ липидные капли в печени; активация AMPK.</p>	<p>Индуцированные алкоголем: ↓ уровень ацетальдегида в плазме; ↓ свободные жирные кислоты; ↓ общий холестерин; ↓ триглицериды; ↓ уровень глюкозы натощак;</p>	41
<p><i>Эскулетин</i> 6,7-дигидрокси-хромен-2-он</p>	<p>↓ адипонектин; ↑ экспрессия генов окисления жирных кислот в печени; активация AMPK.</p>	<p>↓ масса тела; ↓ висцеральный жир; ↓ гиперлипидемия; ↓ гипергликемия; ↓ резистентность к инсулину</p>	42
	<p>активация AMPK; регуляция ключевых маркеров дифференцировки адипоцитов (PPARγ и др.)</p>	<p>↑ дифференцировка адипоцитов → ↓ накопление липидов в адипоцитах</p>	43
<b>Фитостеролы</b>			
<p><i>Бета-ситостерол</i></p> 	<p>Регуляция экспрессии мРНК инсулинового рецептора в жировой ткани; ↓ белок субстрата инсулинового рецептора-1</p>	<p>↑ активация инсулиновых рецепторов; ↓ инсулинорезистентность;</p>	44
	<p>Регуляция уровня адипонектина</p>	<p>↓ масса тела; ↓ висцеральное ожирение, ↓ гипертриглицеридемия; ↓ гипертриглицеридемия,</p>	45
	<p>↓ реабсорбция желчных кислот; ↓ всасывание липидов.</p>	<p>↓ масса тела, ↓ триацилглицерины, ↓ холестерина; ↓ макровезикулярный и микровезикулярный стеатоз печени; ↑↑ экскреция желчных кислот с фекалиями; ↓ уровни общих липидов, холестерина и триглицеридов в печени</p>	46



<p><i>Стигмастерол</i></p> 	<p>↓ реабсорбция желчных кислот; ↓ всасывание липидов; ↓ уровень циркулирующих церамидов и липогенез в печени; ↓ АЛТ</p>	<p>↓↓ масса тела; ↓ масса печени; ↓ триацилглицерины; ↓ холестерин; ↑ экскреция желчных кислот с фекалиями; ↓ макровезикулярный и микровезикулярный стеатоз печени; ↓ уровни общих липидов, холестерина и триглицеридов в печени; ↓ гепатоцеллюлярная гипертрофия</p>	
	<p>↑ экспрессия транспортера глюкозы 4 (GLUT4) в клетках L6, скелетных мышцах и белой жировой ткани</p>	<p>↓ инсулинорезистентность; ↓ толерантность к глюкозе; ↓ уровень липидов в крови;</p>	47
<p><i>Диосгенин</i></p> 	<p>↓ белок, связывающий регуляторные элементы стеролов (SREBP-1c); ↓ синтез жирных кислот; ↓ АЛТ; ↓ АСТ</p>	<p>↓ масса тела; ↓ масса печени; ↓ общий холестерин; ↓ триглицериды; ↓ накопление липидов в печени;</p>	48
	<p>↑ экспрессия рецептора-мусорщика В типа 1 (SRB1), карбоксилэстеразы-1; холестерин 7<math>\alpha</math>-гидроксилазы; и фарнезоидного X-рецептора в печени.</p>	<p>↓ масса тела; ↓ общий холестерин; ↓ триглицериды; ↓ стеатоз печени; ↓ уровень липидов в печени;</p>	49
	<p>↓ экспрессия мРНК медиаторов воспаления (ФНО-<math>\alpha</math>, циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2) и др.)</p>	<p>↓ общий холестерин; ↓ триглицериды; ↓ липопротеины низкой плотности (ЛПНП)</p>	50
<b>Алкалоиды</b>			
<p><i>Кофеин</i></p>	<p>↑ модуляция экспрессии липогенных генов;</p>	<p>↓ накопление липидов; ↓ синтез жирных кислот в жировой ткани и печени; ↓ масса тела;</p>	52

<p>1,3,7-триметил- пурин-2,6-дион</p> 	<p>↑ липолиз; ↓ лептин в сыворотке крови; ↑ адипонектин в сыворотке крови;</p>	<p>↓ масса тела; ↓ триглицериды; ↓ общий холестерин; ↓ липопротеины высокой плотности (ЛПВП); ↓ ЛПНП;</p>	53
<p><i>Капсаицин</i> (Е)-N-[(4-гидрокси-3-метокси-фенил)метил]-8-метилнон-6-енамид</p> 	<p>антагонизм аденозиновых рецепторов (A1) → контроль поглощения жирных кислот и липолиза; ингибирование активности фосфодиэстеразы.</p>	<p>↓ масса тела; ↓ систолическое кровяное давление; ↓ толерантность к глюкозе; ↑ чувствительность к инсулину;</p>	54
<p><i>Берберин</i> 16,17-диметокси-5,7-диокса-13-азониапентацикло[11.8.0.0.2,10.0.4,8.015,20]геникоза-1(13),2,4(8),9,14,16,18,20-октаен</p> 	<p>агонист ваниллоидного канала транзитного рецепторного потенциала 1; ↓ сывороточный лептин; ↑ <i>Lactobacillus</i>, <i>Ligilactobacillus</i>, <i>Limosilactobacillus</i>, <i>Lactococcus</i> <i>shyllum</i>; ↑ секреция слизи толстой кишки; ↓ ИЛ-6;</p>	<p>↓ масса тела (белой жировой ткани); ↑ проницаемость кишечника; ↑ многообразие микрофлоры кишечника; ↓ толерантность к глюкозе; ↓ инсулина в сыворотке;</p>	55
<p>↓ малональдегида в печени + ↑ активность глутатионпероксидазы → ↓ окислительный стресс; ↑ уровень уксусной кислоты в кишечнике;</p>	<p>↓ масса тела; ↓ дислипидемия;</p>	<p>↓ масса тела; ↓ потребление пищи; ↓ триглицериды; ↓ общий холестерин; ↓ уровень глюкозы в плазме</p>	56
<p>↓ уровень лептина в плазме;</p>	<p>↓ ИЛ-6; ↓ МСР-1; ↓ ФНО-α; регуляция поляризации макрофагов;</p>	<p>↓ масса тела; ↓ масса белой жировой ткани; ↓ триглицериды; ↓ хроническое воспаление и стресс эндоплазматического ретикула;</p>	57
<p>↑ активность АМРК; ↓ инфильтрация и поляризация макрофагов жировой ткани;</p>	<p>↓ толерантность к глюкозе; ↓ отложения коллагена; ↓ фиброз жировой ткани; ↓ уровень</p>	<p>↓ толерантность к глюкозе; ↓ отложения коллагена; ↓ фиброз жировой ткани; ↓ уровень</p>	58
<p>↓ толерантность к глюкозе; ↓ отложения коллагена; ↓ фиброз жировой ткани; ↓ уровень</p>	<p>↓ толерантность к глюкозе; ↓ отложения коллагена; ↓ фиброз жировой ткани; ↓ уровень</p>	<p>↓ толерантность к глюкозе; ↓ отложения коллагена; ↓ фиброз жировой ткани; ↓ уровень</p>	59

		инсулина в сыворотке; ↓ масса тела; ↓ свободные жирные кислоты;	
	Регуляция уровня лептина	↓ прибавка в весе во время лечения антипсихотиками у пациентов с шизофренией.	60
	↑ АМРК; ↑ активность и количество митохондрий; регуляция окисления жирных кислот	↓ отложение липидов в скелетных мышцах; ↓ гипергликемия; ↓ гиперлипидемия; ↓ масса тела;	61
<p><i>Нуциферин</i> (6aR)-1,2-диметокси-6-метил-5,6,6a,7-тетрагидро-4H-дibenzo[de,g]хинолин</p> 	↑ количество бокаловидных клеток на стенках кишечника; ↑ продукция муцина в кишечнике; регуляция экспрессии генов;	↑ барьер слизистой оболочки; ↓ воспаление печени; регуляция микрофлоры кишечника; ↓ масса тела; ↓ гипергликемия; ↓ стеатоз печени; ↓ воспаление; ↑ фекальные уксусная пропионовая кислоты	62
	нуциферин взаимодействует с белком, взаимодействующим с регуляторной субъединицей гепатита В → ↓ лизосомальная локализацию и активность мишени комплекса рапамицина 1 у млекопитающих	↓ масса тела; ↓ масса печени; ↓ стеатоз печени; ↓ глюкоза в плазме; ↓ триглицериды; ↓ инсулинорезистентность; ↓ окислительные процессы в печени; ↓ уровень липидов;	63
	↓ трийодтиронин; ↓ свободный трийодтиронин; ↓ тироксин; ↓ свободный тироксин; ↑ глюкагон в плазме; ↑ активность липазы	↓ масса тела; ↓ масса печени; ↓ триглицериды, ↓ общий холестерин в плазме и печени; ↑ неэтерифицированные жирные кислоты в плазме и печени.	64

Природные полисахариды			
Полисахариды гриба <i>Lyophyllum decastes</i> ; (молекулярная масса: ДА: $3.92 \times 10^4$ ; $4.03 \times 10^5$ )	↑ активность UCP1, PPAR $\gamma$ → ↑ термогенная активность белой жировой ткани → «побурение» белой жировой ткани; ↓ размер адипоцитов; ↓ ФНО- $\alpha$ ; ↓ ИЛ-6; ↓ ИЛ-1 $\beta$ ; ↓ АЛТ; ↓ АСТ; ↓ отношение <i>Firmicutes</i> к <i>Bacteroidete</i> ; ↑ <i>Lactobacillus johnsonii</i> ;	↓ масса тела; ↓ накопление жира в белой жировой ткани; ↓ триглицериды, ↓ общий холестерин в плазме и печени; ↓ дисбиоз микрофлоры кишечника;	65
Полисахариды гуавы (84,5 % урсоловых кислот и углеводов)	↓ отношение <i>Firmicutes</i> к <i>Bacteroidete</i> ; ↓ <i>Proteobacteria</i> ; ↑ <i>Actinobacteria</i> ; ↑ <i>Clostridium XIVa</i> ; ↑, <i>Parvibacter</i> ; ↑ <i>Enterorhabdus</i> ; ↓ <i>Mucispirillum</i> ↑ p-AMPK $\alpha$ , ↓ ФНО- $\alpha$ ; ↓ липогенез; ↓ окисления жирных кислот	↓ инсулинорезистентность; ↓ воспаление; регуляция микрофлоры кишечника; ↓ масса тела; ↓ висцеральное ожирение; ↓ триглицериды, ↓ общий холестерин ; ↓ ЛПНП; ↓ накопление липидов в печени;	66
Полисахариды <i>Polygonatum cyrtonema</i>	регуляция метаболических путей $\alpha$ -линоленовой кислоты, арахидоновой кислоты и метаболизм глицерофосфолипидов.	↓ масса тела; ↓ триглицериды, ↓ общий холестерин в плазме и печени;	67
Полисахариды <i>Polygonatum sibiricum</i>	↓ вакуолизация печени; ↓ АЛТ; ↓ АСТ; регуляция активности антиоксидантных ферментов печени;	↓ масса тела; ↓ триглицериды, ↓ общий холестерин ; ↓ ЛПНП;	68
Полисахариды гриба <i>Agrocybe</i>	↓ ФНО- $\alpha$ ; ↓ ИЛ-6; ↓ отношение <i>Firmicutes</i> к <i>Bacteroidetes</i> ratio; ↓ <i>Desulfovibrio</i> и <i>Oscillibacter</i> ; ↑ <i>Bacteroides</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Butyricimonas</i> , <i>Dubosiella</i>	↓ масса тела; ↓ воспаление; регуляция микрофлоры кишечника; ↓ аккумуляция липидов; ↓ уровень липидов;	69

<i>cyindracea</i> (ММ – 670 кДа)		↓ инсулинорезистентность;	
Полисахариды <i>Anoectochilus Roxburghii</i> (5.006 × 10 <sup>-4</sup> г/моль)	↑ активность термогенных генов в белой жировой ткани; ↑ уровень фосфолирирования АМПК; ↓ синтез липидов; ↑ окисление липидов; регуляция энергетического гомеостаза.	↓ уровень глюкозы в плазме крови; ↓ воспаление; ↓ толерантность к глюкозе; ↑ чувствительность к инсулину; ↓ масса тела; ↓ масса жировой ткани; «побурение» адипоцитов;	70
Полисахариды водоросли <i>Enteromorpha prolifera</i> (4929 Да)	↑ метаболическая активность белого и бурого жира; ↑ передача сигналов инсулина в белой жировой ткани;	↓ воспаление; ↓ инсулинорезистентность; ↑ потребление кислорода, выработку углекислого газа и выработку тепла; ↓ масса тела;	71
Полисахариды <i>Artemisiaeae sphaerocephaleae</i> (551 кДа и 39 кДа)	↑ гены барьерной целостности толстой кишки; ↓ гены метаболизма липидов в печени и воспалительной реакции толстой кишки; ↓ экспрессия ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6; ↑ выработка короткоцепочечных жирных кислот; ↓ биосинтез валина, лейцина и изолейцина, а также метаболизм азота ↓ <i>Mucispirillum</i> ; ↓ <i>Helicobacter</i> ; ↑ <i>Bifidobacterium</i> ; ↑ <i>Olsenella</i>	↓ масса тела; ↓ масса печени; ↓ масса эпидермальной жировой ткани; ↓ дислипидемия; ↓ воспаление; ↓ дисбиоз микрофлоры кишечника; ↓ триглицериды, ↓ общий холестерин ; ↓ ЛПНП; ↓ ЛПВП	72
Полисахариды гриба <i>Ganoderma amboinense</i>	↓ ФНО-α; ↓ ИЛ-6; ↓ ИЛ-1β; ↓ соотношение <i>Firmicutes</i> к <i>Bacteroidetes</i> ; ↑ <i>Parabacteroides</i> ; ↑ <i>Bacteroides</i> ; ↓ <i>Porphyromonadaceae</i>	↓ масса тела; ↓ масса печени; ↓ накопление жира; ↓ толерантность к глюкозе; ↓ воспаление; ↓ триглицериды, ↓ ЛПНП; ↓ ЛПВП в сыворотке и печени	73

**Фенольные соединения (флавоноиды, фенольные кислоты, кумарины):** исследования различных научных групп из Китая, Кореи, США, Иордании, Японии и других стран показали возможность применения апигенина [20-23], лютеолина [24-25], кемпферола [26-28], кверцетина [29-30] хлорогеновой [31-33], кофейной [34-35] и п-кумаровой кислот [36-38] в лечении расстройств жировой ткани, коррекции метаболизма липидов и углеводов, а также нарушений функций печени у мышей с индуцированным ожирением. Одним из механизмов действия данных фенольных соединений является способность снижать уровень провоспалительных маркеров, в т.ч. МСР-1, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и др. [22-26]. Помимо этого, предполагается, что в основе механизма действия кемпферола, кверцетина, хлорогеновой и кофейной кислот лежит регуляция микрофлоры кишечника [26, 29, 33, 34]. Обнаружено, что апигенин [21] и кемферол [27] обратимо ингибируют панкреатическую липазу за счет образования комплексов с водородными связями, при этом, оба БАВ дают синергический эффект с препаратом Орлистат, что говорит о возможности использования данных флавоноидов в комплексном лечении ожирения, а также о возможном снижении дозировки синтетического препарата. Способность снижать массу жировой ткани отмечается для всех рассматриваемых флавоноидов и фенольных кислот. Отмечается, что кверцетин [29] и хлорогеновая кислота [31] способствуют «побурению» адипоцитов (новое направление лечения ожирения).

Научные группы из Китая, Кореи и др. стран обнаружили способность скополетина [39-40] и эскулетина [42-43] регулировать метаболизм жировой ткани. Кроме того, установлено, что скополетин [40-41] и эскулетин [42] понижают инсулинорезистентность, действуя через белки-переносчики глюкозы (печеночные GLUT2 [42], GLUT4 [40]). Для скополетина [41] отмечена способность восстанавливать повреждения печени у мышей, вызванные не только высокожировой диетой, но и применением алкоголя. В целом, исходя из комплексного анализа исследований, можно говорить о положительном влиянии веществ фенольной структуры на регуляцию метаболизма жировой ткани, углеводов, липидов, кишечной микрофлоры и печени. Общими эффектами для данной группы веществ является способность снижать концентрацию провоспалительных цитокинов, массу тела, регулировать профиль липидов в крови и концентрацию глюкозы.

**Фитостеролы:** интерес некоторых групп ученых из Китая, Индии и других стран [44-51] направлен на изучение противожировых свойств фитостеролов. Результаты исследований показали способность  $\beta$ -ситостерола [44-45], стигмастерола [45-47] регулировать метаболизм липидов и углеводов, улучшать функции печени. Изучение фитостерола диосгенина [48-50] показало, что он является мощным регулятором обмена липидов, в том числе их печеночного метаболизма. Помимо этого, обнаружена способность диосгенина [48-50],  $\beta$ -ситостерола [44-45] и стигмастерола [45-47] снижать вес тела. В основе механизма действия фитостеролов лежит

способность регулировать экспрессию генов, участвующих в метаболических процессах. Исследования, посвященные сравнительному анализу  $\beta$ -ситостерола и стигмастерола [45] показали, что стигмастерол обладает более высокой активностью в отношении ожирения. Более того, были проведены клинические испытания [51], в которых 1002 добровольцев употребляли пищевые фитостеролы (содержащие  $\beta$ -ситостерин, кампестерин, стигмастерин,  $\beta$ -ситостанол и кампестанол). Результаты показали, что пищевые фитостеролы способны снижать индекс массы тела, регулировать липидный обмен и снижать кровяное давление у взрослого населения Китая.

**Алкалоиды:** исследования научных групп из Китая, Индии и других стран [52-64] демонстрируют положительное влияние алкалоидов кофеина, берберина, капсаицина и нуциферина на регуляцию метаболизма жировой ткани, углеводного и липидного обменов, метаболизма печени. Установлено, что в основе механизма действия кофеина лежит регуляция адипокинов (лептина, адипонектина) [52-53], одним из путей влияния капсаицина и берберина лежит повышение активности АМПК [56-57, 59]. Кроме того, капсаицин [55] и нуциферин [62] демонстрируют влияние на регуляцию микробиоты кишечника, что также лежит в основе их механизма действия. Причем, капсаицин увеличивает популяции различных молочнокислых бактерий, а также регулирует соотношение штаммов *Bacteroidetes-Firmicutes* [55]. Нуциферин же уменьшал популяцию *Firmicutes* и увеличивал популяции *Verrucomicrobiota* и *Akkmensia muciniphila*. Кроме того, для нуциферина обнаружена способность регулировать экспрессию генов, участвующих в липидном обмене [64]. Кардиопротекторное действие отмечалось для кофеина [54] и берберина [58]. Важно отметить, что большое количество исследований [52-64] показывает способность алкалоидов снижать избыточную массу тела, что делает эту группу БАВ интересным объектом для создания растительных препаратов с данным фармакологическим эффектом.

**Полисахариды:** На данный момент одним из актуальнейших направлений исследований является анализ эффекта природных полисахаридов в отношении терапии ожирения. Группы ученых из Китая [65-73] изучили способность полисахаридов из растений *Crude guava* [66], *Polygonatum cyrtonema* [67] *Polygonatum sibiricum* [68], *Anoectochilus Roxburghii* [70], *Artemisiaeae sphaerocephaleae* [72], водоросли *Enteromorpha prolifera* и грибов *Agrocybe cylindracea* [69], *Ganoderma amboinense* [73] влиять на метаболические процессы при ожирении, индуцированном высокожировой диетой. Природные полисахариды снижали массу тела [65-73], регулировали уровень липидов в плазме крови [65-66, 68-69] и печени [65-67, 73], улучшали углеводный обмен [66, 69-71, 73]. Кроме того, обнаружено, что природные полисахариды участвуют в регуляции жировой ткани: способствуют побурению белых адипоцитов [65, 71], регулируют экспрессию генов термогенеза [65, 70], снижают высвобождение воспалительных цитокинов [65, 66, 69, 72, 73]. Ряд исследований [65, 69, 73] продемонстрировали, что в основе механизма действия

природных полисахаридов лежит регуляция микрофлоры кишечника. В первую очередь, полисахариды предотвращают индуцированное HFD повышение популяции *Firmicutes*, уменьшение популяции *Bacteroidetes*.

### 1.3. Сельдерей пахучий – перспективный источник БАВ для разработки функциональных продуктов и лекарственных средств

#### 1.3.1 Ботаническая характеристика и сырьевая база *Apium graveolens* L.

Сельдерей пахучий (*Apium graveolens* L.) является двулетней пищевой культурой, распространенной в Российской Федерации и странах СНГ. Сельдерей относится к семейству *Apiaceae* и существует в трех разновидностях (ботанических формах) – корневой (var. *graveolens*), черешковый (var. *dulce*) и листовой (var. *secalinum*). Согласно государственному реестру селекционных достижений, допущенных к использованию, на 2024 год зарегистрировано 34 сорта сельдерея корневого (например, Грибоский, Егор, Каскаде) и 43 сорта черешкового и листового (например, Паскаль, Нежный, Юта) [8].

Морфологическое описание сельдерея пахучего представлено в таблице 3 [74]. Ботаническая и систематическая принадлежность растения приведена в таблице 4 [75]. На рисунке 3 представлен внешний вид разных ботанических форм сельдерея.

Таблица 3 – Морфологическая характеристика сельдерея пахучего

Орган	Характеристика
1	2
Корень	веретеновидный, ветвистый, на втором году одревесневающий, у культурных форм мясистый, округло-реповидный.
Стебель	прямой, 30-100 см высотой, бороздчатый, часто полый внутри, сильно ветвистый, ветви отстоят от стебля.
Листья	черешковые, первые три листа трехнадрезанные, затем – перистые; верхние стеблевые листья иногда супротивные, почти сидячие, на коротких, по краю – пленчатых, влагалищах. Доли первого порядка у нижних листьев округлые, при основании тупые, трехлопастные или трехраздельные, по краю зубчатые с острыми зубцами. Доли стеблевых листьев с клиновидным основанием, с острыми беловато хрящеватыми зубцами
Цветки	Зонтики многочисленные, мелкие, на коротких цветоносах или сидячие, с 6-12 голыми лучами. Оберток и оберточек нет. Лепестки белые, около 0,5 мм длины.
Плоды	Округлый, почти двойчатый, с пятью нитевидными рёбрами на каждой половине вислоплодник.



Таблица 4 – Ботаническая систематика сельдерея пахучего [75]

Царство	<i>Plantae</i>
Отдел	<i>Pteridobiotina</i>
Класс	<i>Angiosperms</i>
Порядок	<i>Araliales</i>
Семейство	<i>Apiaceae</i>
Род	<i>Apium</i>
Вид	<i>Apium graveolens</i>



a



b



c

Рисунок 3 – Ботанические формы сельдерея пахучего: а – сельдерей корневой; b – сельдерей черешковый c – сельдерей листовой

Согласно portalу открытых данных торговли TrendEconomy [76], объем мирового импорта сельдерея (кроме сельдерея корневого) за 2022 г. составил 318 млн долларов, а основными странами-экспортерами стали США, Испания, Мексика, Китай, Италия. Несмотря на то, что Российская Федерация пока не может конкурировать с существующими игроками на международном рынке, производство сельдерея внутри страны увеличивается и является рентабельным [77]. Согласно российскому агропромышленному серверу [78], по состоянию на май 2024 года преобладающее количество производителей сельдерея представлено Российской Федерацией, также странами-производителями является Иран, Белорусия и Китай. По данным TrendEconomy в 2022 г 1,83 % мирового экспорта сельдерея осуществлялся из Израиля в Россию [76].

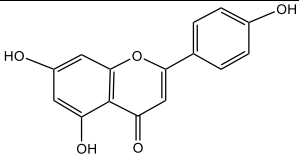
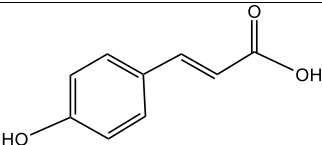
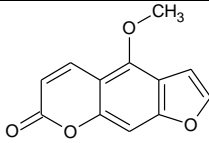
### 1.3.2 Фитохимический состав и фармакологическая активность сырья сельдерея пахучего

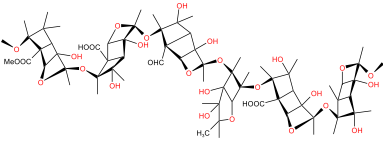
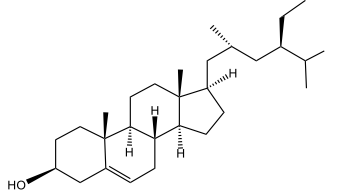
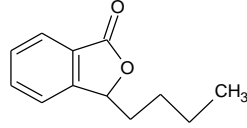
Согласно данным литературы, сельдерей пахучий накапливает различные группы БАВ, включая вещества фенольной природы, производные бутилфталида, полисахариды, фитостеролы, терпены, растительные пигменты и минералы, которые обуславливают различные фармакологические эффекты растения. В таблице 5 представлены агрегированные результаты

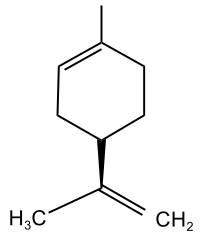
литературного обзора экспериментальных статей по содержанию отдельных классов БАВ в различных частях сельдерея [79-97]. Тем не менее, ряд авторов [98-99] не указывает ботаническую форму изучаемого сырья, что вносит трудности в интерпретацию данных. Например, ученые из России представляют эксперимент по изучению фитохимического состава сырья надземной части сельдерея пахучего, собранного на Кавказе, и проводят изучения фармакологической активности его водных извлечений [98]. Результаты исследования показали наличие в сырье флавоноидов, фенолкарбоновых и органических кислот, кумаринов, дубильных веществ и полисахаридов, однако определить ботаническую форму (листовую или черешковую), используемую для анализа, не представляется возможным.

Сравнительную оценку разных ботанических форм и сортов сырья сельдерея в отношении отдельных групп БАВ осуществляли несколько научных групп. Так, ученые из Китая провели качественный и количественный анализ веществ фенольной природы в семенах, черешках и листьях сельдерея, по результатам которого наибольшее количество гликозидов флавоноидов отмечается в семенах растения [83]. Другая научная группа определяла сортовые преимущества сельдерея черешкового (в стеблях и листьях растения) по содержанию летучих органических соединений. Авторы отмечают, что большинство генов, влияющих на синтез терпеноидов, демонстрируют более высокую экспрессию в листьях сельдерея черешкового [95].

Таблица 5 – Фитохимическая характеристика ботанических форм сельдерея пахучего

Группа БАВ	Формулы мажоритарных соединений	Содержание в ботанических формах сельдерея пахучего			
		Плоды	Корнеплоды	Черешки	Листья
Флавоноиды	 <p>апигенин</p>	гликозиды лютеолина (1,27 %), апигенина (0,18 %), хризоэриола (0,73 %) [83]	апигенин, лютеолин, хризин, кверцетин, рутин и кемпферол [84]	гликозиды лютеолина (0,10 %), апигенина (0,53 %), хризоэриола (0,10 %) [83]	гликозиды лютеолина (0,58 %), апигенина (0,23 %), хризоэриола (0,48 %) [83]
Фенольные кислоты	 <p>п-кумаровая кислота</p>	галловая (13,31 мкг/мг), кофейная (1,59 мкг/мг), трансферуловая (0,29 мкг/мг) и о-кумаровая (0,48 мкг/мг) кислоты [85]	п-кумаровая, хлорогеновая, галловая, ферулловая кислоты [85]	п-кумаровая, кофейная, ферулловая кислоты [86]	
Кумарины и фуранокумарины	 <p>бергаптен</p>	3-н-бутилфталид, седанолид [87], сеселин, бергаптен, изоимператорин, изопимпинеллин, остенол [88]		изопимпинеллин, бергаптен, псорален [89]	

<p>Полисахариды</p>	 <p>Пектиновые вещества [90]</p>		<p>пектиновые вещества [90], водорастворимые полисахариды (8,33 %), пектины (3,45 %), гемицеллюлоза А (1,54 %), гемицеллюлоза Б (1,47 %) [91]</p>	<p>пектиновые вещества [92]</p>	
<p>Фитостеролы</p>	 <p>Бета-ситостерол</p>	<p>кампестерин, стигмастерин, ситостерин [93]</p>	<p>β-</p>		
<p>Фталиды</p>	 <p>3-н-бутилфталид</p>	<p>3-н-бутилфталид, седанолид [94]</p>		<p>неокнидилид, сенкиунолид (общее содержание 19,26 – 58,03 мг/г в зависимости от сорта и органа растения) [95]</p>	

Терпены	 <p style="text-align: center;">ЛИМОНЕН</p>	лимонен, апиол, - миристицин [96]		γ-терпинен, d- лимонен, 2-гексеналь, β-мирцен, кариофиллен и др. (общее содержание терпенов 69,41 – 305,68 мг/г в зависимости от сорта и органа) [95]	-
Минералы	P, K, Ca, Fe, Zn, Mn, Na [97]	P (5.2-6.8 мг/г), Fe (0.41-0.56 мг/г), Cu (0.015-0.026 мг/г), Mn (0.020-0.029 мг/г) [97]		Высокое содержание Ca (41,5-51,3 мг/г) и Na (5,2-8,0 мг/г) [97]	Высокое содержание K (20,3-26,1 мг/г) и Zn (0,09-0,14 мг/г) [97]

Кроме того, научные группы из разных фитохимических школ изучали фармакологическую активность экстрактов и извлечений на основе сельдерея в отношении ряда патологий. В таблице 6 отражены результаты литературного обзора по направлениям фармакологической активности и применения различных видов сырья и продуктов на основе сельдерея. Важно отметить, что лечебные свойства семян сельдерея были проанализированы в клинических испытаниях [100-102], результаты которых продемонстрировали снижение артериального давления [100] у пациентов, улучшение сексуальной дисфункции у женщин [101], регуляции метаболизма [102]. Кроме того, клиническое исследование с участием 50-ти добровольцев показало, что порошок сельдерея листового снижает вес тела и массу жира в организме. Ряд доклинических испытаний показал эффективность извлечений из сельдерея в отношении терапии воспалительных процессов, онкологии, артрита и других патологий [92, 103-107].

Необходимо отметить возрастающую популярность сырья и продуктов переработки сельдерея в нетрадиционной медицине среди населения, что обусловлено, в первую очередь, развитием принципов здорового образа жизни и формированием приверженности правильного питания. Так, пользуется популярностью научно-публицистическая книга «Сок сельдерея» [108], на площадках различных социальных сетей развиваются каналы, посвященные соку сельдерея.

Все вышеперечисленное доказывает актуальность использования сельдерея пахучего в качестве сырьевой основы различных БАВ, входящих в состав функционального, специализированного питания и потенциальных лекарственных средств.

Таблица 6 – Фармакологическая активность продуктов и экстрактов на основе сельдерея пахучего

Патология	Состав исследуемой композиции и режим дозирования	Характеристика эксперимента	И.
Клинические исследования			
Артериальная гипертензия	Экстракт плодов сельдерея, содержащий 3-н-бутилфталид (четыре капсулы экстракта семян сельдерея (всего 1,34 г в день) или 4 капсулы плацебо в день) в течении 4х недель	Рандомизированное тройное слепое плацебо-контролируемое перекрестное клиническое исследование с участием 52 пациентов (группа сельдерей и группа плацебо) показало, что прием экстракта сельдерея снизил значения систолического (с 141,2 до 130,0 мм, рт. ст.), диастолического (с 92,2 до 84,2 мм рт. ст.), среднего артериального (с 108,5 до 99,5 4,66 мм рт. ст.) пульсового (с 49,0 до 45,8 мм рт. ст.) давления без значительных побочных эффектов по сравнению с группой плацебо	100
Сексуальная дисфункция у женщин	Плоды сельдерея, 500 мг	Рандомизированное двойное слепое клиническое исследование с участием 80 женщин показало, что прием плодов сельдерея повышает сексуальное желание, возбуждение, выделение смазки и уменьшает болевые ощущения	101
Метаболические нарушения у лиц с сахарным диабетом 2 типа	750 мг порошка сельдерея (полученного из свежих стеблей и листьев сельдерея), либо плацебо вместе с низкой дозой - калорийность диеты на 12 недель соответственно	Пилотное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование с участием 50-ти взрослых пациентов, из которых исследования завершили 36 (группа вмешательства и контрольная группа), показало, что прием порошка сельдерея значительно снизил процент жира в организме. Хотя изменение уровня инсулина было статистически незначительным, в группе вмешательства наблюдалось клиническое улучшение. Межгрупповой анализ изменений кардиометаболических факторов не выявил существенных различий.	102

Доклинические исследования			
Заболевания мочеполовой системы	Водно-спиртовое и ацетоновое извлечение из плодов сельдерея, содержащее фталиды	Дозозависимая антиадгезивная активность в отношении уропатогенной кишечной палочки.	103
Модель полиартрита	Спиртовой экстракт плодов сельдерея	Равноценное действие в сравнении аспирина, ибупрофена и напроксена в подавлении артрита на модели полиартрита, снижение воспаления у крыс, также защищает и/или уменьшает раздражение желудка, вызванное НПВП, а также синергично действует с ними, уменьшая воспаление.	104
Заболевания, связанные с остеокластами	Водно-спиртовое извлечение сельдерея черешкового, содержащее флавоноиды	Ингибирование дифференцировки остеокластов и резорбции кости без значительных токсических и побочных эффектов	105
Онкологические заболевания	Спиртовые экстракты из корнеплодов и надземной части сельдерея	Умеренная или сильная ингибирующая активность в отношении линий клеток рака печени (HepG-2), толстой кишки (Caco-2) и молочной железы (MCF-7) человека с интересными профилями.	106
Воспалительные процессы	Пектиновые вещества сельдерея черешкового	Снижение продукции ИЛ-1 $\beta$ и увеличение продукции ИЛ-10, уменьшение количества нейтрофилов, мигрирующих в брюшную полость после липополисахаридной инъекции.	92
	Экстракты из листьев и черешков сельдерея	Экстракты сельдерея подавляли выработку NO, индуцированную ЛПС. Экстракт сельдерея листового оказывает целенаправленное воздействие на циклы TCA и мочевины, тогда как в случае черешков участвуют гликолиз и пентозофосфатные пути. Экстракт на основе листьев оказался в 5 раз эффективнее.	107



#### 1.4. ВЭЖХ – один из основных методов анализа растительных БАВ

Как правило, растительные объекты имеют достаточно сложную (многокомпонентную) матрицу, поэтому фитохимические исследования и контроль качества продуктов на их основе требует применения современных физико-химических методов анализа, способных разделить сложные смеси природных веществ. Одним из таких методов является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в связи с ее высокой разделительной способностью, экспрессностью, селективностью и чувствительностью. ВЭЖХ широко используется в различных отраслях, в том числе в пищевой и фармацевтической индустриях и может быть применена для анализа природных соединений таких как фенольные вещества, фитостеролы, алкалоиды, терпены и др. [109-110] в обращенно-фазовом варианте.

Хроматографические условия анализа, а также способ пробоподготовки объектов зависят в первую очередь от физико-химических свойств анализируемого компонента. Тем не менее, важно учитывать влияние тех или иных растворителей на узлы прибора, в том числе на хроматографическую колонку. Таким образом, не рекомендуется использовать растворы кислот с рН менее 2, а также щелочные растворы с рН более 7 (рабочий диапазон рН колонок может быть изменен и указывается в паспорте к колонке, рабочий диапазон рН капилляров и каналов прибора также может быть расширен путем замены на детали более устойчивого материала). Для хроматографического анализа растительных БАВ в качестве растворителей могут быть использованы спирты (метанол, этанол) с последующим разведением раствора в подвижной фазе (ПФ). Растворы неполярных растворителей (гексан, хлороформ и т.д.) неблагоприятно влияют на хроматографическую колонку, в связи с чем рекомендуется выпаривать данные растворители досуха с последующим перерастворением или экстрагировать из них действующее вещество, например с помощью жидкость-жидкостной экстракции. В качестве ПФ для обращенно-фазовой ВЭЖХ используются полярные растворители (вода, буферные растворы, растворы кислот) с добавкой неполярного растворителя (ацетонитрил, метанол), при этом соотношение и другие добавки также зависят от свойств анализируемого вещества. В качестве колонок чаще всего используются колонки C18 длиной 15-25 см.

Одним из наиболее широко применяемых детекторов в ВЭЖХ растительных БАВ является УФ-детектор, при этом популярностью пользуется диодно-матричный детектор, способный записывать УФ-спектры пиков. Данные детекторы позволяют решать задачи в отношении анализа многих растительных групп БАВ, способных поглощать УФ-свет, включая фенольные соединения, фитостеролы, алкалоиды и др. Кроме того, многие научные группы используют для анализа растительных компонентов масс-селективные (МС) детекторы, которые позволяют идентифицировать вещества сложной растительной матрицы без применения стандартных образцов. Тем не менее, оборудование, оснащенное МС-детекцией является весьма

дорогостоящим и более редким, чем УФ. В таблице 7 представлен литературный обзор аналитических ВЭЖХ-УФ-методик для оценки различных групп БАВ, содержащихся в сельдерее пахучем с целью дальнейшего подбора на их основе методик хроматографирования [111-120]. Как видно из данных таблицы, для анализа фенольных веществ, фталидов и фитостеролов используют колонки C18, преимущественно 250 мм длиной. В качестве подвижных фаз для анализа флавоноидов и фенольных кислот используют растворы кислот (уксусная, муравьиная, трифторуксусная (ТФУ), фосфорная), которые позволяют подавить диссоциацию молекул [111-112]. Важно отметить, что авторы используют кислоты разных концентраций, что говорит о разделительной способности более щадящих растворов кислот. В случае анализа кумаринов некоторые авторы также предлагают использовать воду [114, 89], что является более благоприятным, чем раствор кислоты. Анализ фитостеролов также возможен с помощью использования воды и растворов кислот в качестве полярной фазы [117-119]. Для анализа 3-н-бутилфталида авторы используют буферные растворы с  $pH=4,5$  [119-120]. Выбор аналитической длины волны может отличаться в зависимости от максимумов поглощения конкретного вещества.

Тем не менее, актуально применение и других способов детекторования, например рефрактометрического. Данный метод позволяет проводить количественную оценку моносахаров, а также анализировать молекулярно-массовое распределение (ММР) полисахаридов. При этом, для оценки ММР необходимо использование специфичных колонок, поскольку в данном случае разделение веществ основано на их различной способности проникать в поры сорбента неподвижной фазы. В качестве подвижных фаз для оценки ММР могут быть использованы вода, растворы нитритов (гель-фильтрационная хроматография) или органические растворители (гель-проникающая хроматография) [121]. Анализ ММР позволяет определить молекулярную массу образца в диапазоне от  $10^2$  до  $10^8$  Да, среднечисловую молекулярную массу образца -  $M_n$  (представляет собой отношение массы полимера к числу молекул в данном образце) и средневесовую молекулярную массу -  $M_w$  (представляет собой среднее из массовых долей молекул каждой молекулярной массы от их общей массы). Соотношение  $M_w/M_n$  позволяет оценить полидисперсность высокомолекулярных соединений (ВМС).

Таким образом, применение ВЭЖХ является актуальным и перспективным для анализа БАВ растительного происхождения различной природы.

Таблица 7 – Ретроспективный обзор хроматографических условий для разделения и оценки различных БАВ

Наименование индивидуального БАВ	Длина волны детектора	Колонка	Подвижная фаза (ПФ)	Условия элюирования, поток ПФ	t°C	И.
<b>Флавоноиды и фенольные кислоты</b>						
Скутеллареин 7-О-β-d-глюкопиранозид; гиспидулин 7-О-β-d-глюкуронопиранозид; апигенин 7-О-β-d-глюкопиранозид; гиспидулин 7-О-β-d-глюкопиранозид; лютеолин; апигенин;	340 нм	Zorbax XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 3.5 μm)	ПФ А – вода; ПФ Б – ацетонитрил с 0,02% уксусной кислотой;	0,8 мл/мин 0 мин 15% Б, 10 мин 20% Б, 13 мин 20% Б, 15 мин 25% Б, 20 мин 30% Б, 25 мин 30% Б, 30 мин 50% Б.	25	111
Рутин, кверцитрин, кверцетин, Кемпферол, изорамнетин	350 нм	Phenomenex Luna 5mm C18 (2) (250 x 2.00mm)	ПФ А – ацетонитрил; ПФ В – 0,3% раствор муравьиной кислоты	0,4 мл/мин 0 мин 85% Б, 15 мин 75% Б, 33 мин 75% Б	45	112
Галловая, протокатеховая, Хлорогеновая, ванилиновая, кофейная., сиреневая, катехин	237, 261, 276, 310, 330 нм	Zorbax Eclipse XDB C18 250 × 4.6 мм с размером частиц 5 мкм	ПФ А – 0,3% водный раствор ТФУ; ПФ Б – ацетонитрил	1,0 мл/смн; 0–12 мин 90% А, 12–28 мин 90–80% А, 28–30 мин 80% А, 30–40 мин 80–65% А, 40–60 мин, 65% А.	40	113
<b>Кумарины и фуранокумарины</b>						
Скимин, Скополин, Скополетин, Умбеллиферон, Скопарон,, Кумарин, Псорален, Метоксален ,	316 нм	MS C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм)	ПФ А – Ацетонитрил ПФ В – 0,5% фосфорная кислота	1,0 мл/мин; 0 мин – 95% В, 40 мин – 20% В, 41 мин – 95% В, 48 мин – 95% В.	25	114

Цитроптен, Императорин, Остол	Пимпинеллин,						
Метоксален,, Изопимпинеллин, Пимпинеллин	Ангелицин Бергаптен,	254, 320 нм	Zorbax Eclipse XDB C18 (Agilent) (250 мм × 4.6 мм, 5 μm)	ПФ А – метанол ПФ В – вода	1,0 мл/мин.; 0 мин – 20 % А, 10 мин – 50 % А, 15 мин – 60 % А, 40 мин – 60 % А, 42 мин – 100 % А, 44 мин – 100 % А, 48- 60 мин – 20 % А	20	115
Умбеллиферон, Изопимпинеллин, Пимпинеллин	Метоксален, Бергаптен	255, 310, 323 нм	RP-18 Merck LiChrocart (250 мм × 4.0 мм, 5 μm)	ПФ А – метанол ПФ В – 0,5% фосфорная кислота	1,0 мл/мин; 0 мин – 30% А, 10 мин – 45% А, 20 мин – 55% А, 35 мин – 70% А, 37 мин – 100% А	25	116
Метоксален, Изопимпинеллин, Бергаптен	Псорален,	254, 366 нм	LiChrospher 100 RP C 18 (250 мм × 4,0 мм, 5 μm)	ПФ А – метанол ПФ В – вода	0,8 мл/мин; 0 мин – 40% А, 10 мин – 50 % А, 25 мин – 75% А, 35 мин 75% А, 40 мин – 100% А	25	89
<b>Фитостеролы</b>							
Кампестерол, β- Ситостерол, Стигмастанол	Стигмастерол,	210 нм	Kinetex (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм)	ПФ А – Вода; ПФ В – Ацетонитрил	0,9 мл/мин; 0-4,0 мин – 40- 65% В, 4,0-7,0 65-70% В, 7,0-7,2 мин – 70-40% В, 7,2- 8,5 мин 40%	60	117

β-Ситостерол, Стигмастерол	205 нм	Xterra MS, Waters C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм)	ПФ А – Метанол ПФ В – Ацетонитрил	1,2 мл/мин; Изократический режим, 20% В, 15 мин.	25	118
Брассикастерол, Кампестерол, Стигмастерол, β-Ситостерол	210, 254 нм	Gemini C18 (250 × 3.0 мм, 5 мк)	ПФ А – вода ПФ В – метанол.	0,5 мл/мин; Изократический режим, 95%В, 38 мин.	30	119
<b>Фталиды</b>						
3-н-бутилфталид	228 нм	Kromasil ODS-1 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)	ПФ А – 0,2 М дигидрофосфата натрия (рН 4,5); ПФ В – ацетонитрил	1,0 мл/мин; Изократический режим, 50% В, 10 мин.	30	120

### Выводы к главе 1

1. Разработка лекарственных средств растительного происхождения, а также функционального и специализированного питания – актуальное направление исследований, которое находится в фокусе научно-технического развития РФ, в связи с чем актуален поиск сырьевых источников и создание на их основе данных продуктов. Перспективным показывает себя ряд сельскохозяйственных культур в связи с наличием в их составе широкого спектра БАВ, а также применением в пищевой индустрии.
2. Ретроспективный анализ литературных источников демонстрирует повышенный интерес научного сообщества в направлении оценки фармакологической активности различных веществ природного происхождения на моделях метаболических заболеваний – социально значимой группы патологий с высокой степенью распространенности по всему миру. Показано положительное влияние индивидуальных веществ из класса фенолов, фитостеролов, полисахаридов на динамику течения ожирения, сахарного диабета, неалкогольной жировой болезни печени и др. В настоящее время большинство исследований проведены в рамках доклинических испытаний, однако эти данные являются фундаментом для проведения клинических испытаний и формирования доказательной базы клинической эффективности природных компонентов.
3. Сельдерей пахучий – пищевая культура, распространённая на территории Российской Федерации, с достаточной сырьевой базой и сортовым разнообразием, а также опытом применения в народной медицине и в лечебном питании. Фитохимический профиль растения представлен различными группами БАВ, которые обуславливают фармакологическую эффективность. Тем не менее, на данный момент наиболее изученной морфологической частью остаются плоды сельдерея пахучего, что обуславливает актуальность направленного изучения других ботанических форм данного растения.
4. Анализ данных литературы показал, что одним из основных аналитических подходов в фитохимическом изучении фенольных соединений, фитостеролов и бутилфталидов (основные маркерные соединения сельдерея пахучего) является использование метода ВЭЖХ, который позволяет решить задачу, связанную со сложной матрицей растительных объектов. Для изучения вышеперечисленных групп БАВ применяются диодно-матричный и УФ детекторы, октаэдрические колонки C18 длиной 15-25 см, смесь ацетонитрила и воды / растворов кислот / буферных растворов в изократическом или градиентном режимах элюирования в качестве подвижной фазы. ВЭЖХ также может быть использован для оценки молекулярно-массового распределения полисахаридных фракций на приборах, оснащенных рефрактометрическим детектором с применением специализированных колонок.

5. Все вышесказанное создает научный теоретический базис для направленного изучения сырья различных ботанических форм сельдерея пахучего, его последующего маркирования и получения различных продуктов \ фракций \ групп БАВ для обоснования его возможного применения в целях разработки функциональных, специализированных пищевых продуктов и лекарственных средств.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали сырье сельдерея пахучего разных форм и сортов. Черешки и корнеплоды сельдерея приобретали в магазинах г. Санкт-Петербурга в течение 2020 – 2024 гг. Страна происхождения (по информации на упаковке): Россия и Иран. Кроме того, черешковую и листовую ботанические формы сельдерея пахучего выращивали на территории Ленинградской области в Питомнике лекарственных растений СПХФУ (Всеволожский р-н, пос. Лемболово, 60.389368, 30.275313) и на частных территориях в СНГ 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). В таблице 8 приведен перечень сырья сельдерея разных ботанических форм, сортов, мест произрастания, которое было использовано в разных разделах экспериментальной части работы.

Сырое сырье корневой, черешковой и листовой форм сельдерея пахучего измельчали на куски примерно 3 x 3 см, высушивали в сушильном шкафу при температуре 40°C, распределяя тонким слоем. Высушенное сырье измельчали до диаметра частиц  $\approx 1$  см (основная фракция около 95%), что являлось базовым объектом исследования.

Таблица 8 – Перечень сырья, которое было использовано в ходе проведения эксперимента

Сырье, сорт	Место культивации / страна-производитель, год сбора	Вид исследования
Фитохимический скрининг сырья		
Сельдерей черешковый, сорт Малахит	2021 г., Россия	ВЭТСХ-анализ фенольных кислот
Сельдерей корневой, сорт Олимп	2021 г., Россия	
Сельдерей листовой, сорта Юта, Захар	2020 г., СНТ «Ручей»	
Сельдерей листовой, сорт Паскаль	2020 г., пос. Лемболово	
Сельдерей черешковый, сорт Малахит	2021 г., Россия	УФ-анализ суммы гидроксикоричных кислот
Сельдерей корневой, сорт Олимп	2021 г., Россия	
Сельдерей листовой, сорт Нежный	2020 г., СНТ «Ручей»	
Сельдерей листовой, сорта Нежный, Захар, Самурай, Парус	2021 г., СНТ «Ручей»	УФ-анализ суммы флавоноидов
Сельдерей черешковый, сорт Малахит	2021 г., Россия	
Сельдерей корневой, сорт Олимп	2021 г., Россия	



Сельдерей листовой, сорта Нежный, Захар	2020 г., СНТ «Ручей»	Изучение минерального состава методом АЭС-ИП
Сельдерей листовой, сорт Паскаль, Бодрость	2020 г., пос. Лемболово	
Сельдерей корневой, сорта Каскаде	2021-2022 г., Россия	Изучение полисахаридных фракций, липофильных фракций
Сельдерей черешковый (сорт не указан)	2021 г., Иран	
Сельдерей листовой, сорт Нежный	2021 г., СНТ «Ручей»	
Сельдерей черешковый, сорт Танго	2023 г., пос. Тайцы	Количественный анализ сенкиунолида А
Изучение сырья сельдерея пахучего ВЭЖХ		
Сельдерей листовой, сорта Нежный	2023 г., СНТ «Ручей»	Разработка и валидация методики анализа хлорогеновой кислоты в сырье сельдерея листового
Сельдерей листовой, сорта Нежный, Летний бум, Ванюша, Юта, Бодрость, Пучковый	2023 г., пос. Лемболово	Анализ сортовых преимуществ по содержанию
Сельдерей листовой, сорта Нежный, Ванюша и Бодрость	2023 г., СНТ «Ручей»	хлорогеновой кислоты
Сельдерей корневой, сорт не указан	2023 г., Россия	Выбор оптимальных условий и верификация методики количественного определения кумаринов
Сельдерей черешковый, сорт Танго	2023 г., пос. Тайцы	
Сельдерей листовой, сорт не указан	2023 г., пос. Тайцы	
Разработка фитосубстанций на основе сырья сельдерея		
Сельдерей корневой, сорта Каскаде	2022 г., Россия	Получение и анализ фитосубстанции на основе полисахаридов
Сельдерей черешковый, сорт Танго	2023 г., пос. Тайцы	Получение и анализ фитосубстанции на основе липофильной фракции

## 2.2 Предварительный фитохимический скрининг сырья сельдерея пахучего

### 2.2.1. Анализ фенольного профиля ботанических форм и сортов сельдерея пахучего методами ВЭТСХ и УФ-спектрофотометрии

#### 2.2.1.1. ВЭТСХ-анализ фенольных кислот в ботанических формах сельдерея листового

Спиртово-водные извлечения (двухкратная экстракция 70 % этанолом (1:4) на водяной бане в течение 1 часа) из черешковой, корневой и листовой ботанических форм сельдерея различных сортов анализировали на наличие фенольных кислот методом ВЭТСХ. Для анализа использовали установку CAMAG с УФ-кабинетом (характеристика прибора представлена в таблице 9) в системе растворителей толуол – этилацетат – муравьиная кислота – вода (10:20:5:2). В качестве стандартных образцов (СО) использовали метанольные (метанол «хч», АО «Вектон») растворы хлорогеновой (1,07 мг / мл), коричной (1,02 мг / мл), салициловой (1,02 мг / мл), вератровой (1,02 мг / мл), п-кумаровой (1,00 мг / мл), кофейной (0,98 мг / мл), сиреневой (1,04 мг / мл), протокатеховой (1,02 мг / мл) кислот (пр-ль СО «Sigma Aldrich», США и EDQM, Швейцария). Детекцию пятен на хроматограммах испытуемого раствора проводили в фильтрованном УФ-свете при  $\lambda=254$  и 366 нм. Сравнивали значение факторов удерживания, форму, размер и цвет пятна СО и пятна на треке хроматограммы испытуемого раствора.

Таблица 9 – Параметры прибора для проведения ВЭТСХ-анализа

Аппарат	CAMAG HPTLC visionCATS
Пластинка	Merck, HPTLC silicagel 60 F154, 20'10.
Камера	TLC Visualizer
Скорость нанесения	150 nl/s
Объем вводимой пробы	5-15 мкл
Детекция	спектрофотометр при 254нм, 366 нм
Программное обеспечение	visionCATS

2.2.1.2. Количественное определение суммы фенолкарбоновых кислот методом УФ-спектрофотометрии в ботанических формах сельдерея листового.

Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую оценивали методом УФ-спектрофотометрии на приборе СФ-2000 (Россия), пробоподготовку сырья проводили в соответствии с ФС.2.5.0019.15 «Крапивы двудомной листья» [122]. Предварительно регистрировали УФ-спектры анализируемых извлечений в соответствии с ОФС 1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях» для определения аналитической длины волны [122].

2.2.1.3. *Количественное определение суммы флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии в сортах сельдерея листового.*

Определение суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в разных сортах сельдерея листового проводили методом спектрофотометрии (СФМ) с использованием спектрофотометра СФМ-2000 (Россия).

Около 1,0 г (точная навеска) измельченных листьев сельдерея пахучего помещали в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 70 % спирта этилового. Проводили экстракцию на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию сырья повторяли еще 2 раза порциями растворителя 30 мл и 20 мл. Извлечения объединяли и объем раствора доводили 70 % спиртом этиловым до метки (раствор А). 1,0 мл раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл, добавляли 1 мл спиртового раствора алюминия хлорида 2 % (приготовлен согласно ОФС.1.3.0001.15 [122]) и доводили до метки 70 % спиртом этиловым (*испытываемый раствор*). Для приготовления раствора сравнения 1 мл раствора А помещали в мерную колбу объемом 25 мл и доводили до метки 70% этанолом. Оптическую плотность испытуемого раствора измеряли через 30 минут при длине волны 393 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца (СО) апигенина. 1,0 спиртового раствора стандартного образца апигенина (EP RS, Sigma Aldich) с концентрацией 0,1030 мг/мл помещали в мерную колбу на 10 мл, добавляли 1 мл спиртового раствора алюминия хлорида 2 %, доводили до метки 70 % спиртом этиловым. В качестве раствора сравнения использовали спиртовой раствор апигенина с концентрацией 0,0103 мг/мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_x \times C_{CO} \times 100 \times 25 \times 100 \times 100}{A_{CO} \times a \times 1 \times (100-w)}$$

где  $A_x$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{CO}$  – оптическая плотность раствора СО апигенина;

$C_{CO}$  – концентрация раствора СО апигенина, мг/мл;

100, 25, 1 – объемы мерных колб и аликвот, взятых для разведения испытуемого раствора;

$a$  – масса навески испытуемого образца, мг;

$w$  – потеря в массе при высушивании, %.

