



Анализ сортовых преимуществ листовой формы *Arium graveolens* L. по содержанию хлорогеновой кислоты

Е. С. Сурбеева✉, У. А. Ефремова, В. С. Шуракова, Е. В. Вишняков, И. И. Тернинко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Сурбеева Елизавета Сергеевна. E-mail: bazanova.elizaveta@pharminnotech.com

ORCID: Е. С. Сурбеева – <https://orcid.org/0000-0002-7005-2477>; У. А. Ефремова – <https://orcid.org/0000-0001-5144-3061>;
В. С. Шуракова – <https://orcid.org/0009-0001-9938-1549>; Е. В. Вишняков – <https://orcid.org/0000-0002-4716-7866>;
И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Статья поступила: 04.03.2024

Статья принята в печать: 24.04.2024

Статья опубликована: 26.04.2024

Резюме

Введение. Изучение сортовых преимуществ сельскохозяйственных растений – актуальное направление исследований ввиду перспективности разработки на их основе продуктов функционального и специализированного питания. Вещества фенольного профиля демонстрируют различные виды фармакологической активности, направленные на терапию метаболических и других социально значимых заболеваний, что позволяет позиционировать их как эффективные функциональные ингредиенты. Листовая ботаническая форма сельдерея пахучего – богатый источник фенольных соединений.

Цель. Разработка и валидация методики количественного анализа хлорогеновой кислоты для оценки сортовых преимуществ сырья *Arium graveolens* L. методом ВЭЖХ.

Материалы и методы. Для анализа использовали высушенную и измельченную траву сельдерея листового разных сортов, выращенную на двух площадках (пос. Лемболово и СНТ «Ручей»). Пробоподготовку сырья проводили путем экстракции на УЗ-ванне. Условия хроматографирования: колонка Luna 5 μm C18(100) Å LC Column 250 \times 4.6 мм, температура термостата – 40 °С, длина волны детекции – 327 нм. ПФ А – 0,05 % ТФУ, ПФ Б – ацетонитрил. Режим элюирования: 0 мин – 12 % ПФ Б, 20 мин – 30 % ПФ Б, 23 мин – 12 % ПФ Б.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным данным, накопление хлорогеновой кислоты в сырье сельдерея зависит как от сорта растения, так и от условий культивирования. Тем не менее существует корреляция между количественным содержанием целевого компонента и сортами, выращенными на разных площадках. Наибольшее содержание хлорогеновой кислоты было отмечено в сорте Нежный (СНТ «Ручей»), оно составило $0,464 \pm 0,012$. При сравнительной оценке как наиболее перспективный для культивирования в медицинских целях можно выделить сорт Летний бум.

Заключение. Результаты исследования могут быть использованы в разработке и контроле качества функционального и специализированного питания на основе листовой ботанической формы сельдерея пахучего за счет высокого содержания веществ фенольной природы.

Ключевые слова: *Arium graveolens* L., сельдерей листовой, функциональное питание, сортовые преимущества, фенольные соединения, хлорогеновая кислота, ВЭЖХ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Е. С. Сурбеева – литературный поиск, планирование и выполнение экспериментальной работы, получение и обработка данных, формулирование выводов и написание статьи. В. С. Шуракова – литературный поиск, пробоподготовка образцов, участие в интерпретации данных. У. А. Ефремова – участие в валидационных исследованиях. Е. В. Вишняков – статистическая обработка данных эксперимента. И. И. Тернинко – идея и планирование дизайна эксперимента, редактирование рукописи.

Финансирование. Анализ выполнен на базе Центра коллективного пользования (ЦКП) «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России».

Для цитирования: Сурбеева Е. С., Ефремова У. А., Шуракова В. С., Вишняков Е. В., Тернинко И. И. Анализ сортовых преимуществ листовой формы *Arium graveolens* L. по содержанию хлорогеновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024; 13(2):142–153. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1779>

Analysis of varietal advantages of leaf form *Arium graveolens* L. according to chlorogenic acid content

Elizaveta S. Surbeeva✉, Ulyana A. Efremova, Valeria S. Shurakova,
Evgeniy V. Vishnyakov, Inna I. Terninko

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ Corresponding author: Elizaveta S. Surbeeva. E-mail: bazanova.elizaveta@pharminnotech.com

ORCID: Elizaveta S. Surbeeva – <https://orcid.org/0000-0002-7005-2477>; Ulyana A. Efremova – <https://orcid.org/0000-0001-5144-3061>;
Valeria S. Shurakova – <https://orcid.org/0009-0001-9938-1549>; Evgeniy V. Vishnyakov – <https://orcid.org/0000-0002-4716-7866>;
Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Received: 04.03.2024

Accepted: 24.04.2024

Published: 26.04.2024

© Сурбеева Е. С., Ефремова У. А., Шуракова В. С., Вишняков Е. В., Тернинко И. И., 2024

© Surbeeva E. S., Efremova U. A., Shurakova V. S., Vishnyakov E. V., Terninko I. I., 2024

Abstract

Introduction. Special studies on the benefits of agricultural crops – current research regarding the prospects for the development of their products based on functional and specialized nutrition. Substances with a phenolic profile carry out various types of pharmacological activity aimed at treating metabolic and other socially significant phenomena, which allows them to be positioned as generally accepted main ingredients. The leafy botanical form of celery is a rich source of phenolic compounds.

Aim. Development and validation of a method for the quantitative analysis of chlorogenic acid to assess the varietal advantages of *Apium graveolens* L. raw materials using HPLC.

Materials and methods. For the analysis, we used leaf celery grass of different varieties grown at two sites (the village of Lembolovo and SNT "Ruchey"). Sample preparation of raw materials was carried out by extraction in an ultrasonic bath. Chromatography conditions: column Luna 5 μ m C 18(100) Å LC Column 250 \times 4.6 mm, thermostat temperature 40 °C, detection wavelength 327 nm. PF A 0.05 % TFA, PF B acetonitrile. Elution mode: 0 min 12 % B, 20 min 30 % PF B, 23 min 12 % PF B.

Results and discussion. According to the data obtained, the accumulation of chlorogenic acid in celery raw materials depends on both the plant variety and the cultivation conditions. However, the difference in the quantitative content of the target component correlates between varieties grown on different sites. The highest content of chlorogenic acid was noted in the variety Nezhny (SNT "Ruchey") and amounted to 0.464 ± 0.012 . The variety Summer Boom can be distinguished as the best variety.

Conclusion. The results of the study can be used in the development and quality control of functional and specialized nutrition based on the leafy botanical form of odorous celery due to the high content of phenolic substances.

Keywords: *Apium graveolens* L., leaf celery, functional nutrition, varietal advantages, phenolic compounds, chlorogenic acid, HPLC

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Elizaveta S. Surbeeva – literature search, planning and execution of experimental work, obtaining and processing data, drawing conclusions and writing the article. Valeria S. Shurakova – literature search, sample preparation, participation in the interpretation of data. Ulyana A. Efremova – participation in validation studies. Evgeniy V. Vishnyakov – statistical processing of experimental data. Inna I. Terninko – idea and planning of the experimental design, editing the manuscript.

Funding. The analysis was carried out on the basis of the Collective Use Center (CCU) "Analytical Center" of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education (SPKhFU) of the Ministry of Health of Russia.

For citation: Surbeeva E. S., Efremova U. A., Shurakova V. S., Vishnyakov E. V., Terninko I. I. Analysis of varietal advantages of leaf form *Apium graveolens* L. according to chlorogenic acid content. *Drug development & registration*. 2024;13(2):142–153. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1779>

ВВЕДЕНИЕ

Разработка функциональных продуктов питания является одним из приоритетов научно-технического развития Российской Федерации¹. Данные продукты содержат функциональные ингредиенты (полисахариды, полифенолы, каротиноиды и др.), оказывающие при систематическом употреблении целевое воздействие на одну или несколько физиологических функций, процессы обмена веществ². В связи с этим актуален поиск потенциальных сырьевых источников функциональных продуктов питания, в качестве которых могут выступать сельскохозяйственные культуры, накапливающие различные биологически активные вещества (БАВ).

¹ Указ Президента РФ от 1 декабря 2016 г. № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации». Доступно по: <https://base.garant.ru/71551998/> Ссылка активна на 04.03.2024.

² ГОСТ Р 52349-2005. Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения (с Изменением № 1). Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200039951>. Ссылка активна на 04.03.2024.

Согласно данным литературы [1–4], фенольные соединения уменьшают гипергликемию и инсулинорезистентность, воспаление и оксидативный стресс, обладают гепатопротекторными свойствами и регулируют профиль липидов, что говорит об актуальности их использования в качестве функциональных ингредиентов для профилактики метаболических нарушений. Известно, что пищевые культуры отличаются высоким содержанием и разнообразным качественным составом данной группы соединений и могут выступать их источником [5–6].