### 2.2.2. Анализ минерального состава сырья сельдерея методом АЭС-ИСП.

Оценку минерального состава сырья сельдерея проводили на приборе ICP-OES Perkin Elmer Optima 8000, США.

Пробоподготовка образцов: около 400 мг (точная навеска) высушенного измельченного сырья сельдерея помещали в тefлоновые реакторы, добавляли 5 мл азотной кислоты (Nitric acid Puriss. P.a., 65%, Honeywell Fluka, Германия) и 3 мл раствора перекиси водорода 30% (ООО «НеваРеактив», Россия), аккуратно перемешивали и оставляли на 10 минут для удаления паров. Проводили разложение проб с использованием микроволновой системы BERGHOF SpeedWave Entry Two. После охлаждения, полученные растворы количественно переносили в мерные колбы вместимостью 50 мл и доводили до метки водой деионизированной (с электропроводностью менее  $0,5 \text{ См} \cdot \text{см}^{-1}$ ). Полученные пробы использовали для качественного и количественного определения элементов.

В качестве стандартного образца (СО) использовали Multi-Element Calibration Standard 3, с концентрацией всех ионов (Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, Zn, U, V) равной 10 мкг/мл (Perkin Elmer, США), из которого готовили градуировочные растворы (конц. = 0,1; 0,5; 1,0 мг/л) для построения градуировочные зависимости.

В качестве растворителя (*blank*) использовали 5 мл азотной кислоты и 3 мл раствора перекиси водорода 30%, которые помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки водой деионизированной (с электропроводностью менее  $0,5 \text{ См} \cdot \text{см}^{-1}$ ).

Последовательно анализировали растворитель и испытуемые растворы при следующих настройках прибора: время интегрирования – 1-2 сек.; число повторов интегрирования – 3; скорости потоков плазмообразующего газа, дополнительного газа и газа для распыления пробы – 10 л/мин, 0,2 л/мин и 0,7 л/мин, соответственно. Содержание элементов в образце (x, мг/кг) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C_x \cdot V_k \cdot w}{a} * 1000,$$

где  $C_x$  – концентрация аналита по градуировочной прямой, мг/л;

$V_k$  – объём мерной колбы, мл

a – масса навески, г

1000 – перевод г в кг

w – коэффициент разведения (использовался для магния, калия, кальция, натрия, = 50)

Полученные данные обрабатывали методом математической статистики в соответствии с рекомендациями ГФ РФ ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [122].

### 2.2.3. Выделение и анализ полисахаридных фракций ботанических форм *Apium graveolens* L.

#### 2.2.3.1. Выделение и очистка

Точную навеску высушенного и измельченного сырья корнеплодов, черешков и листьев сельдерея пахучего обезжиривали хлороформом (1:4) в аппарате Сокслета в течение часа, после чего шрот (высушенный на воздухе до отсутствия запаха хлороформа) двукратно экстрагировали спиртом (82%) по 2 часа на водяной бане с обратным холодильником, спиртовую фракцию выдерживали в холодном месте в течение 7 дней, выпавший осадок подвергали вакуумной фильтрации и высушивали при температуре 100°C с целью получения спирторастворимых полисахаридов (СРПС). Оставшийся шрот последовательно экстрагировали водой (двукратно в течение 1 ч.) и буферной смесью 0,5% аммония оксалата и щавелевой кислоты (1:1) двукратно в течение 2-х ч. при нагревании 85-95°C и постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки (Heidolph, Германия) (300 об/мин), каждый раз высушивая шрот после окончания экстракции определенным экстрагентом. Полученные извлечения осаждали 3-5 кратным количеством этанола, фильтровали и высушивали осадки. Таким образом, получали фракции водорастворимых полисахаридов (ВРПС) и пектиновые вещества (ПВ). Также нами была предпринята попытка выделения из отработанного шрота фракции гемицеллюлоз (ГЦ) путем мацерации 1% раствором гидроксида натрия.

Для очистки полученных полисахаридных фракций от примеси белка использовали метод Севага, рекомендованный литературой [123]: около 600 мг полисахаридных фракций растворяли в 60 мл воды и смешивали с 60 мл раствора Севага (н-бутанол (хч) : хлороформ (хч) – 1:4), тщательно встряхивали и центрифугировали на центрифуге Sigma 2-16P (Sartorius AG, Германия) со скоростью 4500 об/мин в течение 10 минут. Очистку повторяли еще дважды. Водный раствор полисахаридов декантировали и подвергали лиофильной сушке на электронном комплексе для высушивания образцов методом вымораживания в условиях пониженного давления (Labconco, США). Процесс лиофилизации включал замораживание водных растворов полисахаридных фракций при -50°C в течение суток; первичную и вторичную сушку (сублимацию в вакууме и вакуумную десорбцию с целью удаления свободной и связанной воды соответственно).

Схема выделения и очистки полисахаридных фракций представлена на рисунке 4.

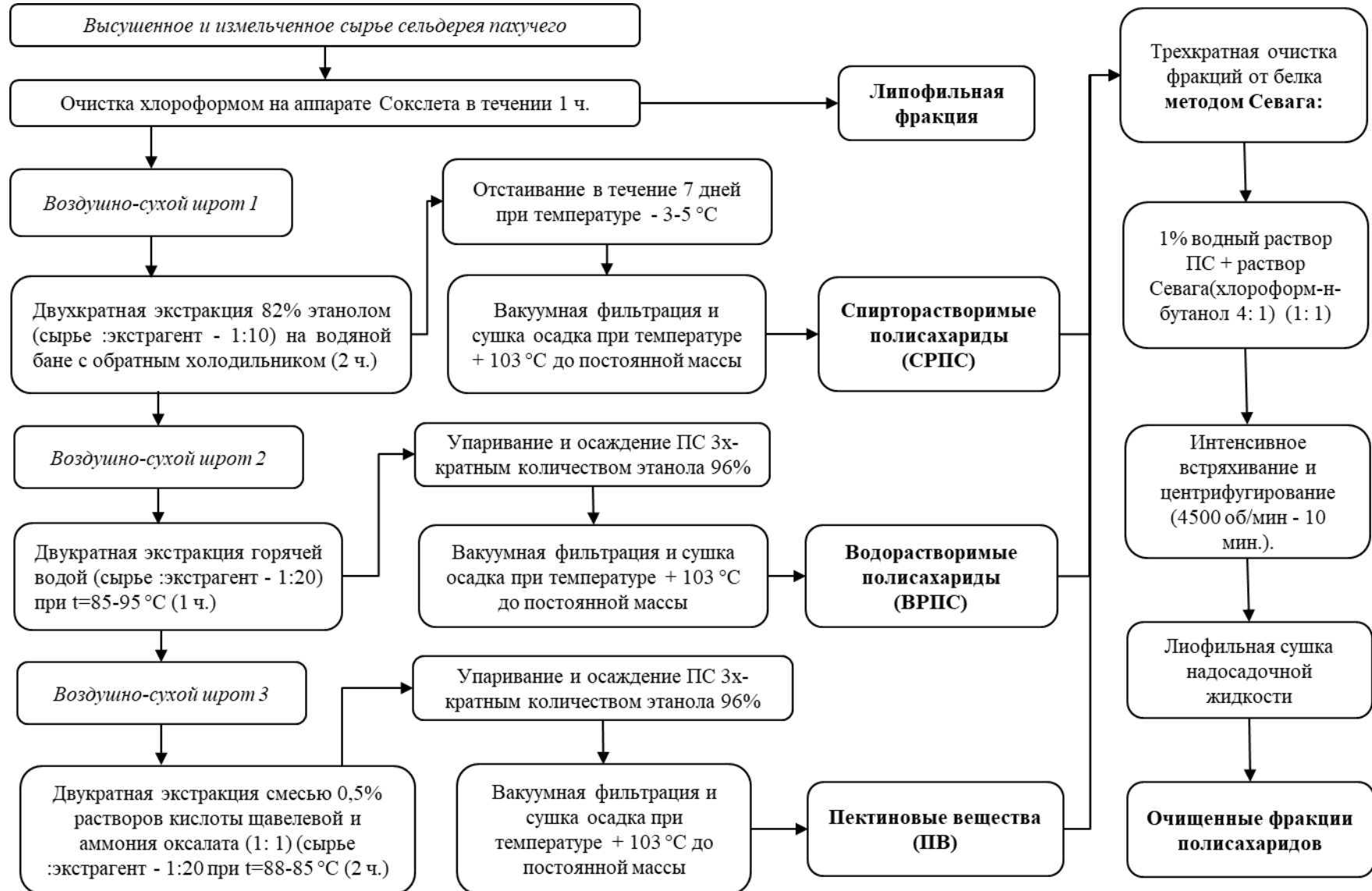


Рисунок 4 – Схема выделения полисахаридных фракций из разных ботанических форм сельдерея пахучего

Количественное содержание полисахаридных фракций в ботанических формах сельдерея определяли методом гравиметрии до очистки по следующей формуле:

$$X = \frac{m \text{ фпс.} * 100}{m_n * (100 - W)} * 100\%$$

где  $m$  фпс – масса фракции полисахаридов, г

$m_n$  – масса навески исходного сырья, г

$W$  – относительная влажность сырья, %

Для оценки фактического содержания полисахаридов в ботанических формах сельдерея (с учетом очистки) полученные данные умножали на соответствующие значения коэффициентов потери в массе (КПМ) после проведения нескольких циклов очистки ( $n=3$ ), рассчитанных по следующей формуле:

$$\text{КПМ} = \frac{m \text{ ср. фракции после очистки}}{m \text{ ср. фракции до очистки}}$$

#### 2.2.3.1. Изучение структурных характеристик полисахаридных фракций

**Оценка мономерного состава фракций методом ВЭТСХ.** Идентификацию моносахаров после гидролиза полисахаридных фракций проводили методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на приборе SAMAG HPTLC visionCATS по методике, представленной в литературе [124] с некоторыми модификациями:

*Испытуемый образец.* Около 50 мг (точная навеска) помещали в пробирку с притертой пробкой, растворяли в 2 мл воды и добавляли 2 мл раствора серной кислоты 2%. Пробирки закрывали крышками и нагревали на водяной бане 2-8 ч, проводя отбор проб гидролизатов для контроля полноты гидролиза каждые 2 ч.

*Стандартные образцы (СО).* В качестве СО использовали субстанции глюкозы, галактозы, маннозы, арабинозы, рамнозы, ксилозы, фруктозы фармацевтического качества. Около 100 мг (точные навески) помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл воды очищенной и доводили объем до метки тем же растворителем. Таким образом, получали индивидуальные растворы СО с концентрацией 1 мг/мл. Для получения смеси СО точные навески моносахаров около 100 мг помещали в мерные колбы на 10 мл, растворяли в 5 мл воды и доводили до метки тем же растворителем (получали растворы СО с концентрацией 10 мг/мл). Затем по 1,0 мл каждого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили водой до метки. Получали смесь СО с концентрацией каждого стандарта 1 мг/мл.

*Пробоподготовка пластинки.* Для анализа использовались пластинки Merck, HPTLC silicagel 60 F154, 20x10, которые предварительно активировали смесью метанол : вода (6:1), подсушивали на воздухе, затем повторно обрабатывали той же смесью и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 15 минут. Далее пластинки обрабатывали

фосфатным буферным раствором (рН=6,8), подсушивали на воздухе и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 120 °С в течение 10 минут.

На подготовленные пластинки наносили по 4 мкл растворов и смеси СО и по 20 мкл образцов гидролизатов. Хроматограмму высушивали на воздухе и элюировали смесью ацетонитрил : пентанол : вода (4:4:1), высушивали и затем снова элюировали смесью ацетонитрил : бутанол : вода (4:3,5:1,5). Для дериватизации моносахаров хроматограмму обрабатывали дифениламиновым реактивом и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 110 °С 3-5 минут. Пластины визуализировали на устройстве Camag TLC visualizer 2: время экспозиции 20 мс, усиление 1, режим пропускания белого света. Идентифицировали моносахара путем сравнения значений факторов удерживания, формы и цвета пятен треков гидролизатов и треков СО.

**Анализ полисахаридных фракций методом ИК-спектроскопии.** Исследование структурных особенностей полисахаридных фракций проводили методом ИК-спектроскопии. Около 10 мг лиофилизатов помещали на НПВО-приставку Фурье-ИК спектрометра Spectrum-3 (Perkin Elmer, США). Интерпретацию ИК-спектров осуществляли с использованием справочной [125-127] и научной [128] литературы.

#### *2.2.3.3. Анализ примесей низкомолекулярных и азотсодержащих соединений.*

С целью обнаружения примесей фенольных соединений, каротиноидов и хлорофилла, снимали УФ-спектры водных растворов полисахаридных фракций (0,1 мг/мл) на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Количество азотсодержащих соединений в полученных фракциях определяли методом Кьельдаля в соответствии с ОФС.1.2.3.0011 [121] на автоматическом анализаторе азота с потенциометрическим титратором (BUCHI, Швейцария). Точную массу навески полисахаридных фракций (около 0,4 г для неочищенных фракций и около 0,2 г для фракций после очистки) переносили в колбы для сжигания, в каждую колбу помещали таблетку для сжигания (4,98 г калия сульфата и 0,02 г меди сульфата) и 7 мл концентрированной серной кислоты (хч, АО «Вектон», Россия). Колбы нагревали до тех пор, пока растворы не становились прозрачными, и продолжали нагревание в течение еще 30 минут. Далее проводили отгонку с водяным паром, предварительно добавив 20 мл воды и 30 мл натрия гидроксида (42% водный раствор). Отгон собирали в 30 мл борной кислоты (концентрация водного раствора 40 г/л). Полученный дистиллят титровали 0,025 М раствором серной кислоты, конечную точку титрования определяли потенциометрически.



#### 2.2.3.4. Определение молекулярно-массового распределения фракций ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея

Молекулярно-массовые характеристики ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея определяли методом эксклюзионной хроматографии по условиям, представленным в таблице 10.

Таблица 10 – Условия хроматографирования для оценки молекулярно-массового распределения

Прибор	Хроматограф Ultimate 3000 с рефрактометрическим детектором RI-101 (Dionex, Thermo, Германия).
Подвижная фаза	Водный раствор 0,01 М натрия нитрата, 0,1% натрия азида
Колонка	Ultrahydrogel 250, 7.8×300 мм, 250 Å, (Waters, США).
Объем пробы	10 мкл,
Скорость потока	0.5 мл/мин.
Температура термостата колонки	30 °С

Для расчета значений среднемассовой ( $M_w$ ) и среднечисленной ( $M_n$ ) молекулярных масс использовали стандартные образцы пуллуланов (lot. Pulkitsa-10 Mr 342-200000 Da, PSS GmbH). Для расчета параметров молекулярной массы хроматографические пики разбивали на 20 фрагментов, которые интегрировали по отдельности. Хроматограммы обрабатывали с использованием программного обеспечения Chromeleon 6.8. Расчет параметров производили по формулам:

$$M_w = \frac{\sum M_i^2 \times H_i}{\sum M_i \times H_i}$$

$$M_n = \frac{\sum M_i \times H_i}{\sum H_i}$$

$$p = M_w / M_n,$$

где  $M_i$  – молекулярная масса  $i$ -ого фрагмента;

$H_i$  – высота пика  $i$ -ого фрагмента;

$M_w$  – среднемассовая молекулярная масса;

$M_n$  – среднечисленная молекулярная масса;

$p$  – полидисперсность.

#### 2.2.4. Анализ липофильных фракций ботанических форм *Apium graveolens* L методом ГХ/МС

Липофильные фракции черешков, листьев и корнеплодов сельдерея (полученные в ходе обезжиривания сырья в схеме на рисунке 4) анализировали методом газовой хромато-масс-

спектрометрии (ГХ/МС) в режиме сканирования полного тока с целью скрининга мажоритарных соединений для формирования дальнейшего вектора исследований.

Состав липофильных фракций сельдерея изучали на газовом хромато-масс-спектрометре Clarus 600T, (PerkinElmer, США). Условия хроматографирования: хроматографическая колонка – Rtx-5MS, 30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм; газ-носитель – гелий; температура инжектора – 250 °С; программирование температур термостата колонки: 0–1 мин – 50 °С; 2–51 мин – увеличение температуры со скоростью 4 °С/мин до 250 °С; 52–55 мин – выдерживание при 250 °С; скорость потока газа-носителя – 1 мл/мин; объем вводимой пробы – 0,5 мкл; общее время записи хроматограммы – 60 минут. Масс-спектрометр: электронная ионизация (EI) при 70 eV; квадрупольный анализатор-масс; диапазон  $m/z$  29–350; температура линии переноса – 250 °С; температура детектора – 240 °С.

Интерпретацию масс-спектров осуществляли с помощью библиотеки NIST-20. Оценку количественного содержания компонентов липофильных фракций проводили методом внутренней нормализации (без оценки фактора отклика детектора).

#### *2.2.5. Количественный анализ содержания сенкиунолида А в липофильной фракции сельдерея пахучего.*

Количественное определение сенкиунолида А в черешках сельдерея проводили с использованием жидкостного хроматографа LicArt 62 (ООО «Лабконцепт», Российская Федерация) с диодно-матричным детектором (длина детекции – 275 нм) на колонке Luna 5  $\mu$ m C18(100) 100 Å LC Column 250\*4.6 mm. Сырье измельчали на кусочки 0,5×1 см высушивали в сушилке при температуре не более 40 °С, до уровня остаточной влажности не более 10%.

*Получение липофильной (хлороформной) фракции:* 30 г (точная навеска) измельченного до 1 мм сырья помещали в круглодонную колбу, прибавляли 200 мл хлороформа, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 4 часов. Полученное извлечение отфильтровывали под вакуумом. Растворитель отгоняли на ротационном испарителе (Hei-Var Advantade ML/G3, Германия) с вакуумной системой (T=30 °С, 80 об/мин). Экстракцию проводили еще три раза. Полученные хлороформные фракции объединяли, упаривали до остаточного объема 70 мл и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки хлороформом.

*Испытуемый раствор:* 10,0 мл полученного извлечения переносили в круглодонную колбу и досуха упаривали на ротационном испарителе, после чего сухой остаток растворяли в 5 мл метанола, переносили в мерную колбу объемом 25 мл, круглодонную колбу дважды промывали 5 мл метанола и переносили в ту же колбу, затем добавляли 7,5 мл 1 % раствора уксусной кислоты (чс, АО «Вектон», Россия) и доводили до метки метанолом.

Из полученного раствора отбирали аликвоту 1,0 мл, переносили в мерную колбу на 10 мл, доводили до метки растворителем пробы (смесь метанола и 1 % водного раствора уксусной кислоты 7:3).

*Раствор СО:* в качестве стандартного образца использовали CRS сенкиунолида А (Biorbyt, Китай). 20 мг субстанции (точная навеска) помещали в мерную колбу на 20 мл и доводили до метки метанолом. 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу на 10 мл и доводили до метки растворителем пробы. Таким образом, концентрация полученного раствора стандартного образца составила 0,1 мг/мл.

*Условия хроматографирования:* объем вводимой пробы составил 20 мкл, скорость подвижной фазы колонки 1 мл/мин, температура термостата колонки 35°C, детектор диодно-матричный, волна детекции – 275 нм. В качестве подвижных фаз использовали 1 % водный раствор уксусной кислоты (элюент А) и метанол (элюент В), режим элюирования изократический (70 % элюента В). Время записи хроматограммы 12 минут.

Пригодность хроматографической системы оценивали в соответствии с ОФС 1.2.1.2.0001 «Хроматография» [121] по показателям: относительное стандартное отклонение (RSD) времен удерживания и площадей СО сенкиунолида А (не более 2 %), фактор асимметрии пика ( $A_s$ ) (в интервале 0,8-1,5), число теоретических тарелок ( $N$  – более 5000).

Расчет содержания сенкиунолида А (мг/мл) проводили по формуле:

$$C_x, (\text{мг/мл}) = \frac{S_x \times a_0 \times P \times 1 \times 25 \times 10}{S_0 \times 20 \times 10 \times 10 \times 100 \times 1}$$

где  $S_x$  – площадь пика сенкиунолида в испытуемом растворе;

$S_0$  – площадь пика сенкиунолида в растворе СО;

$a_0$  – масса навески СО, мг;

$P$  – содержание сенкиунолида в СО, %;

### **2.3. Разработка и проведение валидационных испытаний ВЭЖХ-методик количественного определения фенольных соединений в сырье сельдерея пахучего**

#### *2.3.1. Разработка и валидация методики количественного определения хлорогеновой кислоты в сырье сельдерея листового для оценки сортовых преимуществ сырья.*

Для оценки сортовых преимуществ была разработана методика количественного определения хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ. Стадии разработки и текст методики приведен в результатах исследования (Глава 4). Испытания проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LicArt 62 (ООО «Лабконцепт», Россия), оснащенный диодно-матричным детектором. Внутрилабораторную воспроизводимость (прецизионность) оценивали также на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC 20 (Shimadzu, Япония). Для приготовления подвижных фаз использовали трифторуксусную кислоту (HPLC grade, Merck,

США) Ацетонитрил (HPLC grade, Fisher Chemical, США). Анализ проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» [121].

Подтверждение достоверности предложенной методики доказывали путем проведения валидационных испытаний по таким параметрам, как проверка пригодности хроматографической системы, специфичность, линейность, правильность, сходимость (доверительный интервал правильности отдельного определения), прецизионность (сходимость, внутрिलाбораторная прецизионность), аналитическая область. Выбор критериев приемлемости и расчеты основных статистических характеристик проводились в соответствии с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [121]. В качестве объекта валидации использовали сорт «Нежный» (произрастание – СНТ Ручей) ввиду высокой урожайности.

### *2.3.2. Подбор хроматографических условий для анализа кумаринов*

Для оценки количественного содержания кумаринов и фуранокумаринов в сырье ботанических форм сельдерея пахучего были подобраны хроматографические условия и выбран оптимальный способ пробоподготовки. Стадии подбора хроматографических условий и способов пробоподготовки сырья приведены в экспериментальной части работы (Глава 4). Для проведения испытаний использовали хроматограф Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором на колонке Intersil 5  $\mu\text{m}$  ODS-3 100  $\text{\AA}$  250\*4.6 m. В качестве СО использовались CRS скополетина, бергаптена, псоралена, метоксалена и изопимпинеллина (SigmaAldrich, США). Анализ проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» [121].

Достоверность подобранных условий анализа подтверждали путем проведения валидационных испытаний по следующим параметрам: проверка пригодности хроматографической системы, специфичность, сходимость (доверительный интервал правильности отдельного определения). Кроме того, в связи с достаточно низкой концентрацией анализируемых веществ в сырье, был оценен предел количественного определения (ПКО) методики. Выбор критериев приемлемости и расчеты основных статистических характеристик проводились в соответствии с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [121].

## **2.4. Разработка фитосубстанций на основе сырья сельдерея пахучего и предпосылки для их изучения и последующего использования.**

### *2.4.1 Анализ структуры предложения и объемов продаж БАД, содержащих полисахариды природного происхождения*

Информационную базу для проводимого исследования составили данные Единого реестра свидетельств о государственной регистрации Евразийской экономической комиссии российской

части по состоянию на 30 сентября 2023 г. в рамках сегмента БАД, содержащих полисахариды природного происхождения, разрешенных для реализации через аптечные учреждения (аптеки, аптечные киоски и др.), специальные отделы, секции, киоски [15]. В работе использовались методы контент-анализа, агрегирования данных и сравнительного анализа с учетом торговых наименований, форм выпуска, стран и наименований производителей.

#### *2.4.2 Исследование приверженности целевой аудитории к использованию продуктов функционального и специализированного питания*

Объект исследования: мнения потребителей БАД природного происхождения по состоянию на 2023 год. В качестве инструмента получения данных был выбран метод анкетирования потребителей рынка БАД растительного происхождения. В анкетировании приняли участие 107 человек, оценка данных проводилась согласно этому количеству опрошенных. Ответы респондентов ранжировались в зависимости от пола и возраста. Анкета включала в себя 2 раздела из 12 вопросов суммарно (таблица 11). Первый раздел посвящен вопросам гендерной принадлежности и возраста респондентов, 2 раздел включал в себя 10 вопросов, касающихся предпочтений потребителей в БАД и продуктах функционального питания, а также в заинтересованности опрашиваемых в информации о продуктах функционального питания, содержащих природные ПС.

Таблица 11 – Вопросы анкетирования для оценки приверженности целевой аудитории.

№ вопроса	Содержание вопроса
1 раздел:	
1.	Укажите Ваш пол
2.	Укажите Ваш возраст
2 раздел:	
3.	Употребляете ли Вы специализированные продукты питания (БАД, диетическое профилактическое/лечебное питание)?
4.	В какой форме Вам удобнее принимать или удобнее было бы принимать такие продукты?
5.	Задумывались ли Вы о доказательной эффективности данных продуктов?
6.	Знаете ли Вы что такое продукты функционального питания?
7.	Хотели ли бы Вы повысить качество своего питания?
8.	Что бы Вас заинтересовало в продуктах функционального и специализированного питания?
9.	Знаете ли Вы, что пищевые волокна и другие полисахариды способны регулировать микрофлору кишечника и за счет этого улучшать метаболизм?

10.	Готовы ли Вы покупать продукты специального и функционального питания на основе растительных полисахаридов, если в инструкции по применению имеется научно-подтвержденная информация о прямом положительном влиянии их на здоровье?
11.	Сколько в среднем Вы были бы готовы тратить на такие продукты питания в месяц?
12.	Хотели ли бы Вы больше знать о продуктах функционального питания, содержащих полисахариды природного происхождения?

#### 2.4.3. Модификация методики выделения ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея пахучего.

С целью увеличения выхода полисахаридов и снижения соэкстракции балластных веществ, методика выделения фракций, представленная в пункте 2.2.3.1 была подвергнута модификации. Для предварительной очистки сырья использовали хлороформ «хч» и 70% этанол. Затем оставшийся шрот поочередно или совместно экстрагировали водой и буферной смесью (0,5% щавелевая кислота и аммония оксалат 1:1) с разными временными промежутками и количеством циклов экстракций. Кроме того, проводили совместное выделение ВРПС и ПВ (таблица 12).

Таблица 12 – Подбор условий выделения ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея пахучего

№ варианта	Условия выделения
Раздельное выделение	
1 (исходная методика)	ВРПС: двукратная экстракция водой (1 час, 1:20), ПВ: двукратная экстракция буферной смесью (2 часа, 1:10)
2	ВРПС: двукратная экстракция водой (2 час, 1:20), ПВ: двукратная экстракция буферной смесью (2 часа, 1:20)
3	ВРПС: трехкратная экстракция водой (1 час, 1:20), ПВ: трехкратная экстракция буферной смесью (2 часа, 1:20)
Совместное выделение	
4	Двукратная экстракция буферной смесью (2 часа, 1:20)

#### 2.4.4. Выбор показателей качества и разработка проекта ТУ фитосубстанции на основе ВРПС и ПВ сельдерея корневого

Для разработки проекта НД на смесь фракций полисахаридов сельдерея пахучего было принято решение предложить для анализа следующие показатели качества: описание, подлинность, растворимость, рН, тяжелые металлы, микробиологическая чистота, остаточные органические растворители, количественное определение, упаковка, хранение, срок годности. В

ходе исследования были апробированы методики анализа описания, растворимости, подлинности, рН и количественного определения.

**Остаточные органические растворители.** Анализ остаточных органических растворителей в соответствии с ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» [121] проводили на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором Clarus 680 (PerkinElmer, США). В качестве стандартных растворов использовали СТХ метанола, этанола, бутанола-2 и хлороформа. (ООО «Экрос», Россия). 2,0 мл стандартного водного раствора, содержащего метанол ( $c = 0,158$  мг/мл), этанол ( $c = 0,079$  мг/мл), н-бутанол ( $c = 0,032$  мг/мл) и хлороформ ( $c = 0,056$  мг/мл) помещали во флакон для парофазного анализа, закрывали пробкой и герметично укупоривали. Около 0,2 г (точная навеска) фракции ВРПС (ПВ) помещали во флакон для парофазного анализа, добавляли 2,0 мл воды очищенной, закрывали пробкой и герметично укупоривали. Хроматографировали паровую фазу стандартного и испытуемых растворов по условиям, представленным в таблице 13.

Таблица 13 – Условия хроматографирования при определении остаточных органических растворителей

Колонка	капиллярная ZB-624 30 м, 0,53 мм, 3 мкм
Газ-носитель	азот, 3 мл/мин, деление потока 1:5
Температура термостата колонки	40 °С в течение 15 минут, увеличение температуры со скоростью 35 °С/мин до 240 °С, затем 5 минут при конечной температуре
Температура инжектора	200 °С
Температура детектора	260 °С
Детектор	ионизационно-пламенный, расход водорода – 40 мл/мин, расход воздуха – 400 мл/мин
Температура термостатирования образца	95 °С
Время термостатирования	30 мин
Температура иглы	110 °С
Температура линии переноса	130 °С
Время нагнетания	2 мин
Ввод пробы	0,08 мин
Давление	17 psi
Время хроматографирования	25 мин

Расчет содержания органических растворителей определяли по формуле:

$$X = \frac{c_{st} \cdot S_x \cdot 2 \cdot 100 \cdot 10000}{m \cdot S_{st}},$$

где  $c_{st}$  – концентрация стандартного образца,  $S_x$  - площадь пика растворителя на хроматограмме испытуемого вещества; 100 – перевод в проценты; 10000 – перевод в ppm;  $S_{st}$  - площадь пика растворителя на хроматограмме стандартного раствора;  $m$  - масса навески испытуемого образца, мг

#### *2.4.5. Изучение фармакологической активности фитосубстанций ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея пахучего.*

Оценку фармакологической активности проводили на базе Центра экспериментальной фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России на модели лептин-дефицитных мышей серии C57BL/Ks-db +/+m, страдающих аномальным ожирением и сахарным диабетом 2 типа. Животные (самцы и самки в равном количестве) были рандомизированы на 3 группы (n=8): контрольную группу, не получавшую лечение, группу препарата сравнения, получавшую метформин (300 мг/кг) и испытуемую группу, получавшую смесь ВРПС и ПВ 1:1 (100 мг/кг). Длительность эксперимента составила 4 недели.

Для оценки фармакологического действия фитосубстанции полисахаридов изучали динамику веса животных, а также содержания массы жира в организме. Животных взвешивали в 1, 14 и 28 дни эксперимента на весах CE-323 (ЗАО «Sartorius», Россия), биоимпедансный анализ проводили в 1, 14 и 28 дни эксперимента на спектроскопическом импедансометре ImpediVET® BIS1 («ImpediMed Inc.», США).

На 28 день эксперимента отбирали кровь испытуемых животных из глазной вены, центрифугировали и декантировали надосадочный слой (плазму). В полученных образцах измеряли концентрацию гормона лептина с использованием набора для ИФА-анализа Cloud clone (ELISA Kit For LEP). Все разведения и измерения проводились согласно инструкции к наборам. В качестве оборудования были задействованы термостат типа "Драй-блок" TDB-120 (Biosan, Латвия) и планшетный ридер Multiskan FC (Thermo Fisher, США).

### **2.5. Разработка фитосубстанции на основе липофильной фракции черешковой ботанической формы сельдерея пахучего**

#### *2.5.1. Прогностическая оценка биологической активности мажоритарных компонентов липофильных фракций сельдерея методом компьютерного моделирования*

Прогностическую оценку фармакологической активности идентифицированных в результате ГХ/МС-анализа липофильных фракций сельдерея соединений осуществляли с использованием программы PASS Online [129]. При изучении каждого вида активности оценивали вероятность наличия (P<sub>a</sub>) и отсутствия (P<sub>i</sub>) ее проявления.



### *2.5.2. Разработка методики выделения липофильной фракции из черешковой ботанической формы сельдерея пахучего.*

По результатам фитохимического скрининга, было принято решение о разработке эффективного способа выделения липофильной фракции из черешковой ботанической формы сельдерея. Для этого проводили сравнительную экстракцию различными растворителями (хлороформ, дихлорметан, гексан; все растворители квалификации «хч», производства АО «Вектон», Россия) в различных соотношениях (1:5, 1:7, 1:10, 1:15). Снимали УФ-спектры полученных извлечений в диапазоне от 240 до 700 нм на приборе UV 1800 (Shimadzu, Япония) с последующей оценкой содержания производных бутилфталида и хлорофиллов.

Для количественного анализа суммы фталидов в пересчете на сенкиунолида А использовали СО CRS сенкиунолида А (Biorbyt). 1,0 мл метанольного раствора стандарта с концентрацией 0,1 мг/мл (приготовление описано в пункте 2.2.5) переносили в мерную колбу размером 10 мл и доводили до метки метанолом. Снимали УФ-спектр раствора и фиксировали значение оптической плотности в максимуме поглощения при 275 нм.

После выбора оптимального растворителя и соотношения сырье : экстрагент определяли количество циклов экстракций. После завершения процесса экстракции оптимальным растворителем, объединенную липофильную фракцию упаривали на ротационном испарителе (Hei-Var Advantade ML/G3, Германия) с вакуумной системой ( $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 80 об/мин) досуха (масса сухого остатка составила 1,118 г из 30,0658 г сырья). Полученный сухой остаток растворяли в 45 мл вазелинового масла, что соответствует 38,25 г ( $\rho=0,85$ ), на УЗ бане ( $t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 мин).

### *2.5.3. Выбор критериев качества и разработка проекта нормативной документации для фитосубстанции липофильной фракции сельдерея черешкового в вазелиновом масле.*

Для оценки контроля качества полученной субстанции, в соответствии с ГФ РФ, были выбраны следующие показатели: описание, растворимость, подлинность, плотность, кислотное число, перекисное число, остаточные органические растворители, микробиологическая чистота, количественное определение, хранение, срок годности.

В ходе данного исследования, полученная фитосубстанция была проанализирована по всем предложенным показателям качества (кроме показателя «Микробиологическая чистота», который проводится по стандартной фармакопейной методике и характеризует производственную площадку). Методики проведения испытаний представлены в проекте НД в приложении Ж.

## **Выводы к главе 2**

1. В качестве объектов исследования использовали сырье сельдерея пахучего черешковой, листовой и корневой ботанических форм различных сортов, как

приобретенное в продуктовых магазинах г. Санкт-Петербурга, так и культивируемое в разных районах Ленинградской области.

2. Проводили сравнительный анализ сырья различных ботанических форм и сортов на наличие веществ фенольной природы, полисахаридов, производных бутилфталата, изучали состав липофильных фракций и минеральный состав ботанических форм сельдерея пахучего. Для всестороннего фитохимического скрининга сырья сельдерея использовали современные физико-химические методы анализа, такие как ВЭТСХ, УФ-СФМ, АЭС-ИП, гравиметрия, ВЭЖХ, ГХ/МС.
3. Разработку и валидацию методики количественного определения хлорогеновой кислоты для оценки сортовых преимуществ сельдерея листового и подбор хроматографических условий для оценки содержания кумаринов в сырье сельдерея пахучего проводили методом ВЭЖХ.
4. По результатам фитохимического скрининга для перспективных фитосубстанций - ВРПС и ПВ корнеплодов и липофильной фракции черешков сельдерея – подбирали оптимальную методику экстракции, осуществляли стандартизацию (выбор показателей качества) и подготовку проектов нормативной документации.
5. Для оценки перспективности разработки фитосубстанций на основе полисахаридных фракций сельдерея проводили анализ рынка специализированного питания на основе полисахаридов.
6. Оценку биологической активности мажоритарных соединений липофильной фракции сельдерея проводили методом компьютерного моделирования PASS online. Фармакологическую активность фитосубстанции на основе полисахаридов оценивали на модели лептин-дефицитных мышей путем характеристики динамики массы тела животных и биоимпедансометрического анализа содержания массы жира в организме.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКОГО СКРИНИНГА СЫРЬЯ *APIUM GRAVEOLENS L.*

#### 3.1 Результаты анализа фенольного профиля сырья сельдерея методами ВЭТСХ и УФ-спектрофотометрии.

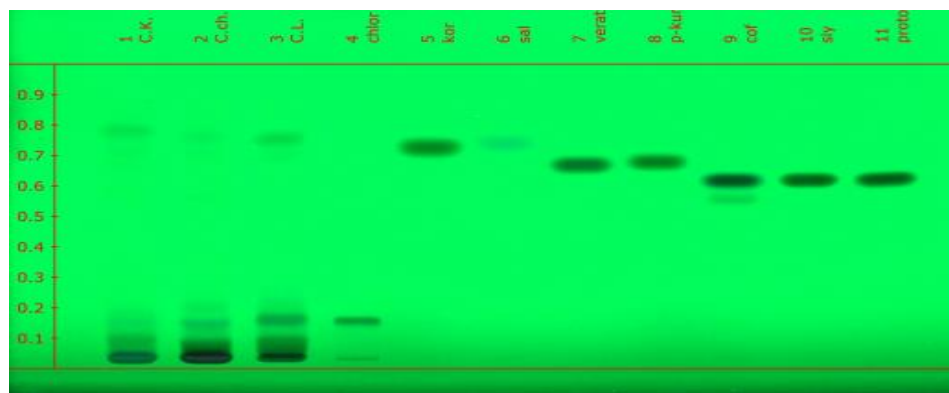
##### 3.1.1. Результаты ВЭТСХ-анализа содержания фенольных кислот в ботанических формах и сортах сельдерея пахучего

Методом ВЭТСХ в ботанических формах сельдерея пахучего было установлено наличие хлорогеновой, сиреневой и салициловой кислот. Причем, характер пятен гидроксикоричных кислот на треках испытуемых растворов схож по значениям факторов удерживания, форме, и цвету пятен, но отличается по интенсивности окраски, что говорит о различном количественном содержании данных БАВ (рисунок 5)

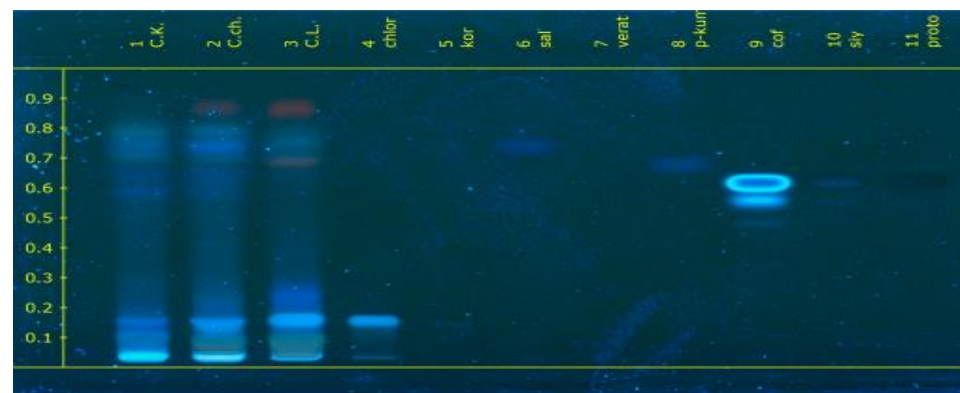
При сравнительном анализе разных сортов сельдерея листового (рисунок 6) были обнаружены хлорогеновая и салициловая кислоты. Но в данном случае, можно говорить о том, что мономерный состав сорта «Паскаль» отличается от сортов «Захар» и «Юта», которые схожи. И, также как и в случае с разными ботаническими формами сельдерея, наблюдается разная интенсивность пятен фенольных кислот, что говорит об их различном количественном содержании в разных сортах.

Кроме того, на треках всех сортов сельдерея листового наблюдаются различные по интенсивности пятна красного цвета, которые можно идентифицировать как вещества хлорофилльной природы в связи со специфичной окраской. Это позволяет позиционировать листовую ботаническую форму сельдерея как источник хлорофилла.

Результаты ВЭТСХ-скрининга фенолкарбоновых кислот сырья сельдерея пахучего позволили сформировать дальнейший вектор исследования в направлении разработки и валидации аналитических методик для оценки сортовых преимуществ листовой ботанической формы сельдерея по содержанию веществ фенольной природы. Объектом выбора маркерного соединения в данном случае является хлорогеновая кислота, пятно которой отчетливо видно на треках всех ботанических форм сельдерея пахучего. При этом на треке листовой ботанической формы наблюдается самая яркая интенсивность, что подтверждает выбор данной ботанической формы в качестве источника фенольных соединений.

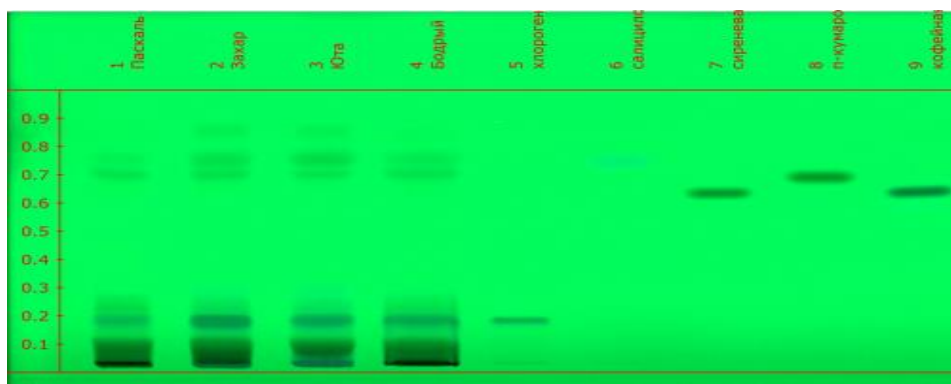


а

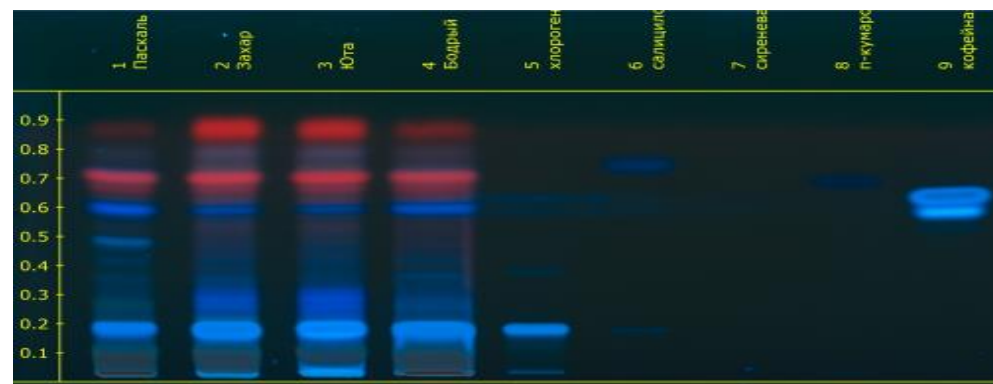


б

Рисунок 5 – Хроматограмма фенолкарбоновых кислот сельдерея пахучего: а – УФ-свет ( $\lambda = 254$  нм); б – УФ-свет ( $\lambda = 366$  нм): ботанические формы: 1 – корневая; 2 – черешковая; 3 - листовая; СО: 4 – хлорогеновой кислоты; 5 – коричной кислоты; 6 – салициловой кислоты; 7 – вератровой кислоты; 8 – п-кумаровой кислоты; 9 –кофейной кислоты; 10 – сиреневой кислоты; 11 – протокатеховой кислоты.



а



б

Рисунок 6 – Хроматограмма фенолкарбоновых кислот разных сортов сельдерея листового: а – УФ-свет ( $\lambda = 254$  нм); б – УФ-свет ( $\lambda = 366$  нм): 1 – извлечение из сорта «Паскаль»; 2 – извлечение из сорта «Захар»; 3 – извлечение из сорта «Юта»; 4 – извлечение из сорта «Бодрый»; 5 – СО хлорогеновой кислоты; 6 – СО салициловой кислоты; 7 – СО сиреневой кислоты; 7- СО п-кумаровой кислоты; 8 – СО кофейной кислоты

### 3.1.2. Результаты количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в ботанических формах сельдерея пахучего

Количественную оценку содержания кислот фенольной природы в разных видах сырья проводил методом УФ-спектрофотометрии. Для подтверждения возможности использования аналитической длины волны (330 нм – максимум поглощения хлорогеновой кислоты), рекомендованной ФС.2.5.0019.15 «Крапивы двудомной листья», предварительно регистрировали УФ-спектры полученных извлечений (рисунок 7). Как видно из данных УФ-спектра, для всех извлечений характерен экстремум при  $\lambda=330$  нм (причем для извлечения из листьев и черешков достаточно выраженный), что подтверждает правильность выбора хлорогеновой кислоты в качестве маркера для пересчета суммы гидроксикоричных кислот.

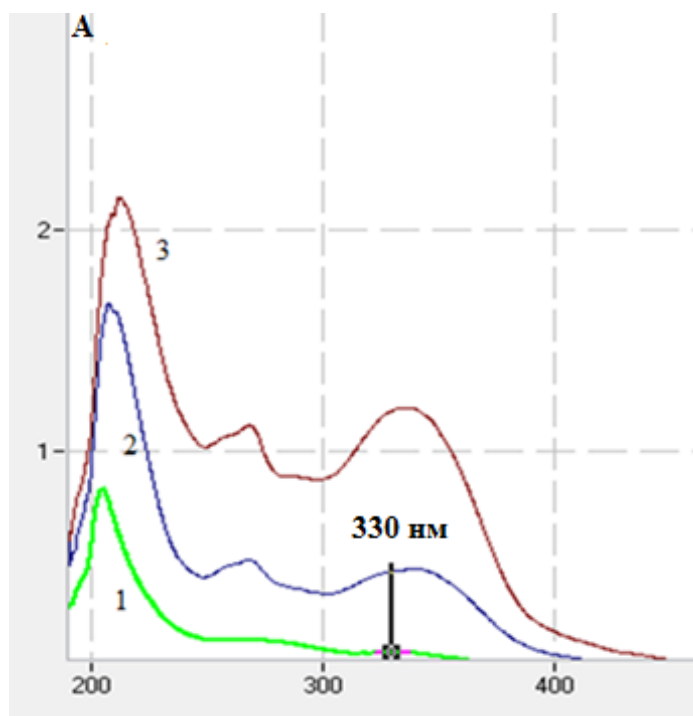


Рисунок 7 – УФ-спектры извлечений из сырья сельдерея пахучего: 1 (зеленый) – сельдерей корневой; 2 (синий) – сельдерей черешковый; 3 (красный) – сельдерей листовой

В таблице 14 представлены результаты количественного определения суммы гидроксикоричных кислот (в пересчете на хлорогеновую кислоту) в разных ботанических формах сельдерея пахучего.

Таблица 14 – Результаты количественного определения суммы гидроксикоричных (в пересчете на хлорогеновую кислоту) в сырье сельдерея

Ботаническая форма, сорт	Содержание в сырье, %
Сельдерей корневой (сорт «Олимп»)	0,44 ± 0,05
Сельдерей черешковый (сорт «Малахит»)	2,07 ± 0,12
Сельдерей листовой (сорт «Нежный»)	6,05 ± 0,23

Как видно из полученных результатов, листовая ботаническая форма сельдерея пахучего накапливает значительно больше гидроксикоричных кислот, что делает ее объектом выбора для выделения и анализа данной группы БАВ.

### 3.1.3. Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в сортах сельдерея листового

Исходя из представленных выше результатов, листовая разновидность сельдерея была выбрана в качестве оптимального источника фенольных соединений. При этом ассортиментное разнообразие сортов растения говорит о необходимости выбора наиболее перспективного сорта для медицинского применения. Оценку содержания суммы флавоноидов в пересчете на апигенин для разных сортов сельдерея листового проводили методом УФ-спектрофотометрии (таблица 15, рисунок 8). Согласно данным литературы (см. раздел 1.3.2), в сырье сельдерея одним из основных представителей флавоноидов является апигенин, поэтому он был выбран в качестве маркерного соединения. Правильность выбора маркерного соединения подтверждается экстремумами спектра извлечений, которые совпадают по значениям с максимумами поглощения СО апигенина. Наибольшее накопление данной группы БАВ наблюдалось в сортах «Захар» ( $2,0 \pm 0,2$ ) % и «Нежный» ( $1,4 \pm 0,1$ ) %, что делает их наиболее перспективными для дальнейшего анализа и использования.

Таблица 15 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в разных сортах сельдерея листового

Сорт сельдерея листового	«Нежный»	«Захар»	«Самурай»	«Парус»
Сумма флавоноидов	( $1,4 \pm 0,1$ ) %	( $2,0 \pm 0,2$ ) %	( $0,57 \pm 0,01$ ) %	( $1,1 \pm 0,2$ ) %

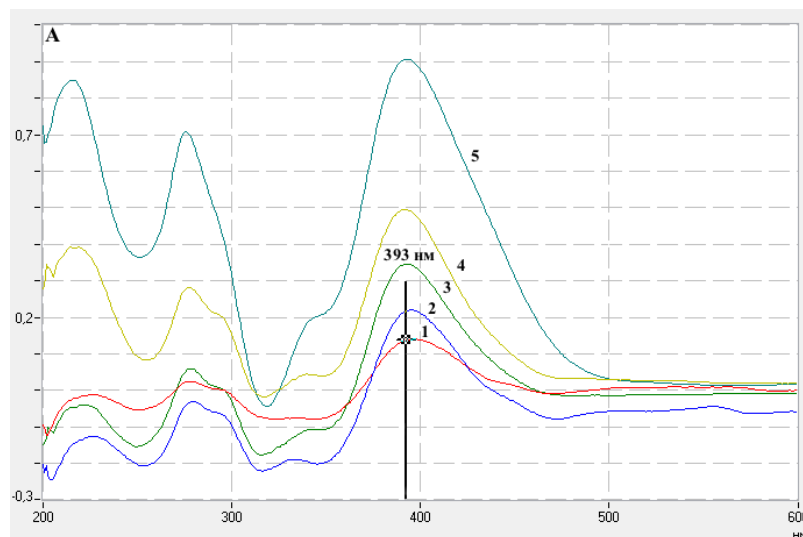


Рисунок 8 – УФ-спектры: 1 (красный) – сельдерея листовая сорт «Самурай», 2 (синий) – сельдерея листовая сорт «Парус», 3 (зеленый) – сельдерея листовая сорт «Нежный», 4 (желтый) – сельдерея листовая сорт «Захар», 5 (голубой) – СО апигенина ( $0,0104$  мг/мл)

Как видно из результатов изучения фенольного профиля сельдерея пахучего методами ВЭТСХ и УФ-СФМ, наибольшее содержание целевых соединений демонстрирует листовая ботаническая форма, что делает ее объектом выбора в качестве источника фенольной группы БАВ. Кроме того, обнаружено, что разные сорта сельдерея листового накапливают разное количество веществ фенольной природы. Полученные результаты позволяют сформировать подзадачу исследований в отношении разработки и валидации экспрессной и экономичной методики количественного определения хлорогеновой кислоты в сырье сельдерея пахучего методом ВЭЖХ. Выбор хлорогеновой кислоты в качестве маркерного соединения обусловлен, с одной стороны, ее присутствием во всех сортах и ботанических формах сельдерея, а с другой, структура данного соединения остается относительно статичной в растении, тогда как флавоноиды гликозилируются, причем состав сахарной части может варьировать в зависимости от условий культивирования, онтогенетических и других факторов, что затрудняет их идентификацию, а количественное определение агликонов флавоноидов усложняет пробоподготовку исходного сырья в связи с необходимостью использования гиролитического расщепления, которое не всегда характеризуется полным количественным протеканием. Выбор метода ВЭЖХ обусловлен способностью разделить сложную матрицу сырья, что позволит провести косвенную оценку сортовых преимуществ по другим фенольным соединениям (идентификация с помощью УФ-спектров пиков, снятых на диодно-матричном детекторе).

### 3.2 Результаты изучения минерального состава ботанических форм и сортов сельдерея

Анализ минерального состава растительного сырья является неотъемлемым звеном фитохимических исследований, а использование растений в качестве источника микронутриентов актуально и востребовано на рынке. По результатам исследования в различных видах и сортах *Apium graveolens* L. методом АЭС-ИП было обнаружено 12 макро- и микроэлементов (таблица 16).

Таблица 16 – Макро- и микроэлементный состав различных ботанических форм сельдерея пахучего

Гр. Эл.	Элемент	Содержание элементов, мг/кг, (n=6)		
		С. листовой (сорт «Нежный»), хср ± Δхi	С. черешковый хср ± Δхi	С. корневой хср ± Δхi
Макро-элементы	Ca	$27 \times 10^3 \pm 4 \times 10^3$	$11 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$	$8 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^2$
	K	$14,0 \times 10^3 \pm 0,4 \times 10^3$	$19,0 \times 10^3 \pm 0,6 \times 10^3$	$31 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$
	Mg	$3,0 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$	$1 \times 10^3 \pm 18$
	Na	$7,0 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$	$51,0 \times 10^3 \pm 0,4 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$
Микроэлемент	Fe	$2 \times 10^2 \pm 19$	$2 \times 10^2 \pm 16$	$101 \pm 24$
	Cd (ПДК 1,0 мг/кг)	-	-	-

	Co	$5 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-2}$	$11 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-2}$	$2, \cdot 10^{-1} \pm 0,2 \cdot 10^{-1}$
	Cu	$7 \pm 1$	$7 \pm 1$	$16 \pm 2$
	Al	$2 \cdot 10^2 \pm 16$	$24 \cdot 10^2 \pm 1$	$62 \pm 21$
	As (ПДК 0,5 мг/кг)	-	-	-
	Ba	$62 \pm 4$	$4,0 \pm 0,6$	$5 \pm 2$
	Mn	$47 \pm 6$	$28 \pm 1$	$22 \pm 1$
	Pb (ПДК 6,0 мг/кг)	-	-	-
	Hg (ПДК 0,1 мг/кг)	-	-	-
	Rb	$18,0 \pm 0,3$	$26 \pm 3$	$11,0 \pm 0,4$
	Sr	$75 \pm 3$	$43 \pm 2$	$24,0 \pm 0,4$
	Zn	$65 \pm 3$	$26 \pm 0,6$	$55 \pm 2$

Примечание: «-» - содержание элемента ниже ПКО данным методом; *курсивом* выделены контролируемые элементы в соответствии с ГФ РФ ОФС.1.5.3.0009.15 [122].