Отличительной особенностью сельскохозяйственных пищевых культур является их сортовое разнообразие. Так, согласно Государственному реестру селекционных достижений, допущенных к использованию, сельскохозяйственные растения представлены большим разнообразием сортов, которые различаются между собой урожайностью и морозостойкостью³. Однако только на примере культуры *Petroselinum crispum* L. показано, что накопление БАВ также раз-

³ Государственный реестр селекционных достижений допущенных к использованию. Доступно по: <https://gossortrf.ru/registry/> Ссылка активна на 04.03.2024.

лично в зависимости от сорта растения [7]. В остальных случаях мажоритарное накопление отдельных компонентов не является признаком/характеристикой сорта пищевых культур.

Сельдерей пахучий (*Apium graveolens* L.) – сельскохозяйственная культура с высоким содержанием различных групп БАВ, включая соединения фенольной природы [8], – используется в составе продуктов диетического питания¹ и широко применяется в народной медицине. Сельдерей представлен тремя ботаническими формами: корневой, черешковой и листовой, среди которых наибольшим накоплением фенолов отличается листовая. На данный момент зарегистрировано более 10 сортов сельдерея листового, однако данных касательно сравнительного накопления в них функциональных ингредиентов крайне мало. Таким образом, актуальна оценка сортовых преимуществ сельдерея и выбор оптимального сорта для последующей разработки функциональных продуктов питания и БАД.

Мажоритарными соединениями из ряда фенолов в составе листовой формы сельдерея пахучего являются гликозиды апигенина, лютеолина, а также хлорогеновая кислота [8]. Поскольку вариативность гликозидных форм флавоноидов может отличаться в зависимости от факторов окружающей среды и самих сортов, а анализ агликонов сопряжен с продолжительной пробоподготовкой, оценку сортовых преимуществ сельдерея пахучего целесообразно проводить по хлорогеновой кислоте.

Для оценки матрицы растительного сырья целесообразно использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), позволяющий разделять сложные смеси веществ. Классическим вариантом пробоподготовки растительных объектов является многократная экстракция на установке с обратным холодильником [9]. Тем не менее ультразвуковой способ экстракции позволяет увеличить экспрессность и эффективность выделения растительных БАВ [10].

В литературе представлено значительное число методик ВЭЖХ-анализа хлорогеновой кислоты в обращенно-фазовом варианте [11–14]. Однако время записи хроматограмм составляет 30–60 минут, а используемые в качестве подвижной фазы (ПФ) растворы кислот весьма концентрированные (от 0,1 до 2 %) и могут неблагоприятно влиять на узлы прибора и приводить к быстрому износу оборудования. Кроме того, большинство предложенных методик не учитывают поликомпонентность химического состава растительного сырья и не дают возможности селективно оценить содержание конкретного компонента в общем профиле схожих соединений.

¹ Единый реестр свидетельств о государственной регистрации. Евразийский экономический союз. Доступно по: <https://nsi.eaeunion.org/portal/1995?date=2024-02-29>. Ссылка активна на 04.03.2024.

Учитывая вышесказанное, **целью данной работы** является разработка экспрессной и селективной методики определения функционального ингредиента – хлорогеновой кислоты и сравнительная оценка приоритетности разных сортов сельдерея пахучего для последующей разработки функциональных и специализированных продуктов питания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали надземную вегетативную часть листовой ботанической формы сельдерея пахучего (*Apium graveolens* L.) различных сортов. Сорта Нежный, Летний бум, Ванюша, Юта, Бодрость, Пучковый культивировали в питомнике лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (п. Лемболово, Ленинградская область, 60.389368, 30.275313). Кроме того, для проведения сравнения сорта Нежный, Ванюша и Бодрость были культивированы в СНТ «Ручей» (Кировское городское поселение, Ленинградская область, 59.831756, 31.031655).

Сбор сырья проводили в августе – сентябре 2023 г. в сухую погоду. Свежесобранную траву сельдерея измельчали ножницами на кусочки 2 × 3 см и сушили при температуре 40 °С до остаточной влажности сырья около 5 %. Ботаническую идентификацию растений проводили на базе кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО СПХФУ.

Количественное определение хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ

Испытания проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LicArt 62 (ООО «Лабконцепт», Россия), оснащенном диодно-матричным детектором. Внутрिलाбораторную сходимость оценивали на высокоэффективном жидкостном хроматографе ВЭЖХ LC 20 (Shimadzu Corporation, Япония).