Таблица 17 – Макро- и микроэлементный состав различных сортов сырья сельдерея пахучего листового

Гр. Эл.	Элемент	Содержание элементов, мг/кг, (n=5) в с. листовом сорта		
		«Захар», $\text{хср} \pm \Delta \text{хi}$	«Паскаль», $\text{хср} \pm \Delta \text{хi}$	«Бодрый», $\text{хср} \pm \Delta \text{хi}$
Макро- элементы	Ca	$15,0 \cdot 10^3 \pm 0,5 \cdot 10^3$	$16 \cdot 10^3 \pm 0,08 \cdot 10^3$	$16 \cdot 10^3 \pm 1 \cdot 10^3$
	K	$29 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^3$	$29,0 \cdot 10^3 \pm 0,3 \cdot 10^3$	$37 \cdot 10^3 \pm 8 \cdot 10^3$
	Mg	$3,0 \cdot 10^3 \pm 0,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3 \pm 0,4 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3 \pm 0,3 \cdot 10^3$
	Na	$5,0 \cdot 10^3 \pm 0,4 \cdot 10^3$	$6135 \pm 592$	$5401 \pm 416$
Микроэлементы	Fe	$127 \pm 9$	$159 \pm 12$	$112 \pm 11$
	Cd (ПДК 1,0 мг/кг)	-	-	-
	Co	$5 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-1} \pm 0,3 \cdot 10^{-1}$
	Cu	$3 \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$2 \pm 3 \cdot 10^{-1}$	$3 \pm 2 \cdot 10^{-1}$
	Al	$205 \pm 5$	$263 \pm 13$	$154 \pm 5$
	As (ПДК 0,5 мг/кг)	-	-	-
	Ba	$18 \pm 1$	$14 \pm 1$	$12 \pm 2 \cdot 10^{-1}$
	Mn	$33 \pm 1$	$28 \pm 4$	$27 \pm 1$
	Pb (ПДК 6,0 мг/кг)	-	-	-
	Hg (ПДК 0,1 мг/кг)	-	-	-
	Rb	$42 \pm 2$	$54 \pm 3$	$65 \pm 12$
	Sr	$13 \pm 2$	$13 \pm 2$	$32 \pm 2 \cdot 10^{-1}$
	Zn	$24 \pm 1 \cdot 10^{-1}$	$23 \pm 2$	$25 \pm 1$



Примечание: «-» - содержание элемента ниже его ПКО данным методом; *курсивом* выделены контролируемые элементы с соответствии с ГФ РФ ОФС.1.5.3.0009.15 [122].

Полученные данные по изучению минерального профиля в сравнительном аспекте по разным ботаническим формам представлены на диаграммах (рисунки 9-10).

Тяжелые металлы и мышьяк в анализируемых объектах идентифицированы не были (содержание ниже ПКО данных элементов).

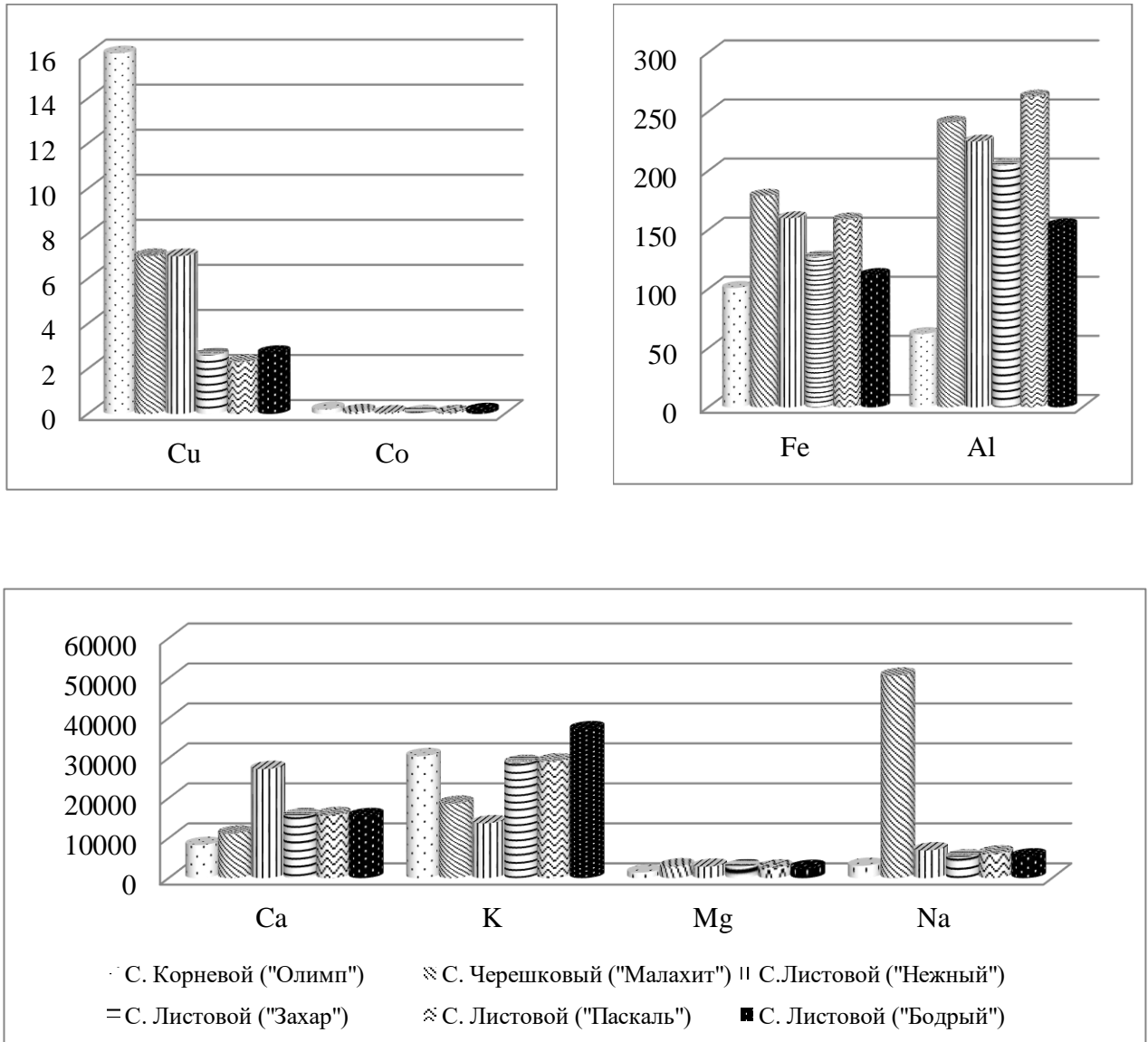


Рисунок 9 – Макроэлементный профиль сельдерея пахучего (мг/кг)

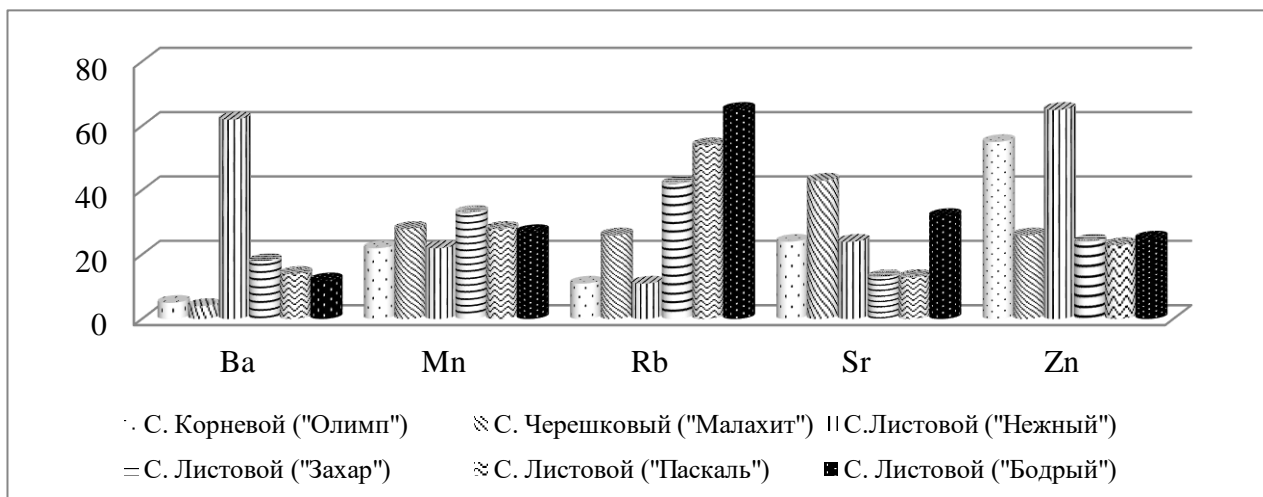


Рисунок 10 – Микроэлементный профиль сельдерея пахучего (мг/кг)

Как видно представленных выше данных, разные ботанические формы сельдерея накапливают различные мажоритарные элементы. Так, из макроэлементов накопление кальция превалирует в листьях, причем максимальная концентрация наблюдается в сорте «Нежный» (около 27 г/кг растения). 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.

Мажоритарными микроэлементами сельдерея являются железо, цинк и стронций, накопление которых отличается в разных ботанических 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 наблюдается в корнеплодах (около 50 мг/кг) сельдерея и листьях сорта «Нежный» (около 65 мг/кг).

Таким образом, наибольшим накоплением мажоритарных элементов (кальция, цинка, магния, железа) характеризуется сельдерей листовой сорта «Нежный», что делает его объектом выбора в диетическом питании и в качестве источника получения биологически активных добавок. Помимо этого, значительно содержание кальция в данном сорте растения (около 25 г/кг) позволяет отнести его к биологическому индикатору кальциево-стронциевых почв, а также позиционировать как источник минеральной БАД.

Необходимо отметить, что различное накопление минералов также может быть обусловлено различным их содержанием в почве места произрастания и для того, чтобы говорить об избирательном накоплении отдельных элементов необходимо рассчитывать коэффициент биологического поглощения (КБП) по шкале Н.Ф. Ганжара (2007) [130]. Однако тенденция по накоплению отдельных минералов прослеживается внутри сортов и характеризуется превалированием кальция, железа и цинка.

### 3.3. Результаты скрининга полисахаридных фракций в ботанических формах сельдерея пахучего

#### 3.3.1. Результаты выделения и очистки полисахаридных фракций

Количественное содержание фракций полисахаридов различных ботанических форм сельдерея до и после очистки представлено в таблице 18.

Таблица 18 – Количественное содержание полисахаридных фракций в разных ботанических формах сельдерея до и после очистки

	Корнеплоды		Черешки		Листья	
	$\bar{X} \pm \Delta X\%$ (n=5)					
	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

После очистки полученных субстанций методом Севага наблюдалось значительное изменение органолептических характеристик, а также уменьшение массы полисахаридных фракций (таблицы 18-20).

Таблица 19 – Органолептическая характеристика полисахаридных фракций корнеплодов до и после очистки

Фракция ПС	До очистки		После очистки	
		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 20 – Органолептическая характеристика полисахаридных фракций черешкового и листового сельдерея

Фракция ПС	Описание органолептических свойств фракций разных ботанических форм	
	До очистки	После очистки
<b>Черешки</b>		

СРПС	Кристаллический порошок коричневого цвета с сильным сладким запахом	Аморфный порошок светло-коричневого цвета без запаха
ВРПС	Кристаллический порошок серовато-коричневого цвета со сладким запахом	Аморфный мелкий порошок светло-бежевого цвета без запаха
ПВ	Мелкокристаллический порошок светло-коричневого цвета со слабым сладким запахом	Аморфный волокнистый порошок светло-бежевого цвета без запаха
<b>Листья</b>		
СРПС	Кристаллический порошок бледно-зеленого цвета с серыми вкраплениями со сладким запахом	Аморфный мелкий почти белый порошок без запаха
ВРПС	Кристаллический порошок серого цвета со слабым сладким запахом	Аморфный серовато-бежевый порошок без запаха
ПВ	Мелкокристаллический порошок бежевого цвета со слабым сладким запахом	Аморфный желтовато-белый порошок без запаха

Как видно из данных таблицы 18 наибольшее содержание полисахаридов наблюдается в корнеплодах сельдерея ( $13,54 \% \pm 1,07$  после очистки), что может быть обусловлено накопительной функцией данного органа. При этом мажоритарной фракцией для корнеплодов и листьев является ВРПС, тогда как в черешках наблюдается приблизительно равное накопление ВРПС и ПВ. Фракция СРПС превалирует в сельдерее листовом, однако ввиду того, что спирт является универсальным растворителем, мало используемом в выделении полисахаридов, можно предположить значительное количество примесей низкомолекулярных веществ, что подтверждается результатами мономерного анализа фракции.

Необходимо отметить, что фракция ГЦ была очень незначительна (менее 0,5% вне зависимости от ботанической формы), поэтому было принято решение эту фракцию в дальнейшем не использовать в работе.

Полисахаридные фракции ботанических форм сельдерея до очистки представлены кристаллическими и мелкокристаллическими порошками со слабым сладковатым запахом в основном светло- или темно-коричневого цвета. Очистка полисахаридов привела к изменению окраски фракций до светло-коричневых и светло-бежевых оттенков, а также к приобретению ими аморфной структуры, характерной для полимеров.

### *3.3.2. Результаты анализа примесей в полисахаридных фракциях.*

Оценка примесей низкомолекулярных соединений методом УФ-спектрофотометрии (рисунок 11) показала отсутствие максимумов поглощения в диапазоне от 300 до 700 нм во всех фракциях, кроме СРПС листьев, что говорит об отсутствии примесей фенольных веществ, каротиноидов и хлорофиллов. В области 200-300 нм наблюдаются «плечо» поглощения, которое может быть обусловлено наличием карбоксильной группы в соединениях [131]. Для фракции СРПС листьев наблюдаются максимумы поглощения на 266 и 341 нм, что говорит о наличии примеси фенольных веществ, а именно – апигенина и его гликозидов [132].

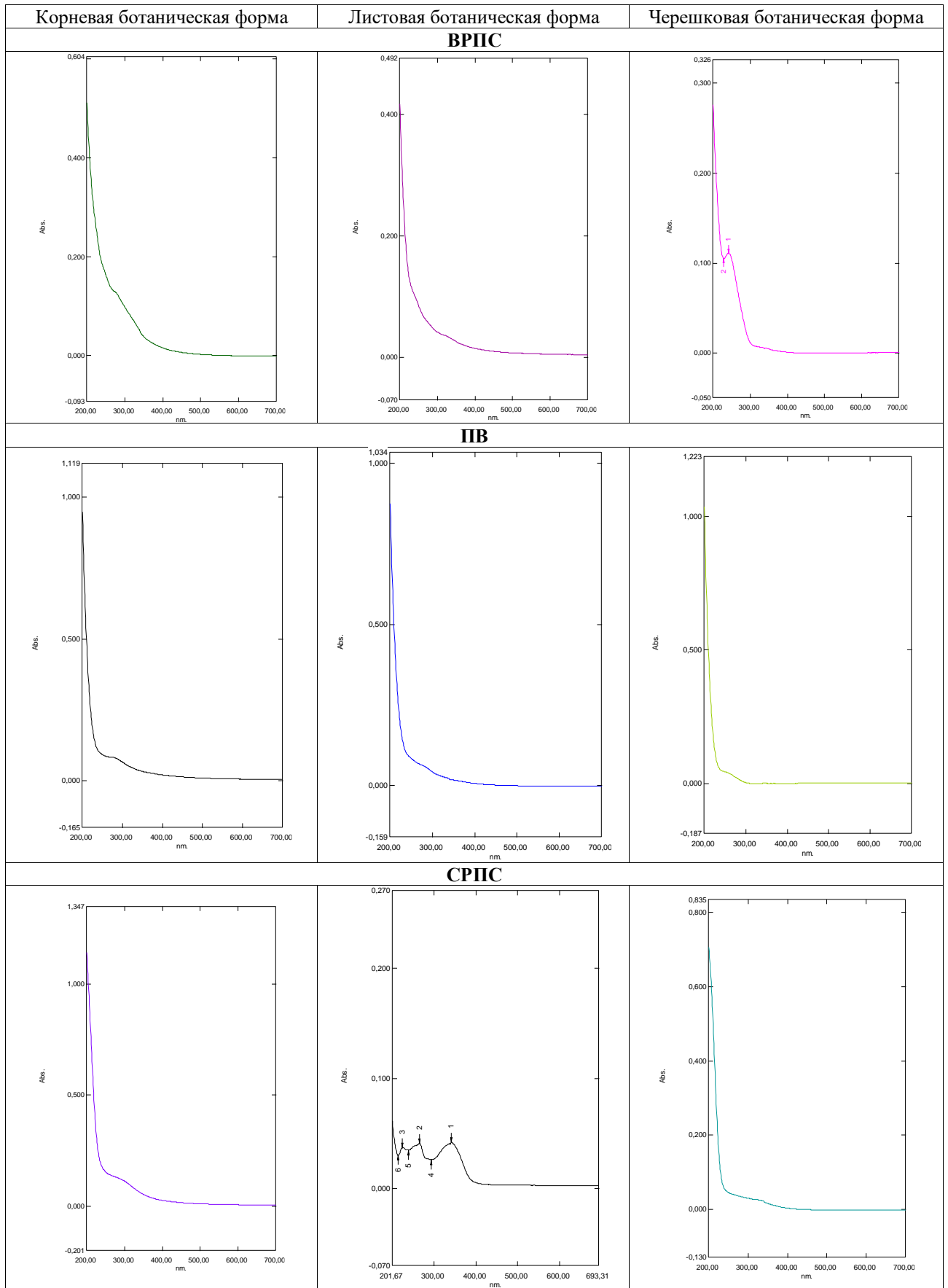


Рисунок 11 – УФ-спектры полисахаридных фракций ботанических форм сельдерея пахучего

Результаты количественного определения примеси азотсодержащих соединений, включая белки, представлены в таблице 21.

Таблица 21– Оценка примеси азотсодержащих соединений во фракциях

Фракция ПС	Содержание азота во фракциях полисахаридов, $\bar{X} \pm \Delta X$ % (n=3)					
	корнеплоды		черешки		листья	
	До очистки	После очистки	До очистки	После очистки	До очистки	После очистки
СРПС	0,42 ± 0,08	0,35 ± 0,06	0,32 ± 0,05	0,26 ± 0,08	0,35 ± 0,04	0,29 ± 0,05
ВРПС	1,29 ± 0,25	0,98 ± 0,05	1,14 ± 0,30	0,87 ± 0,20	0,97 ± 0,15	0,65 ± 0,08
ПВ	3,02 ± 0,17	2,07 ± 0,14	2,45 ± 0,13	1,95 ± 0,17	2,44 ± 0,17	2,02 ± 0,21

Как видно из данных таблицы, метод Севага не позволяет добиться полной очистки от примесей азотсодержащих соединений. Тем не менее, использование данного метода целесообразно ввиду очистки от других балластных соединений (н\р, хлорофилла и фенольных соединений), что подтверждается значительным изменением органолептических свойств фракций и данными спектрофотометрии.

### 3.3.3. Результаты изучения структурных характеристик полисахаридных фракций.

Хроматограмма СО моносахаров и их смеси представлена на рисунке 12 и характеризуется достаточным разрешением всех пятен СО моносахаров за исключением фруктозы и маннозы, однако в случае качественного анализа, данные соединения могут быть идентифицированы по характерным цветам окраски.

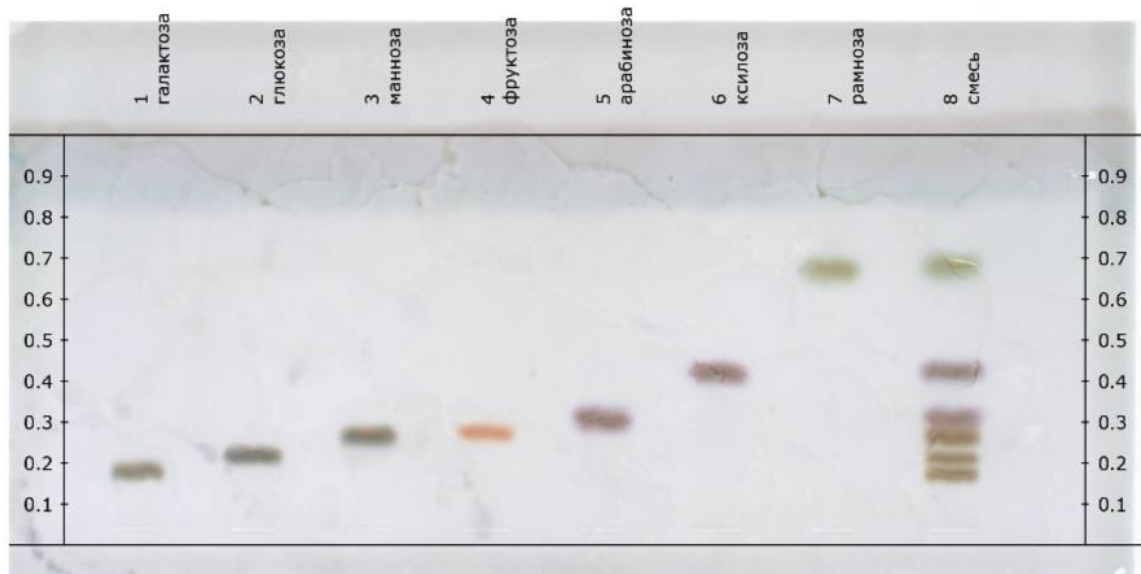


Рисунок 12 – Хроматограмма СО моносахаров и их смеси

Оптимальное время гидролиза фракций было определено экспериментально исходя из интенсивности пятен моносахаров и отсутствия ее увеличения при дальнейшем проведении гидролиза (составило 4 часа для всех образцов). Хроматограмма сравнительного анализа монокомпонентного состава СРПС, ВРПС и ПВ корнеплодов, черешков и листьев сельдерея представлена на рисунке 13.

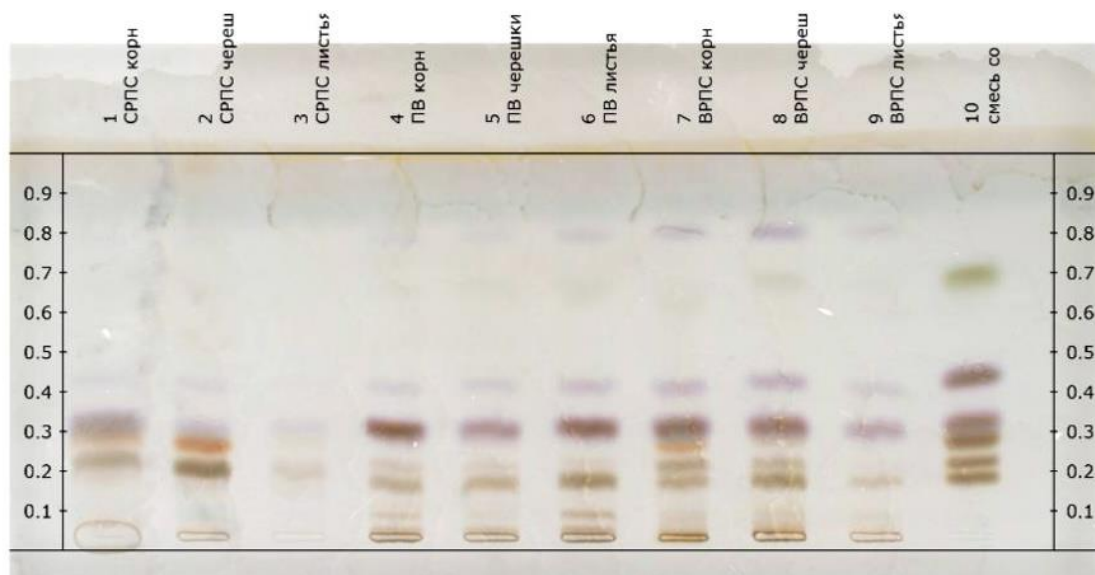


Рисунок 13 – Хроматограмма определения мономерного состава полисахаридных фракций разных ботанических форм сельдерея

В таблице 22 представлены сводные результаты оценки мономерного состава полисахаридных фракций различных ботанических форм сельдерея пахучего.

Таблица 22 – Результаты мономерного состава полисахаридных фракций сельдерея пахучего

Моно-сахарид	Окраска зоны адсорбции	Значение Rf		СРПС			ПВ			ВРПС		
		р-ры СО	Смесь СО	К	Ч	Л	К	Ч	Л	К	Ч	Л
Галактоза	Серо-зеленый	0,18	0,17	-	-	-	++	++	+++	++	+++	+
Глюкоза	Серо-зеленый	0,22	0,21	++	+++	+	+	+	+	+++	++	+
Манноза	Сине-серый	0,27	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Фруктоза	Оранжевый	0,28	0,28	+	+++	+	-	-	-	++	+	-
Арабиноза	Фиолетово-серый	0,31	0,32	++	+	+	+++	++	+++	+++	++	++
Ксилоза	Фиолетово-серый	0,42	0,43	-	-	-	+	+	++	++	++	+
Рамноза	Бледно-зеленый	0,68	0,68	-	-	-	-	-	+	-	+	-

*Примечание:* К – корневая, Ч – черешковая, Л – листовая форма сельдерея; «-» не идентифицированные сахара, «+» и их количество – обнаруженные моносахара в соответствии с интенсивностью пятен

Как видно из представленных данных, состав моносахаров вариабелен и различается у разных фракций полисахаридов и ботанических форм сельдерея. СРПС черешков представлены преимущественно глюкозой и фруктозой, пятна которых обладают интенсивной окраской и большим размером, тогда как СРПС корнеплодов помимо глюкозы и фруктозы также содержат арабинозу. Что касается СРПС листьев, в них были обнаружены лишь следовые количества моносахаров, что может говорить как о большом количестве балластных соединений в данной фракции, так и о незначительном накоплении данной группы БАВ в этом виде сырья. Во

фракциях ПВ и ВРПС всех ботанических форм наблюдается присутствие ксилозы, арабинозы и галактозы, причем, исходя из интенсивности пятен, можно сказать, что арабиноза и галактоза являются преобладающими сахарами почти во всех образцах. Наиболее разнообразным мономерным составом характеризуется фракция ВРПС корнеплодов сельдерея, где помимо вышеупомянутых компонентов присутствуют глюкоза и фруктоза. В некоторых фракциях ВРПС и ПВ наблюдались следовые количества рамнозы.

ИК-спектры очищенных полисахаридных фракций сырья сельдерея представлены на рисунках 14-16. В таблице 23 отражена интерпретация полученных ИК-спектров, которую осуществляли с использованием справочной [125-127] и научной [128] литературы.



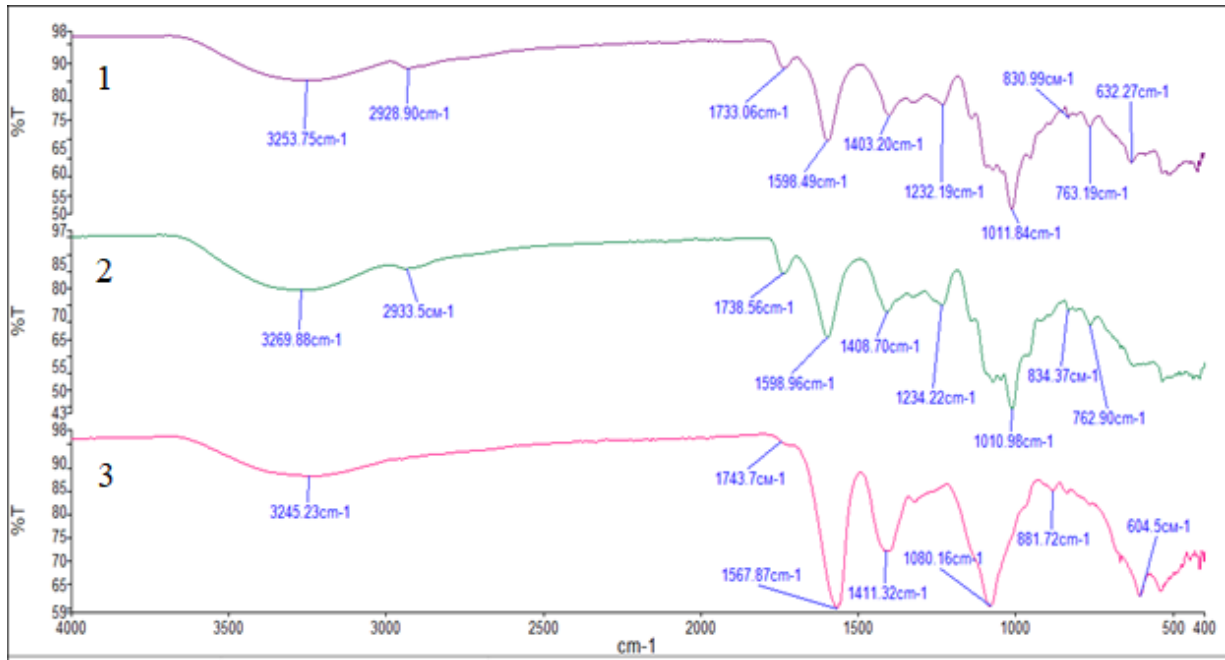


Рисунок 14 – ИК-спектры ВРПС корнеплодов (1), черешков (2) и листьев (3)

сельдерея пахучего

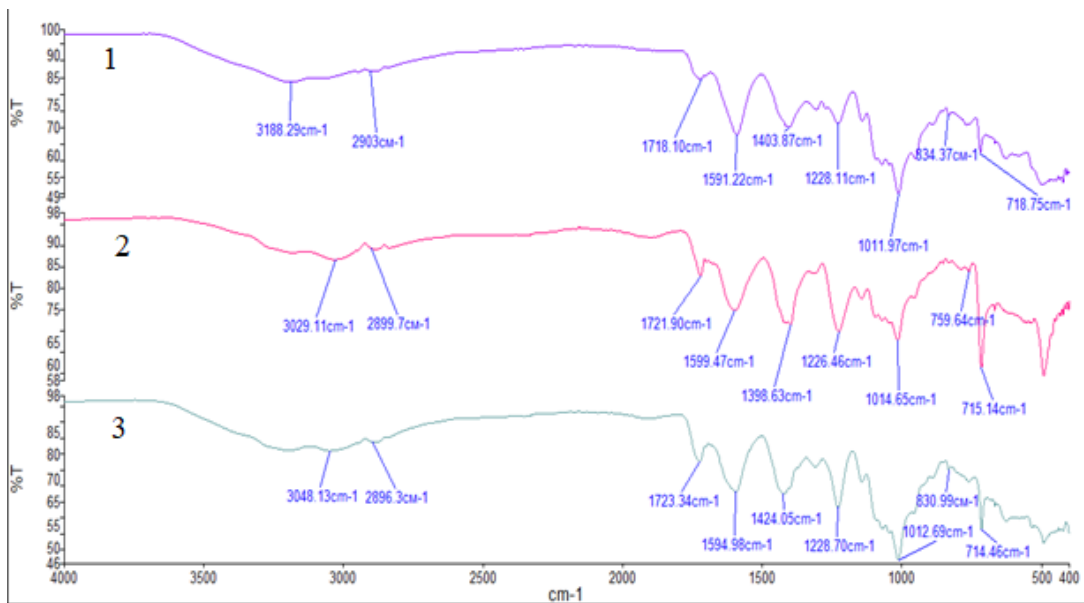


Рисунок 15 – ИК-спектры ПВ корнеплодов (1), черешков (2) и листьев (3) сельдерея пахучего

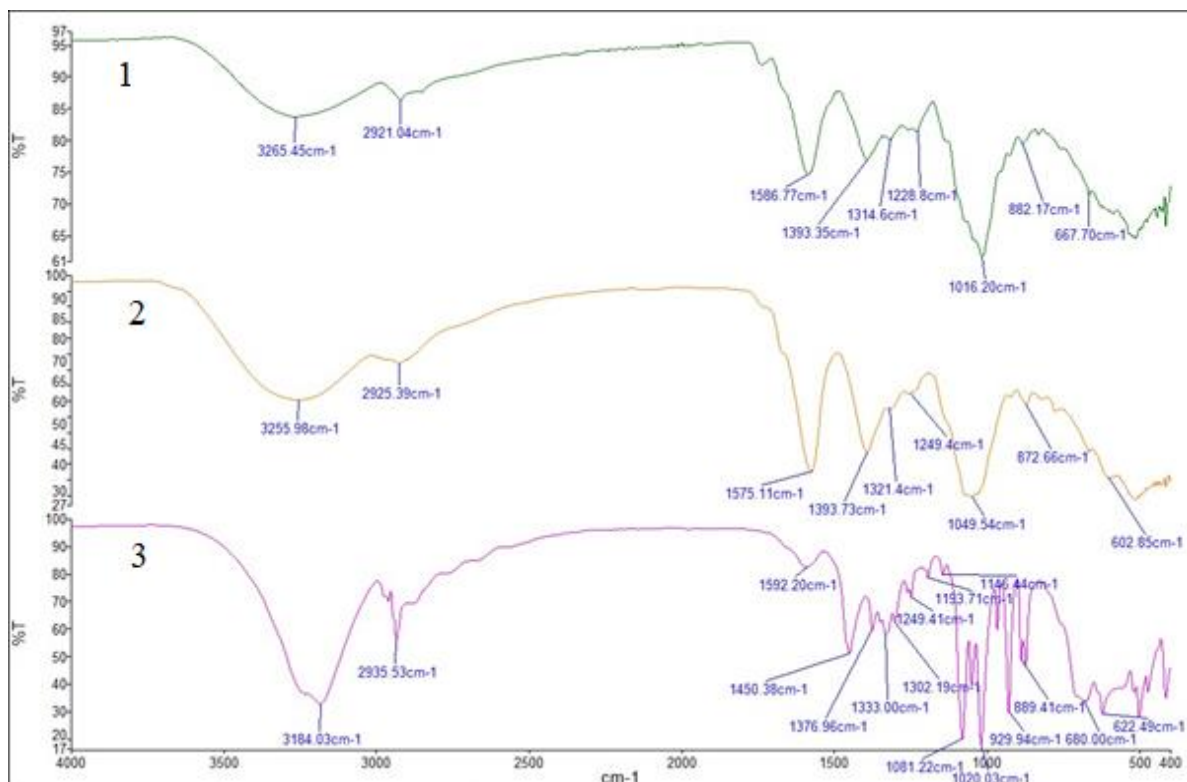


Рисунок 16 – ИК-спектры ВРПС корнеплодов (1), черешков (2) и листьев (3)

сельдерея пахучего

Идентификация полос поглощения в диапазоне от 4000 до 1500  $\text{cm}^{-1}$  показала наличие характерных валентных колебаний связи гидроксильных групп О-Н (3650-3200  $\text{cm}^{-1}$ ), асимметричные (2962 – 2926  $\text{cm}^{-1}$ ) и симметричные С-Н (2872 – 2853  $\text{cm}^{-1}$ ) [125]. При 1740-1700  $\text{cm}^{-1}$  обнаружены валентные колебания, характерные для С=О в карбоксильной группе – симметричные (1789-1740  $\text{cm}^{-1}$ ) и асимметричные (1730-1690  $\text{cm}^{-1}$ ) – предельных алифатических кислот [126]. Валентные колебания свободной карбоксильной группы СОО- имеют характерное для всех видов полисахаридов поглощение при 1610-1550  $\text{cm}^{-1}$  [126]. Колебания при ~1400  $\text{cm}^{-1}$  относятся к деформационным колебаниям С-Н группы [125]. Деформационные колебания С-О карбоксильной группы наблюдаются при ~1250  $\text{cm}^{-1}$  [125]. Далее полоса поглощения при ~1010  $\text{cm}^{-1}$  сочетает в себе несколько групп колебаний за счет наложения, некоторые из которых удалось идентифицировать как валентные колебания С-О-С пиранозного цикла (1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ ). В области отпечатков пальцев удалось обнаружить колебания  $\alpha$ - и  $\beta$ -конфигураций гликозидной связи (865-820  $\text{cm}^{-1}$  и 920-870  $\text{cm}^{-1}$  соответственно) [127-128], а также характерную полосу поглощения в ВРПС и ПВ – С1- $\alpha$ -конформация галактуроновой кислоты (763-760  $\text{cm}^{-1}$ ) [126].

Как видно из полученных результатов, в качестве наиболее перспективных фракций полисахаридов для дальнейшего исследования целесообразно выбрать ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея в связи с их наибольшим выходом относительно других фракций. Кроме того, данные фракции имеют достаточно разнообразный мономерный состав, в котором, исходя из интенсивности пятен, преобладают галактоза и арабиноза.

Таблица 23 – Интерпретация ИК-спектров ВРПС, ПВ и СРПС ботанических форм сельдерея пахучего

Типы колебаний	Диапазон частот, см <sup>-1</sup>	Значения волновых чисел ВРПС, см <sup>-1</sup>			Значения волновых чисел ПВ, см <sup>-1</sup>			Значения волновых чисел СРПС, см <sup>-1</sup>		
		Корневая	Черешковая	Листовая	Корневая	Черешковая	Листовая	Корневая	Черешковая	Листовая
$\nu$ (О-Н) спиртовые связанные и свободные	3650-3200 [125]	3254	3270	3245	3168	3170	3196	3265	3256	3184
$\nu_{as}$ (С-Н) $\nu_s$ (С-Н)	2962-2926 2872-2853 [125]	2929	2934	-	2903	2899	2896	2921	2925	2935
$\nu_s$ (С=О) в СООН $\nu_{as}$ (С=О) в СООН	1789-1740 1730-1690 [126]	1733	1739	-	1718	1722	1723	-	-	-
$\nu$ (СОО-) свободной группы	1610-1550 [126]	1598	1599	1568	1591	1599	1595	1587	1575	1592
$\delta_{as}$ (С-Н) $\delta_s$ (С-Н)	1485-1430 1380-1340 [125]	1403	1409	1411	1404	1404	1399	1393	1394	1450
$\delta$ (С-О) в СООН	~1250 [125]	1232	1234	-	1228	1226	1229	1229	1249	1249
$\nu$ (С-О-С) пиранозного цикла	1200-1000 [127]	1012	1011	1080	1012	1015	1012	1016	1049	1020
$\delta$ ( $\beta$ -конфигурация гликозидной связи)	920-870 [127]	-	-	882	-	-	-	882	873	889
$\delta$ ( $\alpha$ -конфигурация гликозидной связи)	865-820 [128]	831	834	-	834	-	831	-	-	-
С1- $\alpha$ -конформация галактуроновой кислоты	763-760 [126]	763	763	760	-	-	-	-	-	-

### 3.3.4. Анализ молекулярно-массового распределения ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея

Для целевого изучения структуры выбранных полисахаридных фракций проводили оценку молекулярно-массового распределения (ММР). Калибровочная зависимость пуллуланов представлена на рисунке 17. Как видно из данного рисунка, зависимость папуланов линейна, значение R составляет более 0,99, следовательно, система пригодна.

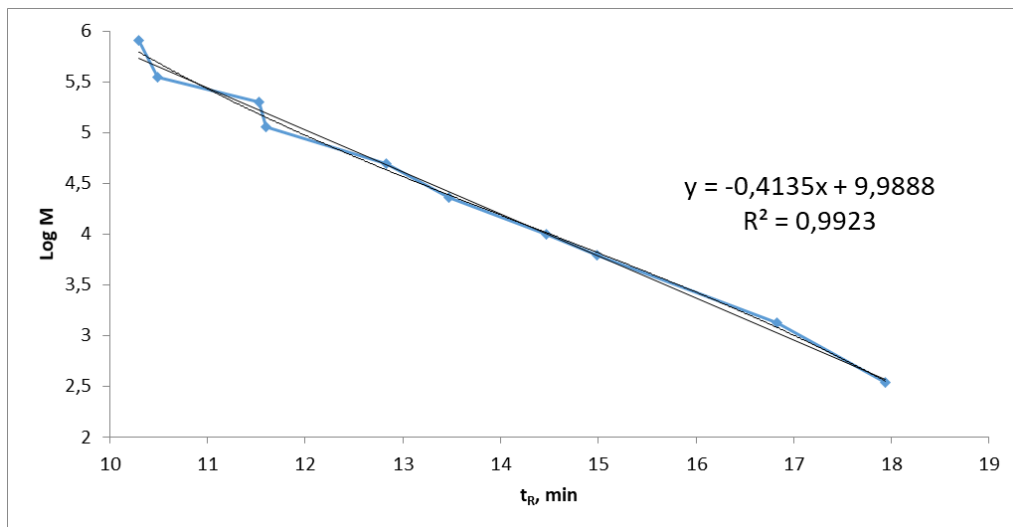


Рисунок 17 – Калибровочная зависимость пуллуланов 1,1-466 кДа

Результаты оценки молекулярно-массового распределения ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея представлены на рисунке 18 и в таблице 24.

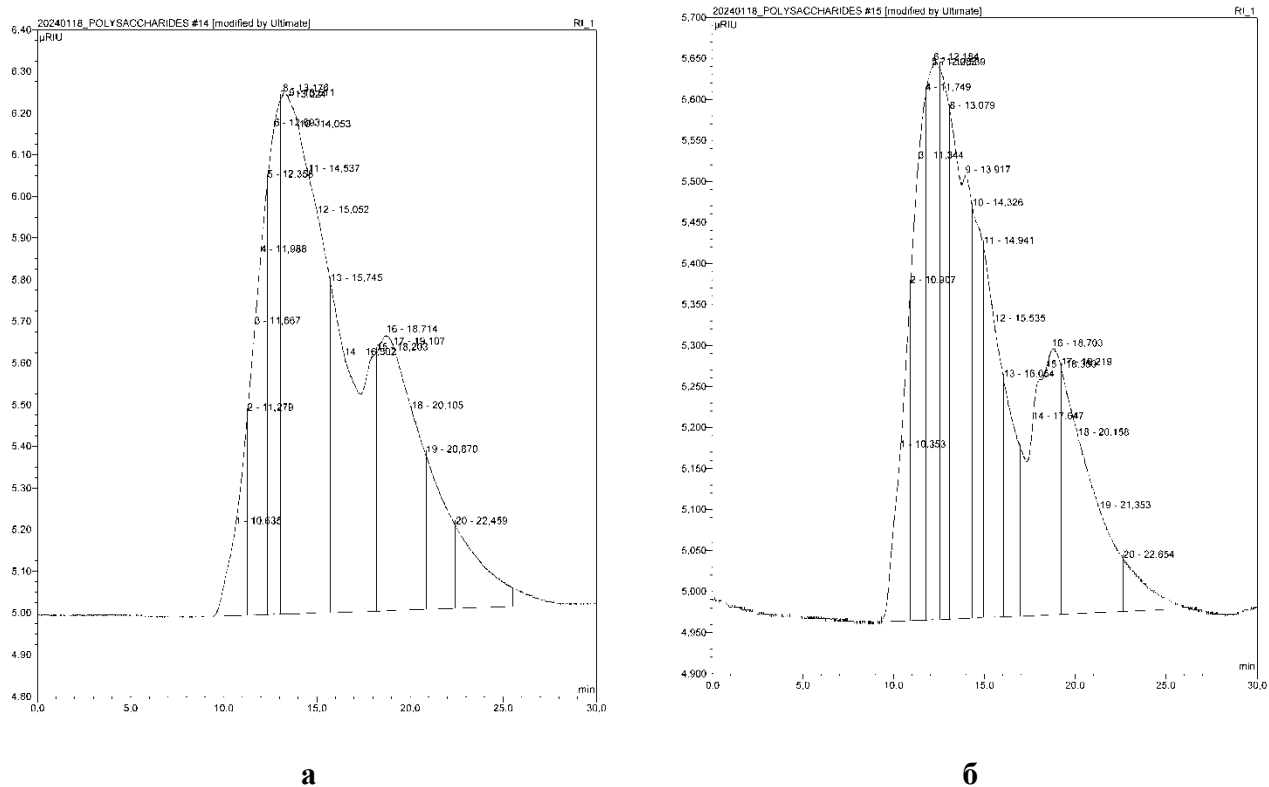


Рисунок 18 – Хроматограммы ММР ВРПС (а) и ПВ (б) корнеплодов сельдерея

Таблица 24 – Результаты определения молекулярно-массовых характеристик

Образец	$M_w$	$M_n$	$p$
ВРПС	143512	31012	4,63
ПВ	216372	60260	3,59

Как видно из данных таблицы, молекулы ВРПС и ПВ являются полидисперсными (отношение среднемассовой молекулярной массы к среднечисловой более 1). По результатам анализа, общая молекулярная масса фракции ВРПС составила 1,121316 кДа, а фракции ПВ – 1,476688 кДа. Наблюдается бимодальное распределение фракций, максимально – 34000 Да. Количество звеньев в цепи образцов составляет менее 1500. В обоих образцах наблюдается большое количество фракций низкомолекулярных сахаров (моно- и олигосахаридов) – порядка 32 % во фракции ВРПС и 28 % в фракции ПВ, о чем говорит наличие пиков с временем удерживания более 18 минут. Наличие примесей моносахаров 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.

#### **3.4 Результаты анализа липофильных фракций ботанических форм сельдерея методом ГХ/МС**

Хроматограммы липофильных фракций корнеплодов, черешков и листьев сельдерея представлены на рисунках 19-20. Всего в извлечении из корнеплодов было обнаружено 50 соединений, из которых идентифицировано – 34 (68%), в черешках – 36 соединений, из которых идентифицировано 22 (61%), в листьях – 22 соединения, из которых идентифицировано – 14 (64%). Идентифицированные соединения в ботанических формах рассмотрены в приложении Б и представлены в сравнительном аспекте в таблице 25. Рисунок 22 отражает сравнительное содержание разных групп БАВ в ботанических формах сельдерея.

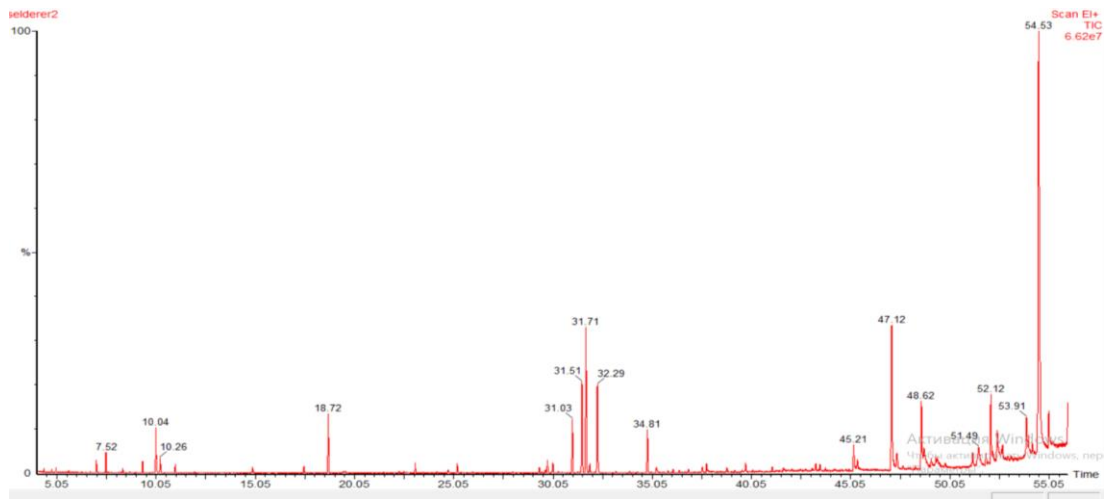


Рисунок 19 – Хроматограмма липофильной фракции черешковой ботанической формы сельдерея пахучего

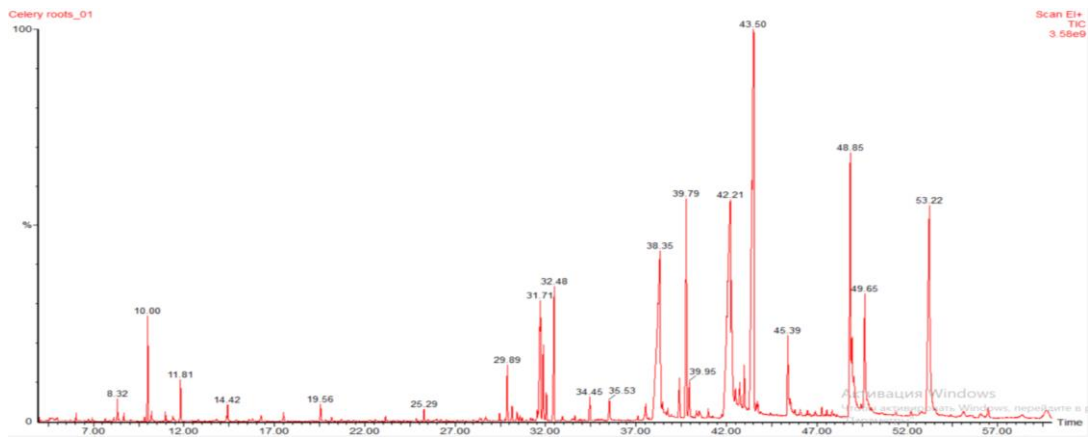


Рисунок 20– Хроматограмма липофильной фракции корневой ботанической формы сельдерея пахучего

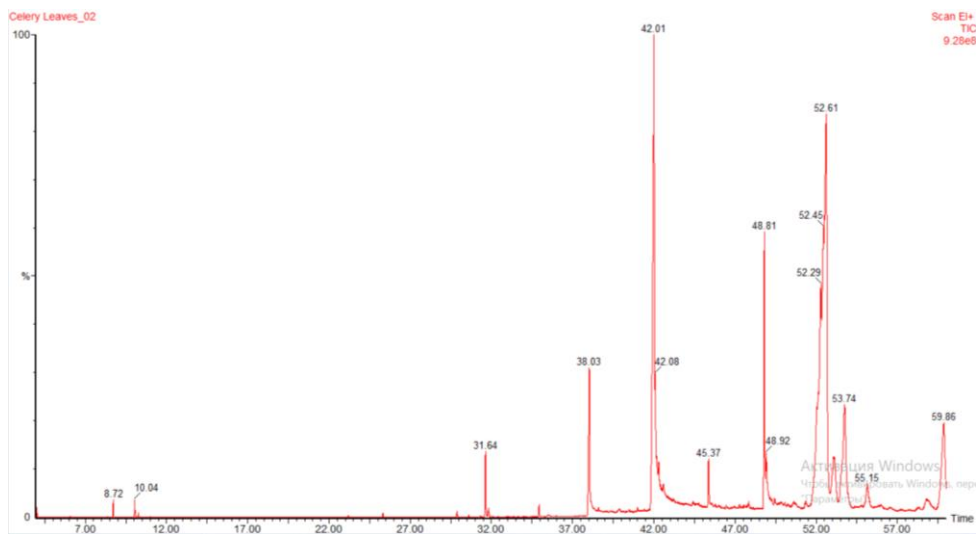


Рисунок 21 – Хроматограмма липофильной фракции листовой ботанической формы сельдерея пахучего

Таблица 25 – Характеристика компонентного (качественный и количественный) состава липофильных фракций различных ботанических форм сельдерея

Наименование идентифицированного соединения	Корнеплоды		Черешки		Листья	
	t <sub>R</sub>	%	t <sub>R</sub>	%	t <sub>R</sub>	%
<i>Терпены</i>						
α-гуйон	-	-	7,04	0,31	-	-
Камфен	-	-	7,52	0,53	-	-
2-β-пинен	8,32	0,32	-	-	-	-
β-мирцен	8,68	≤ 0,12	8,37	≤ 0,35	8,72	0,16
3-карен	-	-	9,37	0,32	-	-
D-лимонен	10,04	1,37	10,00	1,41	10,04	0,18
Транс-α-осимен	10,21	0,14	-	-	-	-
Транс-β-осимен	-	-	-	-	10,25	≤ 0,15
α-пинен	-	-	10,26	0,38	-	-
γ-терпинен	10,97	0,13	11,02	≤ 0,35	-	-
5-пентил-циклогекса-1,3-диен	14,42	0,26	-	-	-	-
Эндо-борнеол	-	-	14,9	≤ 0,35	-	-
Изоборнеола ацетат	-	-	18,72	1,94	-	-
Транс-кариофиллен	23,15	≤ 0,12	23,11	0,29	-	-
β-селинен	25,29	0,20	25,23	≤ 0,35	-	-
Фитол	-	-	34,81	1,44	-	-
Сквален	56,47	<b>2,28</b>	-	-	-	-
<i>Производные бензофурана</i>						
Гексагидро-3-бутилфталид	29,42	0,13	-	-	-	-
Бутилфталид	29,89	1,02	-	-	29,88	≤ 0,15
Бутилиденфталид	30,41	0,19	-	-	-	-
Сенкиунолид	31,71	<b>3,39</b>	31,51	<b>3,32</b>	31,64	0,88
3-изобутилиденфталид	-	-	31,71	<b>5,61</b>	-	-
Транс-седанолид	-	-	-	-	31,84	≤ 0,15
Цис-неокнидилид	-	-	32,29	<b>3,39</b>	-	-
Транс-лигустилид	32,04	0,44	-	-	-	-
Изокнидилид	32,48	<b>2,94</b>	-	-	-	-
<i>Кумарины (в т.ч. фуранокумарины)</i>						
Фикусин	34,45	0,46	-	-	-	-
Скополетин	37,55	0,49	-	-	-	-
Метоксален	39,40	0,83	-	-	-	-
Бергаптен	39,95	0,75	39,76	0,38	-	-
Изопимпинелин	-	-	43,51	≤ 0,35	-	-
<i>Жирные кислоты и их производные (спирты, эфиры)</i>						
n-пентадекановая кислота	35,53	3,31	-	-	-	-
Пальмитиновая кислота	38,35	11,04	37,79	0,38	38,03	3,31
Фалькаринол	39,79	4,26	-	-	-	-
Линолевая кислота	42,21	12,28	-	-	42,01	18,87
Стеариновая кислота	42,74	0,54	-	-	-	-
Панксидол	43,39	15,86	-	-	-	-
Глицеридил пальмитат	43,50	1,79	-	-	45,37	0,83
Гександиовой кислоты моно(2-этилгексилловый) эфир	-	-	47,12	6,42	-	-
Этиллеолнат	-	-	-	-	48,81	4,37

Метиллеоленат	-	-	-	-	48,92	1,96
Пальмитин, 2-моно	49,65	3,41	-	-	-	-
Линолеин, 2-моно	53,22	9,92	-	-	-	-
<i>Фитостеролы</i>						
Стигмастерол	-	-	54,53	<b>28,95</b>	53,08	<b>2,60</b>
Изофусостерол	-	-	-	-	53,74	<b>6,94</b>
<i>Витамины</i>						
Токоферол	-	-	51,49	1,92	-	-

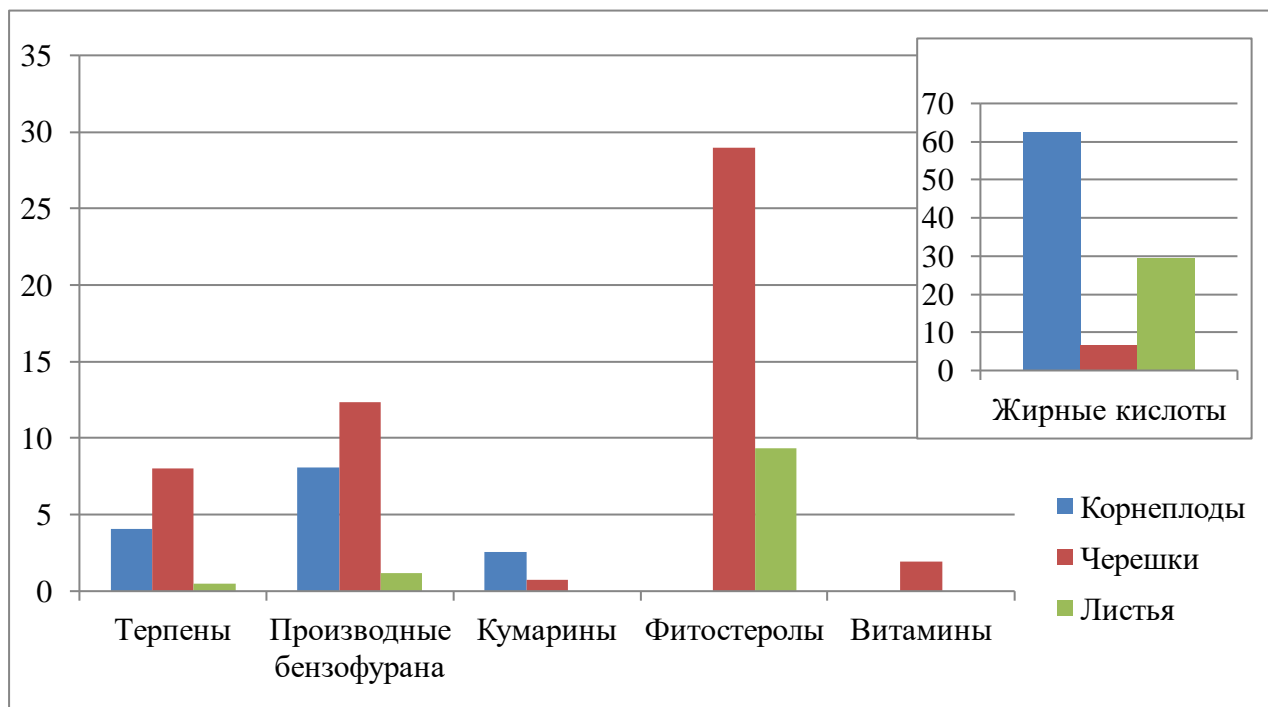


Рисунок 22 - Сравнительное содержание групп БАВ (%) в липофильных фракциях ботанических форм сельдерея пахучего

Как видно из представленных выше данных, наибольшим накоплением липофильных соединений характеризуется корневая ботаническая форма сельдерея. При этом корнеплоды содержат большее разнообразие кумаринов и производных бензофурана относительно других ботанических форм. Однако если в случае кумаринов их накопление превалирует в корнеплодах, то наибольшая концентрация бензофуранов наблюдается у черешковой ботанической формы, хоть их качественный состав и меньше, чем у корневой. Обе ботанические формы демонстрируют широкий профиль терпенов, но в данном случае и качественные и количественные характеристики данной группы БАВ превалируют в черешках. Накопление терпенов и производных бензофурана в листьях сельдерея наблюдается значительно меньше, чем в других ботанических формах, а кумарины не были обнаружены вовсе.

Соединения стероидной природы присутствуют преимущественно в надземных частях растения, причем их концентрация достаточно высокая, особенно у черешковой ботанической формы. Однако говоря о данной группе БАВ, необходимо отметить, что выбранные условия



хроматографии адаптированы для низкомолекулярных терпеновых соединений у пиков которых наблюдается высокое разрешение, поэтому на хроматограмме пики, соответствующие фитостеролам, выходят в конце времени записи хроматограммы (далее 50-й минуты) и плохо разделяются между собой, что приводит к затруднению расшифровки интегрирования и последующей достоверной интерпретации данных.

Во всех разновидностях сельдерея наблюдалось высокое накопление жирных кислот и их производных. При этом, максимальное содержание данных групп БАВ наблюдается у корнеплодов сельдерея, что обуславливается накопительной функцией данного морфологического органа.

Следовательно, разные ботанические формы сельдерея характеризуются разным липофильным профилем. Так, для корнеплодов сельдерея в качестве маркерных соединений можно выделить сквален (2,28%), сенкиунолид (3,39%) и изокнидилид (2,94%), для черешков – стигмастерол (28,95%), 3-изобутилиденфталид (5,61%), сенкиунолид (3,32%) и транс-седанолид (3,39%), для листьев – изофусостерол (6,94) и стигмастерол (2,60%). Таким образом, можно говорить о том, что разные ботанические формы сельдерея пахучего практически не имеют общих маркерных соединений. Это позволяет позиционировать ботанические виды растения как разное сырье, имеющие различный химический состав и, как следствие, различные фармакологические свойства.

Исходя из результатов исследования, в качестве наиболее перспективного объекта для выделения липофильной фракции может быть предложена черешковая ботаническая форма сельдерея пахучего, т.к. именно она накапливает в сравнительном соотношении наибольшее число БАВ, которые могут быть использованы в медицинских целях – фитостеролов, фталидов и терпенов. Кроме того, надземная ботаническая форма также имеет в своем составе значительное количество хлорофиллов, которые также могут проявлять фармакологическую активность.

### **3.5. Результаты анализа производных бутилфталида в черешковой ботанической форме сельдерея пахучего**

На рисунках представлены хроматограммы СО сенкиунолида А (рисунок 23) и липофильной фракции сельдерея черешкового (рисунок 24)

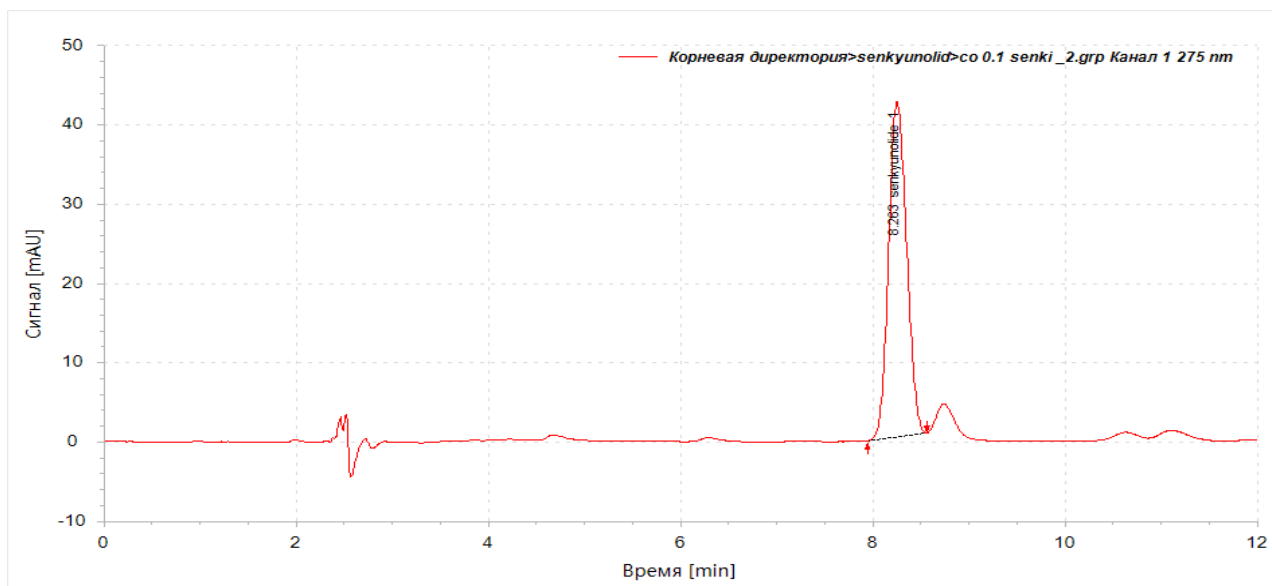


Рисунок 23 – Хроматограмма СО сенкиунолида А

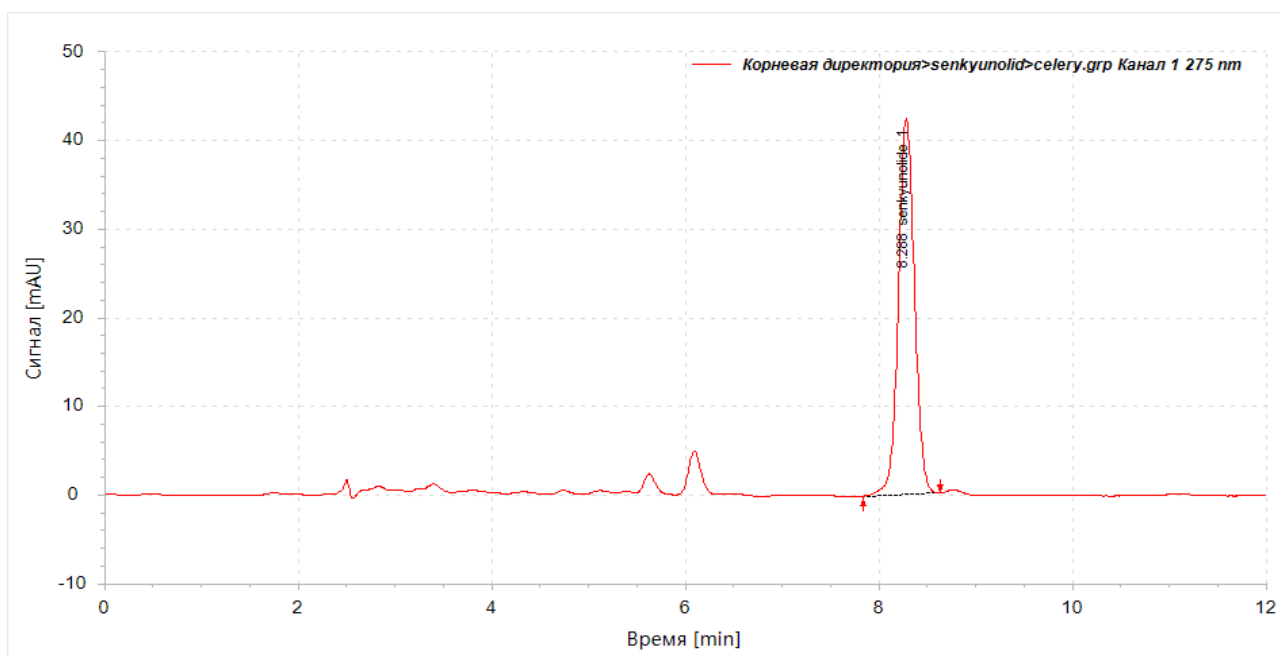


Рисунок 24 – Хроматограмма липофильной фракции сельдерея черешкового

Согласно результатам оценки пригодности хроматографической системы, фактор асимметрии пика  $A_s$  составил 1,1, а величины  $RSD (S)$  и  $RSD (t_R)$  – 0,51 % и 0,09 %, соответственно. Эффективность колонки - 8500 теоретических тарелок ( $N$ ). Следовательно, хроматографическая система пригодна и может быть использована при качественном и количественном анализе сенкиунолида А. Модернизация (увеличение концентрации метанола до 70%) состава подвижной фазы методики, взятой из литературы, позволила сократить время записи хроматограммы и тем самым сделать ее более экспрессной. Кроме того, использование изократического режима элюирования позволяет сократить нагрузку насосов, что благоприятно сказывается на их сроке эксплуатации.

Как видно из данных хроматограмм, сенкиунолид А может быть идентифицирован в липофильной фракции сельдерея черешкового исходя из времен удерживания пиков, а так же путем сравнения УФ-спектров веществ в стандартном и испытуемом растворах. Количественное содержание сенкиунолида А во фракции составило  $(0,0961 \pm 0,0002)$  мг/мл, что говорит о значительном накоплении веществ класса фталидов в исследуемом растительном сырье и позволяет сформировать дальнейший вектор исследования касательно разработки мягкой лекарственной формы на основе липофильной фракции сельдерея пахучего с направленной фармакологической активностью, характерной для класса фталидов.

### Выводы к главе 3

1. По результатам фитохимического скрининга фенольного профиля разновидностей сельдерея пахучего методами ВЭТСХ и УФ-спектрофотометрии, можно сделать вывод о том, что среди корневой, черешковой и листовой форм сырья последняя накапливает наибольшее количество анализируемых соединений (в том числе гидроксикоричных кислот, и флавоноидов), что делает ее объектом выбора в качестве источника данной группы БАВ. При этом важно отметить, что на треках извлечений из разных сортов сельдерея листового наблюдается различное количество пятен с разной интенсивностью, что говорит о необходимости оценки сортовых преимуществ, для выбора наиболее перспективного сорта. Среди оцененных сортов, наиболее перспективными являются Нежный и Захар которые накапливают  $2,0 \pm 0,2$  % и  $1,4 \pm 0,1$  % флавоноидов (в пересчете на апигенин) соответственно.

2. По результатам оценки минерального состава ботанических форм и сортов *Arium graveolens* L. было обнаружено 12 макро- и микроэлементов. Из макроэлементов накопление кальция превалирует в листьях (27 мг на 1 кг), а накопление магния максимально в черешках и листьях сельдерея (от 2,5 до 3 г/кг). Наибольшим содержанием калия отличаются корнеплоды. Мажоритарными микроэлементами сельдерея являются железо, цинк и стронций, накопление которых отличается в разных формах и сортах растения. Наибольшим накоплением мажоритарных элементов (кальция, цинка, магния, железа) характеризуется сельдерей листовой сорта «Нежный», что делает его объектом выбора в диетическом питании и в качестве источника получения биологически активных добавок. Помимо этого, значительное содержание кальция в данном сорте растения (около 25 г/кг) позволяет отнести его к биологическому индикатору кальциево-стронциевых почв, а также позиционировать как источник минеральной БАД.

3. По результатам выделения, очистки и анализа полисахаридных фракций методом гравиметрической оценки показано, что наибольшим выходом характеризуется ВРПС ( $8,18 \pm 0,68$  % после очистки) и ПВ корнеплодов сельдерея ( $3,38 \pm 0,80$  % после очистки). Оценка наличия примесей низкомолекулярных соединений методом УФ-спектрофотометрии показала отсутствие характерных для фенольных соединений и хлорофиллов максимумов поглощения во

всех очищенных фракциях (кроме СРПС листьев). Примесь азотсодержащих соединений была определена методом Кьельдаля до и после очистки фракций и показала наличие азотсодержащих соединений даже после очистки. Однако важно отметить, что очистка фракций методом Севага приводила к значительным изменениям в органолептических свойствах полисахаридов и может быть рекомендована для очистки полисахаридов.

Методом ВЭТСХ установлено, что мажоритарными мономерами в гидролизатах фракций ПВ и ВРПС являются арабиноза и галактоза. Фракции СРПС также демонстрируют схожий и весьма непоказательный состав (глюкоза, фруктоза, арабиноза). Анализ ИК-спектроскопии позволил сделать некоторые выводы относительно структуры соединений: наличие колебаний, характерных для карбоксильной группы, циклов моносахаров, характеристики гликозидной связи. Таким образом, сельдерей пахучий является перспективным источником полисахаридов. В качестве оптимальных фракций для дальнейшего изучения могут быть рекомендованы ВРПС и ПВ корнеплодов, что обусловлено значительным выходом фракций, пониженным содержанием в них примесей низкомолекулярных соединений, а также ввиду структурных особенностей молекул, включая наличие уроновых кислот и преобладания в составе молекул галактозы и арабинозы.

4. Хлороформные извлечения, представляющие собой липофильную фракцию, выделенные из трех ботанических форм сельдерея пахучего – корневого, черешкового и листового – были проанализированы методом ГХ/МС. На хроматограммах наблюдалось наличие пиков около 50 соединений в корнеплодах, 36 и 22 в черешках и листьях соответственно. С использованием библиотеки масс-спектров NIST-14 было идентифицировано более 60 % веществ, относящихся к классам терпенов, производных бензофурана, жирных кислот, кумаринов, фитостеролов и витаминов. В качестве оптимального источника липофильных соединений можно предложить черешковую ботаническую форму сельдерея пахучего, содержащую наибольшее количество групп БАВ, перспективных для медицинского применения.

5. Методом ВЭЖХ было определено количественное содержание сенкиунолида А в хлороформном извлечении сельдерея черешкового, которое составило  $2,20 \pm 0,01$  мг/мл, что говорит о перспективности использования сырья сельдерея в качестве источника данного соединения. Сенкиунолид А, представитель группы фталидов, является одним из мажоритарных соединений сельдерея пахучего и обладает широким спектром биологической активности, включая антиэкземное и антисеборейное действие. Это создает предпосылки для разработки формы для наружного применения, в которых сенкиунолид А будет выбран в качестве маркера для стандартизации.

## ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СЫРЬЯ *APIUM GRAVEOLENS L.*

### 4.1. Разработка и валидация методики количественного определения хлорогеновой кислоты в сортах сельдерея листового

В основу разработки положены методики анализа флавоноидов и фенольных кислот (Глава 1, таблица 7), приведенные в литературе, где в качестве подвижной фазы преимущественно используют растворы кислот в градиентном режиме элюирования с 10-50% ацетонитрила в течении 30-60 минут [111-112]. Тем не менее, уникальность состава растительного сырья требует подбора индивидуальных условий анализа применительно к конкретному объекту. Кроме того, целесообразно разрабатывать методики, которые характеризуются экспрессностью и ресурсосбережением, что позволит использовать их в рутинных испытаниях для большого числа повторяющихся образцов. Таким образом, адаптировав и доработав методики анализа, приведенные в литературе, нами были предложены оптимальные хроматографические условия для количественного определения хлорогеновой кислоты, которые были апробированы на сырье сельдерея листового (таблица 26). В качестве подвижной фазы была использована 0,03 % ТФУ [112], поскольку данный растворитель обладает достаточной разделительной способностью, а низкая концентрация кислоты снижает негативное воздействие на узлы прибора. Режим элюирования включает достаточно быструю смену соотношения ПФ с целью уменьшения времени анализа.

Таблица 26 – Условия скринингового анализа хлорогеновой кислоты в сельдерее листовом

Пробоподготовка сырья	Около 1 г (точная навеска) высушенного и измельченного сырья сельдерея листового экстрагировали на УЗ-бане 70% этанолом (1:10) 30 минут, извлечение фильтровали в мерную колбу на 10 мл и доводили до метки тем же растворителем. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу на 10 мл и доводили до метки водой деионизированной	
СО	Раствор хлорогеновой кислоты (0,00214 мг/мл)	
Хроматограф	Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония)	
Детектор	диодно-матричный	
Колонка	Intersil 5 µm ODS-3 100 Å 250*4.6 m	
Длина волны детекции	270 нм	
Скорость потока	1 мл/мин	
Температура	40 °С	
Состав ПФ и режим элюирования	элюент А – ацетонитрил	Элюент Б – ТФУ 0,03%
0-5 мин.	15%	85%

5-10 мин.	30%	70%
10-15 мин.	50%	50%

Хроматограммы извлечений сельдерея листового (сорт «Захар») и хроматограмма СО хлорогеновой кислоты представлены на рисунках 25 и 26.

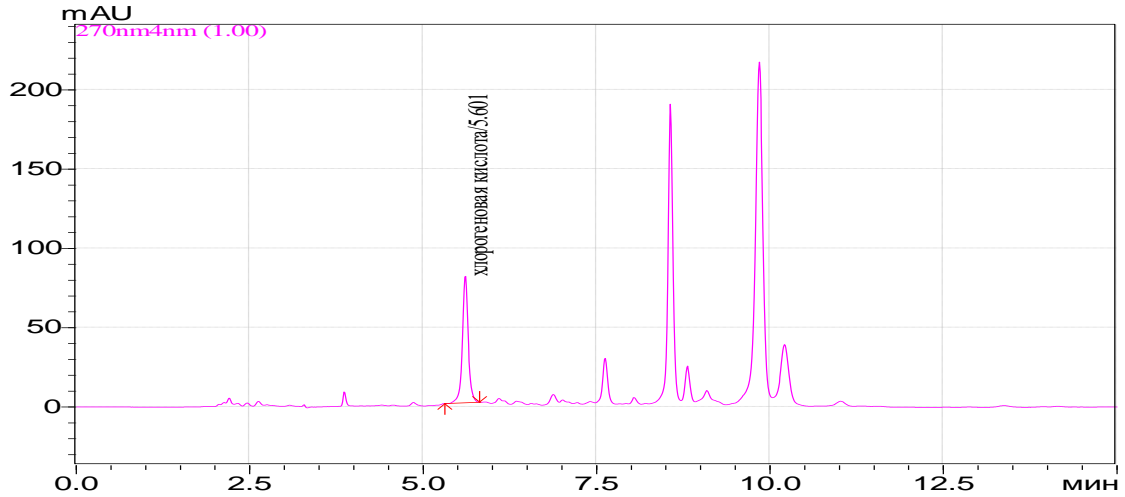


Рисунок 25 – Хроматограмма спиртового извлечения сельдерея листового (сорт «Захар»), полученная в условиях ацетонитрил (ПФ А), 0,03 % ТФУ (ПФ Б): 0 мин. 15% А, 10 мин. 30% А, 15 мин. 50% А

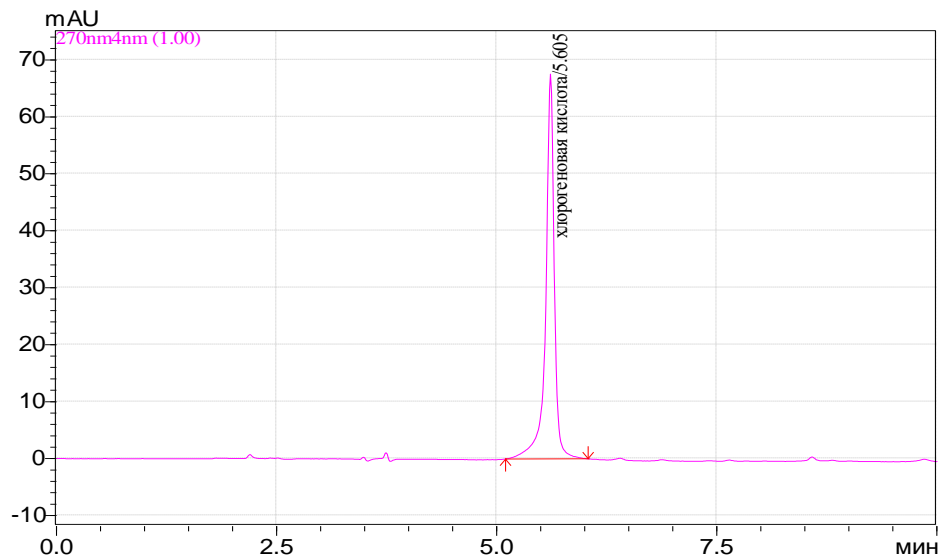


Рисунок 26 – Хроматограмма СО хлорогеновой кислоты (0,00214 мг/мл)

Выбранные хроматографические условия, представленные достаточно резким градиентом, были взяты с целью экспрессной оценки количества пиков мажоритарных веществ и времени их выхода. Как видно на хроматограмме, пик хлорогеновой кислоты выходит с временем удерживания около 6 мин с высоким разрешением от других пиков ( $R_s \geq 5,0$ ), что позволяет использовать предложенные условия для персонафицированного количественного анализа данного вещества. Тем не менее, группа пиков в диапазоне от 8 до 11 минут характеризуется плохим разрешением, что негативно сказывается на полноте оценки фенольного

профиля сортов сельдерея листового. В связи с чем, были использованы разные режимы элюирования, варьирующие состав элюента А от 10 до 40% в различных потоках градиента.

В ходе подбора условий, был выбран оптимальный режим элюирования: 0 мин - 12% ПФ Б, 20 мин - 30% ПФ Б, 23 мин - 12% ПФ Б. Кроме того были внесены следующие изменения: длина волны детекции была изменена на 327 нм (экстремум хлорогеновой кислоты составляет 330 нм, что подтверждается данными УФ-спектрофотометрии (раздел 3.1.2.); для улучшения показателей симметричности пика концентрация ТФУ была увеличена до 0,05%.

Таким образом, была разработана следующая методика анализа:

*Подвижная фаза (ПФ) А.* 0,05% раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ).

*ПФ Б.* Ацетонитрил (HPLC grade, Fisher Chemical)

*Испытуемый раствор.* Около 250 мг (точная навеска) измельченного до размера частиц 1,0 мм сырья сельдерея помещали в плоскодонную колбу с притертой пробкой, добавляли 10 мл 70% этанола и закрывали крышкой. Сырье экстрагировали на ультразвуковой ванне «Сапфир» (Россия) в течении 30 минут при температуре 40°C, периодически перемешивая. Полученный раствор фильтровали в мерную колбу объемом 10 мл через мембранный фильтр диаметром 0,45 мкм и доводили до метки 70% этанолом. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 10 мл и доводили до метки водой деионизированной.

*Раствор стандартного образца хлорогеновой кислоты.* Около 10 мг (точная навеска) стандартного образца хлорогеновой кислоты (Sigma Aldrich) помещали в мерную колбу объемом 10 мл и растворяли в 96% этаноле. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 10 мл доводили до метки 70% этанолом (получали раствор с концентрацией 0,1 мг/мл). 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу объемом 10 мл и доводили до метки водой (получали раствор с концентрацией 0,01 мг/мл).

*Условия хроматографирования:* колонка Luna 5  $\mu\text{m}$  C 18(100) Å LC Column 250\*4.6 mm, температура термостата 40°C, длина волны детекции 327 нм. Режим элюирования: 0 мин - 12% ПФ В, 20 мин - 30% ПФ В, 23 мин - 12% ПФ Б.

*Проверка пригодности хроматографической системы:*

Эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику хлорогеновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца, должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок;

Фактор асимметрии пика ( $A_s$ ) хлорогеновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца должен быть не менее 0,8 и не более 1,5;

Относительное стандартное отклонение (RSD) значений времен удерживания ( $t_R$ ) и площадей (S) пика хлорогеновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца не более 2,0 % ( $n \geq 5$ );

Содержание хлорогеновой кислоты (%) в пересчете на абсолютно сухое сырье в сельдерее пахучем рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_x \times a_{co} \times 1 \times 10 \times 10 \times 10 \times P \times 100}{S_{co} \times a \times 10 \times 10 \times 1 \times 1 \times (100 - W)}$$

Где  $S_x$  – площадь пика хлорогеновой кислоты в испытуемом растворе;  $S_{co}$  – площадь пика хлорогеновой кислоты в растворе стандартного образца;  $a$  – масса навески ЛРС сельдерея, мг;  $a_{co}$  – масса навески стандартного образца хлорогеновой кислоты, мг;  $P$  – содержание хлорогеновой кислоты в СО, %;  $W$  – влажность сырья, %.

Подобранные условия были использованы для проведения валидационных испытаний, результаты которых представлены в виде валидационного отчета в Приложении В. Было показано, 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 методика обеспечивает требуемую линейность, правильность и прецизионность составляет от 0,001 мг/мл до 0,025 мг/мл. Методика способна давать достоверные и воспроизводимые результаты и пригодна для решения поставленной задачи.

#### 4.2. Оценка сортовых преимуществ листовой ботанической формы сельдерея пахучего по содержанию хлорогеновой кислоты

Результаты оценки сортовых преимуществ листовой формы сельдерея пахучего по содержанию хлорогеновой кислоты представлены в таблице 27. Хроматограммы испытуемых растворов приведены на примере сорта «Нежный» различного произрастания (рисунки 27-28). На рисунке 29 приведены сравнительные диаграммы содержания хлорогеновой кислоты в различных сортах сельдерея пахучего (листовая форма).

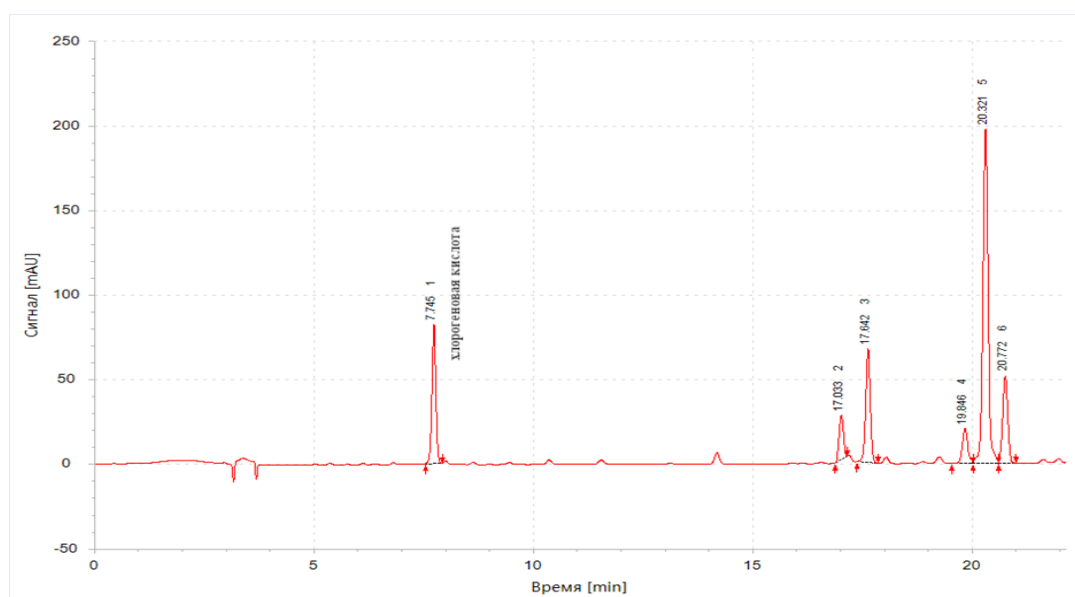


Рисунок 27 – Хроматограмма испытуемого раствора извлечения сельдерея листового сорта «Нежный» (место заготовки - СНТ Ручей)



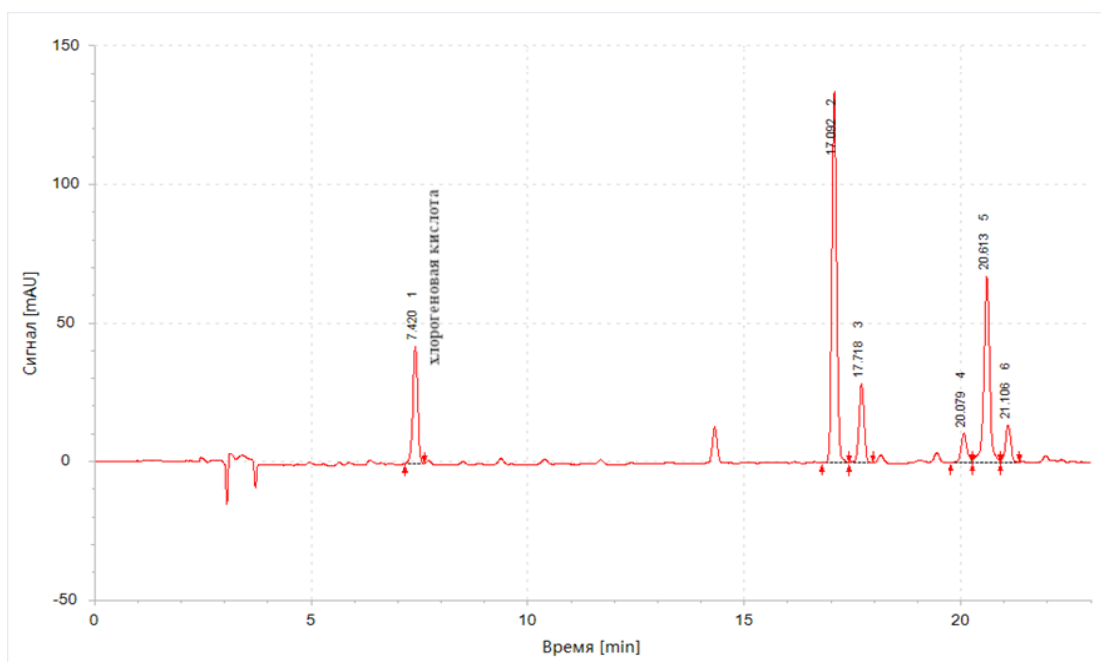


Рисунок 28 – Хроматограмма испытуемого раствора извлечения сельдерея листового сорта «Нежный» (место заготовки - пос. Лемболово)

Таблица 27 – 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

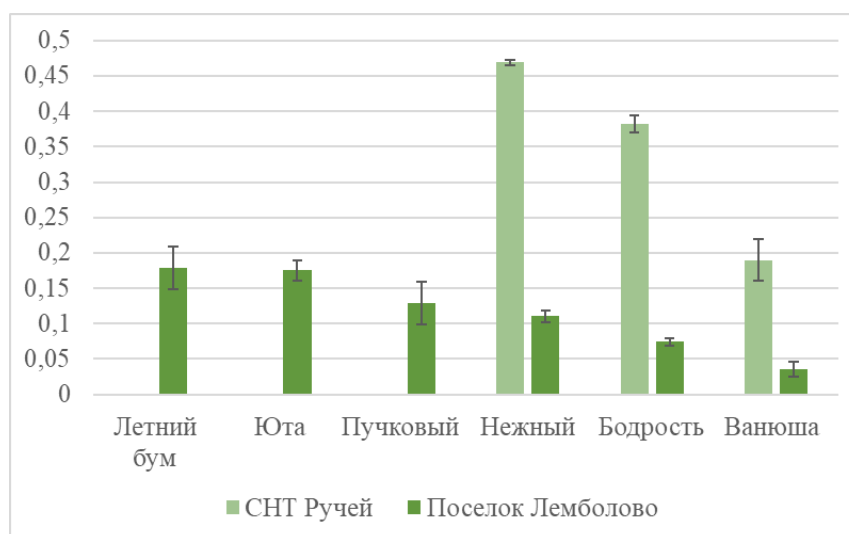
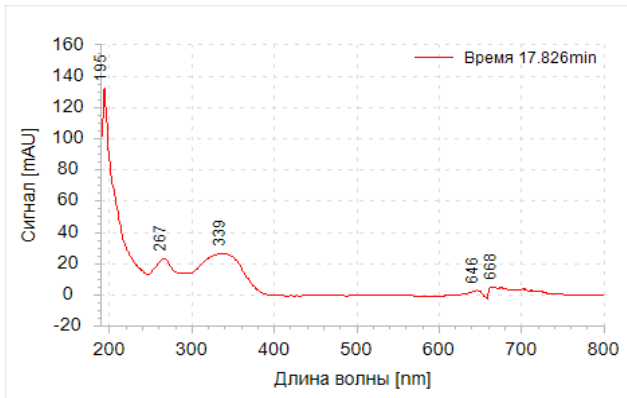


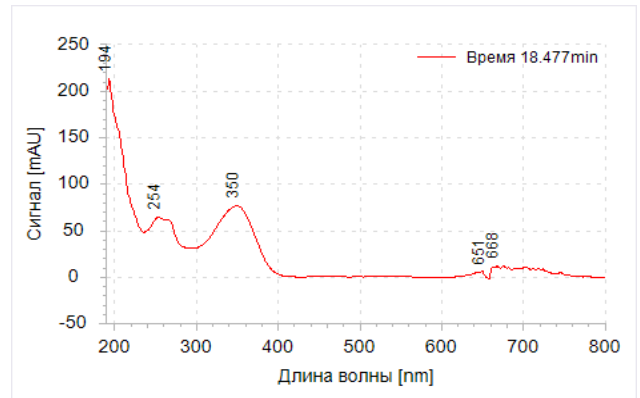
Рисунок 29 – Содержание хлорогеновой кислоты в разных сортах сельдерея листового (выращенного в пос. Лемолово и СНТ «Ручей»).

Как видно из представленных данных, разные сорта сельдерея листового накапливают различное количество хлорогеновой кислоты, произрастая в одинаковых условиях. Причем, зависимость на примере сортов «Нежный», «Ванюша» и «Бодрость» сохраняется (таблица 27), не смотря на разные места возделывания. При этом важно отметить значительное расхождение в накоплении целевого БАВ для сырья, выращенного в СНТ Ручей и поселке Лемболово. Эту разницу можно объяснить условиями культивирования: в СНТ Ручей растения подвергались необильному поливу, землю удобряли перегноем, золой, мелом не реже 1 раза в 2 недели, тогда как в поселке Лемболово растения не удобряли и подвергали обильному поливу. Таким образом, можно сделать вывод о том, что на накопление БАВ в сельдерее листовом влияют как конкретный сорт сырья, так и агротехнические условия.

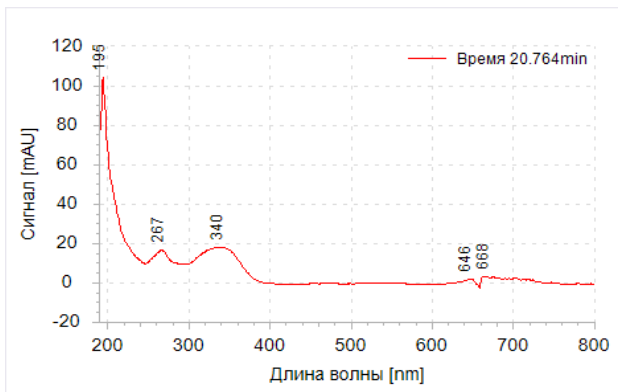
Помимо пика хлорогеновой кислоты на хроматограммах испытуемых образцов наблюдаются пики еще 5 соединений, которые, исходя из идентификации по УФ-спектрам (рисунок 30) и их интерпретации по данным литературы, относятся к гликозидам флавоноидов – предположительно производным апигенина (а, г) [132], лутеолина (б, д) [133] и кемпферола (в) [134].



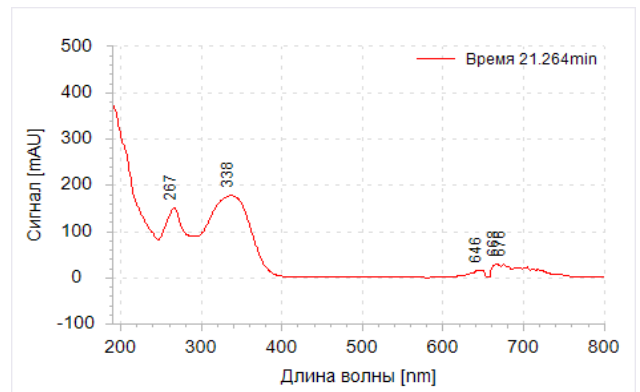
(а)



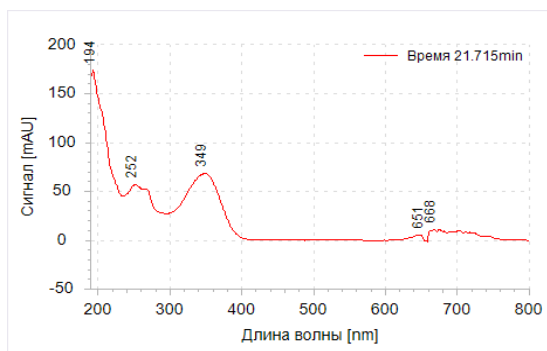
(б)



(в)



(г)



(д)

Рисунок 30 – УФ-спектры пиков соединений №2 (а - предположительно производное апигенина [132]), №3 (б – предположительно производное лютеолина [133]), №4 (в – предположительно производное кемпферола [134]), №5 (г - предположительно производное апигена [132]).

Как видно из хроматограмм представленных на рисунках 27-28, качественный состав соединений не отличается в зависимости от сорта и места произрастания. Так, наибольшие площади пиков наблюдаются у веществ №2 и №5 (предположительно, гликозидов апигенина) для всех испытуемых образцов. Пики №2, 4 и 6 также наблюдались на хроматограммах всех исследуемых растворов в разных соотношениях. Количественный состав основных веществ достаточно сильно отличался от места произрастания, а также между сортами (в 2-5 раз).

### 4.3. Подбор и верификация хроматографических условий для анализа кумаринов и фуранокумаринов в ботанических формах сельдерея листового

#### 4.3.1. Выбор условий элюирования и способа пробоподготовки сырья сельдерея

Подбор хроматографически условий осуществлялся на основе обзора данных литературы (глава 2), ряд из которых продемонстрировал возможность применения воды вместо растворов кислот в качестве ПФ [89, 133]. Применение воды вместо растворов кислот повышает экспрессность анализа за счет снижения временных затрат на промывку колонки и насосов до и после проведения испытаний, что позволяет увеличить время эксплуатации узлов прибора. Таким образом, в качестве ПФ были выбраны вода (ПФ А) и ацетонитрил (ПФ Б).

С целью снижения времени записи хроматограммы, а также снижения нагрузки на насосы, связанной с резкой сменой соотношения ПФ, проводили определение оптимального режима элюирования кумаринов. Анализируемые вещества хроматографировали в изократических и градиентных режимах элюирования по условиям, представленным в таблице 28. Для испытания вводили пробу объемом 20 мкл, скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин, температура термостата колонки 40°C, детектор диодно-матричный. Длина волны детекции была подобрана экспериментально и составила 240 нм.

Таблица 28 – Подбор условий градиентного элюирования для анализа смеси кумаринов

№	Режим элюирования
1	15 мин. 40 % ПФ Б
2	10 мин. 50 % ПФ Б
3	1-5 мин - 15-30% ПФ Б, 5-20 мин - 30-50% ПФ Б, 20-25 мин - 50% ПФ Б
4	0-10 мин. – 30-50 % ПФ Б, 10-25 мин. – 50-75 % ПФ Б
5	0-10 мин. – 30-50 % ПФ Б, 10-20 мин. – 50-75 % ПФ Б
6	0-10 мин. – 30-40 % ПФ Б, 10-15 мин. – 40-50 % ПФ Б, 15-20 мин. – 50-75 % ПФ Б
7	0-15 мин. – 40-50 % ПФ Б
8	0-10 мин. – 30-40 % ПФ Б, 10-15 мин. – 40-50 % ПФ Б, 15-20 мин. – 50-75 % ПФ Б

Исходя из факторов разрешения ( $R_s$ ) между пиками (не менее 1,5), загрузки насосов, времен удерживания веществ и времени записи хроматограммы, оптимальным режимом был выбран градиент от 40 до 50% ПФ Б в течении 15 минут (вариант № 7). Данные условия позволяют добиться разделения всех компонентов смеси, не перегружают насосы в связи с небольшой сменой соотношения ПФ, при этом времена удерживания пиков основных веществ начинаются от 4,3 минуты, что дает время для элюирования сопутствующих компонентов из растительного извлечения.

Для осуществления пробоподготовки сырья (на примере корнеплодов сельдерея, которые, исходя из ГХ/МС-скрининга, характеризуются наибольшим накоплением кумаринов) (Глава 2), использовали различные растворители (метанол, этанол 70 %, этанол 96 %) и способы экстракции (на УЗ-бане при температуре 40° С, на кипящей водяной бане с обратным холодильником, при комнатной температуре с постоянным перемешиванием в течение 30-120 минут).

Таким образом, была разработана следующая методика анализа сырья сельдерея пахучего:

*Подвижная фаза (ПФ) А.* вода для хроматографии

*ПФ Б.* Ацетонитрил (HPLC grade, Fisher Chemical)

*Растворитель пробы:* вода : ацетонитрил (1 : 1)

*Испытуемый образец:* около 1 г (точная навеска) высушенного измельченного сырья сельдерея помещали в круглодонную колбу объемом 50 мл, добавляли 10 мл 96% этанола и экстрагировали на водяной бане с обратным холодильником в течении 2 часов. Полученное извлечение фильтровали в мерную колбу номиналом 10 мл, доводили до метки растворителем пробы и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу номиналом 10 мл, доводили до метки растворителем пробы, перемешивали и фильтровали через фильтр диаметром 0,45 мкм.

*Стандартный раствор:* смесь СО скополетина (0,0005 мг/мл), псоралена (0,0005 мг/мл), метоксалена (0,0003 мг/мл) и бергаптена (0,001 мг/мл).

*Условия хроматографирования:* колонка Luna 5 µm C 18(100) Å LC Column 250\*4.6 mm, температура термостата 40° С, длина волны детекции 240 нм. Режим элюирования: 0 мин-15 мин – 40- 50 % ПФ Б.

*Проверка пригодности хроматографической системы:*

- На хроматограмме смеси СО: эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пикам СО скополетина, псоралена, метоксалена и бергаптена не менее 5000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии (As) пиков СО скополетина, псоралена, метоксалена и бергаптена не менее 0,8 и не более 1,5;
- относительное стандартное отклонение значений времени удерживания и площади пиков СО скополетина, псоралена, метоксалена и бергаптена 2 % ( $n \geq 5$ );
- Разрешение (Rs) между всеми пиками СО составляет более 1,5

Содержание определенного кумарина (%) в пересчете на абсолютно сухое сырье в сельдерее пахучем рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_x \times C_{CO} \times 10 \times 10 \times P \times 100}{S_{CO} \times a \times 1 \times (100 - W)},$$

где  $S_x$  – площадь пика определенного кумарина в испытуемом растворе;  $S_{CO}$  – площадь пика определенного кумарина в растворе смеси СО;  $a$  – масса навески ЛРС, мг;  $C_{CO}$  – концентрация СО определенного кумарина, мг/мл;  $P$  – содержание определенного кумарина в СО, %;  $W$  – влажность сырья, %.

#### **4.3.2. Результаты верификации методики анализа содержания кумаринов и фуранокумаринов в ботанических формах сельдерея пахучего**

Для подтверждения того, что предложенные условия пригодны для количественного определения скополетина, псоралена, метоксалена и бергаптена в ЛРС при совместном присутствии была проведена проверка пригодности хроматографической системы. Хроматограмма раствора смеси СО кумаринов представлена на рисунке 31. Значения времен удерживания, площадей пиков, факторов асимметрии и эффективности представлены в таблицах 29-32.

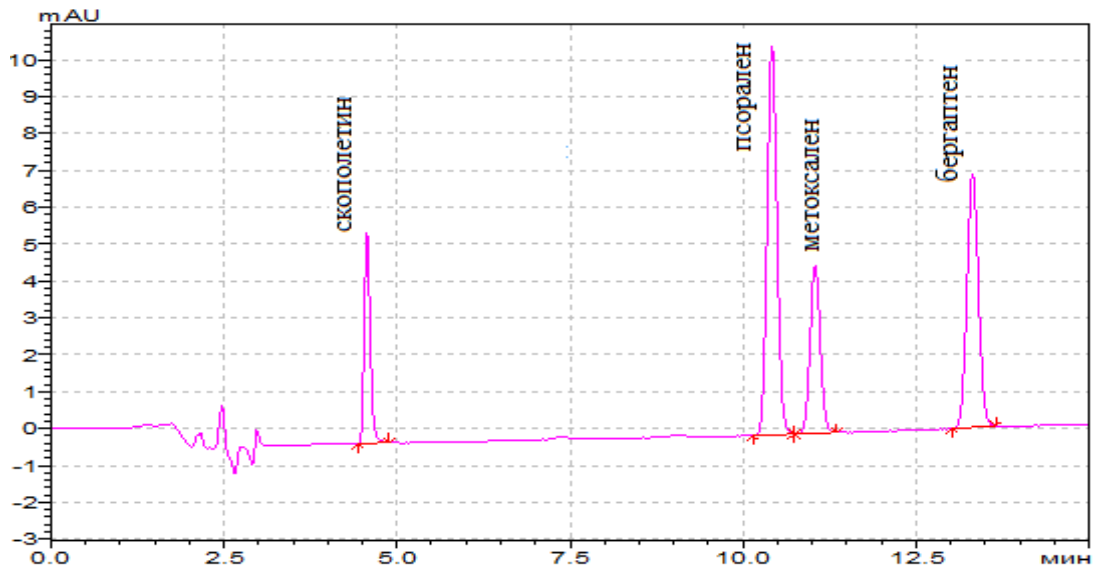


Рисунок 31 – Хроматограмма смеси СО кумаринов

Таблица 29 – Результаты хроматографирования раствора СО скополетина

Наименование кумарина	tR	S	N	As
СО скополетин - 1	4,658	35738	10764,79	1,23
СО скополетин - 2	4,56	35175	10787,51	1,24
СО скополетин - 3	4,387	34960	8657,50	1,25
СО скополетин - 4	4,56	35088	10343,13	1,25
СО скополетин - 5	4,586	34934	10699,04	1,24
<b>Среднее значение</b>	4,5502	35179	10250,39	1,24
<b>Стандартное отклонение</b>	0,08913	292,836		
<b>RSD, %</b>	1,96	0,83		

Таблица 30 – Результаты хроматографирования раствора СО псоралена

	tR	S	N	As
СО псорален - 1	10,585	107014	23695,10	1,09
СО псорален - 2	10,417	105584	22824,80	1,09
СО псорален - 3	10,282	104682	21394,96	1,09
СО псорален - 4	10,413	105040	22883,57	1,09
СО псорален - 5	10,453	104801	23077,35	1,09
<b>Среднее значение</b>	10,43	105424,2	22775,16	1,09
<b>Стандартное отклонение</b>	0,0989	853,211439		
<b>RSD, %</b>	0,93	0,8093127		

Таблица 31 – Результаты хроматографирования раствора СО метоксалена

	tR	S	N	As
СО метоксален - 1	11,21	47017	25314,73	1,09
СО метоксален - 2	11,04	46920	24188,57	1,08
СО метоксален - 3	10,90	46183	22970,11	1,08
СО метоксален - 4	11,06	46499	24397,79	1,09
СО метоксален - 5	11,08	46668	24592,68	1,08
<b>Среднее значение</b>	11,05	46657,4	24292,77	1,08
<b>Стандартное отклонение</b>	0,098	299,5093321		
<b>RSD, %</b>	0,89	0,641933181		

Таблица 32 – Результаты хроматографирования раствора СО бергаптена

	tR	S	N	As
СО бергаптен -1	13,48	80517	28989,06	1,08
СО бергаптен - 2	13,32	79604	27931,19	1,08
СО бергаптен -3	13,19	79628	26699,69	1,08
СО бергаптен -4	13,31	79175	28159,72	1,07
СО бергаптен -5	13,56	79315	28159,52	1,08
<b>Среднее значение</b>	13,34	79647,8	27987,84	1,08
<b>Стандартное отклонение</b>	0,092	467,3574221		
<b>RSD, %</b>	0,69	0,59		

Как видно из данных таблиц, хроматографическая система является пригодной: эффективность хроматографической колонки (N) не менее 5000 теоретических тарелок; факторы асимметрии (As) пиков СО - не менее 0,8 и не более 1,5; относительное стандартное отклонение значений времен удерживания и площадей пиков СО кумаринов не более 2 % ( $n \geq 5$ ).

*Специфичность* методики подтверждали с целью определения точности и селективности измерений конкретного кумарина в присутствии сопутствующих компонентов. Для этого оценивали следующие критерии приемлемости:

- Соответствие УФ-спектра испытуемого и стандартного растворов в области от 200 до 500 нм и наличие характерных для определенных кумаринов максимумов поглощения.
- Совпадение времен удерживания пиков определенных кумаринов в испытуемом и стандартном растворах.
- Отсутствие пиков с временами удерживания определенных кумаринов на хроматограмме растворителя.

Хроматограммы испытуемых растворов корневой, черешковой и листовой ботанических форм сельдерея представлены на рисунках 32-34.

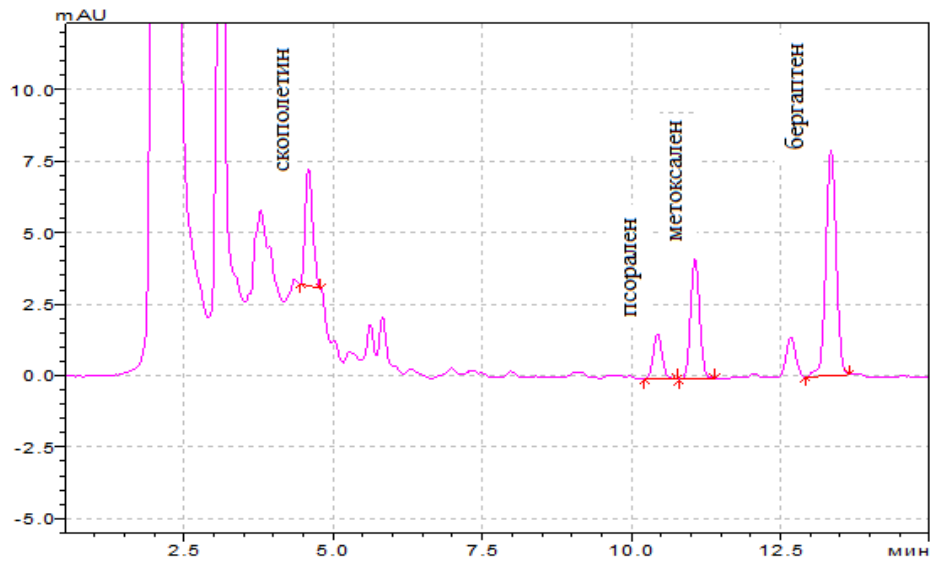


Рисунок 32 – Хроматограмма испытуемого раствора сельдерея корневого

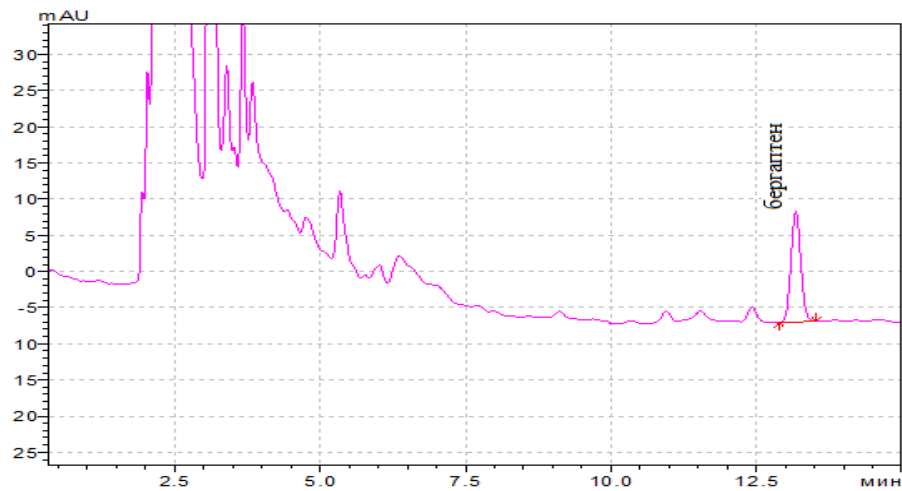


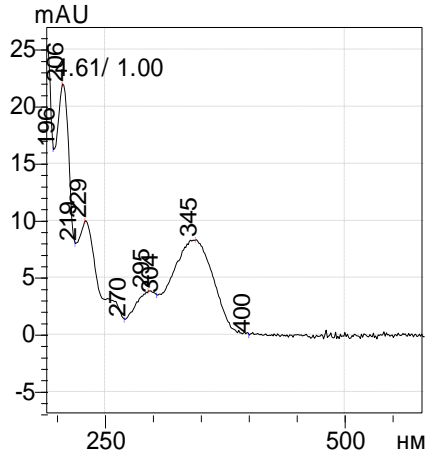
Рисунок 33 – Хроматограмма испытуемого раствора сельдерея листового



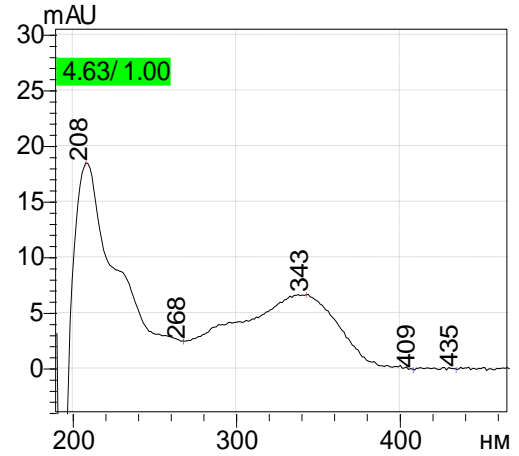
Рисунок 34 – Хроматограмма испытуемого раствора сельдерея черешкового



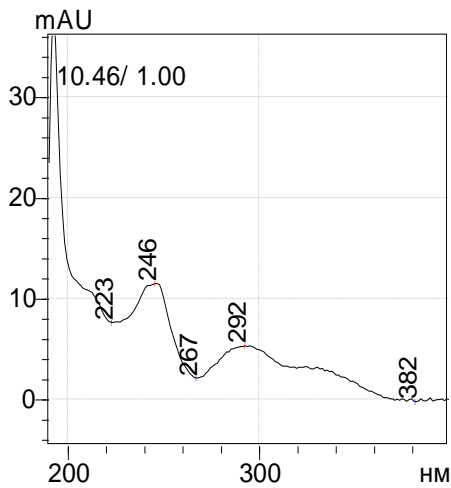
Значения времен удерживания и УФ-спектры пиков всех анализируемых кумаринов в испытуемом и стандартном растворах (на примере извлечений корнеплодов) представлены в таблицах 33-34 и на рисунке 35. Хроматограмма растворителя представлена на рисунке 36.