Подвижная фаза (ПФ) А. 0,05%-й 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%-го этанола и закрывали крышкой. Сырье экстрагировали на ультразвуковой ванне «Сапфир» (Россия) в течение 30 мин при температуре 40 °С, периодически перемешивая. Полученный раствор фильтровали в мерную колбу объемом 10 мл через мембранный фильтр диаметром 0,45 мкм и доводили до метки 70%-м 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, США) помещали в мерную колбу объемом 10 мл и раство-

ряли в 96%-м этаноле. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 10 мл, доводили до метки 70%-м 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 деионизированной (получали раствор с концентрацией 0,01 мг/мл).

Условия хроматографирования: колонка Luna 5 μm C 18(100) Å LC Column 250 × 4.6 мм, температура термостата – 40 °С, длина волны детекции – 327 нм. Режим элюирования: 0 мин – 12 % ПФ Б, 20 мин – 30 % ПФ Б, 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 (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:

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

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, %.

Испытания проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XV, ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография»¹.

Для подтверждения достоверности предложенной методики проводили ее валидацию по следующим параметрам: проверка пригодности хроматографической системы, специфичности, линейности, правильности, сходимости (доверительный интервал правильности отдельного определения), прецизионности (сходимость, внутрилабораторная прецизионность), аналитической области. Критерии

приемлемости, а также формулы для расчета основных статистических характеристик были взяты из ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» (ГФ РФ XV)². В качестве объекта валидации использовали сорт Нежный (произрастание – СНТ «Ручей») ввиду высокой урожайности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка пригодности хроматографической системы: результаты оценки пригодности системы представлены в таблице 1. Хроматограмма раствора СО хлорогеновой кислоты представлена на рисунке 1.

Таблица 1. Результаты хроматографирования раствора СО хлорогеновой кислоты

Table 1. Results of chromatography chlorogenic acid's reference solution

| № | t_R | S | N | As |
|-----------|----------|----------|----------|-------|
| 1 | 7,856 | 535,57 | 25561,34 | 0,948 |
| 2 | 7,79 | 530,014 | 24774,66 | 0,943 |
| 3 | 7,762 | 529,823 | 25103,49 | 0,967 |
| 4 | 7,72 | 532,155 | 24541,18 | 0,96 |
| 5 | 7,779 | 531,853 | 25943,45 | 0,975 |
| \bar{X} | 7,7814 | 531,883 | | |
| SD | 0,049475 | 2,31331 | | |
| RSD, % | 0,635814 | 0,434928 | | |

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.

Специфичность: оценка специфичности методики представлена в таблице 2 и на рисунках 2–3.

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

Table 2. Specificity assessment based on retention time of test and reference samples

| № | t_R стандартного образца t_R reference sample | t_R испытуемого образца t_R test sample |
|-----------|--|--|
| 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} | 7,7814 | 7,7748 |
| SD | 0,0495 | 0,0600 |
| RSD, % | 0,64 | 0,77 |

¹ ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/2-1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/vysokoeffektivnaya-zhidkostnaya-khromatografiya/> Ссылка активна на 04.03.2024.

² ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/11/OFS.1.1.0013.15-Statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta.pdf>. Ссылка активна на 04.03.2024.