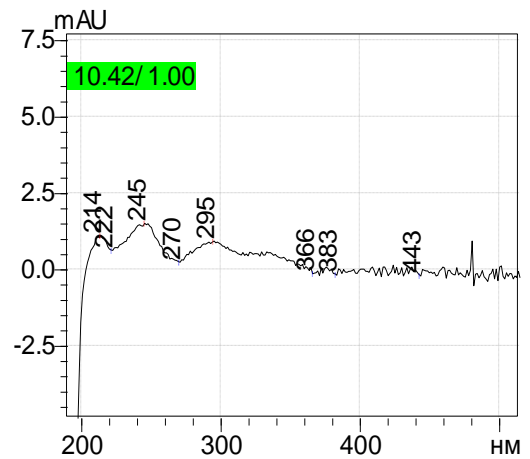
а



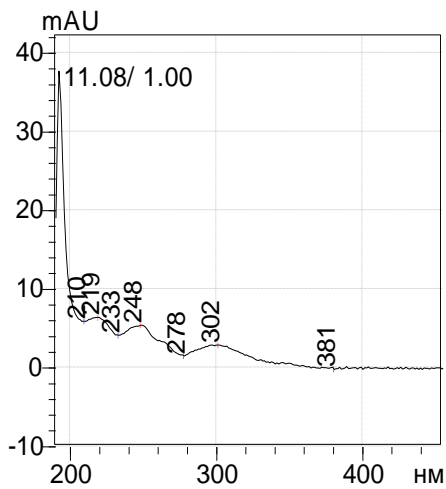
б



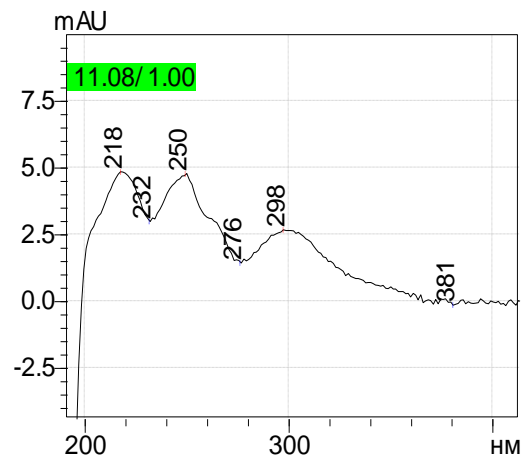
в



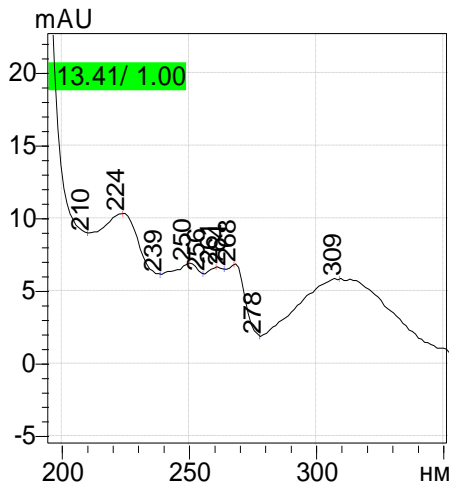
г



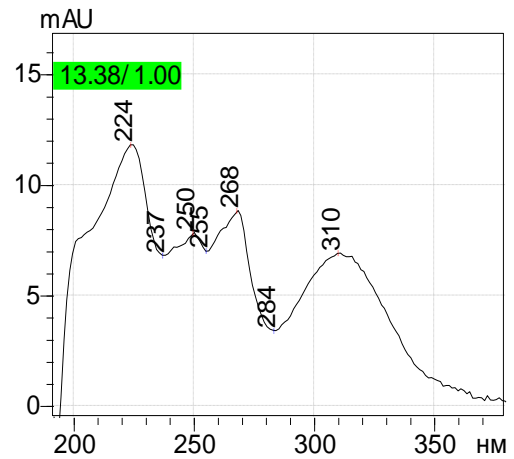
д



е



ж



з

Рисунок 35 – УФ спектры пиков определенных кумаринов в стандартном и испытуемых растворах корнеплодов сельдерея пахучего: а, б – скополетина; в, г – псоралена; д, е – метоксалена; ж, з – бергаптена

Таблица 33 – Времена удерживания пиков определенных кумаринов в стандартном и испытуемых растворах (СО и ИО) корнеплодов сельдерея

скополетин			псорален			метоксален			бергаптен		
№	tr СО	tr ИО	№	tr СО	tr ИО	№	tr СО	tr ИО	№	tr СО	tr ИО
1	4,69	4,58	1	10,59	4,58	1	11,21	10,45	1	13,48	13,34
2	4,56	4,56	2	10,42	4,60	2	11,04	10,43	2	13,32	13,36
3	4,39	4,37	3	10,28	4,37	3	10,90	10,07	3	13,19	12,91
4	4,6	4,59	4	10,41	4,59	4	11,06	10,04	4	13,31	13,11
5	4,59	4,54	5	10,45	4,61	5	11,08	10,35	5	13,56	13,37
$\bar{X}$	4,55	0,089	$\bar{X}$	10,43	4,551	$\bar{X}$	11,05	10,27	$\bar{X}$	13,34	13,218
<b>SD</b>	0,089	1,9522	<b>SD</b>	0,099	0,090	<b>SD</b>	0,098	0,177	<b>SD</b>	0,092	0,1836
<b>RSD,</b> <b>%</b>	1,96	4,58	<b>RSD,</b> <b>%</b>	0,93	1,97	<b>RSD,</b> <b>%</b>	0,89	1,73	<b>RSD</b> <b>, %</b>	0,69	1,39

Бергаптен, в отличие от других кумаринов, был идентифицирован во всех ботанических формах сельдерея, поэтому параметры удерживания данного кумарина для оценки специфичности также были оценены и в испытуемых растворах листьев и черешков сельдерея (таблица 34).

Таблица 34 – Времена удерживания пика бергаптена в стандартном и испытуемых растворах (ИО) листьев и черешков сельдерея

№	tr СО бергаптена	tr ИО (листья)	tr ИО (черешки)
1	13,48	13,44	13,26

2	13,32	13,42	13,29
3	13,19	13,28	13,39
4	13,31	13,34	13,41
5	13,56	13,23	13,28
$\bar{X}$	13,34	13,3406	13,3268
<b>SD</b>	0,092	0,081	0,061
<b>RSD, %</b>	0,69	0,61	0,456

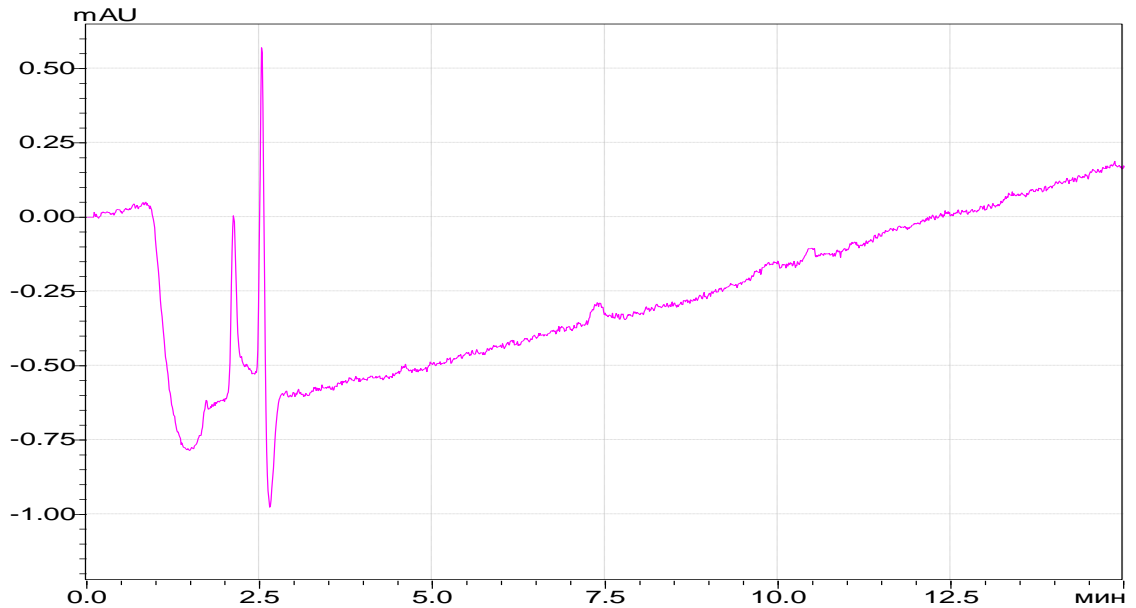


Рисунок 36 – Хроматограмма растворителя пробы для анализа кумаринов

Как видно из иллюстрационных данных, времена удерживания пиков скополетина, псоралена, метоксалена и бергаптена в испытуемых и стандартном растворах статистически достоверно совпадают. УФ-спектры данных пиков в испытуемых и стандартных растворах имеют схожие максимумы и минимумы поглощения. На хроматограмме растворителя пробы отсутствуют пики с временами удерживания отдельных анализируемых кумаринов. Следовательно, методика специфична.

Результаты оценки *сходимости* данных количественного определения кумаринов в сырье сельдерея листового представлена в таблице 35.

Таблица 35 – Результаты оценки *сходимости* методики количественного определения кумаринов в сырье сельдерея пахучего

№	Корнеплоды			Листья	Черешки	
	Скополетин, %	Псорален, %	Метоксален, %	Бергаптен, %		
1	0,0049	0,0007	0,0036	0,0113	0,0236	0,0055
2	0,0037	0,0006	0,0033	0,0121	0,0227	0,0056
3	0,0041	0,0007	0,0036	0,0101	0,0218	0,0057

4	0,0041	0,0008	0,0033	0,0105	0,0214	0,0058
5	0,0046	0,0008	0,0035	0,0098	0,0203	0,0051
6	0,0040	0,0007	0,00304	0,0094	0,0215	0,0052
$\bar{X}$	0,004	0,0007	0,0034	0,0105	0,0219	0,0055
<b>SD</b>	0,00039	5,84E-05	0,0002	0,0009	0,0010	0,00025
<b>RSD, %</b>	9,33	7,9	5,7	8,9	4,8	4,6

Как видно из данных таблицы, RSD концентраций кумаринов в сырье сельдерея пахучего составило менее 10. С учетом того, что объект является растительным, а концентрация искомым веществ крайне мала (менее 0,05%), можно сделать вывод, что методика сходима.

Для оценки предела количественного определения (ПКО) готовили смесь СО скополетина (0,0001 мг/мл), псоралена (0,0001 мг/мл), метоксалена (0,00006 мг/мл) и бергаптена (0,0002 мг/мл) и хроматографировали в выбранных условиях, определяли соотношение сигнал/шум (S/N, не менее 10) для пиков СО кумаринов. Хроматограмма приготовленной смеси СО представлена на рисунке 37, рассчитанные значения S/N – в таблице 36.

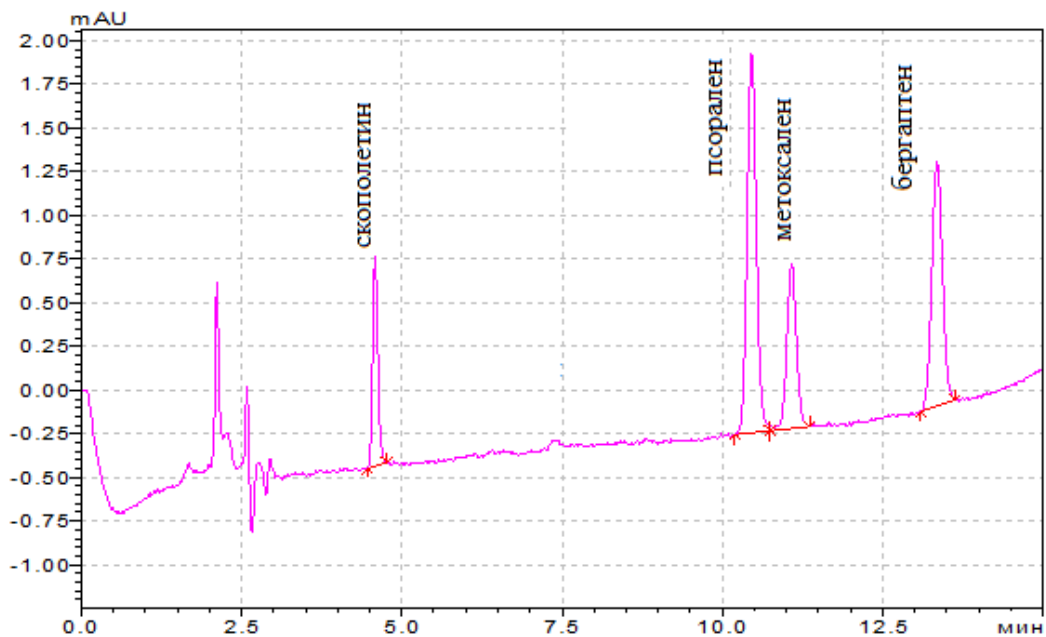


Рисунок 37 – Хроматограмма смеси СО скополетина (0,0001 мг/мл), псоралена (0,0001 мг/мл), метоксалена (0,00006 мг/мл) и бергаптена (0,0002 мг/мл) для анализа ПКО

Таблица 36 – Значения S/N для пиков СО определяемых кумаринов

СО кумарина	Скополетин	Псорален	Метоксален	Бергаптен
S/N	13	24	10	15

Результаты количественного определения содержания псоралена, бергаптена, метоксалена и скополетина в ботанических формах сельдерея пахучего, определенные с помощью разработанной методики, представлены в таблице 37.

Таблица 37 - Количественная оценка кумаринов в ботанических формах сельдерея

Кумарин	Содержание (%) в ботанической форме		
	Корневая	Черешковая	Листовая
Скополетин	0,0040 ± 0,0010	-	-
Псорален	0,0070 ± 0,0008	-	-
Метоксален	0,0034 ± 0,0005	-	-
Бергаптен	0,0101 ± 0,0007	0,0210 ± 0,0008	0,0055 ± 0,0006
<b>Сумма</b>	<b>0,0245 ± 0,0010</b>	<b>0,0210 ± 0,0008</b>	<b>0,0055 ± 0,0006</b>

Как видно из данных таблицы, качественный состав кумаринов отличается в разных ботанических формах сельдерея. Наибольшим разнообразием представителей данной группы БАВ характеризуются корнеплоды сельдерея, что коррелирует с результатами скрининга липофильных фракций методом ГХ/МС, тогда как в листьях и черешках из анализируемых соединений обнаружен только бергаптен., наибольшее накопление которого наблюдается в сельдерее черешковом. Тем не менее, если рассматривать сумму данных БАВ, корнеплоды характеризуются наибольшим их накоплением.

#### Выводы к главе 4

1. Разработана и валидирована методика количественного определения хлорогеновой кислоты - функционального ингредиента с рядом фармакологических свойств - в сырье листовой формы *Apium graveolens* L. и проведена оценка сортовых преимуществ растений, выращенных на двух локациях с различными агротехническими условиями.

2. 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 универсальной колонки и растворителей, что важно при воспроизведении методики в рутинном анализе.

3. 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 методика обеспечивает требуемую линейность, правильность и прецизионность составляет от 0,001 мг/мл до 0,025 мг/мл.

4. 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 ± 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.

5. Подобраны условия пробоподготовки сырья и хроматографические условия (режим элюирования) для количественного определения бергаптена, псоралена, метоксалена и скополетина методом ВЭЖХ. Выполнена верификация предложенной методики.

6. Результаты верификационных испытаний показали, что методика является пригодной, специфичной и сходимой. ПКО кумаринов составляет от  $0,00006$  мг/мл до  $0,0002$  мг/мл в зависимости от конкретного кумарина.

7. Сравнительная оценка содержания кумаринов в сырье сельдеря показала, что наибольшее разнообразие данной группы БАВ представлено в корневой форме, тогда как черешковая и листовая содержат только бергаптен, максимальное накопление которого наблюдается в черешках. Тем не менее, сумма кумаринов превалирует в корнеплодах сырья ( $0,0245 \pm 0,0010$  %). Однако необходимо отметить, что данная группа БАВ не отличается мажоритарным накоплением в ЛРС, что и демонстрирует сырье сельдеря. 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) является обязательным элементом фармакогностического анализа растений семейства зонтичные.

## ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ СЕЛЬДЕРЕЯ ПАХУЧЕГО

По результатам фитохимического скрининга были выбраны перспективные ботанические формы сельдерея пахучего и группы БАВ (фракции), которые отличаются максимальным накоплением, разнообразием входящих в них компонентов, что в совокупности обуславливает возможность выбора их для разработки различных лечебно-профилактических продуктов на основе сельдерея.

Суммируя результаты предшествующих испытаний, в фокусе наших дальнейших исследований были обозначены полисахаридные фракции ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея пахучего, что обусловлено наибольшим выходом данных соединений относительно других групп БАВ, разнообразным мономерным составом и отсутствием примесей низкомолекулярных веществ, поглощающих в области от 200 до 700 нм и липофильная фракция черешковой формы сельдерея, которая также характеризуется накоплением различных групп БАВ (терпенов, фталидов, фитостеролов, хлорофиллов и др.) с выраженной фармакологической активностью по данным прогностического анализа.

Поскольку разработка продуктов на основе растительного сырья требует включения различных областей знаний и навыков фармации, нами была предложена схема работы над мультидисциплинарными проектами (рисунок 38), которая частично реализована нами на примере кейсов «Полисахаридная фракция сельдерея» и «Липофильная фракция сельдерея».

## СХЕМА РАБОТЫ НАД МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНЫМИ ПРОЕКТАМИ



\*с потенциальной фармакологической активностью, ресурсосберегающим методом получения, актуальностью в разработке, соответствующий стратегии научно-технического развития страны, интересам университета и др.

Рисунок 38 – Схема работы над мультидисциплинарными проектами на стыке различных областей знаний фармацевтической отрасли



## **5.1. Разработка фитосубстанции на основе водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ сельдерея корневого**

Полисахариды природного происхождения – одни из самых распространённых биополимеров – являются важными макромолекулами всех биологических видов и широко используются в различных отраслях промышленности [135]. В настоящее время полисахариды применяются в качестве инновационных систем доставки лекарственных средств [136], находят применение в косметологии и тканевой инженерии [137]. Кроме того, ряд природных полисахаридов рассматривается как активные вещества и применяются в составе лекарственных средств (ЛС) [14], так как имеют собственный спектр биологических свойств.

Согласно данным электронной базы Science direct, за последние 20 лет наблюдается ежегодный рост исследовательских статей по запросу «polysaccharides» (с 2504 работ в 2002 году до 16462 в 2022), что говорит о стабильном повышении интереса научного сообщества к изучению данной темы. Тем не менее, количество патентов по запросу «полисахариды» в Российской Федерации за последние годы, наоборот, значительно снизилось (с 998 патентов в 2012 до 48 в 2022) [138], что говорит о перспективности разработки продуктов, содержащих полисахариды, и внедрения их на рынок. При этом необходимо отметить, что химический синтез природных полисахаридов представляет собой нетривиальную задачу ввиду сложности структуры. В связи с этим, можно сделать вывод, что изучение (поиск сырьевых источников, способов выделения, очистки и установления структуры) растительных полисахаридов и разработка на их основе новых продуктов для фармацевтического (в т.ч. ветеринарного), пищевого и агротехнического рынка считается фронтальным направлением.

Таким образом, разработка фитосубстанции на основе полисахаридов является актуальной, а выбор фракций ВРПС и ПВ сельдерея корневого обоснована высоким выходом соединений, структурными характеристиками и низким содержанием примесей (Глава 3).

*5.1.1. Результаты анализа рынка продуктов специализированного и функционального питания, содержащих полисахариды природного происхождения.*

*5.1.1.1 Результаты анализа структуры предложения и объемов продаж БАД, содержащих полисахариды природного происхождения*

Анализ ассортимента показал, что на сегодняшний день рынок Российской Федерации представлен 59 наименованиями БАД (Приложение Г), содержащих полисахариды в качестве активного компонента, и 91 в которых полисахариды сочетаются с другими соединениями: витаминами, минералами, ЛРС и т.д. Сравнительная оценка вклада отдельных форм выпуска в общую структуру ассортимента указывает на тот факт, что наибольший удельный вес в исследуемом сегменте занимают капсулы – 25% и таблетки – 24%.

В условиях активной реализации курса импортозамещения в РФ целесообразным являлось изучение ассортимента в разрезе стран-производителей, которое позволило установить, что сегодня существенный вклад в структуру предложения вносит Россия, формируя 76% ассортимента (рисунок 39)

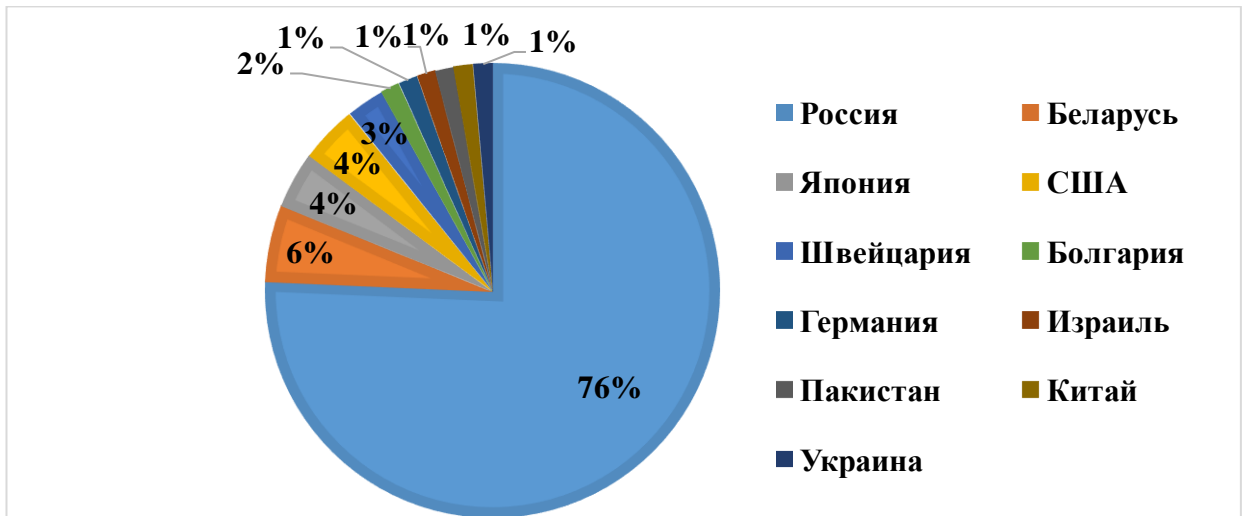


Рисунок 39 - Структуризация ассортимента БАД, содержащих природные полисахариды по странам-производителям

Данные Единого реестра свидетельств о государственной регистрации демонстрируют, что выпуск российских БАД анализируемой группы обеспечивают 28 компаний. При этом в топ-6 входят ООО НПЦ «Элюсан» (10 наименований), ООО «Аквामीр» (5 наименований), ООО «Архангельский водорослевый комбинат» (4 наименования), ООО «Биотэла», ЗАО «Пектин-доктор» и ООО «ФАРМАКОР ПРОДАКШН» по 3 наименования. Продукция остальных производителей суммарно охватывает 50%, что представлено на Рисунок 40.

Важно отметить, что зарубежные производители представлены 13 компаниями из 10 стран, предложение которых суммарно составляет 24%, при этом среди них лидирует Беларусь, на долю которой приходится 5%. Таким образом, полученные результаты дают основания полагать, что заполнение российского рынка БАД, в состав которых входят полисахариды природного происхождения, сегодня осуществляется в основном российскими производителями.

Установлено, что в 2022 г. аптечные организации реализовали 4,5 млн упаковок (4 525 803) (рисунок 41) анализируемой группы БАД на общую сумму 1,5 млрд. рублей (1 504 732 940) (рисунок 42). Эти показатели на 13,4% и 19,7%, соответственно, выше показателей 2021 г. (3 921 599 уп., 1 207 644 510 руб.).

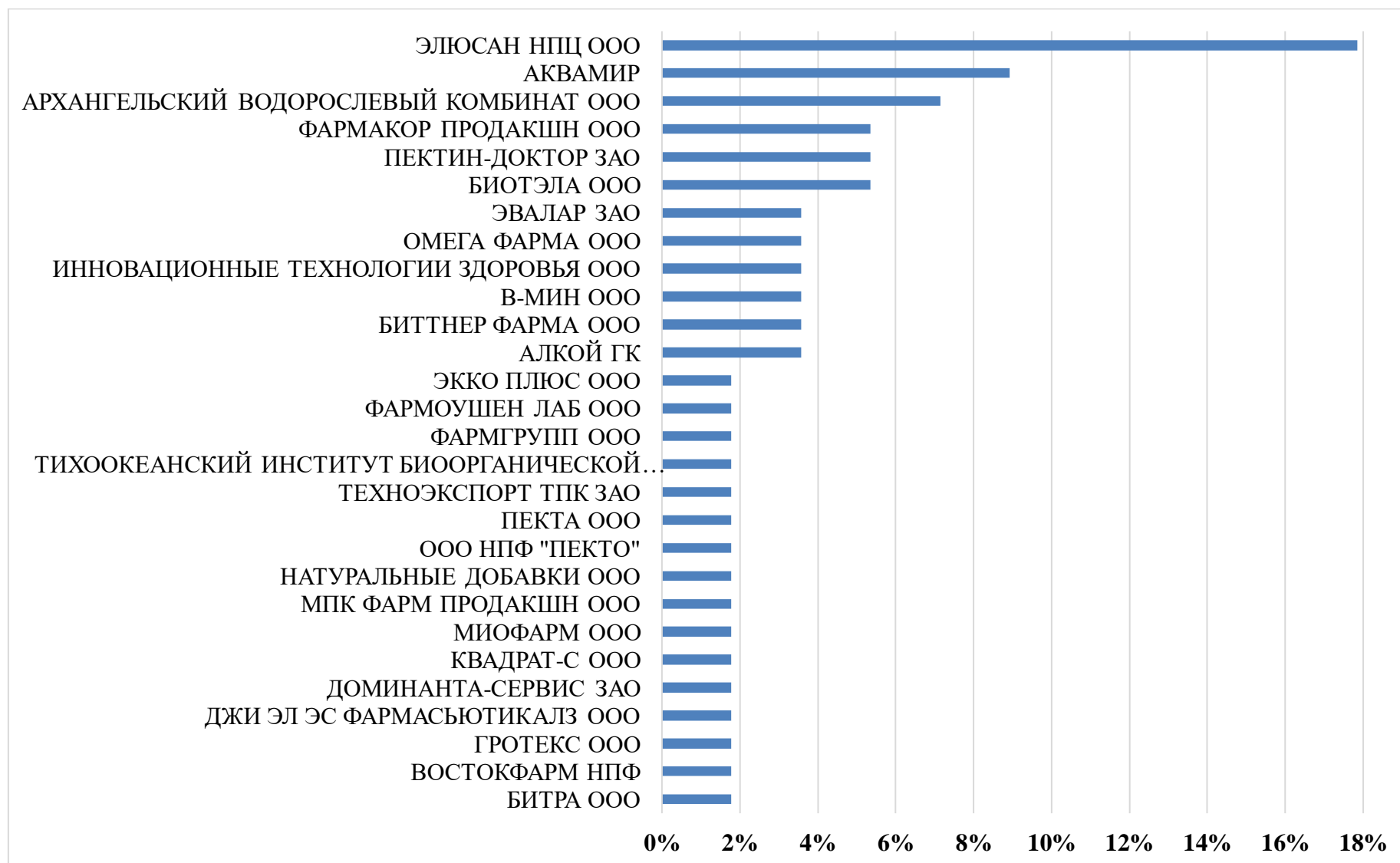


Рисунок 40 - Структура предложения отечественных производителей БАД, содержащих природные полисахариды

Анализ динамики объемов продаж показал, что за последние 3 года наблюдались сезонные колебания, однако в целом имеет место тенденция увеличения анализируемого показателя. Кроме того, уменьшение стоимостного объема БАД в упаковках в 2020 г. незначительно сказывается на стоимостном объеме продаж в рублях в этот год, что может быть обосновано возможным повышением цен на ряд товаров, рассматриваемой группы или снижением платежеспособности населения, возможным смещением фокуса целевой группы на ряд других, более значимых, товаров аптечного ассортимента. В то же время наблюдаемый рост продаж в натуральном и стоимостном выражении с 2021 г. свидетельствует о приверженности потребителей к этой группе БАД.

Таким образом, анализируемая группа товаров аптечного ассортимента является востребованной среди потребителей. В течение последних 4 лет наблюдается стойкая тенденция к увеличению показателей объема рынка БАД, содержащих полисахариды природного происхождения в стоимостном выражении. Показатели объемов продаж в натуральном выражении за последние 3 года отражают высокий спрос на российские БАД, что обусловлено прежде всего эффективностью, соизмеримой с зарубежными аналогами, доступностью в цене, доверием и лояльностью современных потребителей к отечественным производителям БАД.

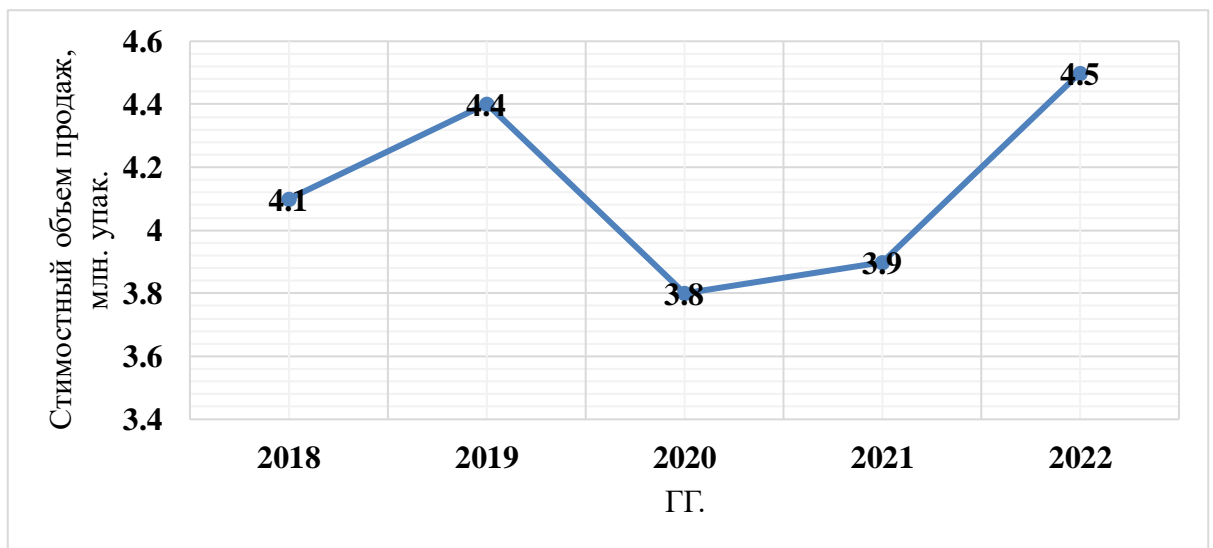


Рисунок 41 - Динамика розничной реализации БАД, содержащих природные полисахариды, в натуральном выражении, в период с 2018 по 2022 гг.

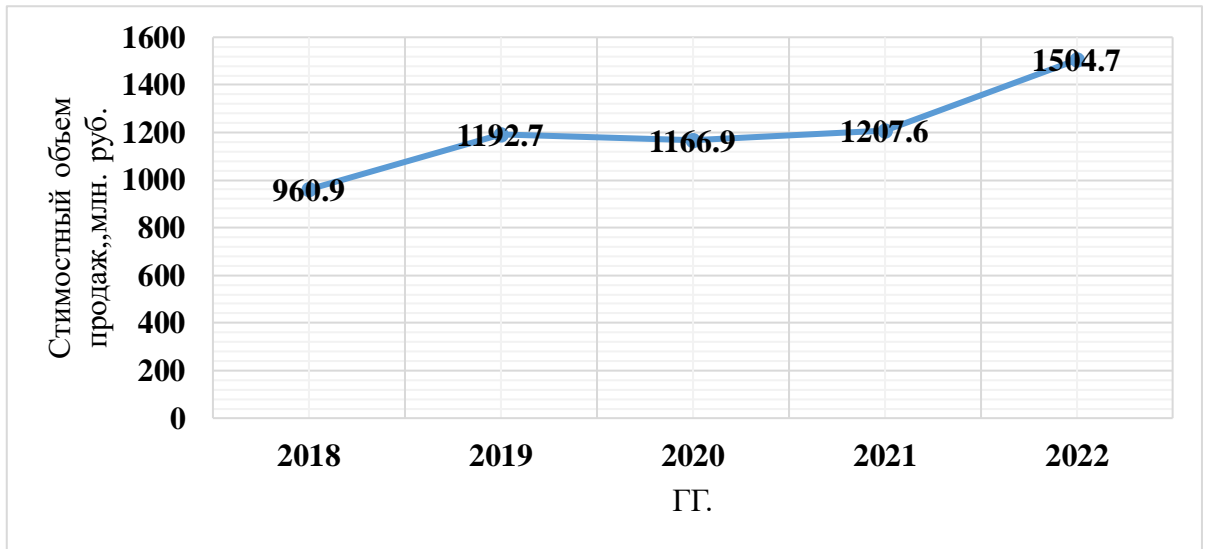


Рисунок 42 - Динамика розничной реализации БАД, содержащих природные полисахариды, в стоимостном выражении, 2018 - 2022 гг.

### 3.3.2 Результаты исследования приверженности целевой аудитории к использованию продуктов функционального и специализированного питания

Согласно социально-демографическим характеристикам (рисунок 43) в опросе преимущественно участвовали молодые женщины (69,2%), в возрасте от 18 до 25 лет. Более 60% (62,6%) опрошенных отметили, что употребляют специализированные продукты питания (БАД, диетическое профилактическое/лечебное питание), в то время как 37,4% респондентов воздерживаются от приема каких-либо пищевых добавок.

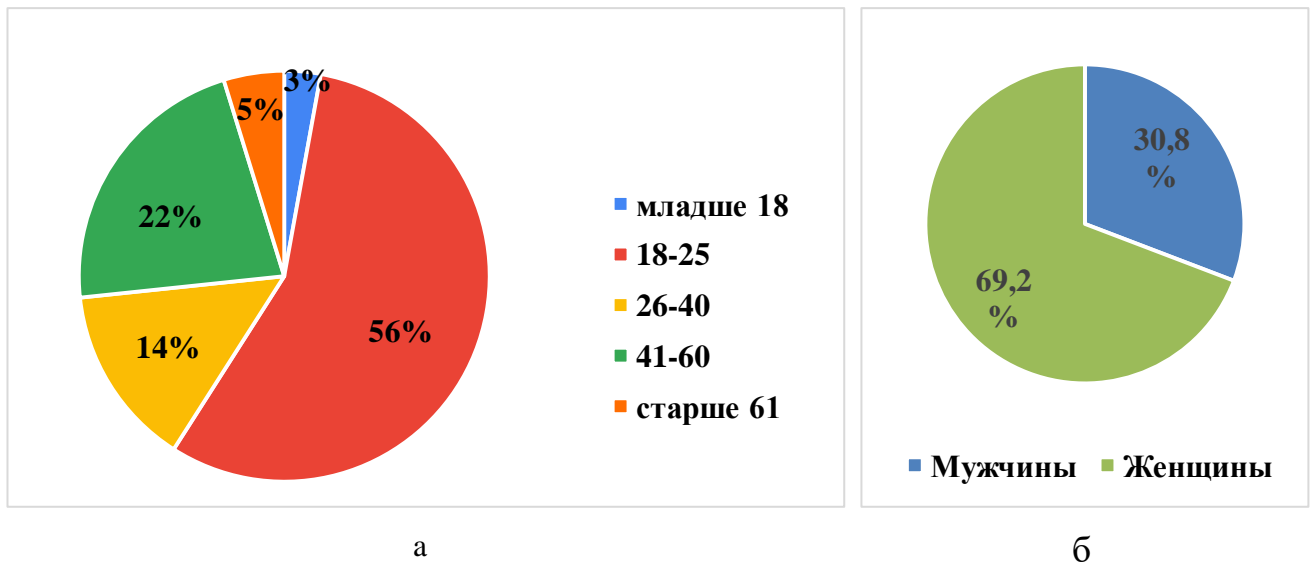


Рисунок 43 - Результаты социально-демографических характеристик: (а) Возрастные категории респондентов, %; (б) пол респондентов

Превалирующее число молодых (56%) респондентов преимущественно (85%) женского пола может являться как следствием характеристик генеральной совокупности прошедших анкетирование респондентов, так и более значимой ориентированностью населения данной возрастной группы на поддержание здорового образа жизни и готовностью принимать добавки к

пище. Высокий (80%) спрос на БАД и продукты специализированного питания отмечен и среди потребителей в возрастной группе от 26 до 40 лет. Таким образом, можно сделать вывод, что продукты специализированного питания достаточно популярны среди потребителей разных возрастных категорий, основной сегмент которых, согласно полученным сведениям – люди трудоспособного возраста. Однако данный показатель нельзя считать окончательным, поскольку существует ограничения возможностей привлечения к онлайн-анкетированию людей старшего возраста.

Более 80% опрошенных (83,2%) ответили, что задумывались над доказательной эффективностью БАД, более 75% отметили, что им известна способность пищевых волокон улучшать метаболизм за счет регуляции микрофлоры. При этом 92,5% респондентов упомянули, что недовольны качеством своего питания, а 93,5% из них подтвердили готовность приобретать продукты специального и функционального питания на основе растительных полисахаридов, если в инструкции по применению имеется научно-подтвержденная информация о прямом полезном влиянии их на здоровье. В свою очередь, анализ финансовых возможностей в генеральной совокупности респондентов продемонстрировал, что последние готовы выделять от 200 до 1000 рублей в месяц на покупку подобной категории БАД. Стоит отметить, что наиболее значимыми для респондентов мотивами потребления БАД явились: улучшение физического состояния организма (71%), повышение иммунитета (60,7%) и качественный и сбалансированный рацион (56,1 %) (рисунок 44).

Было выявлено высокий процент заинтересованности опрошенных в повышении знаний о продуктах функционального питания, содержащих полисахариды природного происхождения. Доля таких респондентов составила 84,1%.

Таким образом, принимая во внимание все вышеизложенное, потребители российского рынка привержены к использованию БАД, содержащих полисахариды растительного происхождения. Анкетирование показало, что целевая аудитория заинтересована в потреблении продуктов функционального питания, содержащих природные полисахариды в первую очередь для улучшения физического состояния организма, обеспечения качественного и сбалансированного рациона, а также повышения иммунитета (рисунок 44).

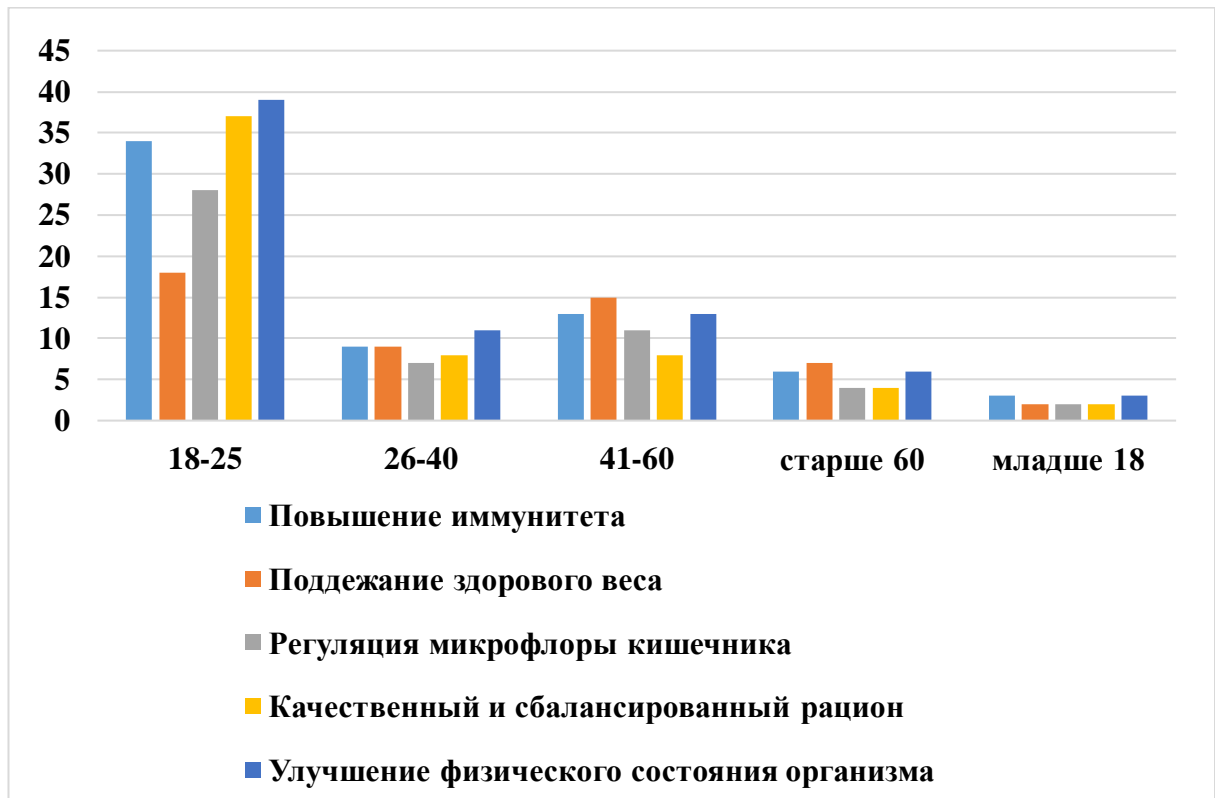


Рисунок 44 - Соотношение параметров интереса потребителей различных возрастных категорий, чел.

#### 5.1.2. Результаты модификации методики выделения ВРПС и ПВ из корнеплодов сельдерея

Для подбора оптимальной методики выделения полисахаридных фракций из корнеплодов сельдерея пахучего были определены оптимальное соотношение сырье : растворитель, количество циклов и времени экстракции ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея (таблица 38).

Таблица 38 – Результаты подбора условий отдельного поэтапного выделения ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея

Содержание ПС в корнеплодах сельдерея, $\bar{X} \pm \Delta X\%$ (n=3)									
	1 способ			2 способ			3 способ.		
	До очистки	После очистки	КПМ	До очистки	После очистки	КПМ	До очистки	После очистки	КПМ
<b>ВРПС</b>	16,41 ± 0,50	8,37 ± 0,45	0,5	32,99 ± 0,48	17,99 ± 0,49	0,54	33,21 ± 0,44	16,61 ± 0,52	0,5
	8,02 ± 1,80	2,89 ± 0,20	0,36	18,66 ± 0,22	6,38 ± 0,24	0,34	17,53 ± 1,83	6,85 ± 0,17	0,39
<b>ПВ</b>									

Было показано, что проведение совместного выделения является менее эффективным, чем раздельная экстракция целевых компонентов (таблица 39).

Таблица 39 - Сравнение эффективности раздельного и совместного способов выделения ВРПС и ПВ сельдерея пахучего

Содержание суммы очищенных ПС в корнеплодах сельдерея, $\bar{X} \pm \Delta X\%$ (n=3)	
Раздельное поэтапное выделение	Совместное выделение
24,37 ± 0,68	15,84 ± 0,32

Схема модифицированной методики выделения ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея представлена на рисунке 45.

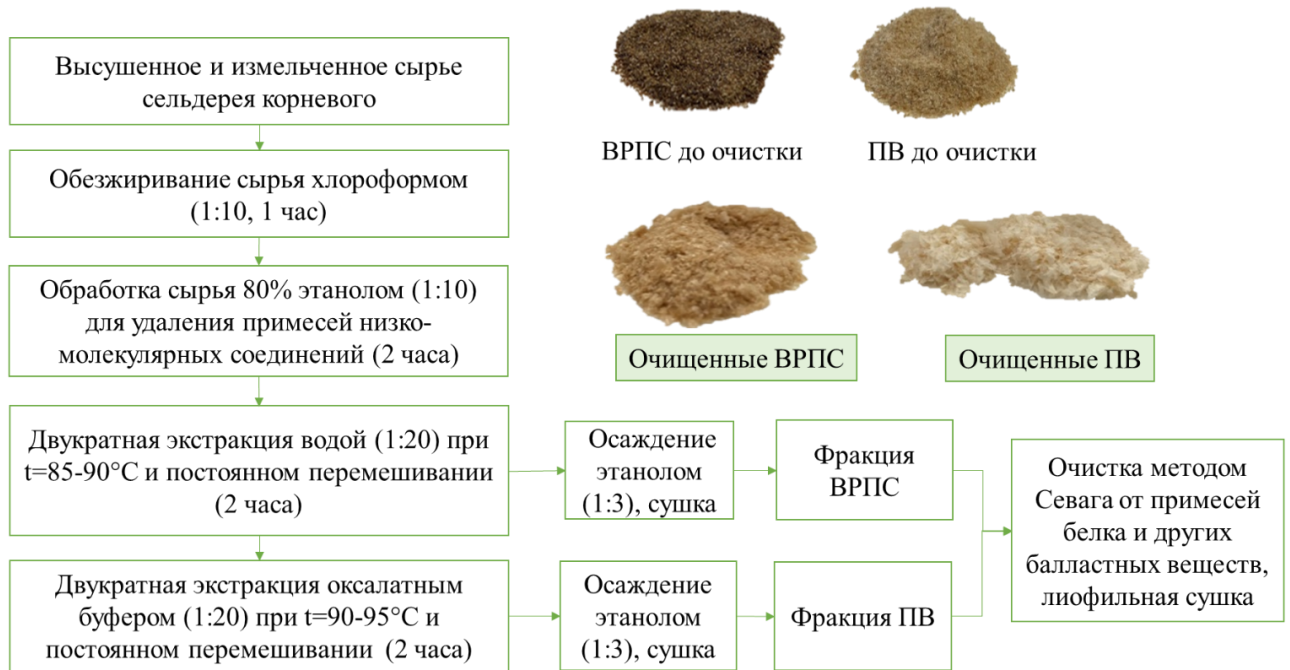


Рисунок 45 – Схема модифицированной методики извлечения ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея пахучего

### 5.1.3. Выбор и нормирование параметров качества для фитосубстанции на основе ВРПС и ПВ

Выбор параметров и критериев приемлемости контроля качества продукта – неотъемлемая часть разработки, позволяющая оценить ее качество и, как следствие, безопасность. В таблице 40 представлены результаты выбора показателей качества для фитосубстанций ВРПС и ПВ сельдерея пахучего корневого формы. Диапазон критериев приемлемости был подобран экспериментальным путем (описание, растворимость, pH, подлинность (ТСХ), примеси низкомолекулярных соединений), а также регламентированы требованиями ГФ РФ (остаточные органические растворители) [121] и ТР ТС-21 (микробиологическая чистота, тяжелые металлы) [11].



Таблица 40 Рекомендованные параметры качества фракции ВРПС и ПВ сельдерея корневого

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный	ВРПС - аморфный порошок с вкраплениями прозрачных кристаллов светло-коричневого цвета, без запаха; ПВ - аморфный волокнистый порошок светло-бежевого цвета, без запаха
Растворимость	ГФ РФ / ФЕАЭС	Легко растворимы в воде, очень мало растворимы или практически нерастворимы в 96% спирте, практически нерастворим в хлороформе
рН	ГФ РФ / ФЕАЭС, потенциометрически	ВРПС - от 5,1 до 5,8 ПВ - от 3,3 до 3,9
Подлинность	Качественная реакция с этиловым спиртом 96%	При добавлении к 1% водному раствору полисахарида трехкратного количества этилового спирта 96% наблюдается выпадение светло-коричневого аморфного осадка
	ТСХ	На хроматограмме должно наблюдаться соответствие размера, цвета и Rf пятен галактозы и арабинозы на треках испытуемых и стандартного раствора
Примеси низкомолекулярных соединений	Спектрофотометрия	Отсутствие максимумов поглощения в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм
Тяжелые металлы	ТРТС 21	Не более 0,001%
Остаточные органические растворители	ФЕАЭС, ГХ	Содержание хлороформа – не более 50 ppm, метанола – не более 3000 ppm, бутанола и этанола – не более 5000 ppm
Микробиологическая чистота	ФЕАЭС	Категория ЗБ
Хранение	В сухом месте при температуре не выше 25 °С	
Маркировка	В соответствии с НД	

Результаты оценки остаточных органических растворителей в ВРПС и ПВ сельдерея пахучего представлены в таблице 41 и на рисунках 46-48.

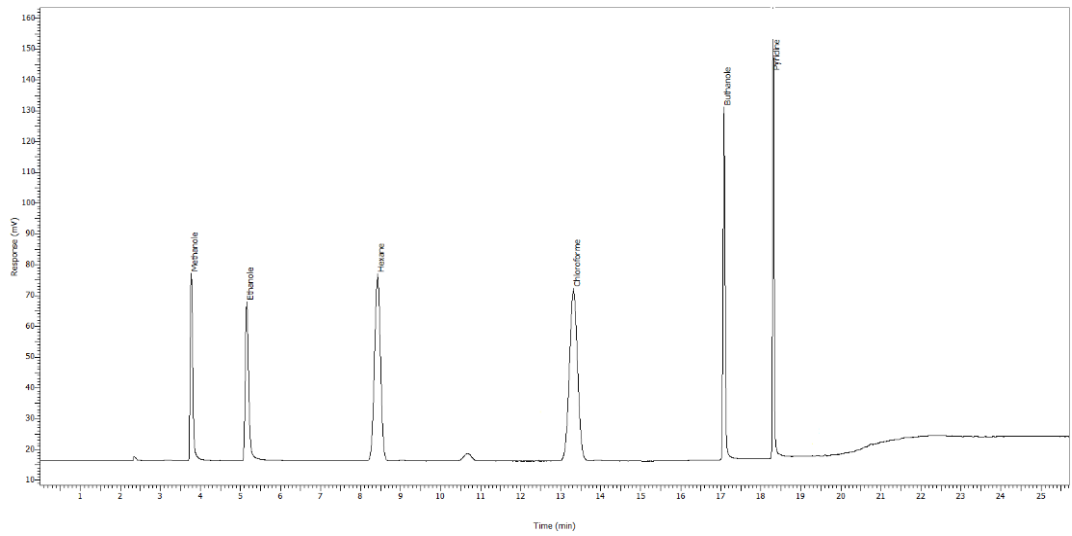


Рисунок 46 - Хроматограмма стандартного раствора, содержащего метанол ( $c = 0,158$  мг/мл), этанол ( $c = 0,079$  мг/мл), н-бутанол ( $c = 0,032$  мг/мл) и хлороформ ( $c = 0,056$  мг/мл)

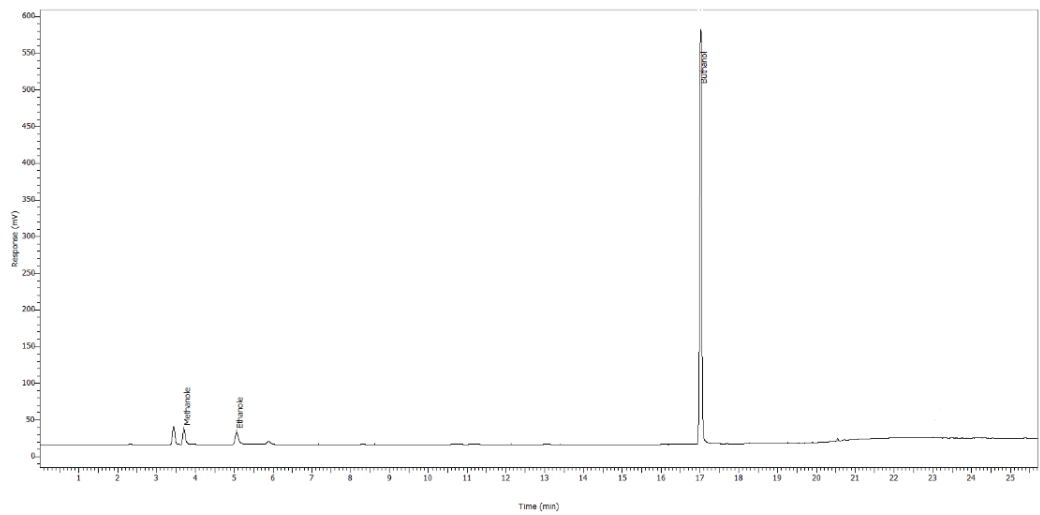


Рисунок 47 - Хроматограмма испытуемого образца ВРПС

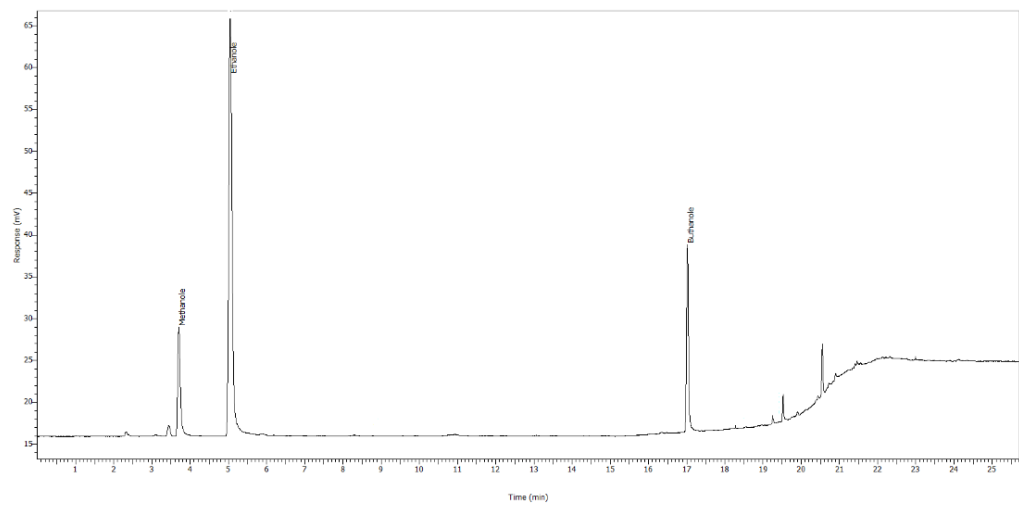


Рисунок 48 - Хроматограмма испытуемого образца ПВ

Таблица 41 - Результаты анализа остаточных органических растворителей в полисахаридных фракциях сельдерея корневого

Растворитель	Содержание в ВРПС, ppm	Содержание в ПВ, ppm	Норма, ppm
Метанол	590 ± 30	281 ± 11	Не более 3000
Этанол	291 ± 15	662 ± 28	Не более 5000
Бутанол-2	56 ± 7	150 ± 8	
Хлороформ	Не обнаружено	Не обнаружено	Не более 60

Как видно из данных рисунков и таблицы, в обеих фитосубстанциях были обнаружены остаточные количества этанола и н-бутанола-2, используемые в процессе выделения и очистки полисахаридных фракций, а также метанола, который в технологической схеме не используется. Однако присутствие метанола можно обосновать качеством используемого для выделения фракций этилового спирта. Помимо этого, на хроматограммах испытуемых образцов наблюдается неидентифицированный пик с временем удерживания около 3,5 минут, требующий идентификации. Тем не менее, количественное содержание всех органических растворителей в полисахаридных фракциях ниже ПДК, что говорит о безопасности их применения.

#### 5.1.4. Результаты оценки фармакологической активности ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея

Результаты измерения массы тела, а также содержания жира в организме групп животных, получающих метформин, смесь полисахаридов и контрольной группы в 1, 14 и 28 дни эксперимента представлены на рисунках 49-50.

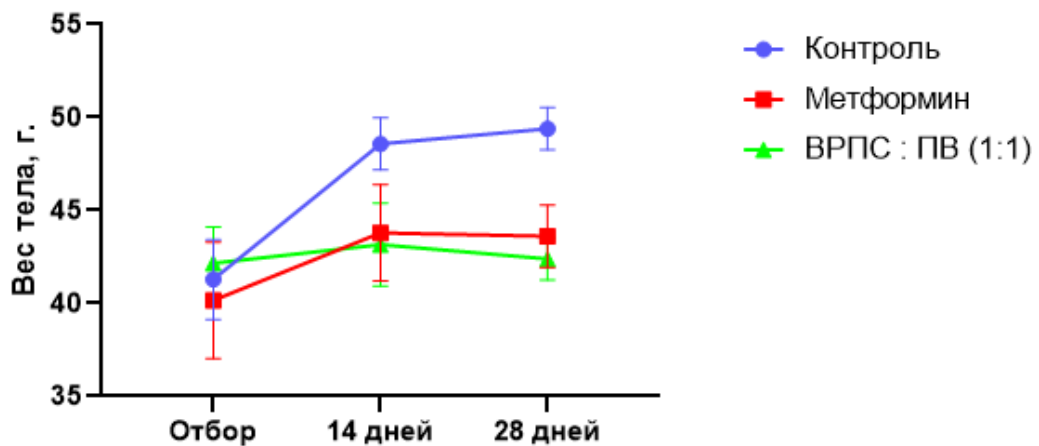


Рисунок 49 – Динамика массы тела в испытуемых группах животных (синий – контроль, красный – метформин, зеленый – смесь ВРПС и ПВ)

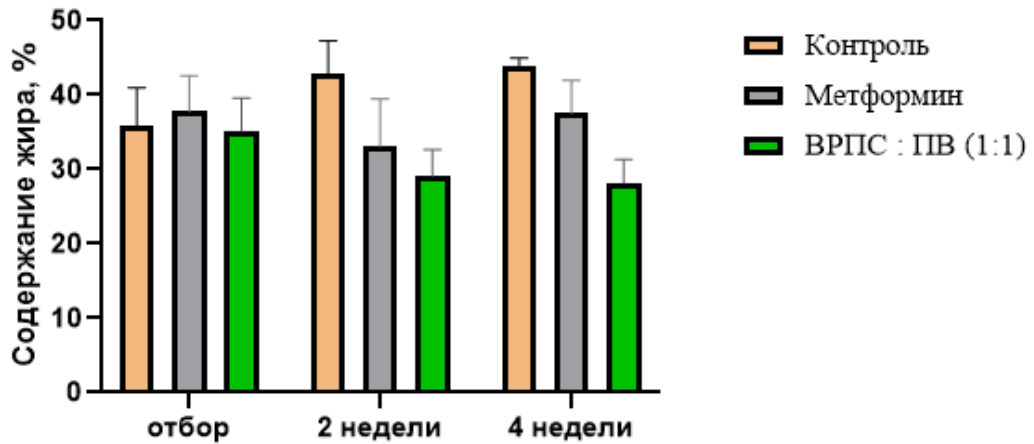


Рисунок 50 - Результаты анализа содержания массы жира в организме исследуемых групп животных (оранжевый – контроль, серый – метформин, зеленый – смесь ВРПС и ПВ)

Как видно из представленных данных, прием полисахаридов сельдерея положительно влиял на динамику массы тела животных. Так, после 2 недель приема полисахаридов 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 значительно уменьшилось в отношении контрольной группы (на 13,8 % через 2 недели и на 15,5 % через 4 недели приема), а также показали лучшие данные относительно препарата сравнения.

Содержание лептина в крови лабораторных животных испытуемых групп возросло по сравнению с контролем для ВРПС на 14,3%, для ПВ на 19% (рисунок 51). Лептин – гормон жировой ткани, выполняющий функцию контроля аппетита и обмена веществ. При его дефиците наступает снижение чувства сытости, что ведет к чрезмерному потреблению пищи и развитию ожирения [90]. Следовательно, растворы ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея способствуют выработке лептина, что приводит к восстановлению физиологической регуляции аппетита, снижению потребления пищи и, следовательно, избыточной массы тела. В таблице 42 приведены значения концентрации лептина в группах.

Таблица 42 – Концентрации лептина в крови мышей испытуемых и контрольной группы.

Гормон	Содержание $\bar{X} \pm \Delta X\%$ (нг/мл) в крови лабораторных животных, получавших		
	ВРПС : ПВ (1:1)	Препарат сравнения	Контроль
Лептин	$2,58 \pm 0,21$	$2,40 \pm 0,21$	$2,10 \pm 0,20$

### Концентрация лептина в плазме крови

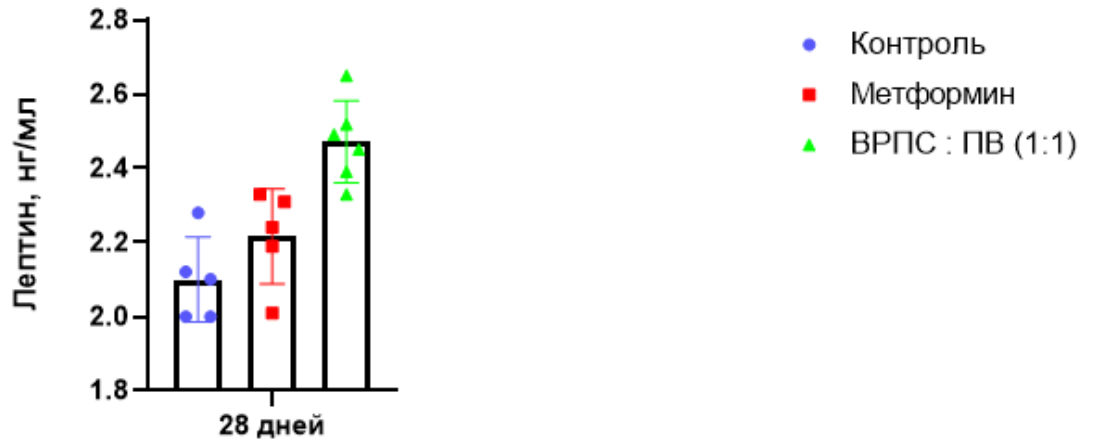


Рисунок 51 – Концентрации лептина в крови мышей испытываемой и контрольных групп.

Таким образом, смесь очищенных фракций ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея пахучего статистически значимо снижали вес тела и массу жировой ткани у генномодифицированных мышей, страдающих сахарным диабетом 2 типа и ожирением. Данные результаты говорят о перспективности применения ВРПС и ПВ сельдерея пахучего в терапии ожирения и других метаболических нарушений, что делает актуальным разработку фитосубстанции на их основе.

#### *5.1.5. Концепция разработки порошка для приготовления коктейля на основе фитосубстанции из полисахаридов сельдерея*

ВРПС и ПВ корнеплодов сельдерея пахучего представляют собой смесь полисахаридов с примесью олиго- и моносахаров. Данные фитосубстанции могут быть рассмотрены в качестве потенциальных продуктов функционального, специализированного питания и ЛС. В связи с чем актуально проведение анализа рынка продуктов на основе полисахаридов, доклинических испытаний исследуемых фитосубстанций, выбора и анализа показателей качества продуктов.

ВРПС и ПВ сельдерея могут быть рассмотрены в качестве основного ингредиента продукта функционального питания – порошка для приготовления коктейля, способствующего регуляции нарушений метаболизма. Теоретический состав порошка может быть представлен полисахаридами сельдерея, наполнителем (например, маннитол), подсластителем (например, экстракт стевии), антислеживающим агентом (например, аэросил и магния стеарат), ароматизатором. Позиционирование и развитие продукта является неотъемлемой частью разработки, в связи с чем был предложен вариант упаковки порошка для приготовления коктейля на основе полисахаридов сельдерея «Arislim» (рисунок 52). Заявка по данной тематике подавалась на различные конкурсы и гранты (КНВШ, РНФ, УМНИК).

Проект НД сельдерея корневого корнеплоды – в приложении Д. Проект ТУ на фитосубстанцию полисахаридов представлены в приложении Е.



Рисунок 52 - Концепция разработки продукта на основе полисахаридов сельдерея

## 5.2. Разработка фитосубстанции на основе липофильной фракции черешковой ботанической формы

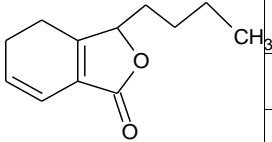
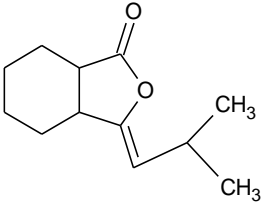
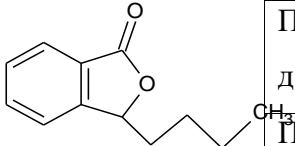
Результаты фитохимического скрининга позволяют позиционировать черешковую ботаническую форму сельдерея как богатый источник фитостеролов, производных бутилфталида и терпенов. Согласно данным литературы [139-144], вышеперечисленные группы БАВ обладают различными местными и системными фармакологическими свойствами. В связи с этим, разработка фитосубстанции на основе липофильной фракции черешковой формы сельдерея является перспективной. Для подтверждения актуальности разработки было осуществлено прогнозирование биологической активности мажоритарных компонентов сельдерея (установленных методом ГХ/МС в Главе 3), разработана эффективная схема выделения фракции, выбраны методики контроля качества и представлена концепция разработки мягкой лекарственной формы на ее основе.

### 5.2.1. Прогнозирование биологической активности мажоритарных соединений липофильных фракций *Apium graveolens L.*

Результаты прогнозирования биологической активности мажоритарных соединений, идентифицированных в липофильной фракции черешков сельдерея пахучего, представлены в

таблицах 43-45. Для установления взаимосвязи структура-действие, рассматриваемые вещества были разделены по классам соединений.

Таблица – 43 Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений класса производных бутилфталата с использованием PASS-online

Название вещества	Структурная формула	Вид биологической активности	Pa	Pi
Сенкиунолид		Противоэксудатическая активность	0,776	0,024
		Вазопротектор	0,666	0,013
		Регулятор липидного обмена	0,602	0,021
		Противозудная, антиаллергическая активность	0,572	0,017
		Антимутагенная активность	0,505	0,015
		Антитромботическая активность	0,516	0,027
		Противогрибковая активность	0,514	0,028
		Гиполипемическая активность	0,51	0,035
		Противопротозойная (лейшманиоз) активность	0,452	0,032
3-изобутилен фталат		Лечение фобических расстройств	0,741	0,058
		Стимулятор агрегации тромбоцитов	0,581	0,032
		Противоартритная активность	0,58	0,032
		Противовирусная (риновирус) активность	0,552	0,012
		Антисеборейная активность	0,567	0,06
		Агонист апоптоза	0,492	0,042
		Противоопухолевая активность	0,497	0,072
Бутилфталат		Противоэксудатическая активность	0,758	0,028
		Вазопротекторная активность	0,609	0,019
		Регулятор липидного обмена	0,558	0,029
		Противоишемическое, церебральное действие	0,588	0,061
		Противозудное, антиаллергическая активность	0,549	0,023
		Антиметастатическая активность	0,517	0,016
		Гиполипемический	0,51	0,035

	Агонист апоптоза	0,508	0,039
	Противогрибковая активность	0,485	0,03

Таблица 44 – Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений класса фитостеролы с использованием PASS-online

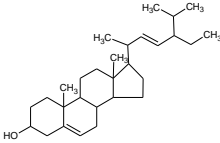
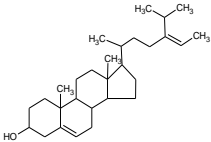
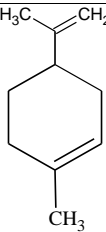
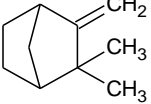
Название вещества	Структурная формула	Вид биологической активности	Pa	Pi
Стигмастерол		Гиполипемическая активность	0,9	0,004
		Дерматологическая активность	0,81	0,004
		Противоэксзематическая активность	0,806	0,017
		Иммунодепрессантная активность	0,782	0,007
		Антитоксическая активность	0,755	0,004
		Противопсориазная активность	0,751	0,004
		Агонист апоптоза	0,753	0,011
		Противозудная активность	0,705	0,008
Изофусостерол		Гиполипемическая активность	0,873	0,005
		гепатопротекторная активность	0,797	0,004
		Противоэксзематическая активность	0,793	0,02
		Иммунодепрессантная активность	0,779	0,008
		Противозудная активность	0,752	0,005
		Дерматологическая активность	0,742	0,005
		Противогрибковая активность	0,634	0,015
		противопсориазная активность	0,621	0,009
Противовоспалительная активность	0,575	0,037		

Таблица 45- Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений класса терпены с использованием PASS-online

Название вещества	Структурная формула	Вид биологической активности	Pa	Pi
D-лимонен		Ветрогонная активность	0,961	0,001
		Противоэксзематическая активность	0,896	0,005
		Противоопухолевая активность	0,812	0,01
		Дерматологическая м	0,716	0,007
		Противопсориазная активность	0,641	0,007
		Противопаразитарная активность	0,614	0,008



		Антимикробактериальная активность	0,61	0,009
		Противовоспалительная активность	0,61	0,029
		Противогрибковая активность	0,582	0,02
Камфен		Противоэксзематическая активность	0,882	0,006
		Сердечно-сосудистый аналептик	0,816	0,004
		Лечение фобических расстройств	0,782	0,04
		Дерматологическая активность	0,726	0,006
		Педикулицидная активность	0,631	0,004
		Противопсориазная активность	0,585	0,012
		Лечение алопеции	0,567	0,028
		Аналептическая активность	0,512	0,029

Как видно из представленных выше данных, мажоритарные компоненты сельдерея могут с высокой долей вероятности проявлять различную биологическую активность и использоваться как для системных расстройств, так и для терапии дерматологических заболеваний. Особенно обращает на себя внимание последняя группа патологий, поскольку для всех анализируемых групп веществ прогнозируется дерматологическая, противоэксзематическая, противопсориазная виды активности. Кроме того, для производных бутилфталида и терпенов возможна противогрибковая активность, а противозудная характерна для фитостеролов и фталидов.

Таким образом, можно сделать вывод о целесообразности использования липофильной фракции сельдерея пахучего в качестве средства для наружного применения при лечении дерматологических заболеваний. Липофильная фракция черешков сельдерея является потенциальным лекарственным кандидатом для терапии псориаза, экземы и других кожных заболеваний, сопровождающихся зудом и воспалительными реакциями.

*5.2.2. Выбор оптимальной методики выделения липофильной фракции из черешковой ботанической формы сельдерея пахучего.*

Для разработки эффективной методики выделения липофильной фитосубстанции из растительного сырья сельдерея был определен оптимальный растворитель (таблица 46, рисунок 53), соотношение сырье-растворитель (таблица 47) и количество циклов экстракции. Критерием «оптимальности» было выбрано количественное содержание сенкиунолида А, который по данным прогностической оценки обладает наиболее ценными для дерматологической ЛФ эффектами, а также количество соэкстрактивных веществ.

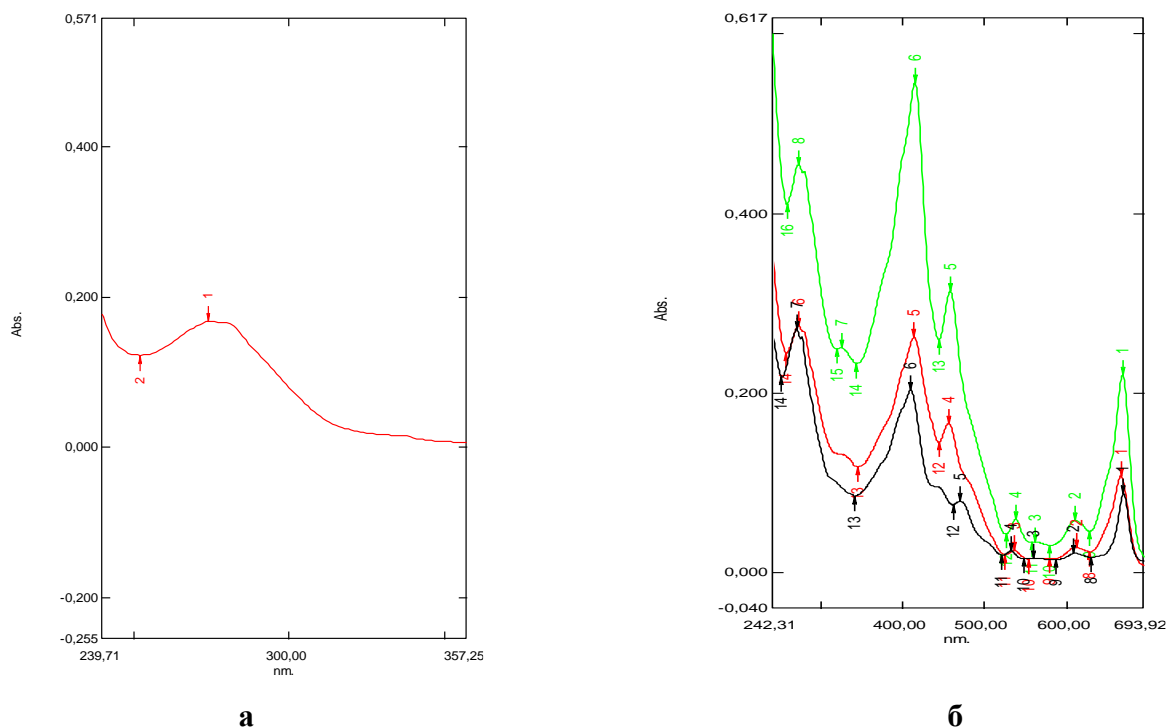


Рисунок 53 - Результаты определения оптимального растворителя для получения липофильной фракции: а – УФ-спектр СО сенкиунолида А (0,01 мг/мл), б – УФ-спектры извлечений сельдерея (зеленый - хлорформ, красный - дихлорметан, черный - гексан)

Таблица 46 - Выбор оптимального растворителя для извлечения липофильной фракции

Растворитель	Гексан	Дихлорметан	Хлороформ
Количественное содержание суммы фталидов в пересчете на сенкиунолида А, %	0,16±0,01	0,17±0,01	0,26±0,01

Как видно из данных таблицы, для выделения липофильной фракции сельдерея черешкового оптимально использовать хлороформ в качестве растворителя в связи с его наибольшей экстрактивной способностью.

Таблица 47 - Выбор оптимального соотношения сырье : экстрагент

Соотношение	1:5	1:7	1:10	1:15
Количественное содержание суммы фталидов в пересчете на сенкиунолида А, %	0,23 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,39 ± 0,13

Как видно из представленных данных, наиболее эффективное соотношение растворителя к сырью составило 1:15. Для определения оптимального количества циклов экстракции, к точной навеске (около 15 г сырья) добавляли 225 мл хлороформа, экстрагировали на водяной бане с обратным холодильником в течении двух часов (1 цикл). Полученное извлечение фильтровали под вакуумом и количественно переносили в мерную колбу номиналом 250 мл, доводили хлороформом до метки. 1,0 мл полученного извлечения переносили в мерную колбу номиналом 10 мл и измеряли оптическую плотность раствора. К оставшемуся шроту добавляли новую

порцию растворителя и экстракцию повторяли до обесцвечивания сырья и отсутствия максимумов поглощения на спектре. В качестве оптимального количества, было выбрано 4 цикла экстракции.

Таким образом, была разработана следующая методика выделения липофильной фракции: около 30 г (точная навеска) высушенного и измельченного сырья сельдерея черешкового помещали в круглодонную колбу на 1000 мл и экстрагировали 450 мл хлороформа, полученное извлечение фильтровали и упаривали на ротационном испарителе. Экстракцию повторяли четырежды, полученные извлечения объединяли и упаривали досуха. Полученный сухой остаток перерастворяли в вазелиновом масле в соотношении 1:50. Выбор вазелинового масла в качестве растворителя обусловлен несколькими факторами: во-первых, оно способно растворить труднорастворимые липофильные вещества фракции, кроме того, вазелиновое масло характеризуется инертностью по отношению к ним, а также.

Масса сухого остатка, полученного после упаривания хлороформа, была около 1 г ( $0,995 \pm 0,055$ ), что составляет около 3,3 % от сырья. После перерастворения, концентрация липофильной фракции в вазелиновом масле составляла около 2,0 %.

### *5.2.3. Выбор и нормирование показателей качества липофильной фракции и разработки проекта НД на ее основе.*

Проект НД для полученной фитосубстанции представлен в приложении Ж. В таблице 48 отражены результаты контроля качества раствора липофильной фракции сельдерея черешкового в вазелиновом масле.

Таблица 48 – Спецификация фитосубстанции на основе липофильной фракции сельдерея черешкового

Показатель качества	Метод	Норма
Описание	Органолептический	Легко подвижная жидкость темно-зеленого цвета с характерным запахом производящего растения.
Растворимость	ФЕАЭС	Очень легко растворима или легко растворима в хлороформе, практически нерастворима в воде и спирте этиловом 96%.
Подлинность	ФЕАЭС Спектрофотометрия	Наблюдаются максимумы поглощения при длинах волн $275 \pm 2$ нм и $668 \pm 2$ нм
Плотность	ФЕАЭС «Плотность», метод 1	От 0,80 до 0,90

Кислотное число	ФЕАЭС «Кислотное число», метод 2	Не более 1
Остаточные органические растворители	ФЕАЭС «Остаточные органические растворители»)	Содержание хлороформа не должно превышать 60 ppm
Микробиологическая чистота	ФЕАЭС «Микробиологическая чистота»	Категория 3.2
Количественное определение	Спектрофотометрия	Содержание суммы фталидов в пересчете на сенкиунолид А не менее 1 мг/мл
Хранение	В хорошо укупоренной таре, в защищенном от света месте при температуре не выше 15°C	

*5.2.4. Концепция разработки мягкой лекарственной формы на основе фитосубстанции липофильной фракции сельдерея черешкового*

Исходя из прогностической оценки биологической активности (раздел 5.2.1) липофильная фракция сельдерея пахучего может быть предложена в качестве основного компонента средства для наружного применения. Таким образом, на основе полученной фитосубстанции может быть разработана мягкая лекарственная форма для терапии и профилактики кожных заболеваний, включая псориаз, дерматит, ожоги.

Ввиду липофильной природы основных компонентов фракции, растворенных в вазелиновом масле, перспективной лекарственной формой выступает эмульгель, так как повышает биодоступность активных соединений. Теоретический состав эмульгеля включает липофильную фракцию, гелеобразователь (например, карбопол), эсульгатор (например, сорбитан стеарат) в составе масляной фазы, а также воду очищенную, эмульгатор (например, твин 20) и консервант (например, калия сорбат).

Концепция разработки эмульгеля на основе полисахаридных фракций сельдерея представлена на рисунке 54.

Проект НД сельдерея пахучего черешковой разновидности трава – сырьё для разработки фитосубстанции, представлен в приложении 3.



Рисунок 54 – Концепция разработки мягкой лекарственной формы на основе липофильной фракции сельдерея черешкового

### Выводы по главе 5

1. Разработка фитосубстанций на основе полисахаридов является актуальным направлением современных исследований. ВРПС и ПВ корневой формы сельдерея - перспективные кандидаты для разработки ингредиента функционального питания. Был выбран наиболее эффективный способ выделения фитосубстанций, подобраны показатели качества и проведено их нормирование.
2. На модели лептин-дефицитных мышей, страдающих ожирением и сахарным диабетом 2 типа, доказано положительное влияние ВРПС и ПВ сельдерея на динамику массы тела (снижение на 14,2 % относительно контрольной группы после 4 недель приема) и уровень жира в организме (снижение на 15,5 % относительно контрольной группы после 4 недель приема). Данные результаты позволяют позиционировать фитосубстанцию на основе ВРПС и ПВ сельдерея как средство для профилактики ожирения.
3. Результаты разработки фитосубстанции на основе сельдерея пахучего позволили сформировать теоретическую концепцию получения готового продукта – БАД в виде

порошка для приготовления коктейл, способствующего регуляции метаболизма. Данный продукт отличается рядом преимуществ, поскольку имеет натуральный растительный состав, доказательную базу и культивируется на территории Российской Федерации (Краснодарский край), что позволяет нивелировать экономические издержки и повлиять на уменьшение цены конечного продукта.

4. Было проведено прогнозирование биологической активности мажоритарных соединений липофильной фракции сельдерея черешкового. Результаты 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 противоэкземное, противопсориатическое, противовоспалительное и др. Полученные результаты позволяют сформировать дальнейший вектор исследования в отношении разработки мягкой лекарственной формы на основе липофильной фракции сельдерея пахучего. Таким образом, актуальность разработки фитосубстанции на основе липофильной фракции сельдерея черешкового обоснована.
5. Экспериментально доказано, что для выделения липофильной фракции оптимальным растворителем является хлороформ (в соотношении 1:15). После проведения циклов экстракции, масса сухого остатка фракции составляла около 2,6 % от массы исходного сырья и растворялась в 40 граммах вазелинового масла, которое было выбрано в качестве оптимального носителя фитосубстанции.
6. Были выбраны и нормированы показатели качества раствора липофильной фракции в вазелиновом масле: описание, растворимость, подлинность, количественное определение, остаточные органические растворители, перекисное число, плотность, микробиологическая чистота.
7. Результаты разработки фитосубстанции на основе липофильной фракции сельдерея позволили сформировать теоретическую концепцию разработки готового продукта на ее основе – эмульгеля для наружного применения в терапии дерматологических заболеваний.

## 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 превалирующим 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 превалировало 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 СОКРАЩЕНИЙ**

- АД – артериальное давление
- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- АСТ – аспаргатаминотрансфераза
- АЭС-ИП - атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой
- БАВ - биологически активные вещества
- БАД - биологически активные добавки
- ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
- ВРПС – водорастворимые полисахариды
- ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
- ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации
- ГХ - газовая хроматография
- ГХ/МС - газовая хроматография с масс-спектрометрией
- ИЛ – интерлейкин
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛПВП – липопротеины высокой плотности
- ЛНПН – липопротеины низкой плотности
- ЛР - лекарственное растение
- ЛРС - лекарственное растительное сырье
- НД - нормативная документация
- ПВ – пектиновые вещества
- ПО – программное обеспечение
- ПФ – подвижная фаза
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СО - стандартный образец
- СРПС – спирторастворимые полисахариды
- ТСХ - тонкослойная хроматография

ТФУ – трифторуксусная кислота

УФ-СФМ – спектрофотометрия в ультрафиолетовой области

ФНО – фактор некроза опухоли

ФС – фармакопейная статья

ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2

АМПК – adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase – аденозин-5'-монофосфат-активируемая протеинкиназа

GLUT4 – glucose transporter member 4 – переносчик глюкозы типа 4

MCP-1 – monocyte Chemoattractant Protein 1 – моноцитарный хемотаксический фактор

MIP-1 $\beta$  – macrophage inflammatory protein - макрофагальный воспалительный белок

SRB1 – scavenger receptor B type 1 – рецептора-мусорщика B типа 1

SREBP-1c – sterol regulatory element-binding protein 1 – белок, связывающий регуляторные элементы стеролов

STAT-3 - signal transducer and activator of transcription 3 - преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3

UCP1 – uncoupling Protein 1 – белок-разобщитель-1

PAI-1 – plasminogen activator inhibitor-1 – ингибитор активации плазминогена 1 типа

PGC-1 $\alpha$  – peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator – пролифератор пероксисомы- $\gamma$ -ко-активатора-1 $\alpha$

PM-GLUT4 – plasma membrane glucose transporter type 4 – переносчик глюкозы плазматической мембраны типа 4

PPAR- $\gamma$  – proliferator-activated receptor gamma – гамма-рецептор, активирующий пролифератор пероксисомы

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaachouay, N. Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development / N. Chaachouay, L. Zidane // *Drugs and Drug Candidates*. – 2024. – Vol. 3(1). – P. 184-207. DOI: <https://doi.org/10.3390/ddc3010011>
2. Указ Президента Российской Федерации от 01.12.2016 г. № 642 О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.kremlin.ru/acts/bank/4144910/11/2023> (дата обращения - 10.01.2024 г.)
3. ГОСТ Р 52349-2005 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения (с Изменением N 1). – М.: Издательство стандартов, 2008. – 12 с.
4. Программа фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) [Электронный ресурс] // Правительство Российской Федерации распоряжение от 31 декабря 2020 г. № 3684-р. – Режим доступа: <http://static.government.ru/media/files/skzOODEvyFOIBtXobzPA3zTyC71cRAOi.pdf> (дата обращения - 04.05.2024 г.)
5. Рынок БАДов и витаминов в условиях санкций: перспективы развития биодобавок в 2022 году [Электронный ресурс] // Деловой профиль. – Режим доступа: <https://delprof.ru/press-center/open-analytics/rynok-badov-i-vitaminov-v-usloviyakh-sanktsiy-perspektivy-razvitiya-biodobavok-v-2022-godu/> (дата обращения – 23.03.2024 г.)
6. Nayak, S.N. Omics Technologies to Enhance Plant Based Functional Foods: An Overview // S.N. Nayak, B. Aravind, S.S. Malavalli [et. al.] / *Front. Genet.* – 2021. – Vol. 12. – P. 742095. DOI: 10.3389/fgene.2021.742095
7. Global Herbal Medicine Market Overview [Электронный ресурс] // Market research future. – Режим доступа: <https://www.marketresearchfuture.com/reports/herbal-medicine-market-3250> (дата обращения - 04.05.2024 г.)
8. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Том 1. Сорты растений. [Электронный ресурс] / ФГБУ Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений. – Режим доступа: [https://gossortrf.ru/wp-content/uploads/2020/03/FIN\\_reestr\\_dop\\_12\\_03\\_2020.pdf](https://gossortrf.ru/wp-content/uploads/2020/03/FIN_reestr_dop_12_03_2020.pdf) (дата обращения 05.04.2024)
9. Молчанова, А.В. Биохимическая характеристика сортов петрушки различных разновидностей (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ex A.W. Hill.) / А.В. Молчанова, Н.А. Голубкина, А.А. Кошеваров [и др.] // *Овощи России*. – 2019. Т. (3). – Стр. 74-79. DOI: <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-3-74-79>
10. ГОСТ Р 51074-2003 Продукты пищевые. Информация для потребите. Общие требования. – М.: Издательство стандартов, 2006. – 41 с.

11. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902320560>
12. ГОСТР 55577— 2013 Продукты пищевые функциональные. Информация об отличительных признаках и Эффективности. – М.: Издательство стандартов, 2014. – 23 с.
13. Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 N 61-ФЗ [Электронный ресурс] – Режим доступа: [https://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_99350/](https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/) (дата обращения – 11.03.2024 г.)
14. Реестр продуктов питания [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://foodreestr.ru/> (дата обращения – 05.05.2024 г.)
15. Единый реестр свидетельств о государственной регистрации [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://portal.eaeunion.org> – Дата обращения 05.05.2024 г.
16. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx> (дата обращения: 05.05.2024).
17. Ожирение и избыточная масса тела [Электронный ресурс] // ВОЗ. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (дата обращения – 05.05.2024 г.)
18. Дедов, И.И. Ожирение. Клинические рекомендации. / И.И. Дедов, Н.Г. Мокрышева, Г.А. Мельниченко [и др.] // *Consilium Medicum*. – 2021. – Т. 23, №4. –С. 311–325. DOI: 10.26442/20751753.2021.4.200832
19. Шабутдинова, О.Р. Семаглутид — эффективность в снижении веса и побочные эффекты при применении по данным исследований SUSTAIN, PIONEER, STEP / О.Р. Шабутдинова, А.Р. Даутов, А.А. Самков [и др.] // *Проблемы Эндокринологии*. – 2023. – Т. 69, №3. – С. 68-82. DOI: <https://doi.org/10.14341/probl13197>
20. Su, T. Apigenin inhibits STAT3/CD36 signaling axis and reduces visceral obesity / T. Su, C. Huang, C. Yang [et. al.] // *Pharmacol Res*. – 2020. – Vol. 152. – P. 104586. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104586.
21. Li, S. Mechanistic insights into the inhibition of pancreatic lipase by apigenin: inhibitory interaction, conformational change and molecule docking studies / S. Li, X. Hu, J. Pan, [et. al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol. 335. – P. 116505. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116505>
22. Feng, X. Activation of PPAR $\gamma$  by a Natural Flavonoid Modulator, Apigenin Ameliorates Obesity-Related Inflammation Via Regulation of Macrophage Polarization / X. Feng, D. Weng, F. Zhou [et. al.] // *EbioMedicine*, - 2016. – Vol. 9. – P. 61-76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.017>.

23. Lv, Y. Apigenin ameliorates HFD-induced NAFLD through regulation of the XO/NLRP3 pathways / Y. Lv, X. Gao, Y. Luo [et. al.] // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2019. – Vol. 71. – P. 110-121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.015>.
24. Baek, Y. Luteolin reduces adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in postmenopausal obese mice / Y. Baek, M. N. Lee, D. Wu, M. Pae // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2019. – Vol. 71. – P. 72-81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.06.002>.
25. Kwon, E. Y. Luteolin Targets the Toll-Like Receptor Signaling Pathway in Prevention of Hepatic and Adipocyte Fibrosis and Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice / E. Y. Kwon, M. S. Choi // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 10(10). – P. 1415. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10101415>
26. Bian, Y. Kaempferol reduces obesity, prevents intestinal inflammation, and modulates gut microbiota in high-fat diet mice / Y. Bian, J. Lei, J. Zhong, [et. al.] // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2022. – Vol. 99. – P. 108840. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108840>.
27. Li, S. Kaempferol inhibits the activity of pancreatic lipase and its synergistic effect with orlistat / S. Li, J. Pan, X. Hu, [et. al.] // *Journal of Functional Foods*. Vol. 72. – 2020. – P. 104041. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104041>
28. Alkhalidy, H. Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice / H. Alkhalidy, W. Moore, A. Wang [et. al.] // *The Journal of nutritional biochemistry*. – Vol. 58. – P. 90–101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.014>
29. Pei, Y. Effect of quercetin on nonshivering thermogenesis of brown adipose tissue in high-fat diet-induced obese mice / Y. Pei, D. Otieno, I. Gu [et. al.] // *The Journal of Nutritional Biochemistry* (2020), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108532>
30. Dong, J. Quercetin reduces obesity-associated ATM infiltration and inflammation in mice: a mechanism including AMPK $\alpha$ 1/SIRT1[S] / J. Dong, Z. Zhang, L. Zhang [et. al.] // *Journal of Lipid Research*. – 2014. – Vol. 55(3). – P. 363-374. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.M038786>
31. Sudhakar, M. Chlorogenic acid promotes development of brown adipocyte-like phenotype in 3T3-L1 adipocytes / M. Sudhakar, S. J. Sasikumar, S. Silambanan [et. al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2020. – Vol. 74. – P. 104161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104161>.
32. Bhandarkar, N. S. Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats / N. S. Bhandarkar, L. Brown, S. K. Panchal // *Nutr Res*. – 2019. – Vol. 62. – P. 78-88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.002>
33. Wang, Z. Chlorogenic acid alleviates obesity and modulates gut microbiota in high-fat-fed mice / Z. Wang, K. L. Lam, J. Hu [et. al.] // *Food science & nutrition*. – 2019. – Vol. 7(2). – P. 579–588. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.868>

34. Xu, J. Caffeic acid reduces body weight by regulating gut microbiota in diet-induced-obese mice / J. Xu, J. Ge, X. He [et. al.] // *Journal of functional foods*. – 2020. – Vol. 74. – P. 104061. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104061
35. Mu, H.-N. Caffeic acid prevents non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet through gut microbiota modulation in mice / H.-N. Mu, Q. Zhou, R.-Y. Yang [et. al.] // *Food Research International*. – 2021. – Vol. 143. – P. 110240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110240>.
36. Kim, H. M. Caffeic acid ameliorates hepatic steatosis and reduces ER stress in high fat diet-induced obese mice by regulating autophagy / H. M. Kim, Y. Kim, E. S. Lee [et. al.] // *Nutrition*. – 2018. – Vol. 55–56. – P. 63-70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.03.010>
37. Yoon, D.S. effects of p-coumaric acid against high-fat diet-induced metabolic dysregulation in mice / D. S. Yoon, S. Y. Cho, H. J. Yoon [et. al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 142. – P. 111969. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111969>.
38. Nguyen, L.V. p-Coumaric Acid Enhances Hypothalamic Leptin Signaling and Glucose Homeostasis in Mice via Differential Effects on AMPK Activation / L.V. Nguyen, K.D.A. Nguyen, C.T. Ma [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol.22(3). – P. 1431. DOI: 10.3390/ijms22031431
39. Ham, J. R. Anti-obesity and anti-hepatosteatosis effects of dietary scopoletin in high-fat diet fed mice / J. R. Ham, H.-I. Lee, R.-Y. Choi [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2016. – Vol. 25. – P. 433-446. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.026>.
40. Jang, J.H. Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells / J.H. Jang, J.E. Park, J.S. Han // *Nutrition Research*. – 2019. Vol. – 74. – P. 52-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.12.003>
41. Lee, H.I. Scopoletin prevents alcohol-induced hepatic lipid accumulation by modulating the AMPK-SREBP pathway in diet-induced obese mice / H.I. Lee, K.W. Yun, K.I. Seo [et al.] // *Metabolism*. – 2014. – Vol. 63(4). – P. 593-601. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.01.003.
42. Sim, M.-O. Long-term supplementation of esculetin ameliorates hepatosteatosis and insulin resistance partly by activating AdipoR2–AMPK pathway in diet-induced obese mice / M.-O. Sim, H.-I. Lee, J. R. Ham [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – Vol. 15. – P. 160-171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.014>.
43. Kim, Y. Esculetin, a coumarin derivative, suppresses adipogenesis through modulation of the AMPK pathway in 3T3-L1 adipocytes / Y. Kim, J. Lee // *Journal of Functional Foods*. – Vol. 12. - 2015. – P. 509-515. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.004>.
44. Babu, S. Beta-sitosterol attenuates insulin resistance in adipose tissue via IRS-1/Akt mediated insulin signaling in high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic rats / S. Babu, M. Krishnan, P. Rajagopal [et al.] // *Eur J Pharmacol*. – 2020. – Vol. 15;873. – P. 173004. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173004.

45. Gumedde, N.M. B-sitosterol shows potential to protect against the development of high-fructose diet-induced metabolic dysfunction in female rats / N.M. Gumedde, B.W. Lembede, R.L. Brooksbank [et al.] // *J. Med. Food.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1089
46. Feng, S. Intake of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet / S. Feng, Z. Dai, A.B. Liu [et al.] // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* – 2018. – Vol. 1863(10). – P. 1274-1284. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.08.004.
47. Wang, J. Anti-diabetic activity of stigmasterol from soybean oil by targeting the GLUT4 glucose transporter / J. Wang, M. Huang, J. Yang [et al.] // *Food & Nutrition Research.* – 2017. – Vol. 61. P. 1. DOI: 10.1080/16546628.2017.1364117
48. Khateeb, S. Regulatory effect of diosgenin on lipogenic genes expression in high-fat diet-induced obesity in mice / S. Khateeb, A. Albalawi, A. Alkhedaide // *Saudi J Biol Sci.* – 2021. – Vol. 28(1). – P. 1026-1032. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.11.045.
49. Yu, L. Diosgenin alleviates hypercholesterolemia via SRB1/CES-1/CYP7A1/FXR pathway in high-fat diet-fed rats / L. Yu, H. Lu, X. Yang [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2021. – Vol. 1. – P. 412:115388. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115388.
50. Binesh, A. Atherogenic diet induced lipid accumulation induced NF $\kappa$ B level in heart, liver and brain of Wistar rat and diosgenin as an anti-inflammatory agent / A. Binesh, S.N. Devaraj, D. Halagowder // *Life Sci.* – 2018. – Val. 196. – P. 28-37. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.01.012.
51. Li, Y.C. Associations of dietary phytosterols with blood lipid profiles and prevalence of obesity in Chinese adults, a cross-sectional study / Y.C. Li, C.L. Li, R. Li [et al.] // *Lipids Health Dis.* -2018. – Val. 17(1). – P.54.
52. Fatima, J. Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat accumulation / Fatima J. Zapata, Miguel Rebollo-Hernanz, Jan E. [et al.] // *Journal of Functional Foods.* – 2020. – Vol. 64. – P. 103646. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103646>.
53. Dangol, M. Anti-obesity effect of a novel caffeine-loaded dissolving microneedle patch in high-fat diet-induced obese C57BL/ 6J mice / M. Dangol, S. Kim, C. G. Li [et al.] // *Corel.* – 2017. – Vol. 265. – P.41-47. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.400
54. Panchal, S.K. Caffeine attenuates metabolic syndrome in diet-induced obese rats / S. K. Panchal, W.-Y. Wong, K. Kauter [et al.] // *Nutrition.* – 2012. -Vol. 28(10). – P. 1055-1062, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.02.013>.
55. Kumar, V. Mucin secretory action of capsaicin prevents high fat diet-induced gut barrier dysfunction in C57BL/6 mice colon / V. Kumar, V. Kumar, N. Mahajan [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – Vol. 145. – P. 112452. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112452.



56. Li, W. Capsaicin alleviates lipid metabolism disorder in high beef fat-fed mice / W. Li, H. Yang, Y. Lu *Journal of Functional Foods*. – 2019. – Vol. 60. – P. 103444. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103444>.
57. Bhattacharjee, K. Berberine is as effective as the anti-obesity drug Orlistat in ameliorating betel-nut induced dyslipidemia and oxidative stress in mice / K. Bhattacharjee, M. Nath, Y. Choudhury // *Phytomedicine plus* 1. – 2021. – Vol. 3. P. 100098. DOI: 10.1016/j.phyplu.2021.100098
58. Han, Y.B. // Berberine ameliorates obesity-induced chronic inflammation through suppression of ER stress and promotion of macrophage M2 polarization at least partly via downregulating lncRNA Gomafu / Y.B. Han, M. Tian, X.X. Wang [et al.] // *Int Immunopharmacol*. – 2020. – Val. 86. – P. 106741. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106741.
59. Wang, L. Berberine alleviates adipose tissue fibrosis by inducing AMP-activated kinase signaling in high-fat diet-induced obese mice / L. Wang, X. Ye X, Hua Y, Song Y. // *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. – 2018. – Vol. – 105. – P. 121-129. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.05.110.
60. Qiu, Y. Berberine treatment for weight gain in patients with schizophrenia by regulating leptin rather than adiponectin / Y. Qiu, M. Li, Y. Zhang [et al.] // *Asian Journal of Psychiatry*. – 2022. – Vol. 67. – P. 102896. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2021.102896>.
61. Yao, Y. Berberine attenuates the abnormal ectopic lipid deposition in skeletal muscle / Y. Yao, H. Yuan, X. Zhang [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 65. – P. 66-75 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.028>.
62. Fan, J. Nuciferine prevents hepatic steatosis associated with improving intestinal mucosal integrity, mucus-related microbiota and inhibiting TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway in high-fat induced rats / J. Fan, J. Sun, T. Li [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2022. – Vol. 88. – P. 104859. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104859>.
63. Du, X. Nuciferine protects against high-fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance via activating TFEB-mediated autophagy–lysosomal pathway / X. Du, C. D. Malta, Z. Fang [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2022. – Vol. 12(6). – P. 2869-2886,. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.12.012>.
64. Zhou, Y. Nuciferine reduced fat deposition by controlling triglyceride and cholesterol concentration in broiler chickens / Y. Zhou, Z. Chen, Q. Lin [et al.] // *Poultry Science*. – 2022. – Vol. 99(12). – P. 7101-7108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.013>.
65. Wang, T. Polysaccharides from *Lyophyllum decastes* reduce obesity by altering gut microbiota and increasing energy expenditure / T. Wang, J. Han, H. Dai [et al.] // *Carbohydrate Polymers*, - 2022. – Vol. 295. – P. 119862. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119862>.

66. Li, Y. The crude guava polysaccharides ameliorate high-fat diet-induced obesity in mice via reshaping gut microbiota / Y. Li, D. Bai, Y. Lu [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 213. – P. 234-246. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.130>.
67. Liang, J. Study on the interventional effects of Polygonatum cyrtonema polysaccharides on high-fat-diet-induced obese model mice through serum and liver metabolomics / J. Liang, W. Chen, K. Zong [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2022. – Vol. 95. – P. 105160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105160>.
68. Zeng, L. Polygonatum sibiricum polysaccharides protect against obesity and non-alcoholic fatty liver disease in rats fed a high-fat diet / L. Zeng, F. Zhong, Z. Chen [et al.] // *Food Science and Human Wellness*. – 2022. – Vol. 11(4). – P. 1045-1052. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.03.031>.
69. Zhu, Z. Polysaccharide from Agrocybe cylindracea prevents diet-induced obesity through inhibiting inflammation mediated by gut microbiota and associated metabolites / Z. Zhu, R. Huang, A. Huang [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 209(A) – P. 1430-1438. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.107>.
70. Tian, D. Therapeutic effect and mechanism of polysaccharides from Anoectochilus Roxburghii (Wall.) Lindl. in diet-induced obesity / D. Tian, X. Zhong, L. Fu [et al.] // *Phytomedicine*. – 2022. – Vol. 99. – P. 154031. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154031>.
71. Xie, F. Polysaccharides from Enteromorpha prolifera improves insulin sensitivity and promotes adipose thermogenesis in diet-induced obese mice associated with activation of PGC-1 $\alpha$ -FNDC5/irisin pathway / F. Xie, T. Zou, J. Chen [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2022. – Vol. 90. – P. 104994. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104994>.
72. Li, J. The anti-obesity effects exerted by different fractions of Artemisia sphaerocephala Krasch polysaccharide in diet-induced obese mice / J. Li, H. Jin, X. Yan [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 182. – P. 825-837. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.070>.
73. Ren, F. Ganoderma amboinense polysaccharide prevents obesity by regulating gut microbiota in high-fat-diet mice / F. Ren, C. Meng, W. Chen [et al.] // *Food Bioscience*. – 2021. – Vol. 42. – P. 101107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101107>.
74. Агроэкологический атлас России и сопредельных государств: сельскохозяйственные растения, их вредители, болезни и сорняки. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.agroatlas.ru/ru/content/related/Apium\\_graveolens/index.html](http://www.agroatlas.ru/ru/content/related/Apium_graveolens/index.html) (дата обращения: 03.06.2021)
75. WFO Plant List [Электронный ресурс]. <https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-0000540626-2023-12?page=1> (дата обращения – 01.01.2024 г.)

76. Портал открытых данных Сельдерей прочих, кроме сельдерея корневого, свежий или охлажденный | Импорт и Экспорт | 2022 TrendEconomy [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://trendeconomy.ru/data/commodity\\_h2/070940](https://trendeconomy.ru/data/commodity_h2/070940) (дата обращения: 01.01.2024 г.)
77. Агарарный форум [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://agriexpert.ru/articles/177/proizvodstvo-seldereya-v-rossii-nabiraet-oboroty> (дата обращения – 01.01.2024 г.)
78. Агросервер [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://agroserver.ru/selderey/p1-country-7.htm> (дата обращения – 01.01.2024 г.)
79. Tan, T.Y.C. Neurological Applications of Celery (*Apium graveolens*): A Scoping Review. / T.Y.C. Tan, X.Y. Lim, N.A. Norahmad [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 2,28(15). – P. 5824. DOI: 10.3390/molecules28155824.
80. Alobaidi, S. Antihypertensive Property of Celery: A Narrative Review on Current Knowledge / S. Alobaidi, E. Saleh // *Int J Food Sci*. – 2024. – Vol. 12. – P. 9792556. DOI: 10.1155/2024/9792556.
81. Kooti, W. The effect of celery (*Apium graveolens* L.) on fertility: A systematic review / W. Kooti, M. Moradi [et. al.] // *J Complement Integr Med*. – 2017. – Vol. 6;15(2):/j/jcim.2018.15.issue-2/jcim-2016-0141/jcim-2016-0141.xml. DOI: 10.1515/jcim-2016-0141.
82. Hedayati, N. Beneficial effects of celery (*Apium graveolens*) on metabolic syndrome: A review of the existing evidences / Hedayati, N., Bemani Naeini M, Mohammadinejad A, Mohajeri SA. // *Phytother Res*. – 2019. Vol. 33(12). – P. 3040-3053. DOI: 10.1002/ptr.6492.
83. Lin, L.Z. Detection and quantification of glycosylated flavonoid malonates in celery, Chinese celery, and celery seed by LC-DAD-ESI/MS / S. Lu, J.M. Harnly // *J Agric Food Chem*. – 2007. – Vol.55(4). – P. 1321-6. DOI: 10.1021/jf0624796.
84. Nićetin, M. Celery Root Phenols Content, Antioxidant Capacities and Their Correlations after Osmotic Dehydration in Molasses / M. Nićetin, L. Pezo, M. Pergal [et. al.] // *Foods*. – 2022. – Vol. 11(13). – P. 1945. doi: 10.3390/foods11131945.
85. Atalar, N.A. Determination of Phenolic Components of *Apium graveolens* (Celery) Seeds M. / N. Atalar, M. Karadağ, M. Koyuncu [et. al.] // abstract book of Aromatic Plants and Cosmetics symposium. – Turkey, 2019. – P. 31.
86. Wolski, T. Evaluation of content and composition of phenolic acids and tannins in leaf dry matter of two celery cultivars (*apium graveolens* l. Var. Dulce mill.) / T. Wolski, J. Dyduch, PAN K. N. Ogrodniczych, A. Barbara N. // *Pers*. – 2002. – Vol. 5(1). – P. 01.
87. Fazal, S.S. Isolation of 3-n-Butyl Phthalide & Sedanenolide from *Apium graveolens* Linn. / S. S. Fazal, M. M. Ansarib, R. K Singlac, S. Khan // *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Vol. 2(3). – P. 258-261. DOI:10.35652/IGJPS.2012.32

88. Garg, S. K. Coumarins from *Apium graveolens* seeds / S. K. Garg, S. R. Gupta, N. D. Sharma // Journal article: *Phytochemistry*. – 1979. – Vol. 18. No. 9. – P. 1580-1581 ref. 9
89. Najda, A. Identification and Profile of Furanocoumarins from the Ribbed Celery (*Apium Graveolens* L Var. *Dulce Mill.* / Pers.) / A. Najda, J. Dyduch, K. Świca [et. al.] // 2015. – Vol. 21 (1). – P. 67-75.
90. Petrova I. Isolation of Pectic Polysaccharides from Celery (*Apium graveolens* var. *rapaceum* D. C.) and Their Application in Food Emulsions / I. Petrova, N. Petkova, K. Kyobashieva [et. al.] // *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special*. – 2014. – Vol. 2. – P. 1818-1824.
91. Sarmanovna, T.Z. Phytochemical Study of Odorous Celery Root (*Apium graveolens* L.) Grown in the North Caucasus / T.Z. Sarmanovna // *Pharmacog J*. – 2019. – Vol.11(3). – P. 527-30.
92. Ovodova, R. G. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks / R.G. Ovodova, V.V. Golovchenko, S.V. Popov, G.Yu. Popova // *Food Chemistry*. – 2009. – 114(2). – P. 610-615.
93. Saini, R.K. Phytosterol Profiling of Apiaceae Family Seeds Spices Using GC-MS / R.K. Saini, M.H. Song, J.W. Yu, X. Shang, Y.S. Keum // *Foods*. – 2021. – Vol. 10(10). – P. 2378. DOI: 10.3390/foods10102378.
94. Fazal, S. S. Isolation of 3-n-Butyl Phthalide & Sedanenolide from *Apium graveolens* Linn. / S. S. Fazala, M. M. Ansarib [et. al.] // *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. Vol. 2. – P. 258-261. DOI: 10.35652/IGJPS.2012.32.
95. Sun, Y. Characterization of Volatile Organic Compounds in Five Celery (*Apium graveolens* L.) Cultivars with Different Petiole Colors by HS-SPME-GC-MS / Y. Sun, M. Li, X. Li X [et. al.] // *Int J Mol Sci*. – 2023. – Vol. 24(17). – P. 13343. DOI: 10.3390/ijms241713343. PMID: 37686147; PMCID: PMC10488006.
96. Salimi, F. Phenolic contents, composition and antioxidant activity of essential oils obtained from Iranian populations of *Apium graveolens*, and their canonical correlation with environmental factors / F. Salimi, M. Fattahi, J. Hamzei // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2022. – Vol. 101. – P. 104394. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104394>.
97. Singh, M. Mineral Content Variation in Leaves, Stalks, and Seeds of Celery (*Apium graveolens* L.) Genotypes / M. Singh, U. Nara, N. Rani [et. al.] // *Biol Trace Elem Res*. – 2023. – Vol. 201(5). – P. 2665-2673. DOI: 10.1007/s12011-022-03359-4.
98. Пшукова, И.В. Фитохимическое изучение и оценка фармакологической активности водных извлечений травы сельдерея пахучего / И. В. Пшукова, С. А. Кулешова // *Химия растительного сырья*. – 2012. – Т. 3. – С. 207-212.
99. Yao, Y. Phenolic composition and antioxidant activities of 11 celery cultivars / Y. Yao, W. Sang, M. Zhou, G. Ren // *J Food Sci*. – 2010. - 75(1). – P. 9-13. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01392.x.

100. Shayani, R. M. Effect of celery (*Apium graveolens*) seed extract on hypertension: A randomized, triple-blind, placebo-controlled, cross-over, clinical trial / R. M. Shayani, M. Moohebati, S.A. Mohajeri // *Phytother Res.* – 2022. – Vol. 36(7). – P. 2889-2907. DOI: 10.1002/ptr.7469.
101. Hessami, K. Treatment of women's sexual dysfunction using *Apium graveolens* L. Fruit (celery seed): A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial / K. Hessami, T. Rahnavard, A. Hosseinkhani [et. al.] // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2021. – Vol. 264. – P. 113400, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113400>.
102. Mohsenpour, M.A The effect of celery (*Apium graveolens*) powder on cardiometabolic factors in overweight/obese individuals with type 2 diabetes mellitus: A pilot randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial / Mohsenpour M.A, Samadani M., Shahsavani Z. [et. al.] // *Food Sci Nutr.* – 2023. – Vol. 11(9). P. 5351-5363. DOI: 10.1002/fsn3.3493.
103. Grube, K. Antiadhesive phthalides from *Apium graveolens* fruits against uropathogenic *E. coli* / K. Grube, V. Spiegler, A. Hensel // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2019. – Vol. 237. – P. 300-306, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.024>.
104. Powanda, M.C. Celery Seed and Related Extracts with Antiarthritic, Antiulcer, and Antimicrobial Activities / M.C. Powanda, M.W. Whitehouse, K.D. Rainsford // *Prog Drug Res.* – 2015. – Vol. 70. – P. 133-53. DOI: 10.1007/978-3-0348-0927-6\_4. PMID: 26462366.
105. Jia, L. Total flavonoids from celery suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and bone resorption function via attenuating NF- $\kappa$ B and p38 pathways in RAW264.7 cells / L. Jia, L. Shi, J. Li [et. al.] // *Journal of Functional Food.* – 2020. – Vol. 69. – P. 103949. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103949>.
106. Ahmed, S.S.T. Comparative study of the chemical composition and anti-proliferative activities of the aerial parts and roots of *Apium graveolens* L. (celery) and their biogenic nanoparticles / S. S. T. Ahmed, J. R. Fahim, K. A. Youssif, [et. al.] // *South African Journal of Botany.* – 2022. – Vol. 151, Part B. – P. 34-45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.002>.
107. Lau, H. Evaluation of Anti-Inflammatory Effects of Celery Leaf and Stem Extracts in LPS-Induced RAW 264.7 Cells Using Nitric Oxide Assay and LC-MS Based Metabolomics / H. Lau, N. Ni, H. Dayal [et. al.] // *Curr Issues Mol Biol.* – 2021. – Vol. 43(3). P. 1876-1888. DOI: 10.3390/cimb43030131.
108. Уильям, Э. Сок сельдерея. Природный эликсир энергии и здоровья / Э. Уильям. – М: Эксмо, 2019. – 299 с.
109. A. A. Boligon<sup>1</sup>, A. A Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts - Mini Review / A. A. Boligon<sup>1</sup>, M. L. Athayde<sup>1</sup> // *Austin Chromatogr.* – 2014. – Vol. 1, № 3. – P. 2.

110. Kumar, B. R. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). / B. R. Kumar // *J Pharm Anal.* – 2017. – Vol. 7, № 6. – P. 349-364. DOI: 10.1016/j.jpha.2017.06.005.
111. Bardakci, H. Simultaneous quantification of six flavonoids in four *Scutellaria* taxa by HPLC-DAD method / H. Bardakci, E. T. Acar, H. Kırmızıbekmez // *Revista Brasileira de Farmacognosia.* – – Vol. 29(1). – P. 17-23. DOI:10.1016/j.bjp.2018.09.006
112. Dubber, M. J. High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in *Ginkgo biloba* solid oral dosage forms / M. J. Dubber, I. Kanfer // *J Pharm Pharm Sci.* – 2004. – Vol. 7, № 3. – P. 303-9.
113. Сипкина, Н. Ю. Обнаружение и определение некоторых фенольных и коричных кислот в растительных экстрактах / Н. Ю. Сипкина, Ю. А. Скорик // *Журнал аналитической химии.* – 2015. – Т. 70(11). – С. 1224–122
114. Wang, S. Simultaneous Determination of 12 Coumarins in Bamboo Leaves by HPLC / S. Wang, F. Tang, Y. Yue [et al.] // *Journal of AOAC INTERNATIONAL.* – 2013. – Vol. 96(5). – P. 942–946. DOI: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-441>
115. Orhan, E. Cholinesterase, tyrosinase inhibitory and antioxidant potential of randomly selected Umbelliferous plant species and chromatographic profile of *Heracleum platytaenium* Boiss. And *Angelica sylvestris* L. var. *sylvestris* / E. Orhan, F. Tosum, K. Skalicka-Woźniak // *J. Serb. Chem. Soc.* – 2016. – V. 81. – P. 1–13
116. Oniszczyk, A. Comparison of Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid–Solid Extraction Methods Followed by Solid-Phase Extraction in the Analysis of Selected Furanocoumarins from *Pimpinella* Roots by HPLC–DAD / A. Oniszczyk, M. Waksmundzka-Hajnos, R. Podgórski, R. [et. al.] // *Acta Chromatographica.* – 2015. – Vol. 27(4). – P. 687–696. DOI: 10.1556/Achrom.27.2015.4.7
117. Fibigr, J. A. UHPLC method for the rapid separation and quantification of phytosterols using tandem UV/Charged aerosol detection – A comparison of both detection techniques / Fibigr J., Šatínský D., Solich P. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2017. – Vol. 140. – P. 274–280. DOI:10.1016/j.jpba.2017.03.057
118. De Figueiredo, L. C. Development of an ultrasound assisted method for determination of phytosterols in vegetable oil / L. C. De Figueiredo, E. G. Bonafe, A.F. Martins [et. al.] // *Food Chemistry.* – 2018. Vol. 240. – P. 441–447. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.07.140
119. Kamgang Nzekoue, F. Development of an innovative phytosterol derivatization method to improve the HPLC-DAD analysis and the ESI-MS detection of plant sterols/stanols / F. Kamgang Nzekoue, G. Caprioli, M. Ricciutelli [et. al.] // *Food Research International.* – 2020. – Vol. 131. P. 108998. DOI:10.1016/j.foodres.2020.108998

120. Wang, Q. HPLC evaluation on 3-n-butylphthalide distribution / Q. Wang, S. Li, P. Liu // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2012. – Vol. 2 (10). – P. 016-020. DOI: 10.7324/JAPS.2012.21003
121. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. [Электронный ресурс] / МЗ РФ. – 2024. Т. 1. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopeia.regmed.ru/> (дата обращения 10.05.2024).
122. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. [Электронный ресурс] / МЗ РФ. – 2024. Т. 1. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopeia.regmed.ru/> (дата обращения 10.05.2024).
123. Thuy, H.L.T. Deproteinization in purification of exopolysaccharide from *Ophiocordyceps sinensis* olive oil-stimulated culture / H.L.T. Thuy, C.H. Bao // *International Journal of Agricultural Technology*. – 2018. – Vol. 14(7). – P. 2151. DOI:10.1515/hf-2017-0170
124. Oberlerchner, J.T. A matrix-resistant HPTLC method to quantify monosaccharides in wood-based lignocellulose biorefinery streams / J.T. Oberlerchner // *Holzforschung*. – 2018. – Vol. 72(8). – P. 645-652. DOI:10.1515/hf-2017-0170
125. Тюкавкина, Н.А. Органическая химия: учебник / Н.А. Тюкавкина, В. Л. Белобородов, С. Э. Зурабян, И.А. Селиванова, А.П. Лузин, Н.Н. Артемьева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 640 с.
126. Купцов, А.Х. Фурье-КР и Фурье-ИК спектры полимеров / А. Х. Купцов, Г. Н. Жижин. – Москва: Техносфера, 2013. – 696 с.
127. Казицына, Л.А. Куплетская Н.Б. Применение УФ, ИК, ЯМР спектроскопии в органической химии / Л. А. Казицына, Н.Б. Куплетская. – М.: издательство Московского университета, 1968. – 829 с.
128. Hong, T. Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective / T. Hong, J.Y. Yin, S.P. Nie // *Food chemistry*. – 2021. – Vol. 12. – P. 100168.
129. PASS Online [Электронный ресурс]. <https://www.way2drug.com/passonline/> (дата обращения – 02.06.2024 г.)
130. Ганжара, Н. Ф. Геология и ландшафтоведение / Н. Ф. Ганжара, Р. Ф. Байбеков, О. С. Бойко. – М.: Т-во науки, изданий КМК, 2007. – 380 с. + 56 с. вкл
131. Wang, Y. Multi-fingerprint and quality control analysis of tea polysaccharides / Y. Wang, J. Xian, X. Xi, X. Wei // *Carbohydr Polym*. – 2013. – Vol. 92(1). – P. 583-90. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.09.004
132. Li, B. Evaluation of properties of apigenin and [G-3H] apigenin and analytic method development / B. Li, D.H. Robinson, D.F. Birt // *J Pharm Sci*. – 1997. Val. 86(6). P. 721-5. doi: 10.1021/js960383s

133. Kumar, V. Structural Characterization of Luteolin Glycosides Flavonoids from Indian Plantation White Sugar / V. Kumar // *Oriental Journal of Chemistry*. – 2020. – Vol. 36(4). – P. 773–779. DOI: 10.13005/ojc/360425.
134. Luan, G. Separation and Purification of Five Flavone Glucosides and One Lignan from *Caragana korshinskii* Kom. by the Combination of HSCCC and Semi-preparative RPLC / G. Luan, H. Wang, H. Lv [et al.] // *Chromatographia*. 2016. – Vol. 79. – P. 823–831. DOI:10.1007/s10337-016-3090-4.
135. Yu, Y. Biological Activities and Pharmaceutical Applications of Polysaccharide from Natural Resources: A Review / Y. Yu, M. Shen, Q. Song, J. Xie // *Carbohydr. Polym.* – 2018. – Vol. 183. – P. 91–101. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.009.
136. Afzal, O. Harnessing natural polysaccharides-based nanoparticles for oral delivery of phytochemicals: Knocking down the barriers / O. Afzal, M. Rizwanullah, Altamimi A. S.A. [et. al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2023. – Vol. 82. – P. 104368. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104368.
137. Sukhavattanakul, P. Polysaccharides for Medical Technology: Properties and Applications / P. Sukhavattanakul, P. Pisitsak, S. Ummartyotin, R. Narain // *Macromolecular Bioscience*. – 2023. – Vol. – 23(2). – P. 2200372. DOI: 10.1002/mabi.202200372.
138. Яндекс-патенты. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://yandex.ru/patents>. (дата обращения – 02.02.2024 г.)
139. Lei, W. Phthalides, senkyunolide A and ligustilide, show immunomodulatory effect in improving atherosclerosis, through inhibiting AP-1 and NF- $\kappa$ B expression / W. Lei, Y.F. Deng, X.Y. Hu [et. al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2019. – Vol. 117. – P. 109074. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109074.
140. Zhang, Y. L-3-n-butylphthalide rescues hippocampal synaptic failure and attenuates neuropathology in aged APP/PS1 mouse model of alzheimer's disease *CNS Neurosci* / Y. Zhang, L.J. Huang, S. Shi, S.F. Xu [et. al.] // *Therapy*. – 2016. – Vol. 22. – P. 979-987. DOI: 10.1111/cns.12594
141. Wang, C.Y. DI-3-n-butylphthalide-induced upregulation of antioxidant defense is involved in the enhancement of cross talk between CREB and Nrf2 in an Alzheimer's disease mouse model / C.Y. Wang, Z.Y. Wang, J.W. Xie, T. Wang [et. al.] // *Aging*. – 2016. – Vol. 38. – P. 32-46. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.024
142. He, Z. DI-3-n-butylphthalide attenuates acute inflammatory activation in rats with spinal cord injury by inhibiting microglial TLR4/NF-kappaB signaling / Z. He, Y. Zhou, L. Lin, Q. Wang [et. al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2017. – Vol. 21. – P. 3010-3022. DOI:10.1111/jcmm.13212
143. Reinforcement of barrier function and scalp homeostasis by Senkyunolide A to fight against dandruff / P. Mondon [et al.] // *International Journal of Cosmetic Science*. 2017. V. 39(6). P. 617-621. doi:10.1111/ics.12417



144. Kim, T.Y. Antibacterial Activity of Senkyunolide A Isolated from *Cnidium Officinal* Extract / T.Y. Kim, H.C. Kwon, S.Y. Lee [et. al.] // J Cosmet Sci. 2020 Nov-Dec;71(6):377-383. A review on phytochemical, pharmacological, and pharmacognostical profile of *Wrightia tinctoria*: adulterant of *kurchi*

УТВЕРЖДАЮ  
 Ректор ФГБОУ ВО СГХФУ  
 Минздрава России,  
 д.фарм.н., профессор  
 И.А. Титович

«24» \_\_\_\_\_ 2024 г.






**Акт внедрения  
 результатов научно-практической работы  
 в учебный процесс**

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по учебной работе, канд. фармацевт. наук, доцента	Ю.Г. Ильиновой
и членов комиссии	директора департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук, доцента и.о. начальника учебно-методического отдела	И.А. Титович  А.В. Храбровой

назначенная приказом ФГБОУ ВО СГХФУ Минздрава России от «16» февраля 2024 г. № 184ст, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Сурбеевой Елизаветы Сергеевны на тему «Фитохимическое изучение ботанических форм *Artem graveolens* L. как сырьевого источника пищевых и фармацевтических продуктов», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в контроле качества фенольных веществ растительного происхождения» внедрены в учебный процесс на фармацевтическом факультете по учебной дисциплине «Фармацевтическая химия» в рамках программы высшего образования – программы специалитета по специальности 33.05.01 Фармация очной формы обучения.

Председатель	проректор по учебной работе, канд. фармацевт. наук, доцент		Ю.Г. Ильинова
члены комиссии	директор департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук, доцент и.о. начальника учебно-методического отдела	 	И.А. Титович А.В. Храброва

УТВЕРЖДАЮ  
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ  
Минздрава России,  
д.фарм.н., профессор



И.А. Наркевич

2021 г.




**Акт внедрения  
результатов научно-практической работы  
в научно-исследовательский процесс**

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по научной работе, д-р. фармацевт. наук, профессора	Е.В. Флисюк
и членов комиссии	научного сотрудника департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. фармацевт. наук	К.О. Сидорова
	директора департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук, доцента	И.А. Титович

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем:

Результаты диссертационного исследования Сурбесовой Елизаветы Сергеевны на тему «Фитохимическое изучение ботанических форм *Artem graveolens* L. как сырьевого источника пищевых и фармацевтических продуктов», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, использовано в научно-исследовательской деятельности кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках выделения и очистки полисахаридных фракций из растительных объектов, установления структуры и стандартизации полученных фитосубстанций.

Председатель	проректор по научной работе, д-р. фармацевт. наук, профессор		Е.В. Флисюк
члены комиссии	научный сотрудник департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. фармацевт. наук		К.О. Сидоров
	директор департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук, доцент		И.А. Титович

«С.Ж.Асфендияров атындағы  
Қазақ ұлттық медицина  
университеті» коммерциялық  
емес акционерлік  
қоғамы



Некоммерческое  
акционерное общество  
«Казахский национальный  
медицинский университет  
имени С.Д.Асфендиярова»

050012, Алматы қаласы, Төле би көшесі, 94 үй  
телефон: +7/727/292-78-85, 292-79-37, 338-70-30  
факс: +7/727/292-13-88, e-mail: info@kaznmu.kz

050012, город Алматы, улица Төле би, д.94  
телефон: +7/727/292-78-85, 292-79-37, 338-70-30  
факс: +7/727/292-13-88, e-mail: info@kaznmu.kz

УТВЕРЖДАЮ  
Декан Школы фармации  
КазНМУ им. С.Д.Асфендиярова  
д.фарм.н., профессор

З.Б. Сакипова  
«06» 12 2023 г.

### Акт внедрения результатов научно-исследовательской работы в учебный и научный процесс

**Наименование предложений для внедрения:** подходы к получению и стандартизации (методики выделения, очистки, количественной оценки азотистых соединений и изучения мономерного состава) полисахаридных фракций, сформулированные при выполнении диссертационной работы «*Фитохимическое изучение ботанических форм *Apium graveolens L.* как сырьевого источника пищевых и фармацевтических продуктов*». Результаты представлены в следующих публикациях:

- 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 // Conference Handbook «The 4<sup>th</sup> Belt & Road International Conference on Traditional Medicine and 2021 Symposium on the Chinese Medicinal Materials», Dec. 14-17, 2021 Huazhong Agricultural University, China. – 2022. – P. 112-113
- Е.С. Сурбеева, И.И. Тернинко. Разработка фитосубстанции на основе полисахаридных фракций сельдерея пахучего как потенциального компонента специализированного питания. 1-й Международный форум «Asfen.Forum, новое поколение – 2023». Астана, 2023. С. 203
- Ефремова У.А., Сурбеева Е.С., Тернинко И.И. Получение и предварительный скрининг фракций бав сельдерея листового. Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО. 2023. С. 189-193
- Комова С.И., Сурбеева Е.С., Тернинко И.И. Подходы к анализу и контролю качества растительных полисахаридов как потенциальных лекарственных средств и БАД. Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и



аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО. 2023. С. 213-219

**Авторы разработки:** *Сурбеева Елизавета Сергеевна*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко Инна Ивановна*, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

**Где и куда внедрено:** использовано в образовательной деятельности кафедры фармацевтической, токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники Школы фармации КазНМУ при изучении подходов к получению, фитохимической оценке и стандартизации полисахаридных фракций ЛР и полисахаридов, как класса БАВ, в курсе лекций и практических занятий дисциплин «Общие методы исследования и анализа лекарственных средств», «Стандартизация лекарственных средств» (специальность 5В110300-«Фармация») и в научной деятельности кафедры.

**Результаты внедрения:** методики выделения и изучения полисахаридных фракций, предложенные авторами, воспроизводимы, просты, экспрессны. Данные, полученные в результате исследования, способствуют расширению базовых знаний о полисахаридах, как классе БАВ и систематизируют подходы к их стандартизации. Новый объект – пищевая культура сельдерея посевного – способствует расширению ассортимента потенциальных лекарственных растительных кандидатов.

И.О. Заведующей кафедры

«Фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники»

Школы Фармации

КазНМУ им. С.Д. Асфендиевовой

К.х.н., доцент




А.Л. Ахелова



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке, инновациям и  
цифровизации ФГБОУ ВО «ВГУ»,  
д-р физ.-мат. наук, доц.

  
Д.В. Костин  
«08» декабря 2023 г.

**Акт внедрения  
результатов научно-исследовательской работы  
в учебный и научный процесс**

**Наименование предложений для внедрения:** подходы к контролю качества (методика совместного определения кумаринов и фуранокумаринов методом ВЭЖХ) кумаринов в растительном сырье, полученные при выполнении диссертационной работы «*Фитохимическое изучение ботанических форм *Apium graveolens* L. как сырьевого источника пищевых и фармацевтических продуктов*». Результаты представлены в следующих публикациях:

- Сурбеева Е.С., Шуракова В.С., Ефремова У.А., Тернинко И.И. Разработка оптимальной методики количественного определения фуранокумаринов методом ВЭЖХ. Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО. 2023. С. 327-332

**Автор разработки:** *Сурбеева Елизавета Сергеевна*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Тернинко Инна Ивановна, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

**Где и куда внедрено:** использовано в образовательной деятельности кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» при изучении применимости метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в фитохимическом анализе и стандартизации растительного сырья, содержащего кумарины, а также при изучении анализа допустимых примесей на примере токсичных веществ класса кумаринов, в курсе лекций и лабораторных занятий при изучении дисциплины «Фитохимический анализ и стандартизация лекарственного растительного сырья», (специальность 33.05.01 «Фармация») и в научной деятельности кафедры.

**Результаты внедрения:** методика ВЭЖХ-анализа кумаринов, предложенная авторами, является воспроизводимой, экспрессной и ресурсосберегающей. Данные, полученные в результате исследования, способствуют расширению базовых знаний о ВЭЖХ как методе анализа, а также о кумаринах, как классе БАВ и систематизируют подходы к контролю качества и стандартизации растительного сырья. Исследование нового объекта – пищевой культуры *Apium graveolens* L. – способствует расширению ассортимента специализированных и функциональных продуктов питания на его основе.

Заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»,  
д-р.фарм.наук, проф.



А.И. Сливкин



ПРАВИТЕЛЬСТВО САНКТ-ПЕТЕРБУРГА  
КОМИТЕТ ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ

Санкт-Петербургское государственное  
бюджетное учреждение здравоохранения  
«Северо-Западный центр по контролю  
качества лекарственных средств»

Ленинский пр., д. 140, Санкт-Петербург, 198216  
Тел./факс: (812) 376-97-89  
E-mail: szckklis@zdrav.spb.ru

ОКПО 27530269 ОКОГУ 2300229 ОГРН 1037811001513  
ИНН/КПП 7805063359/780501001

5/4 № 29.11.2023

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложений для внедрения:** «Количественная методика определения хлорогеновой кислоты в растительном сырье *Arium graveolens* L. методом ВЭЖХ», разработанная в процессе выполнения диссертационной работы «Фитохимическое изучение ботанических форм *Arium graveolens* L. как сырьевого источника пищевых и фармацевтических продуктов». Результаты представлены на XXIV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2023.

Surbeeva E.S., Komova S.I., Efremova U.A., Nevedyuk K.S., Shurakova V.S., Terninko I.I.  
HPLC analysis of chlorogenic acid in food cultures for varietal definition benefits. Proceeding of the congress XXIV International Congress PHYTOPHARM May 25 – 27, 2023 St. Petersburg. 2023 P. 103

**Автор разработки:** *Сурбеева Елизавета Сергеевна*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко Инна Ивановна*, д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

**Где и куда внедрено:** использовано в практической деятельности СПб ГБУЗ «СЗЦККЛС» при проведении количественного анализа хлорогеновой кислоты в растительном сырье.

**Результаты внедрения:** методика контроля содержания хлорогеновой кислоты, предложенная авторами, воспроизводима, проста, экспрессна и прошла процедуру проверки пригодности хроматографической системы по параметрам «Относительное стандартное отклонение времени удерживания пика стандартного образца», «Относительное стандартное отклонение площадей пика стандартного образца», «Число теоретических тарелок», «Фактор асимметрии пика»

Начальник ИЛ СПб ГБУЗ «СЗЦККЛС»



Сергеева А.В.





Қазақстан Республикасы,  
Есік к., Маметова к-сі, 25,  
Алматы қ.,  
Ләтифа Хамиди кеш-сі, 113

Республика Казахстан,  
г. Есік, ул. Маметова 25,  
г. Алматы,  
ул. Ләтифа Хамиди, 113

Republic of Kazakhstan,  
Mametova st. 25, Esik,  
Latiya Hamidi st.,  
Almaty

+7 (727) 297 27 00  
+7 (727) 297 27 01  
+7 (727) 297 29 99  
www.fitoleum.kz

«07» 12 2023 г.  
М.П.

«ФИТОЛЕУМ» УТВЕРЖДАЮ  
Директор ТОО «ФитОлеум»  
Сармухамедова О.В.

### АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложений для внедрения:** методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в растительном сырье методом спектрофотометрии, полученная при выполнении диссертационной работы «Фитохимическое изучение ботанических форм *Apium graveolens* L. как сырьевого источника пищевых и фармацевтических продуктов». Результаты представлены на международной научной конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, 2021) и XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО (Санкт-Петербург, 2023)

Сравнительный анализ содержания апигенина в различных сортах сельдерея листового / Е. С. Сурбеева, И. И. Тернинко, Ю. Э. Генералова, С. И. Комова // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения : Сборник материалов IX Международная научная конференция молодых учёных, Москва, 16–17 декабря 2021 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2021. – С. 389-397. – DOI 10.52101/9785870191027\_2021\_389

Неведюк, К. С. Выбор оптимальных условий пробоподготовки УФ-спектрофотометрического определения суммы флавоноидов для оценки сортовых преимуществ сельдерея листового / К. С. Неведюк, Е. С. Сурбеева, И.И. Тернинко // Молодая фармация - потенциал будущего : Итоги конкурсной программы научных работ XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием. Сборник материалов конференции, Санкт-Петербург, 01 марта – 11 2023 года. – Санкт-Петербург: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2023. – С. 274-279.

**Автор разработки:** Сурбеева Елизавета Сергеевна, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Тернинко Инна Ивановна, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».



Где и куда внедрено: использовано в производственной деятельности ОКК ТОО «ФитОлеум» (Республика Казахстан) в рамках проведения контроля качества растительного сырья на предмет наличия флавоноидов.

Результаты внедрения: методика спектрофотометрического анализа суммы флавоноидов в пересчете на апигенин, предложенная авторами, является воспроизводимой экспрессной, ресурсосберегающей и применима в условиях ОКК предприятия. Она дает возможность оценить количественное содержание суммы флавоноидов в растительном сырье.

Руководитель ОКК, начальник НПКАЛ  
ТОО «ФитОлеум»

Балагазиева С.А.

«07» 12 2023 г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Первичные результаты ГХ/МС анализа липофильных фракций ботанических форм сельдерея пахучего

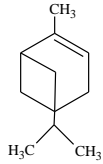
Таблица 1 - БАВ, обнаруженные в липофильной фракции черешковой ботанической формы сельдерея пахучего

№	tR	Коэффициент совпадения*	Наименование вещества	Класс соединения	%
1.	7,04	933	$\alpha$ -туйон	Терпены	0,31
2.	7,52	854	Камфен	Терпены	0,53
3.	8,37	847	Бета-мирцен	Терпены	$\leq 0,35$
4.	9,37	920	3-карен	Терпены	0,32
5.	10,04	883	D-лимонен	Терпены	<b>1,41</b>
6.	10,26	900	$\alpha$ -пинен	Терпены	0,38
7.	11,02	859	$\gamma$ -терпинен	Терпены	$\leq 0,35$
8.	14,9	909	Эндо-борнеол	Терпены	$\leq 0,35$
9.	18,72	885	Изоборнеола ацетат	Терпены	<b>1,94</b>
10.	23,11	859	Транс-кариофиллен	Терпены	0,29
11.	25,23	883	$\beta$ -селинен	Терпены	$\leq 0,35$
12.	29,77	Не идентифицирован		-	0,51
13.	30,05	Не идентифицирован		-	0,36
14.	31,03	Не идентифицирован		-	1,95
15.	31,51	886	Сенкиунолид	Производные бензофурана	<b>3,32</b>
16.	31,71	962	3-изобутилиденфталид	Производные бензофурана	<b>5,61</b>
17.	32,29	907	Цис-неокнидилид	Производные бензофурана	<b>3,39</b>
18.	34,81	898	Фитол	Терпены	1,44
19.	37,79	811	Пальмитиновая кислота	Жирные кислоты	0,38
20.	39,76	809	Бергаптен	Фуранокумарины	0,38
21.	43,51	850	Изопимпинелин	Фуранокумарины	
22.	45,21	Не идентифицирован		-	1,04
23.	47,12	948	Гександиовой кислоты моно(2-этилгексилвый) эфир	Эфиры жирных кислот	6,42
24.	48,62	821	E,E-1,9,17-докасаatriен	Непредельные углеводороды	3,31
25.	51,21	Не идентифицирован		-	0,6
26.	51,49	824	Токоферол	Витамины	1,92
27.	51,88	Не идентифицирован		-	0,39
28.	52,12	Не идентифицирован		-	2,53
29.	52,22	Не идентифицирован		-	0,55
30.	52,45	Не идентифицирован		жирные кислоты*	1,86
31.	52,72	Не идентифицирован		-	0,49
32.	53,91	Не идентифицирован		Фитостеролы*	<b>2,10</b>
33.	54,02	Не идентифицирован		-	0,88
34.	54,21	Не идентифицирован		-	0,37
35.	54,53	839	Стигмастерол	Фитостеролы	<b>28,95</b>

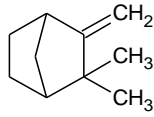
36.	55,03 6	Не идентифицирован	-	2,01
-----	------------	--------------------	---	------

Примечание: \*предположительно

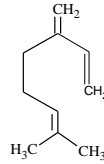
Рисунок 1 – Формулы индивидуальных компонентов, обнаруженных в липофильной фракции черешков сельдерея пахучего



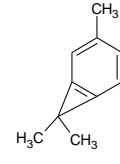
$\alpha$ -туйон (1)



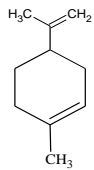
Камфен (2)



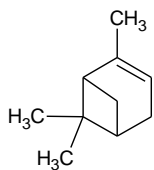
Бета-мирцен (3)



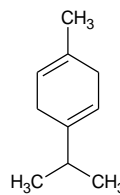
3-карен (4)



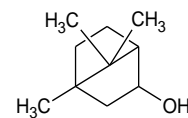
D-лимонен (5)



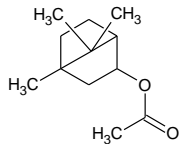
Альфа-пинен (6)



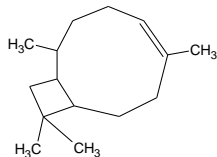
Гамма-терпинен (7)



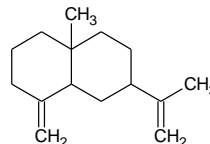
Эндо-борнеол (8)



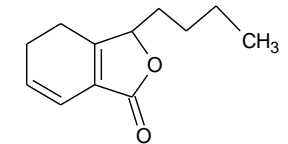
Изоборнеола ацетат (10)



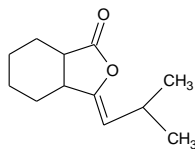
Транс-кариофиллен (11)



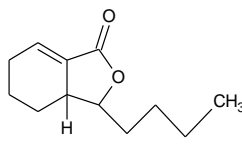
Бета-селинен (12)



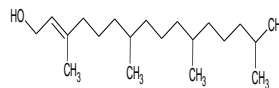
Сенкиунолид (16)



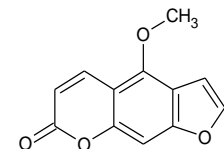
3-Изобутилиденфталид (17)



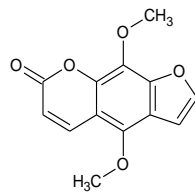
Цис-неокнидилид (18)



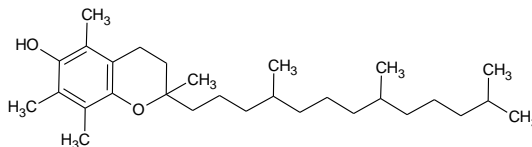
Фитол (19)



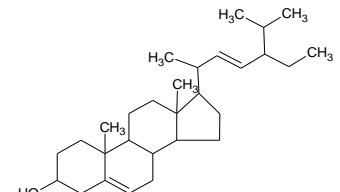
Бергаптен (21)



Изопимпинелин (22)



Токоферол (27)



Стигмастерол (36)

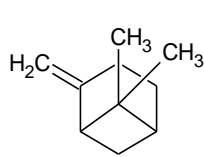
Таблица 2 - БАВ, обнаруженные в липофильной фракции корневой ботанической формы сельдерея пахучего

№	tR		Наименование вещества	Класс соединения	%
	6,04	901	Нонан	Предельный углеводород	≤ 0,12
	8,32	913	2-бета-пинен	Терпены	0,32
	8,68	944	β-мирцен	Терпены	≤ 0,12

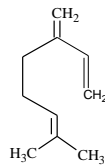
	10,00	932	D-лимонен	Терпены	1,37
	10,21	954	Транс- $\alpha$ -осимен	Терпены	0,14
	10,97	925	$\gamma$ -терпинен	Терпены	0,13
	11,38		Не идентифицирован	-	0,14
	11,81		Не идентифицирован	-	0,59
	14,42	909	5-пентил-циклогекса-1,3-диен	Терпены	0,26
	16,26	965	4-(1-гидроксиэтил) гамма бутанолактон		0,13
	17,51	879	Транс-2-деценал	Альдегиды	0,17
	19,56	952	2-метокси-4-винилфенол	Фенольные соединения	0,28
	23,15	939	Транс-кариофиллен	Терпены	$\leq 0,12$
	25,29	958	$\beta$ -селинен	Терпены	0,20
	29,42	952	Гексагидро-3-бутилфталид	Производные бензофурана	0,13
	29,89	951	Бутилфталид	Производные бензофурана	1,02
	30,15	826	Циклогексен, 3-фенил		0,28
	30,41	912	Бутилиденфталид	Производные бензофурана	0,19
	31,71	940	Сенкиунолид	Производные бензофурана	<b>3,39</b>
	31,88		Не идентифицирован	-	1,35
	32,04	957	Транс-лигустилид	Производные бензофурана	0,44
	32,48	943	Изокнидилид	Производные бензофурана	2,94
	34,45	958	Фикусин	Фуранокумарины	0,46
	35,53	822	N-пентадекановая кислота	Предельные жирные кислоты	3,31
	37,55	969	Скополетин	Кумарины	0,49
	38,35	951	Пальмитиновая кислота	Предельные жирные кислоты	11,04
	38,46		Не идентифицирован	-	0,25
	39,40	960	Метоксален	Фуранокумарины	0,83
	39,79	971	Фалькаринол	Жирный спирт	4,26
	39,95	954	Бергаптен	Фуранокумарины	0,75
	40,51				0,29
	42,21	929	Линолевая кислота	Непредельные жирные кислоты	12,28
	42,28		Не идентифицирован	-	2,58
	42,50		Не идентифицирован	-	0,25
	42,74	817	Стеариновая кислота	Непредельные жирные кислоты	0,54
	42,99		Не идентифицирован	-	0,77
	43,50	43,50	Панксидол	Жирный спирт	15,86
	45,39	916	Глицеридил пальмитат	Эфиры жирных кислот	1,79
	48,89		Не идентифицирован	-	5,79
	48,94		Не идентифицирован	-	1,67

	49,65	Не идентифицирован		-	0,97
	49,65	914	Пальмитин, 2-моно	Эфиры жирных кислот	3,41
	53,22	900	Линолеин, 2-моно	Эфиры жирных кислот	9,92
	53,54	Не идентифицирован		-	1,86
	55,12	Не идентифицирован		-	2,43
	55,57	Не идентифицирован		-	1,29
	56,06	Не идентифицирован		-	1,39
	56,47	890	Сквален	Терпены	2,28
	58,36	Не идентифицирован		-	2,36
	59,69	Не идентифицирован		-	5,17

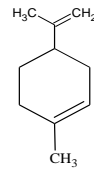
Рисунок 2 - Формулы индивидуальных компонентов, обнаруженных в липофильной фракции корнеплодов сельдерея пахучего



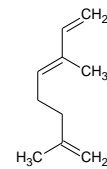
2-бета-пинен (2)



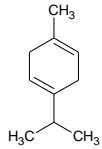
Бета-мирцен (3)



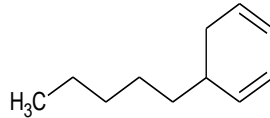
D-лимонен (4)



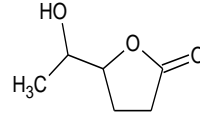
Транс-альфа-осимен (5)



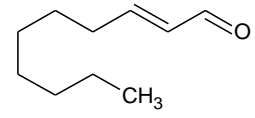
Гамма-терпинен (6)



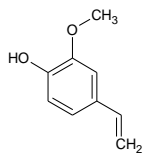
5-пентил-циклогекса-1,3-диен (9)



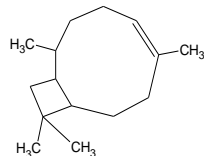
4-(1-гидроксиэтил) гамма бутанолактон (10)



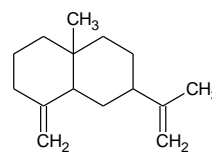
Транс-2-деценал (11)



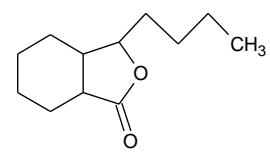
2-метокси-4-винилфенол (12)



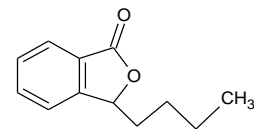
Транс-кариофиллен (14)



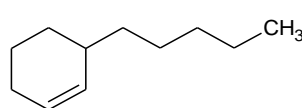
Бета-селинен (15)



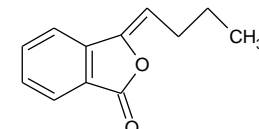
Гексагидро-3-бутилфталид (17)



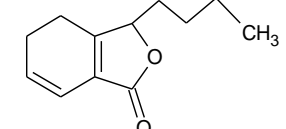
Бутилфталид (18)



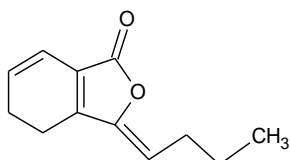
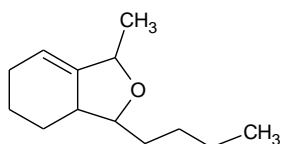
Циклогексен, фенил (19)



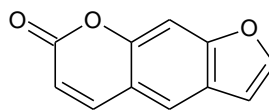
3-Бутиленфталид (20)



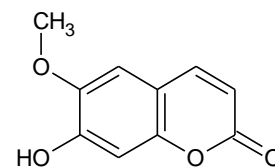
Сенкиунолид (23)

Транс-лигустилид  
(25)

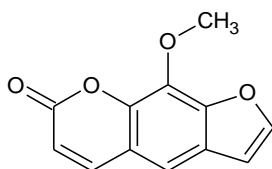
Изокнидилид (26)



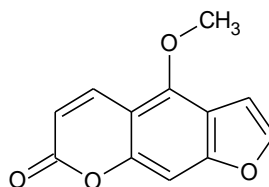
Фикусин (27)



Скополетин (29)



Метоксален (31)

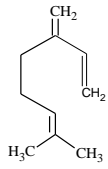


Бергаптен (33)

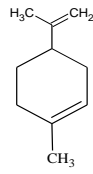
Таблица 3 - БАВ, обнаруженные в липофильной фракции листовой ботанической формы сельдерея пахучего

№			Наименование вещества	Класс соединения	%
	8,72	927	β-мирцен	Терпены	0,16
	10,04	919	D-лимонен	Терпены	0,18
	10,25	890	Транс-бета осимен	Терпены	≤ 0,15
	29,88	976	Бутилфталид	Производные бензофурана	≤ 0,15
	31,64	920	Сенкиулонид	Производные бензофурана	<b>0,88</b>
	31,84	936	Транс-седанолид	Производные бензофурана	≤ 0,15
	34,94	885	Неофитадиен	Непредельные углеводороды	0,16
	38,03	933	Пальмитиновая кислота	Предельные жирные кислоты	3,74
	42,01	941	Линолевая кислота	Непредельные жирные кислоты	18,87
	42,31		Не идентифицирован	-	2,25
	42,58		Не идентифицирован	-	2,36
	43,21		Не идентифицирован	-	1,13
	45,37	810	Глицидил пальмитат	Эфиры жирных кислот	0,83
	48,81	920	Этиллеоленат	Эфиры жирных кислот	4,37
	48,92	862	Метиллеоленат	Эфиры жирных кислот	1,96
	50,61		Не идентифицирован	-	0,31
	52,29		Не идентифицирован	Фитостеролы*	<b>15,03</b>
	52,61		Не идентифицирован	Фитостеролы*	<b>27,34</b>
	53,08	818	Стигмастерол	Фитостеролы	<b>2,60</b>
	53,74	892	Изофусостерол	Фитостеролы	<b>6,94</b>
	55,15		Не идентифицирован	-	1,48
	58,82		Не идентифицирован	-	1,15
	5				

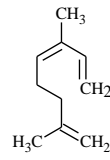
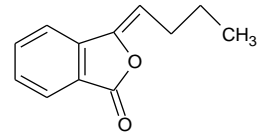
Рисунок 3 - Формулы индивидуальных компонентов, обнаруженных в липофильной фракции листьев сельдерея пахучего



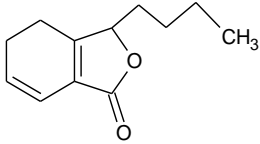
Бета-мирцен (1)



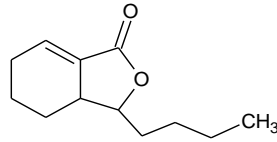
D-лимонен (2)

Транс-бета осимен  
(3)

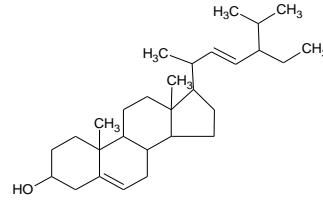
Бутилиденфталид (4)



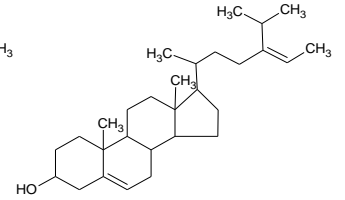
Сенкиунолид (5)



Транс-седанолид (6)



Стигмастерол (16)



Изофустерол (18)

**Отчёт о валидации  
аналитической методики**

«Количественное определение» хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ в траве  
сельдерея листового



## 1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КО – количественное определение

МС – модельная смесь

МР – модельный раствор

СО – стандартный образец

## 2. ВВЕДЕНИЕ




### 2.1. Цель валидации

Предоставить документальное подтверждение, что ВЭЖХ-методика для количественного определения хлорогеновой кислоты в листьях сельдерея пахучего является пригодной для использования в аналитической лаборатории и может быть включена в нормативный документ.

### 2.2. Место проведения валидационных исследований

ЦКП «Аналитический центр» ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

## 3. СОСТАВ ВАЛИДАЦИОННОЙ ГРУППЫ

ФИО	Должность	Область ответственности	Подпись
Сурбеева Е.С.	Химик-аналитик ИЛ (ЦККЛС)	Проведение всего цикла экспериментов, подбор и последующая валидация хроматографических условий анализа, получение и обработка первичных данных, статистическая обработка данных, составление отчета	
Вишняков Е.В.	Химик-аналитик ИЛ (ЦККЛС)	Проведение эксперимента по показателю «Внутрилабораторная сходимост», статистическая обработка данных	
Тернинко И.И.	Начальник ИЛ (ЦККЛС) – руководитель валидационной группы	Разработка дизайна эксперимента, интерпретация полученных данных, составление отчета	

## 4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

### Измерительное оборудование

Жидкостного хроматограф LicArt 62 (ООО «Лабконцепт», Российская Федерация, 2023) с диодно-матричным детектором; зав. № LC084B,

Жидкостного хроматограф Shimadzu LC 20, Япония, 2007) с диодно-матричным детектором, зав. № L20154573449 US

Весы лабораторные электронные CE-224-C, зав. № 29525058,

**Вспомогательное оборудование**

Ультразвуковая ванна «Сапфир» УЗВ-1,3 ТТЦ Зав. № 17724;

Система для подготовки воды Sartorius Agium Mini, зав. № 1000025254

Фильтры мембранные, нейлон, диаметр пор 0,45 мкм

**Сырье:**

Сельдерей пахучий, сорт «Нежный» (место произрастание СНТ Ручей)

**Стандартные образцы:**

СО Хлорогеновой кислоты (Sigma Aldich), срок годности валиден

**Реактивы и материалы:**

Спирт этиловый 96%, пищевой

Вода для ВЭЖХ, свежеполученная

Ацетонитрил, HPLC grade, Fisher Chemical

Трифторуксусная кислота, HPLC grade, Fisher Chemical

**5. ОПИСАНИЕ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ**

*Подвижная фаза (ПФ) А.* 0,05% раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ).

*ПФ Б.* Ацетонитрил

*Испытуемый раствор.* Около 250 мг (точная навеска) измельченного до размера частиц 1,0 мм сырья сельдерея помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой, добавляют 10 мл 70% этанола и закрывают крышкой. Сырье экстрагируют на ультразвуковой ванне «Сапфир» (Россия) в течении 30 минут при температуре 40°C, периодически перемешивая. Полученный раствор фильтруют в мерную колбу номиналом 10 мл через мембранный фильтр диаметром 0,45 мкм и доводят до метки 70% этанолом. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу номиналом 10 мл и доводят до метки водой деионизированной.

*Раствор стандартного образца хлорогеновой кислоты.* Около 10 мг (точная навеска) стандартного образца хлорогеновой кислоты помещают в мерную колбу номиналом 10 мл и растворяют в 96% этаноле. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу номиналом 10 мл доводят до метки 70% этанолом (получают раствор с концентрацией 0,1 мг/мл). 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу номиналом 10 мл и доводят до метки водой деионизированной (получают раствор с концентрацией 0,01 мг/мл).

**Условия хроматографирования:**

колонка	Luna 5 µm C 18(100) Å LC Column 250*4.6 mm, или аналогичная
температура термостата	40°C
скорость потока	1 мл/мин
режим элюирования	0 мин - 12% ПФ В, 20 мин - 30% ПФ В, 23 мин - 12% ПФ Б

длина волны детекции 327 нм

*Проверка пригодности хроматографической системы:*

Эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику хлорогеновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок;

Фактор асимметрии пика (As) хлорогеновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца должен быть не менее 0,8 и не более 1,5;

Относительное стандартное отклонение (RSD) значений времен удерживания ( $t_R$ ) и площадей (S) пика хлорогеновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца не более 2,0 % ( $n \geq 5$ );

Содержание хлорогеновой кислоты (%) в пересчете на абсолютно сухое сырье в сельдерее пахучем рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_x \times a_{CO} \times 1 \times 10 \times 10 \times 10 \times P \times 100}{S_{CO} \times a \times 10 \times 10 \times 1 \times 1 \times (100 - W)}$$

Где  $S_x$  – площадь пика хлорогеновой кислоты в испытуемом растворе;  $S_{CO}$  – площадь пика хлорогеновой кислоты в растворе стандартного образца;  $a$  – масса навески ЛРС сельдерея, мг;  $a_{CO}$  – масса навески стандартного образца хлорогеновой кислоты, мг;  $P$  – содержание хлорогеновой кислоты в СО, %;  $W$  – влажность сырья, %.

## 6. ВЫБОР ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

Для выполнения валидационных испытаний методики ВЭЖХ по показателю «Количественное определение хлорогеновой кислоты» в сырье сельдерея листового получены и обработаны результаты по следующим параметрам: **проверка пригодности хроматографической системы, специфичность, линейность, правильность, сходимость (доверительный интервал правильности отдельного определения), прецизионность (сходимость, внутрилабораторная прецизионность), аналитическая область.** Расчет основных статистических характеристик произведен по формулам, описанным в ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» (ГФ РФ XIV).

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ ВАЛИДАЦИОННЫХ ИСПЫТАНИЙ

### 7.1 Проверка пригодности хроматографической системы

Цель: Доказать, что хроматографические условия пригодны для количественного определения хлорогеновой кислоты.

Критерии приемлемости: На хроматограмме стандартного раствора: эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику СО хлорогеновой кислоты, не менее 5000 теоретических тарелок; фактор асимметрии (As) пика СО хлорогеновой кислоты не менее

0,7 и не более 1,5; относительное стандартное отклонение значений времени удерживания и площади пика СО хлорогеновой кислоты при многократном анализе не более 2 % ( $n \geq 5$ );

Процедура: Для проверки пригодности хроматографической системы готовят раствор СО хлорогеновой кислоты (как описано в методике). Хроматографируют раствор СО в условиях, описанных в методике, не менее 5 раз.

Результаты: Хроматограмма раствора хлорогеновой кислоты представлена на рисунке 1. Значения времен удерживания, площадей пиков, факторов асимметрии и эффективности стандартного раствора представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты хроматографирования раствора СО хлорогеновой кислоты

	tR	S	N	As
СО 1	7,856	535,57	25561,34	0,948
СО 2	7,79	530,014	24774,66	0,943
СО 3	7,762	529,823	25103,49	0,967
СО 4	7,72	532,155	24541,18	0,96
СО 5	7,779	531,853	25943,45	0,975
Среднее значение	7,7814	531,883		
Стандартное отклонение	0,049475	2,31331		
RSD, %	0,635814	0,434928		

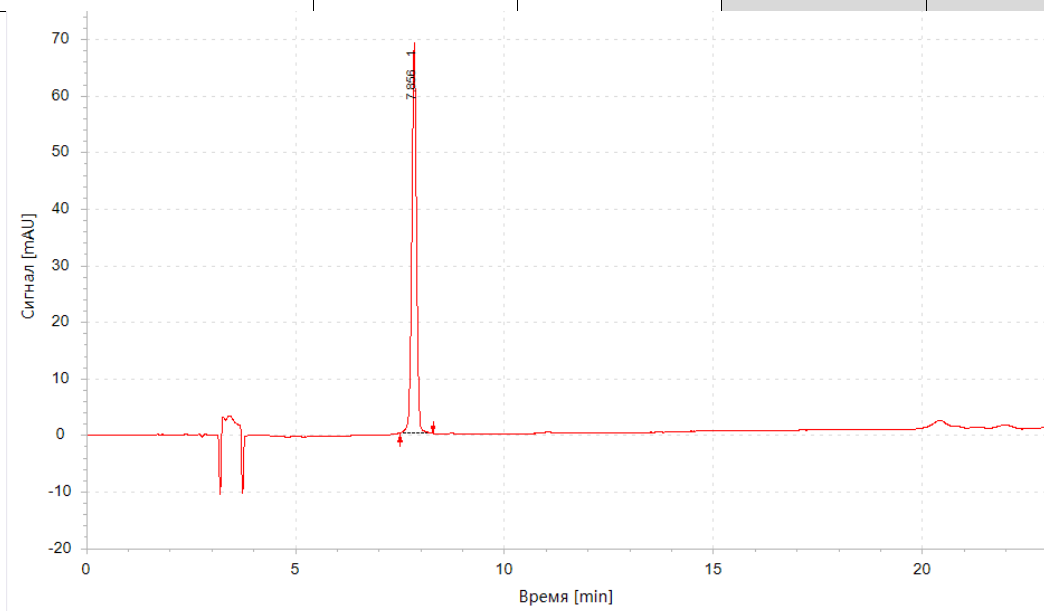


Рис. 1. Хроматограмма СО хлорогеновой кислоты

Выводы: Как видно из данных таблицы, RSD, рассчитанное по временам удерживания и площадям пика СО хлорогеновой кислоты меньше 2,0 %. Эффективность колонки составляет более 5000 теоретических тарелок, а значение фактора асимметрии

пика находится в диапазоне от 0,8 до 1,5. Следовательно, хроматографическая система пригодна.

## 7.2 Специфичность

Цель: Определить способность методики измерять однозначно и селективно содержание хлорогеновой кислоты в присутствии сопутствующих компонентов.

### Критерии приемлемости:

Соответствие УФ-спектра испытуемого и стандартного растворов в области от 200 до 500 нм и наличие максимум поглощения в спектре испытуемого раствора при длине волны  $327 \pm 2$  нм.

Совпадение времен удерживания пиков хлорогеновой кислоты в испытуемом и стандартном растворах.

Отсутствие пика хлорогеновой кислоты на хроматограмме растворителя.

Процедура: Для исследования специфичности готовят растворы СО, испытуемого образца (как описано в методике) и 70% этанола. Хроматографируют раствор СО (не менее 5 раз), раствор испытуемого образца (не менее 5 раз) и раствор этанола 70 % (не менее 3 раз).

Результаты: Значения времен удерживания испытуемого и стандартного растворов представлены в таблице 2. Рисунки УФ-спектров пиков хлорогеновой кислоты в испытуемом и стандартном растворах представлены на рисунке 2. Хроматограмма стандартного и испытуемого образцов – на рисунках 1 и 3, растворителя – на рисунке 4.

Таблица 2. Оценка специфичности по времени удерживания испытуемого и стандартного образцов

№	$t_R$ стандартного образца	$t_R$ испытуемого образца
1	7,856	7,879
2	7,790	7,753
3	7,762	7,737
4	7,720	7,864
5	7,779	7,745
$\bar{X}$	7,781	7,775
SD	0,0495	0,0600
RSD, %	0,64	0,77

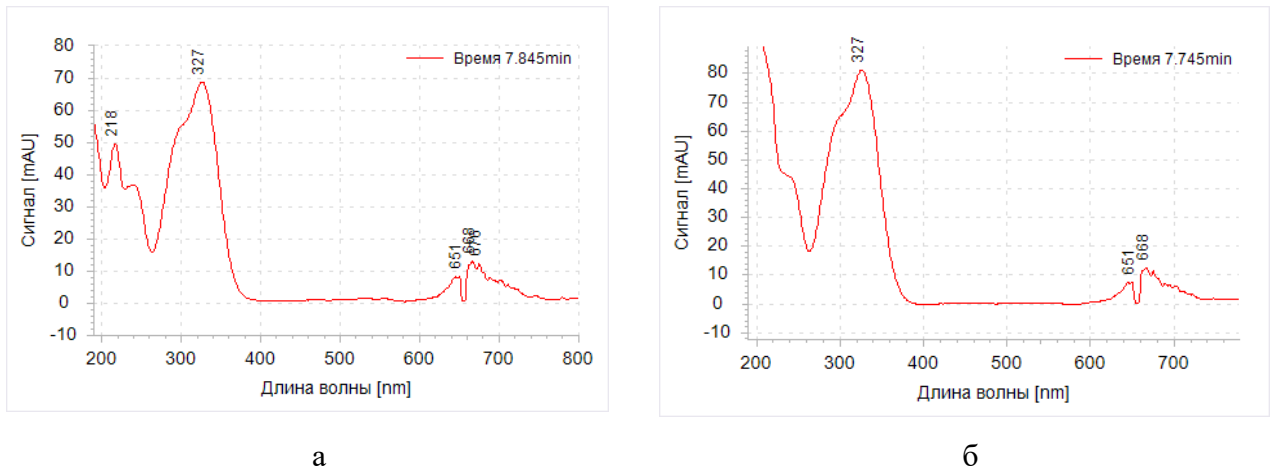


Рисунок 2. УФ-спектр пиков хлорогеновой кислоты в растворе СО (а) и в испытуемом растворе (б)

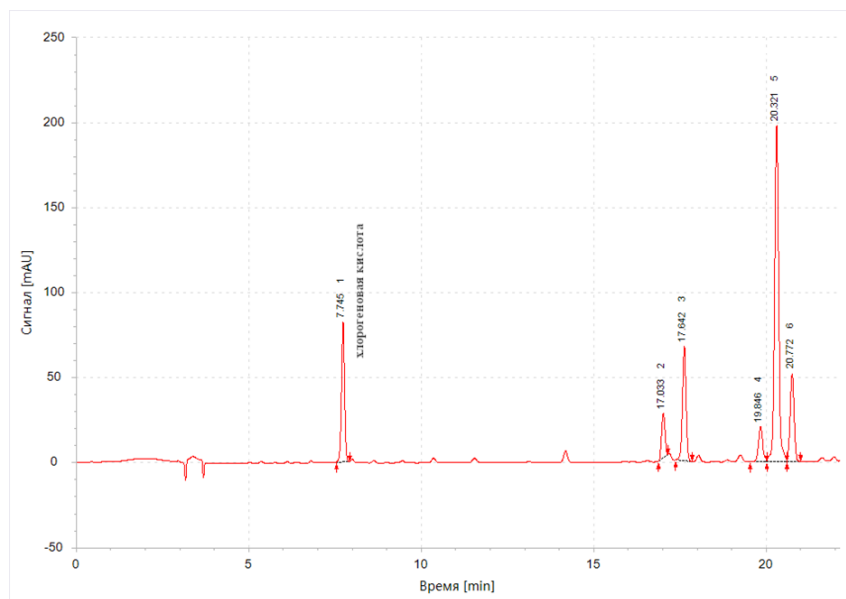


Рисунок 3. Хроматограмма испытуемого образца сельдерея листового

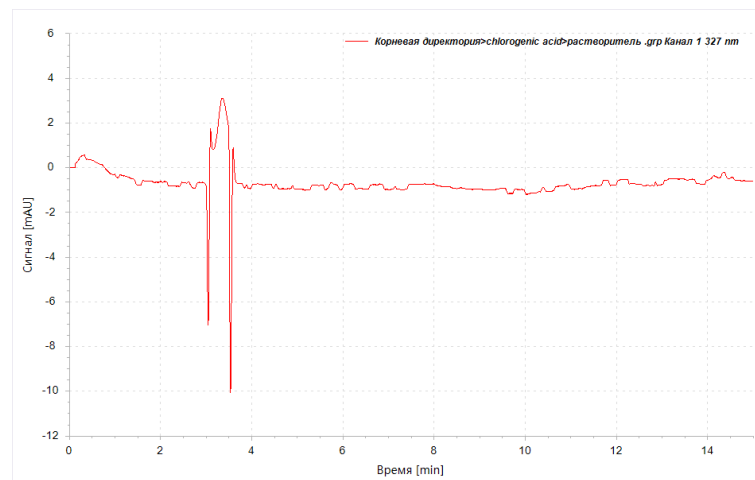


Рисунок 4. Хроматограмма раствора 70% этанола (растворителя)

**Выводы:** Времена удерживания пика хлорогеновой кислоты в испытуемом и стандартном растворах статистически достоверно совпадают. УФ-спектры пиков хлорогеновой кислоты на

хроматограммах стандартного и испытуемого растворов имеют характерный максимум поглощения при длине волны  $(327 \pm 2)$  нм. На хроматограмме раствора 70% этанола отсутствует пик с временем удерживания хлорогеновой кислоты. Следовательно, методика специфична.

### 7.3 Линейность

Линейность определяли путем измерения оптической плотности серии модельных растворов (МР), с содержанием хлорогеновой кислоты в диапазоне концентраций 10-200 % от номинальной концентрации (0,012 мг/мл) хлорогеновой кислоты в испытуемом растворе.

Цель: Определить существует ли линейная зависимость между концентрацией и величиной площади пика хлорогеновой кислоты.

#### Критерии приемлемости:

Зависимость площади пика от концентрации хлорогеновой кислоты в диапазоне применения методики должны быть описаны уравнениями вида  $y = a + b \cdot x$ .

Коэффициенты корреляции  $r$  должен быть не менее 0,99.

Линейность зависимостей должна быть подтверждена визуально графиком.

Свободный член  $a$  должен статистически значимо не отличаться от нуля:

$$|a| \leq \Delta a$$

Процедура: Для исследования линейности готовили следующие растворы СО хлорогеновой кислоты с концентрацией 0,0096 мг/мл, 0,0108 мг/мл, 0,0120 мг/мл, 0,0132 мг/мл, 0,0144 мг/мл. Записывали хроматограммы растворов для определения линейности при длине волны детектора 327 нм.

#### Результаты:

Результаты оценки линейности представлены на рисунке 5 и в таблице 3.

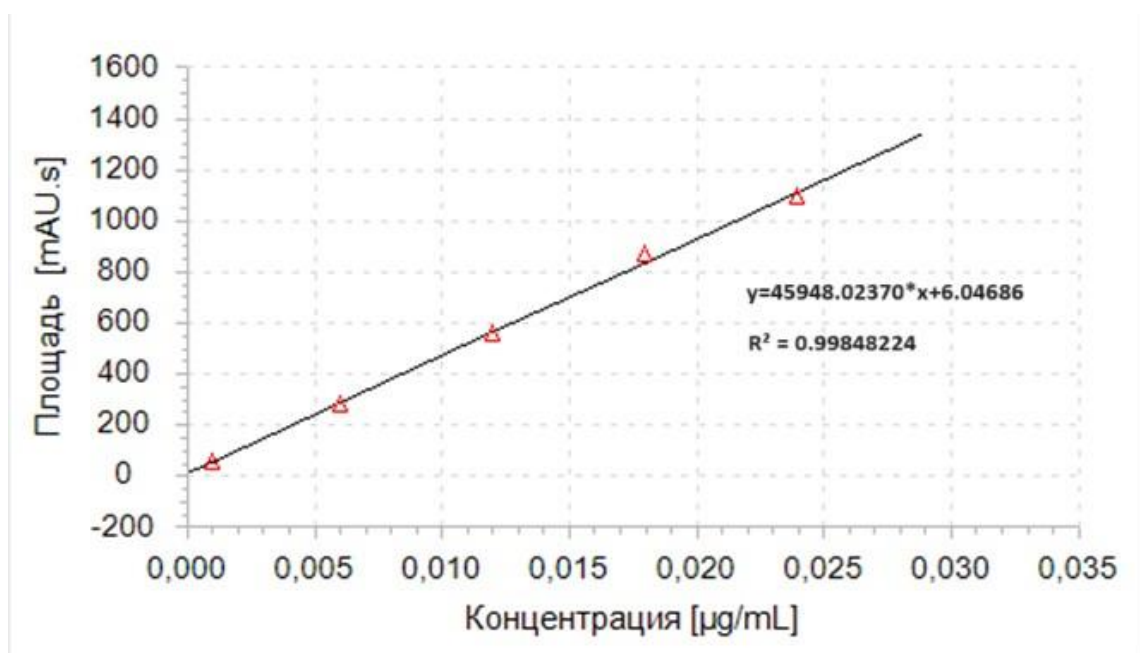


Рисунок 5. График зависимости величины площади пика от концентрации хлорогеновой кислоты в нормализованных координатах

Таблица 3. Результаты оценки линейности

f	a	b	Sa	Sb	t(P,f)	Δa	Δb	r
3	6,05	45948,02	34,015	1034,56	3,18	108,17	3289,89	0,9992

Выводы: график линейной функции имеет вид  $y=bx + a$ , коэффициент корреляции (r) больше 0,99; свободный член линейной зависимости (a) меньше, чем его стандартное отклонение (Δa). Следовательно, линейность методики в диапазоне концентраций 10-200 % от номинальной концентрации (0,012 мг/мл) хлорогеновой кислоты доказана.

#### 7.4 Правильность

Цель: Определить правильность (близость) получаемых результатов эксперимента к истинному значению.

##### Критерий приемлемости:

Значения открываемости (Z) методики должны находится в диапазоне от 98 до 102% ( $100 - Z_{ср.} < 2,0$ ),

Значение RSD (Z) должно быть не более 2,0 %

Процедура: для исследования правильности готовили испытуемые растворы, содержащие 10%, 100% и 200% от концентрации хлорогеновой кислоты установленной в анализируемом сорте в качестве номинальной (0,01182 мг/мл). Диапазон правильности был расширен после анализа разных сортов (таблица 4), разница содержания действующего вещества в которых отличается более чем в 5 раз. Для приготовления 10% и 200% растворов брали аликвоты 0,1 и 2,0 исходного раствора испытуемого образца соответственно.

##### Результаты:

Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты оценки правильности

Введенное значение,	Измеренное значение,	Z (открываемость)	Z - Z <sub>ср.</sub>
1,18	1,20	101,56	1,57
1,18	1,18	99,39	0,60
1,18	1,16	98,20	1,79
11,82	11,77	99,56	0,43
11,82	11,63	98,43	1,56
11,82	12,00	101,55	1,56
23,64	23,64	100,00	0,01
23,64	23,71	100,28	0,29



23,64	23,86	100,95	0,96
Z <sub>ср.</sub>		99,99	
Доверительный интервал		0,95	
RSD, %		1,2	
100 – Z <sub>ср.</sub>		0,0098	

Выводы: значения открываемости находятся в диапазоне от 98 до 102%, полученные значения находятся внутри доверительного интервала, что говорит об отсутствии систематической ошибки методики.

#### 7.5 Прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность)

Цель: Показать сходимость результатов, получаемых одним химиком на одном и том же оборудовании в течение одного дня, а также разными химиками в разные дни на разном оборудовании в пределах одной лаборатории.

##### Критерий приемлемости:

Значение RSD содержания хлорогеновой кислоты в испытуемом образце – не более 3,0 %

Значение критерия Фишера по результатам измерений двух химиков – не более 5,05.

Значение критерия Стьюдента по результатам измерений двух химиков – не более 2,23

##### Процедура:

Для исследования сходимости готовили следующие растворы:

1 стандартный раствор; 6 испытуемых растворов.

Хроматографировали раствор стандартного образца не менее 5 раз, оценивали пригодность системы и после этого хроматографировали испытуемые образцы не менее 6 раз.

Для исследования внутрилабораторной воспроизводимости, химик 2 повторял вышеописанную процедуру в другой день и на другом оборудовании.

Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты оценки сходимости и внутрилабораторной прецизионности

Измерение	Значения химика 1, %	Значения химика 2, %
1	0,468	0,469
2	0,464	0,456
3	0,441	0,447
4	0,471	0,471
5	0,470	0,467
6	0,471	0,470
$\bar{X}$	0,464	0,463
SD	0,012	0,009

RSD, %	2,5	1,9
Критерий Фишера	1,74	
Критерий Стьюдента	1,32	

Как видно из данных таблицы, RSD измерений химиков составило 2,5% и 1,9%. Исходя из того, что в ходе проверки пригодности хроматографической системы значение RSD площади пика СО хлорогеновой кислоты составило менее 1%, повышенный RSD измерений может быть обусловлен природой объекта: для исследования использовали траву сельдерея листового, которая включала стебель и листья. Накопление действующих веществ в ботанических органах может отличаться, что вероятно, приводит к увеличению погрешности измерений. В связи с этим, порог RSD измерений методики был увеличен до 3,0 %.

Выводы: выборки сходимы и их средние значения статистически достоверно не отличаются друг от друга. Значение RSD содержания хлорогеновой кислоты в испытуемом образце – менее 3,0 %. Значение RSD Значение критерия Фишера по результатам измерений двух химиков составило менее 5,05, а критерия Стьюдента – менее 2,23 (табличные значения).

**Аналитическая область:** диапазон концентраций хлорогеновой кислоты в извлечениях из сырья сельдерея листового, в пределах которого методика обеспечивает требуемую линейность, правильность и прецизионность составляет от 0,001 мг/мл до 0,025 мг/мл. Это следует из соответствия показателей «Линейность», «Правильность» и «Прецизионность» предписанным требованиям в пределах данных концентраций.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам, полученным в ходе валидационных испытаний, предложенная методика количественного определения хлорогеновой кислоты в траве листовой ботанической формы *Apium graveolens* L. удовлетворяет установленным требованиям и является пригодной для оценки сортовых преимуществ сырья, использования в аналитической лаборатории и включения в нормативную документацию.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Анализируемая ассортиментная база биологически активных добавок (БАД),  
содержащих только полисахариды природного происхождения

№	Наименование	ЛФ	Состав	Производитель
1.	RHEOLEX®	Саше	глюкомананн, вырабатываемый из клубней японского растения конняку.	Shimizu Chemicals, Япония
2.	Нейтральный полисахарид ламинарии	Капсулы	полисахарид из бурых морских водорослей	НПО Деметра-продукт, Россия
3.	Фуколам-С	Порошок	полисахарид из морских водорослей фукоидан	ТИБОХ ДВО РАН, Россия
4.	Фуколам	Капсулы	фукоидан (сульфатированный полисахарид), альгинат кальция	ТИБОХ ДВО РАН, Россия
5.	Хитозан-диет Форте	Таблетки	Хитозан	АО "ГНЦ ПМ Фарма, Россия
6.	Хитозан диет	Капсулы	Хитозан	АО "ГНЦ ПМ Фарма, Россия
7.	Альгифулам	Таблетки	Альгинат кальция	ТИБОХ ДВО РАН, Россия
8.	Бета-глюкан	Капсулы	Микронизированный сухой экстракт полисахарида Бета 1,3/1,6 D-глюкана из грибов вешенки	Натурес с.р.о., Словакия
9.	VITime ® Slimnes	Мармеладные пастилки	Сироп инулина	ООО «ВТФ», Россия
10.	Бета-глюканы	Таблетки	бета-1.3-глюканы (концентрат дрожжей) - 200 м	Solgar, США

11.	Хитолоза	Капсулы	Хитозан, олигофруктоза, глюкоза	ООО НПФ ЭЛЕСТ, Россия
12.	Бенефибер	Порошок	Пшеничный декстрин	Nestle Health Science (Deutschland) GmbH, Германия
13.	Биосорб Биокор	Гранулы	Пектин цитрусовый, инулин (из цикория)	ООО Биокор, Россия
14.	БИОТЕРРА БЕЛЫЙ СОРБЕНТ ЭКСТРА	Таблетки	Целлюлоза микrokристаллическа я	БИОТЕРРА ООО, Беларусь
15.	ХИТОЗАН	Капсулы	Хитозан	ООО ФОРТЕКС НУТРАСЮТИКАЛ, Болгария
16.	ДОППЕЛЬГЕРЦ АКТИВ ИНУЛИН	Порошок	Инулин (из цикория)	QUEISSER PHARMA GMBH & CO KG, Германия
17.	SUPHERB ВОЛОКНА КОНЖАКА ВИТАМИНЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ АППЕТИТА	Капсулы	Конжак глюкоманнан	AMBROSIA SUPHERB LTD, Израиль
18.	ХИТОЗАН	Капсулы	Хитозан	TIANSHI GROUP, Китай
19.	ЗОСТЕРИН-УЛЬТРА 30	Порошок	Пектин морской травы зостера	АКВАМИР, Россия
20.	ЗОСТЕРИН-УЛЬТРА 60	Порошок	Пектин морской травы зостера	АКВАМИР, Россия
21.	ХИТОЗАН-ДИЕТ	Капсулы	Хитозан	АЛКОЙ ГК, Россия
22.	НАТАЛЬГИН	Капсулы	Альгинат натрия из ламинарии	ОАО АРХАНГЕЛЬСКИЙ

				ОПЫТНЫЙ ВОДРОСЛЕВЫЙ КОМБИНАТ, Россия
23.	AB1918 НАТАЛЬГИН	Капсулы	Альгинат натрия из ламинарии	ОАО АРХАНГЕЛЬСКИЙ ОПЫТНЫЙ ВОДРОСЛЕВЫЙ КОМБИНАТ, Россия
24.	BIOTELA ИНУЛИН	Капсулы	Инулин	ООО БИОТЭА, Россия
25.	BIOTELA ПРЕБИОТИК ИНУЛИН	Капсулы	Инулин	ООО БИОТЭА, Россия
26.	ХИТОЗАН ПРО	Капсулы	Хитозан	ООО БИТРА, Россия
27.	БЕНЕГАСТ РЕДУФЛЮКС	Таблетки жевательные	Фукоидан	ООО БИТТНЕР ФАРМА, Россия
28.	БЕНЕГАСТ РЕДУГАЗ	Таблетки жевательные	Инулин	ООО БИТТНЕР ФАРМА, Россия
29.	ИНУЛИН	Таблетки	Инулин	ООО В-МИН, Россия
30.	МКЦ ПОЛИСЛИМ	Таблетки	Целлюлоза микrokристаллическа я	ООО В-МИН, Россия
31.	ХИТОЗАН АКТИВ СО ВКУСОМ МАНГО	Жидкость для приема внутрь	Хитозан	ООО ГРОТЕКС, Россия
32.	GLS ИНУЛИН	Капсулы	Инулин	ООО ДЖИ ЭЛ ЭС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, Россия
33.	ХИТОЗАН МИЛВЕ	Капсулы	Хитозан, целлюлоза микrokристаллическа я	АО ДОМИНАНТА- СЕРВИС, Россия
34.	ФИЗИО-СОРБ	Суспензия для приема внутрь	Полимер аминополигликана	ООО ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЗДОРОВЬЯ, Россия

35.	АМИНОСОРБ ПРИРОДНЫЙ СОРБЕНТ	Концентрат	Двухфракционный хитозан	ООО ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЗДОРОВЬЯ, Россия
36.	ХИТОЗАН ФОРТЕ	Таблетки	Хитозан, инулин	ООО КВАДРАТ-С, Россия
37.	МИОФАРМ МКЦ ПОЛИСЛИМ	Таблетки	Целлюлоза микrokристаллическа я	ООО МИОФАРМ, Россия
38.	ИНУЛИН-Ф	Таблетки	Инулин	ООО МПК ФАРМ ПРОДАКШН, Россия
39.	NATURALSUPP ИНУЛИН	Капсулы	Инулин	ООО НАТУРАЛЬНЫЕ ДОБАВКИ, Россия
40.	ПЕКТО	Порошок	Пектин цитрусовый, пектин яблочный	ООО НПФ "ПЕКТО", Россия
41.	D-ЗОСТЕРОЛ МОРСКОЙ ПЕКТИН	Порошок	Пектин морской травы зостера	ООО ПЕКТА, Россия
42.	ПЕПИДОЛ ПЭГ	Раствор для приема внутрь	Пектин	АО ПЕКТИН-ДОКТОР, Россия
43.	МИКРОЦЕЛ	Таблетки	Целлюлоза микrokристаллическа я	АО ТЕХНОЭКСПОРТ ТПК, Россия
44.	ХИТОЗАН- ФАРМАКОР	Капсулы	Хитозан	ООО ФАРМАКОР ПРОДАКШН, Россия
45.	БИОТОНЗ ХИТОЗАН	Капсулы	Хитозан	ООО ФАРМАКОР ПРОДАКШН, Россия
46.	ДЕТОКС СОРБЕНТ	Порошок для приготовления раствора для приема внутрь	Пектин цитрусовый, инулин (из клубне топинамбура), фруктоза	ООО ФАРМГРУПП, Россия
47.	ДОКТОР МОРЕ АЛЬГАВИР- ФУКОИДАН	Капсулы	Фукоидан из ламинарии японской	ООО ФАРМОУШЕН ЛАБ, Россия

48.	ЭВАЛАР АНКИР-Б МКЦ ЦЕЛЛЮЛОЗА МИКРОКРИСТАЛЛ ИЧЕСКАЯ	Таблетки	Целлюлоза микrokристаллическа я	АО ЭВАЛАР, Россия
49.	ЭВАЛАР НЕОПУРГЕН	Порошок	Инулин, хитозан	АО ЭВАЛАР, Россия
50.	ХИТОЗАН ФОРТЕ	Таблетки	Хитозан	ООО ЭККО ПЛЮС, Россия
51.	ПЕПИДОЛ ПЭГ для детей	Раствор для приема внутрь	Пектин	ООО ЭЛЮСАН НПЦ, Россия
52.	ПЕПИДОЛ ПЭГ ДЛЯ ВЗРОСЛЫХ	Раствор для приема внутрь	Пектин	ООО ЭЛЮСАН НПЦ, Россия
53.	Пектин	Капсулы	Пектин	NITTANY PHARMACEUTICALS INC, США
54.	NOW ИНУЛИН- ПРЕБИОТИК	Порошок	Инулин	NOW INTERNATIONAL, США
55.	МКЦ	Таблетки	Целлюлоза микrokристаллическа я	КОРТЕС, Украина
56.	ЭКОЦИСТИН	Порошок для приготовления раствора внутри	Д-манноза, инулин	ACINO INTERNATIONAL AG, Швейцария
57.	ФАЙН ФУКОИДАН	Таблетки	Фукоидан из ламинарии японской	FINE JAPAN CO LTD, Япония
58.	ORIHRO ФУКОИДАН	Капсулы	Фукоидан из ламинарии японской	ORIHRO CO LTD, Япония
59.	ORIHRO ПИЩЕВЫЕ ВОЛОКНА	Порошок для приема внутрь	Изомальтодекстрин	ORIHRO CO LTD, Япония

**Проект фармакопейной статьи**  
**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

<b>Сельдерея пахучего корнеплоды</b>	<b>ФС X.X.XXXX.X</b>
<i>Apii graveolensis radix</i>	<b>Вводится впервые</b>

Собранные в фазу окончания вегетации, очищенные и отмытые от земли, разрезанные на куски и высушенные корнеплоды культивируемого двулетнего травянистого растения сельдерея пахучего корневого – *Arium graveolens* L. var. *garaseum*), семейство зонтичных – *Apieaceae*.

**ПОДЛИННОСТЬ**

**Внешние признаки. Цельное сырье.** Куски корнеплодов различной формы. Куски корневищ длиной до 4 см, толщиной - 1–2 см, поперечно – морщинистые. Поверхность корнеплодов матовая, светло-коричневого цвета. Цвет на изломе коричневый или светло-коричневый. Специфический сладковатый запах. Вкус водного извлечения вяжущий.

**Измельченное сырье.** Кусочки корнеплодов различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Цвет бежевый или светло-коричневый с коричневыми вкраплениями. Специфический сладковатый запах. Вкус водного извлечения вяжущий.

**Порошок.** Кусочки корнеплодов различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет бежевый или светло-коричневый с коричневыми вкраплениями. Специфический сладковатый запах. Вкус водного извлечения вяжущий.

**Микроскопические признаки. Цельное сырье.** Покровная ткань – перидерма с редкими чечевичками, которая состоит из 2-5 слоев паренхимных плотнорасположенных клеток с утолщенными оболочками (пробка) и с 2 слоев паренхимных клеток с тонкими оболочками. Иногда перидерма слущивается. На границе перидермы и коровой паренхимы более развитых корнеплодов встречаются схизогенные вместилища. Ниже перидермы расположена 3-5 слойная паренхима с равномерно утолщенными оболочками. Коровая часть корнеплоду хорошо развита и состоит из паренхимных клеток и флоэмы.

Центральный осевой цилиндр безпучкового типа строения. Кольцо камбия узкое. Ксилема представлена в основном лестничными сосудами, редко встречаются пористые. В центре находится остаток диархного пучка первинного строения. Лучи сердцевинны, которые постепенно к периферии расширяются, соединяют центральную часть и коровую паренхиму.

**Определение основных групп биологически активных веществ**

**Качественная реакция на полисахариды**



Около 2 г (точная навеска) измельченного в порошок с диаметром частиц менее 5 мм сырья корнеплодов сельдерея пахучего экстрагируют 40 мл воды при постоянном перемешивании и нагревании (до 95° С) в течении 1 часа. Полученное извлечение фильтруют, к фильтрату добавляют 100 мл этанола, наблюдают образование светло-коричневого или коричневого аморфного осадка (водорастворимые полисахариды). К шроту добавляют 40 мл смеси 0,5% щавелевой кислоты и оксалата аммония (1:1), экстрагируют при постоянном перемешивании и нагревании (до 95 С) в течение 1 часа. Полученное извлечение фильтруют, к фильтрату добавляют 100 мл этанола, наблюдают образование бежевого или светло-коричневого аморфного осадка (пектиновые вещества).

#### ИСПЫТАНИЯ

**Влажность.** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 10 %.

**Зола общая.** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 10 %.

**Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 3%.

**Измельченность сырья.** Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм – не более 5 %. Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 5 %.

**Посторонние примеси.**

**Другие части растения (корни, листья, стебли, в том числе отделяемые при анализе).** Цельное сырье - не более 5 %;

**Органическая примесь.** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1 %

**Минеральная примесь.** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 3%.

**Тяжелые металлы.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Радионуклиды.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Остаточные количества пестицидов.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** Неочищенных водорастворимых полисахаридов – не менее 15 %, неочищенных пектиновых веществ – не менее 7 %.

**Гравиметрический анализ.** Осадки полисахаридов, полученных в ходе качественной реакции (см. Подлинность), фильтруют с помощью вакуумной установки. Отфильтрованные осадки аккуратно переносят в заранее взвешенные фарфоровые чашки и сушат до постоянной массы (при температуре  $(105 \pm 2)^\circ \text{C}$ ). Количество водорастворимых полисахаридов (пектиновых веществ) определяют по следующей формуле:

$$X = \frac{m_{\text{фпс}} * 100}{m_{\text{н}} * (100 - W)} * 100\%$$

где  $m_{\text{фпс}}$  – масса фракции полисахаридов, г

$m_{\text{н}}$  – масса навески исходного сырья, г

$W$  – относительная влажность сырья, %

**Упаковка, маркировка и транспортирование.** В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Хранение.** В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке ФГБОУ ВО СПХФУ

Минздрава России, профессор

Е.В. Флисюк

«24» июня 2024 г.

**ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ И ПЕКТИНОВЫЕ  
ВЕЩЕСТВА КОРНЕПЛОДОВ *APIUM GRAVEOLENS L.***

**ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ**

ТУ \_\_\_\_\_

(Введены впервые)

Держатель подлинника: ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Срок действия: с «24» 06 2024 г.

Без ограничения срока действия

**СОГЛАСОВАНЫ**

Начальник ИЛ(ЦККЛС)

ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

\_\_\_\_\_  
И.И. Тернинко

«24» июня 2024 г.

**РАЗРАБОТАНЫ**

Химик-аналитик ИЛ(ЦККЛС)

ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

\_\_\_\_\_  
Е.С. Сурбева

«24» июня 2024 г.

Место штампа регистрации ТУ

На 11 стр.

г. Санкт-Петербург

2024

## 1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

1.1. Настоящие технические условия распространяются на фитосубстанции водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ (далее – пищевые волокна), полученных из сельдерея корневого, вырабатываемую в виде лиофилизатов из сырья для производства БАД.

1.2. Фитосубстанция предназначена для включения в состав функционального и специализированного питания как активного ингредиента – регулятора кишечной микрофлоры и как следствие метаболических процессов организма.

1.3. Требования настоящих Технических условий являются обязательными.

Пример условного обозначения в других документах и (или) при заказе:

Фитосубстанция «ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ И ПЕКТИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА КОРНЕПЛОДОВ *APIUM GRAVEOLENS L.*», ТУ ХХХ-ХХ-ХХХХХХ.»

## 2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

### 2.1. Основные параметры и характеристики

Фитосубстанция должна соответствовать требованиям настоящих Технических условий и изготавливаться по рецептуре и Технологической инструкции на его производство, утвержденным в установленном порядке. Каждая партия продукции должна сопровождаться паспортом качества.

2.1.1. По органолептическим и физико-химическим показателям Фитосубстанция «ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ И ПЕКТИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА КОРНЕПЛОДОВ *APIUM GRAVEOLENS L.*» должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице

1

Таблица 1

№ п/п	Наименование показателя	Норма	
		ВРПС	ПВ
1	Внешний вид	Порошок светло-коричневого или коричневого цвета	Порошок бежевого цвета
2	Запах	Без запаха	
3	Массовая доля влаги, %, не более	1,5 ± 0,1	
4.	Масса содержимого упаковки, г	10,0 ± 1,0	
5.	Массовая доля общей золы, %, не более	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5

6.	Мономерный состав	На хроматограмме должно наблюдаться соответствие размера, цвета и Rf пятен галактозы и арабинозы на треках испытуемых и стандартного раствора
7.	Остаточные органические растворители, ppm	Содержание хлороформа – не более 50 ppm, метанола – не более 3000 ppm, бутанола и этанола – не более 5000 ppm

2.1.2 По содержанию токсичных элементов, пестицидов и радионуклидов БАД должна соответствовать ТР ТС 021/2011, указанным в таблице 2

Таблица 2

Наименование вещества (элемента)		Допустимый уровень его содержания, мг/кг, не более
Токсичные элементы	Свинец	1,0
	Мышьяк	0,2
	Кадмий	0,1
	Ртуть	0,03
Пестициды	Гексахлорциклогексан ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -изомеры)	0,5
	ДДТ и его метаболиты	0,02
	Гептахлор	Не допускается
	Алдрин	Не допускается
Радионуклиды	Цезий-137, Бк/кг, не более	400
	Стронций – 90, Бк/кг, не более	200

2.1.3. По микробиологическим показателям БАД должна соответствовать ТР ТС 021/2011, указанным в таблице 3.

Таблица 3

Наименование показателя	Значение показателя	НД на методы исследования
КМАФАеМ, КОЕ / г, не более	$5 \times 10^4$	ГОСТ 10444.15
Масса продукта (г), в которой не допускаются	БГКП (колиформы)	ГОСТ 31747
	<i>E.coli</i>	ГОСТ 30726
Плесени, КОЕ/г, не более	100	ГОСТ 33566

## 2.2. Требования к сырью и материалам

2.2.1 Для изготовления фитосубстанции «Водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества корнеплодов сельдерея» применяются: корнеплоды сельдерея, вода очищенная (по

ФС.2.2.0020.18 ) или вода питьевая (по ГОСТ Р 51232 и СанПиН 2.1.3684), аммония ацетат, ХЧ, щавелевая кислота, ХЧ, хлороформ, ХЧ, бутанол, ХЧ

2.2.2. Все сырье и материалы, предназначенные для изготовления БАД к пище, должны проходить входной контроль, быть разрешены к применению органами Роспотребнадзора в установленном порядке и соответствовать требованиям нормативных документов, в соответствии которых они изготовлены.

### 2.3. Упаковка

2.3.1. Используемая при производстве фитосубстанции «Водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества корнеплодов *Apium graveolens* L.» тара и упаковочные материалы должны изготавливаться из материалов, соответствующих требованиям нормативных документов и обеспечивающих безопасность и сохранность в течение всего срока годности.

2.3.2. Фитосубстанция выпускается в банках оранжевого стекла вместимостью 50 дм<sup>3</sup> по ДТ №10702070/150523/3194242 или другим документа производителя

2.3.3. При заполнении средством банок допускается отклонение по массе  $\pm 5,0\%$ .

2.3.4. Упаковку проверяют по п. 5.8 настоящих технических условий

### 2.4. Маркировка

2.4.1. На каждую потребительскую упаковку наклеивают этикетку с маркировкой, на которой указывается: наименование предприятия-изготовителя, его юридический адрес, включая страну, контактные данные и товарный знак производителя (при наличии); наименование БАД на русском языке, включая торговое название, данные о составе продукции; назначение средства; способ применения; массу в граммах; номер серии / партии; дата изготовления; срок годности (в формате «...годен до», указывая месяц и год); условия хранения; обозначение настоящих Технических условий; информация о регистрации

## 3. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

3.1. Фитосубстанции «Водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества корнеплодов *Apium graveolens* L.» по параметрам острой токсичности по ГОСТ 12.1.007. относится к 4 классу малоопасных веществ.

3.2. При производстве БАД состояние условий труда и выполнение санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий контролируется в соответствии с программой производственного контроля.

3.3. Средство и сырье используемое для его производства пожаро- и взрывобезопасны в соответствии с ГОСТ 12.1.044.

3.4. При производстве средства должны соблюдаться общие требования безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.005.

3.5. Производственные помещения предприятия должны удовлетворять требованиям ТР ТС 021/2011 (Технический регламент Таможенного союза о безопасности пищевой продукции). Предприятие должно быть оборудовано горячим и холодным водоснабжением, канализацией и системами отопления.

3.6. Производственные помещения должны быть оборудованы общей приточно-вытяжной и местной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021 и СП 60.13330.2020 «Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха».

3.7. Освещение должно соответствовать требованиям СП 52.13330.2016 «Естественное и искусственное освещение».

3.8. Ведение технологического процесса, наладка, ремонт, санитарная обработка оборудования должны осуществляться согласно требованиям соответствующих нормативных документов.

3.9. Обеспечение безопасных условий труда достигается строгим соблюдением, требований инструкций по технике безопасности, санитарно-гигиенических норм и правил.

3.10. Рабочие места, связанные с наиболее интенсивным выделением пыли, должны быть оборудованы защитными зонтами с вытяжной вентиляцией.

3.11. В помещениях ежедневно должна производиться влажная уборка.

3.12. После окончания работы лицо и руки необходимо вымыть с мылом.

3.13. Курить, пить и принимать пищу на рабочих местах запрещается.

3.14. Контроль предельно-допустимых выбросов в атмосферу должен осуществляться в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".

3.15. Охрана почв от загрязнения бытовыми и промышленными отходами должна соответствовать требованиям СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания".

#### 4. ПРАВИЛА ПРИЕМКИ

4.1 Фитосубстанцию принимают партиями. Партией считается однородное количество продукта, полученного за одну технологическую операцию (технологический цикл) и расфасованное в потребительскую тару одного вида.

4.2. Каждая партия фитосубстанции должна сопровождаться паспортом качества, который должен включать следующие данные: наименование, адрес и товарный знак (при наличии) предприятия-изготовителя; наименование фитосубстанции; дату изготовления; обозначение

настоящих Технических условий ; номер партии (серии); размер партии (серии); годен до...(указывается месяц и год); результаты проведенных испытаний; подтверждение соответствия качества продукции требованиям настоящих Технических условий.

Паспорт заверяется подписью начальника производственной лаборатории.

4.3. Для проверки соответствия качества БАД требованиям настоящих Технических условий проводят приемно-сдаточные испытания каждой партии по показателям 1-9 таблицы 1, а также показателям таблиц 2 и 3 и по показателям п. 2.3. «Упаковка» и п. 2.4. «Маркировка».

4.4. При получении неудовлетворительных результатов испытаний хотя бы по одному из показателей, проводят повторные испытания пробы отобранной от удвоенной выборки той же партии. Результаты повторных испытаний распространяются на всю партию. В случае неудовлетворительных результатов повторных испытаний партию считают несоответствующей требованиям Технических условий и бракуют.

## 5. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

### 5.1 Отбор проб

#### 5.1.1 Отбор проб проводят по следующей схеме:

-от тарных мест, отобранных для контроля, отбирают точечные пробы, которые составляют 10 упаковочных единиц.

-из содержимого 5 упаковочных единиц (оставшихся после контроля по показателю «Масса содержимого упаковки») тщательным перемешиванием составляют объединенную пробу;

-объединенную пробу делят на две части. Одну часть используют для приемно-сдаточных испытаний, вторую – как арбитражную пробу.

5.1.2 Проба для приемно-сдаточных испытаний должна быть объемом не менее 70 грамм. Арбитражную пробу помещают в чистую сухую банку с притертой пробкой или завинчивающейся крышкой.

#### 5.1.3 На банку с арбитражной пробкой наклеивают этикетку с указанием:

- наименования продукта;
- наименования предприятия-изготовителя;
- номера партии;
- даты отбора пробы.

5.2 Определение внешнего вида проводят визуально на матово-белом фоне при рассеянном дневном свете в условиях минимального проявления тени. Для этого на лист белой бумаги помещают небольшое количество продукта (0,5-2,0) и без нажима равномерно распределяют по поверхности бумаги (осторожно разравнивают шпателем или другим приспособлением) так, чтобы поверхность оставалась плоской.



5.3 Определение запаха. Запах оценивают органолептическим методом с расстояния 40-60 мм.

5.4. Определение массовой доли влаги проводят по ОФС.1.2.1.0010, способ 1 (ГФ РФ XV издания). На анализ берут 1,0 (точная навеска) субстанции.

5.4.1. Оборудование:

- шкаф сушильный лабораторный с диапазоном нагрева от 50°C до 350°C и терморегулятором, обеспечивающим поддержание заданной температуры с пределами абсолютной погрешности  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ;

- весы неавтоматического действия по ГОСТ Р 53228 специального (I) класса точности с пределами допускаемой абсолютной погрешности  $\pm 0,001$  г или весы лабораторные, прошедшие процедуру утверждения типа и внесенные в Государственный реестр средств измерений, с пределами допускаемой абсолютной погрешности  $\pm 0,001$  г, поверенные в установленном порядке.

5.5. Определение массовой доли общей золы проводят по ГОСТ 34845. На анализ берут 1,0 (точная навеска) БАД.

5.5.1. Оборудование, реактивы, растворы:

- Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания 210 г и допускаемой погрешностью взвешивания не более  $\pm 0,0001$  г.

- Электропечь сопротивления камерная лабораторная, обеспечивающая поддержание заданного температурного режима ( $550 \pm 25$ )°C.

- Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые по ГОСТ 14919.

- Эксикатор исполнения 2 по ГОСТ 25336 (осушающее вещество - кальций хлористый).

- Тигли и чашки фарфоровые по ГОСТ 9147.

- Щипцы тигельные.

- Кислота азотная по ГОСТ 4461, х.ч.

- Шкаф сушильный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима ( $110 \pm 2$ )°C.

- Кальций хлористый по ГОСТ 450, технический.

- Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, посуды, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

5.6. Определение мономерного состава

5.6.1. Оборудование, реактивы, растворы:

- Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания 210 г и допускаемой погрешностью взвешивания не более  $\pm 0,0001$  г.

- Шкаф сушильный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима.
- Пластинка ТСХ, сорбфил
- Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
- Серная кислота, ХЧ
- Галактоза и арабиноза, ХЧ
- Метанол, ХЧ
- Фосфотный буфер (рН=6,8), ОФС.1.3.0001
- Ацетонитрил, ХЧ
- Бутанол, ХЧ
- Пентанол, ХЧ
- Дифениламинный реактив, ОФС.1.3.0001

Идентификацию моносахаров после гидролиза полисахаридных фракций проводили методом ТСХ.

*Испытуемый образец.* Около 50 мг (точная навеска) помещали в пробирку с притертой пробкой, растворяли в 2 мл воды и добавляли 2 мл раствора серной кислоты 2%. Пробирки закрывали крышками и нагревали на водяной бане 2-8 ч, проводя отбор проб гидролизатов для контроля полноты гидролиза каждые 2 ч.

*Стандартные образцы (СО).* В качестве СО использовали субстанции глюкозы, галактозы и арабинозы фармацевтического качества. Около 100 мг (точные навески) помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл воды очищенной и доводили объем до метки тем же растворителем. Таким образом, получали индивидуальные растворы СО с концентрацией 1 мг/мл. Для получения смеси СО точные навески моносахаров около 100 мг помещали в мерные колбы на 10 мл, растворяли в 5 мл воды и доводили до метки тем же растворителем (получали растворы СО с концентрацией 10 мг/мл). Затем по 1,0 мл каждого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили водой до метки. Получали смесь СО с концентрацией каждого стандарта 1 мг/мл.

*Пробоподготовка пластинки.* Пластинки предварительно активировали смесью метанол : вода (6:1), подсушивали на воздухе, затем повторно обрабатывали той же смесью и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 15 минут. Далее пластинки обрабатывали фосфатным буферным раствором (рН=6,8), подсушивали на воздухе и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 120 °С в течение 10 минут.

На подготовленные пластинки наносили по 4 мкл растворов и смеси СО и по 20 мкл образцов гидролизатов. Хроматограмму высушивали на воздухе и элюировали смесью ацетонитрил : пентанол : вода (4:4:1), высушивали и затем снова элюировали смесью ацетонитрил : бутанол : вода (4:3,5:1,5). Для дериватизации моносахаров хроматограмму обрабатывали дифениламиновым реактивом и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 110 °С 3-5 минут. Наблюдали пятна с окраской серо-фиолетового (галактоза) и фиолетового (арабиноза) цветов.

Идентифицировали моносахара путем сравнения значений факторов удерживания, формы и цвета пятен треков гидролизатов и треков СО.

## 5.7. Определение содержания Остаточных органических растворителей

### 5.7.1. Оборудование, реактивы, растворы:

- Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания 210 г и допускаемой погрешностью взвешивания не более  $\pm 0,0001$  г.

- Газовый хроматограф, прошедший процедуру утверждения типа и внесенные в Государственный реестр средств измерений, с пределами допускаемой абсолютной погрешности  $\pm 0,001$  г, поверенные в установленном порядке. - колонка капиллярная ZB-624 30 м, 0,53 мм, 3 мкм (или аналогичная)

- метанол, СТХ

- этанол, СТХ

- хлороформ, СТХ

-бутанол, СТХ

- стеклянные пробирки с притертой крышкой, ГОСТ

5.2. 2 мл стандартного водного раствора, содержащего метанол ( $c = 0,158$  мг/мл), этанол ( $c = 0,079$  мг/мл), н-бутанол ( $c = 0,032$  мг/мл) и хлороформ ( $c = 0,056$  мг/мл) помещают во флакон для парофазного анализа, закрывают пробкой и герметично укупоривают.

Около 0,2 г фракции ВРПС (ПВ) помещают во флакон для парофазного анализа, добавляют 2,0 мл воды очищенной, закрывают пробкой и герметично укупоривают.

Хроматографируют смесь стандартных образцов (не менее 5 раз) и испытуемые образцы (не менее 2х раз) в условиях, представленных ниже

### *Хроматографические условия*

Колонка	капиллярная ZB-624 30 м, 0,53 мм, 3 мкм
Газ-носитель	азот, 3 мл/мин, деление потока 1:5

Температура термостата колонки	40 °С в течение 15 минут, увеличение температуры со скоростью 35 °С/мин до 240 °С, затем 5 минут при конечной температуре
Температура инжектора	200 °С
Температура детектора	260 °С
Детектор	ионизационно-пламенный, расход водорода – 40 мл/мин, расход воздуха – 400 мл/мин
Парофазный дозатор	
Температура термостатирования образца	95 °С
Время термостатирования	30 мин
Температура иглы	110 °С
Температура линии переноса	130 °С
Время нагнетания	2 мин
Ввод пробы	0,08 мин
Давление	17 psi
Время хроматографирования	25 мин

Расчет содержания органических растворителей определяли по формуле:

$$X = \frac{c_{st} \cdot S_x \cdot 2 \cdot 100 \cdot 10000}{m \cdot S_{st}}$$

где  $c_{st}$  – концентрация стандартного образца,  $S_x$ - площадь пика растворителя на хроматограмме испытуемого вещества;  $S_{st}$  - площадь пика растворителя на хроматограмме стандартного раствора;  $m$ - масса навески испытуемого образца, г

5.8. Упаковку и маркировку проверяют визуально.

## 6. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

6.1. Транспортирование и хранение продукции должно производиться по ГОСТ 17768, в соответствии с ТР ТС 021/2011.

6.2. Хранить средство в упаковке изготовителя в сухих, крытых проветриваемых складских помещениях, защищенных от воздействия прямых солнечных лучей и источников тепла при температуре не выше  $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$  и относительной влажности не более  $(50 \pm 5)\%$ .

6.3. Транспортировка средства допускается всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта и гарантирующими сохранность средства и тары.

6.4. Хранить субстанцию необходимо отдельно от лекарственных средств и пищевых продуктов, в недоступных для детей месте.

## 7. УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Фитосубстанцию «Водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества корнеплодов сельдерея» используют для производства порошка для приготовления коктейлей, способствующего регуляции микрофлоры кишечника.

#### 8. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

8.1. Изготовитель гарантирует соответствие качества БАД к пище требованиям настоящих Технических условий при соблюдении поставщиком и потребителем условий транспортирования и хранения, установленных настоящими Техническими условиями.

8.2 Гарантийный срок фитосубстанции «Водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества корнеплодов сельдерея» - 2 года с даты изготовления

8.3. Срок хранения вскрытой упаковки - не более 1 месяца после вскрытия

8.4. Предприятие – изготовитель не несет ответственности за последствия нарушений (несоблюдение) требований настоящих Технических условий, в том числе связанных с тем, что потребитель не ознакомился с Техническими условиями и не выполнил раздел 5 настоящих технических условий.

---

**Липофильная фракция черешковой формы сельдерея пахучего в вазелиновом масле**  
*Apii graveolentis petiolorum fractio lipophila in paraffino liquido*

---

Сумма биологически активных веществ, получаемых путем многократной экстракции хлороформом из сырья черешков сельдерея пахучего (*Apium graveolens* L.), сем. зонтичных – *Apiaceae*, с последующим перерастворением в вазелиновом масле.

#### СВОЙСТВА

**Описание.** Легко подвижная жидкость темно-зеленого цвета с характерным запахом производящего растения.

**Растворимость.** Очень легко или легко растворима в хлороформе, практически нерастворима в воде и спирте этиловом 96%.

Испытание проводят только для крайних значений, относящихся к указанному термину. К навеске вещества прибавляют отмеренное количество растворителя и непрерывно встряхивают в течение 10 минут при температуре  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Вещество считают полностью растворившимся, если раствор становится прозрачным. Очень легко растворим - до 1 мл (включительно) растворителя для 1 г вещества (1 г вещества должен полностью раствориться в 1,0 мл растворителя). Легко растворим - от 1 до 10 мл (включительно) растворителя для 1 г вещества (1 г вещества не должен полностью раствориться в 1,0 мл, но должен полностью раствориться в 10,0 мл растворителя). Практически нерастворим - более 10000 мл растворителя для 1 г вещества (0,05 г вещества не должен раствориться в более 50,0 мл растворителя).

#### ИДЕНТИФИКАЦИЯ

**Спектрофотометрия.** Испытание проводят совместно с количественным определением. На спектре испытуемого должны наблюдаться максимумы поглощения при длинах волн  $275 \pm 2$  нм и  $663 \pm 2$  нм, соответствующие сенкиунолиду А и хлорофиллу.

#### ИСПЫТАНИЯ

**Плотность.** От 0,80 до 0,90 в соответствии с требованиями ОФС «Плотность», метод 1.

**Кислотное число.** Не более 1 в соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число», метод 2.

**Пероксидное число.** Не более 60 в соответствии с требованиями ОФС «Перекисное число», метод 1.

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители». Содержание хлороформа – не более 50 ppm.

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота». Категория 3.2.

**Количественное определение. Спектрофотометрия.** Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС 1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимых областях»)

*Раствор стандартного образца сенкиунолида А (СО).* Около 20,0 мг (точная навеска) СО сенкиунолида А, растворяют в метаноле в колбе вместимостью 20 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 1,0 мл раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят до метки тем же растворителем и перемешивают.

*Испытуемый раствор.* Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в хлороформе, доводят объем раствора до метки тем же растворителем. 1,0 мл раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят до метки тем же растворителем.

Измеряют оптическую плотность раствора СО и испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 275 нм (сенкиунолид А), 663 (хлорофилл) в кювете с толщиной слоя 1 см относительно растворов сравнения (метанол – для раствора СО, хлороформ – для испытуемого раствора).

Содержание суммы фталидов в пересчете на сенкиунолид А в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{A_x * a_{co} * 10 * 10 * 1 * 1 * 100}{A_{co} * a_{ио} * 20 * 10 * 1 * 1},$$

где  $A_x$  – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 275 нм,

$a_{co}$  – навеска стандартного образца, мг,

$a_{ио}$  – навеска субстанции, взятой на анализ, мг,

$A_{co}$  – оптическая плотность стандартного образца сенкиунолида А при 275 нм.

Содержание хлорофилла вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{A_x * 10 * 10 * 1 * 1}{A_{1\text{ см}}^{1\%} * a * 20 * 10 * 1 * 1},$$

где  $A_x$  – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 663 нм,

$A_{(1\text{ см})}^{(1\%)}$  – удельный показатель поглощения хлорофилла при длине волны 663 нм, равный 755.

$a$  – навеска вещества.

**Упаковка.** В плотно закупоренной таре из темного стекла. Тару заполняют доверху во избежание окисления.

**Хранение.** В защищенном от света месте при температуре 2-8 °С.

**Проект фармакопейной статьи**  
**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

<b>Сельдерея</b>	<b>пахучего</b>	<b>черешковой</b>	<b>ФС X.X.XXXX.X</b>
<b>разновидности трава</b>			
<b><i>Apium graveolens</i> var. <i>dulce</i> herba</b>		<b>Вводится впервые</b>	

Собранные в фазу вегетации, очищенные и разрезанные на куски и высушенные стебли с листьями двулетнего травянистого растения сельдерея пахучего черешкового – *Apium graveolens* L. var. *dulce*, семейство зонтичных – *Apiaceae*.

**ПОДЛИННОСТЬ**

**Внешние признаки. Цельное сырье.** Смесь цельных или частично измельченных олиственных стеблей с листьями. Стебли простые, ребристые, внутри полые, длиной до 30 см. Листья черешковые, первые три листа трехнадрезанные, затем – перистые; верхние стеблевые листья иногда супротивные, почти сидячие, на коротких, по краю – пленчатых, влагалищах. Доли первого порядка у нижних листьев округлые, при основании тупые, трехлопастные или трехраздельные, по краю зубчатые с острыми зубцами. Доли стеблевых листьев с клиновидным основанием, с острыми беловато хрящеватыми зубцами

Цвет листьев – зеленый, темно-зеленый, стеблей – зеленый, темно-зеленый. Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения специфичный, слизистый.

**Измельченное сырье.** Смесь кусочков стеблей и листьев различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет от зеленого до темно-зеленого. Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения специфичный, слизистый.

**Микроскопические признаки.** Листья сельдерея. Листовая пластинка дорсивентрального типа строения, амфистоматическая. Устьица часты. Тип устьицевого аппарата – диацитный, анизоморфный. Клетки верхней и нижней паренхимной эпидермы с тонкими оболочками. Опушение отсутствует.

На поперечном срезе листа центральная жилка ребристая округлой формы. Эпидерма над жилкой представлена достаточно прямостенными паренхимными клетками с утолщенными оболочками. Под эпидермой над пучками расположено 5-7 рядов угловой колленхимы. Ниже колленхимы в клетках основной паренхимы встречаются частые схизогенные вместилища. Проводящая система жилки представлена 3 закрытыми коллатеральными пучками, из которых центральный пучок значительно больше по размеру.



Черешок на поперечном срезе овально-пятиугольный. Эпидерма черешка образована паренхимными разными по размерам и форме клетками с тонкими оболочками. Устьичный аппарат диацитного и анизоцитного типа. Устьица часты. Под эпидермой в ребрах черешка содержится многослойная угловая колленхима. Ниже расположена основная паренхима, клетки которой плотно прилегают друг к другу и разные по размерам. В основной паренхиме над закрытыми коллатеральными пучками (пучков 5-7, разные по размерам) содержатся многочисленные схизогенные вместилища. В центре черешка находится полость.

Нижняя часть черешка образует влагалище. Внутренняя и наружная эпидерма влагалища отличается от эпидермы черешка. Внутренняя эпидерма представлена 4, 6 угловыми слегка прозенхимными тонкостенными клетками. Устьица отсутствуют. Наружная эпидерма влагалища образована более прямостенными по форме клетками, среди которых большинство паренхимных.

#### **Определение основных групп биологически активных веществ**

#### ***Определение суммы фталидов в пересчете на сенкиунолид А методом УФ-спектрофотометрии***

Проводят совместно с Количественным определением. УФ-спектр испытуемого раствора должен иметь характерный максимум поглощения при 275 нм ( $\pm 2$  нм)

#### **ИСПЫТАНИЯ**

***Влажность.*** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 5 %.

***Зола общая.*** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 5 %.

***Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1 %.

***Измельченность сырья.*** Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм – не более 5 %. Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 5 %.

***Посторонние примеси.***

***Органическая примесь.*** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1 %

***Минеральная примесь.*** Цельное сырье, измельченное сырье – не более 2%.

***Тяжелые металлы.*** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

***Радионуклиды.*** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Остаточные количества пестицидов.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.**

Измельченное сырье: суммы фталидов в пересчете на сенкиунолид А – не менее 0,8 %.

Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС 1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимых областях»)

*Испытуемый раствор:* 500 мг (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу, прибавляют 10,0 мл хлороформа и присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут, проводят трехкратную экстракцию с заменой растворителя. Полученные извлечения фильтруют через бумажный фильтр, объединяют и переносят в мерную колбу номиналом 25 мл, доводят до метки хлороформом и перемешивают. Отбирали аликвоту 1,0 мл и помещают в мерную колбу номиналом 10 мл, доводят до метки тем же растворителем и перемешивают.

*Раствор стандартного образца сенкиунолида А:* 10 мг стандартного образца CRS сенкиунолида А (точная навеска) помещают в мерную колбу номиналом 10 мл и доводят до метки метанолом, перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу номиналом 10 мл и доводят до метки метанолом.

Снимают УФ-спектры испытуемого и стандартного раствора, используя метанол в качестве раствора сравнения для СО, а хлороформ – для испытуемого образца, в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм в диапазоне длин волн 220-300 нм. Определяют оптическую плотность СО и испытуемого образца при длине волны 275 нм. Количественное содержание сенкиунолида А в сырье (в %) определяют по следующей формуле:

$$X(\%) = \frac{A_x * a_{CO} * 25 * P * 10 * 1 * 1 * 100}{A_{CO} * a_{ию} * 10 * 10 * 1 * (100 - w)}$$

где  $A_x$  – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 275 нм,

$a_{CO}$  – навеска стандартного образца, мг,

$a_{ию}$  – навеска субстанции, взятой на анализ, мг,

$A_{CO}$  – оптическая плотность стандартного образца сенкиунолида А при 275 нм

$P$  – количество вещества в СО сенкиунолида А, %

$w$  – относительная влажность сырья, %

**Упаковка, маркировка и транспортирование.** В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Хранение.** В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».