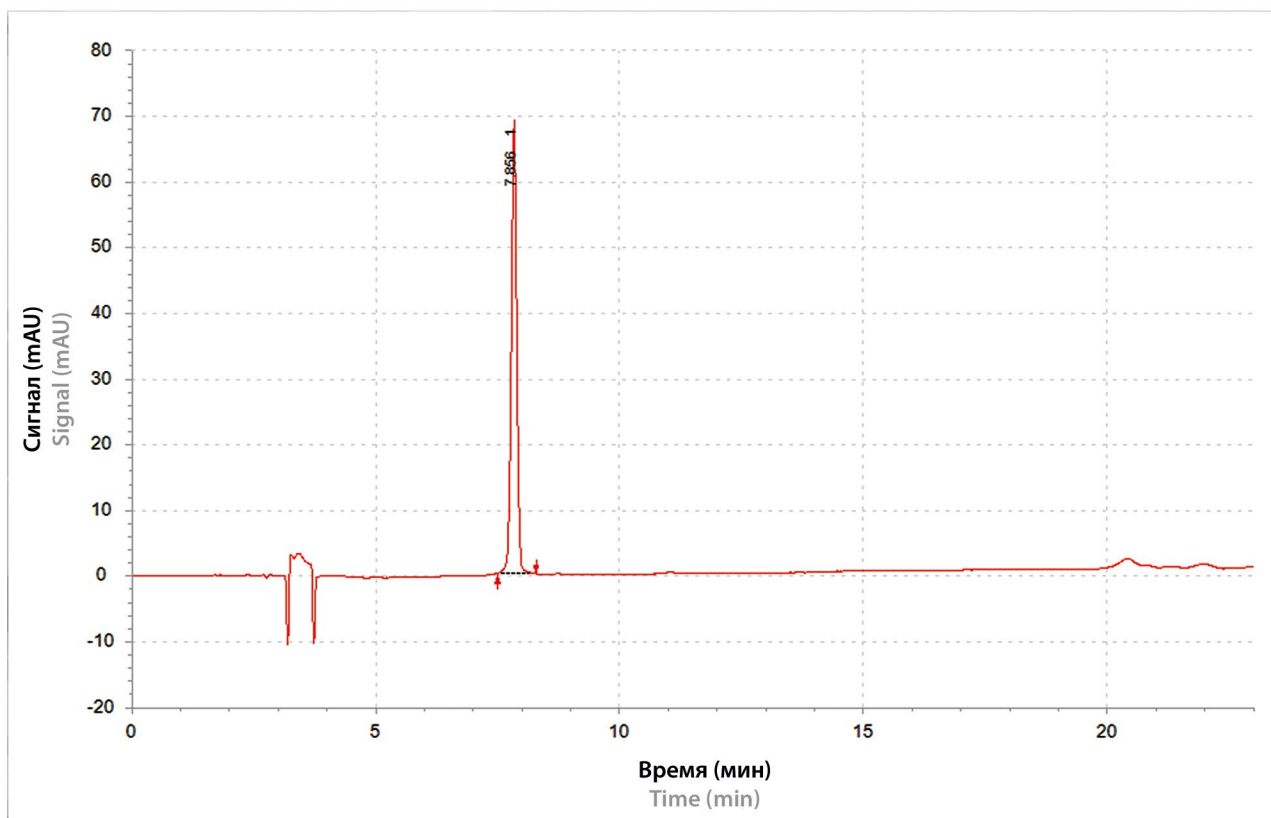
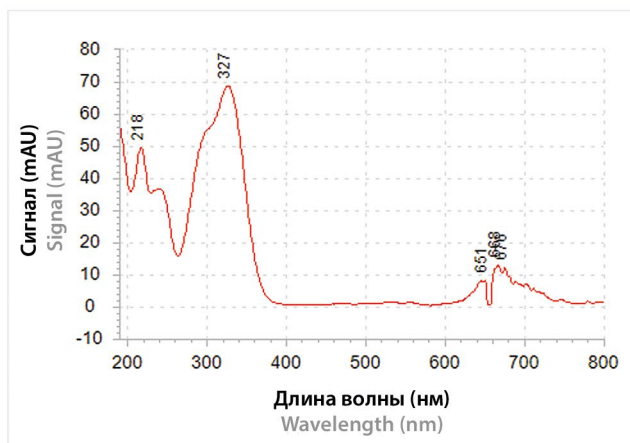


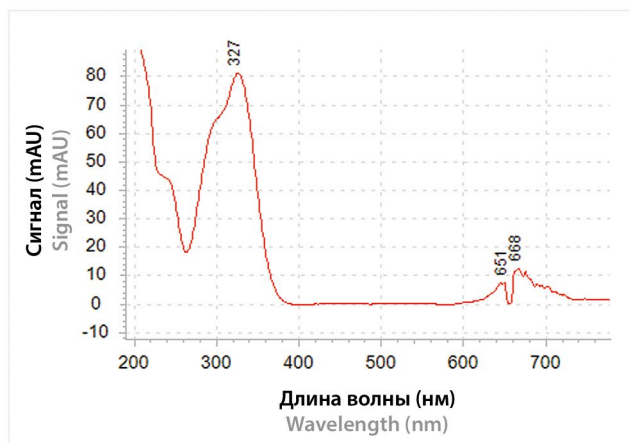
Рисунок 1. Хроматограмма СО хлорогеновой кислоты

Figure 1. Chromatogram of a reference solution of chlorogenic acid



— Время 7.845 мин
Time 7.845 min

A
A



— Время 7.745 мин
Time 7.745 min

B
B

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

Figure 2. UV spectrum of chlorogenic acid peaks in reference solution (A) and in the test solution (B)

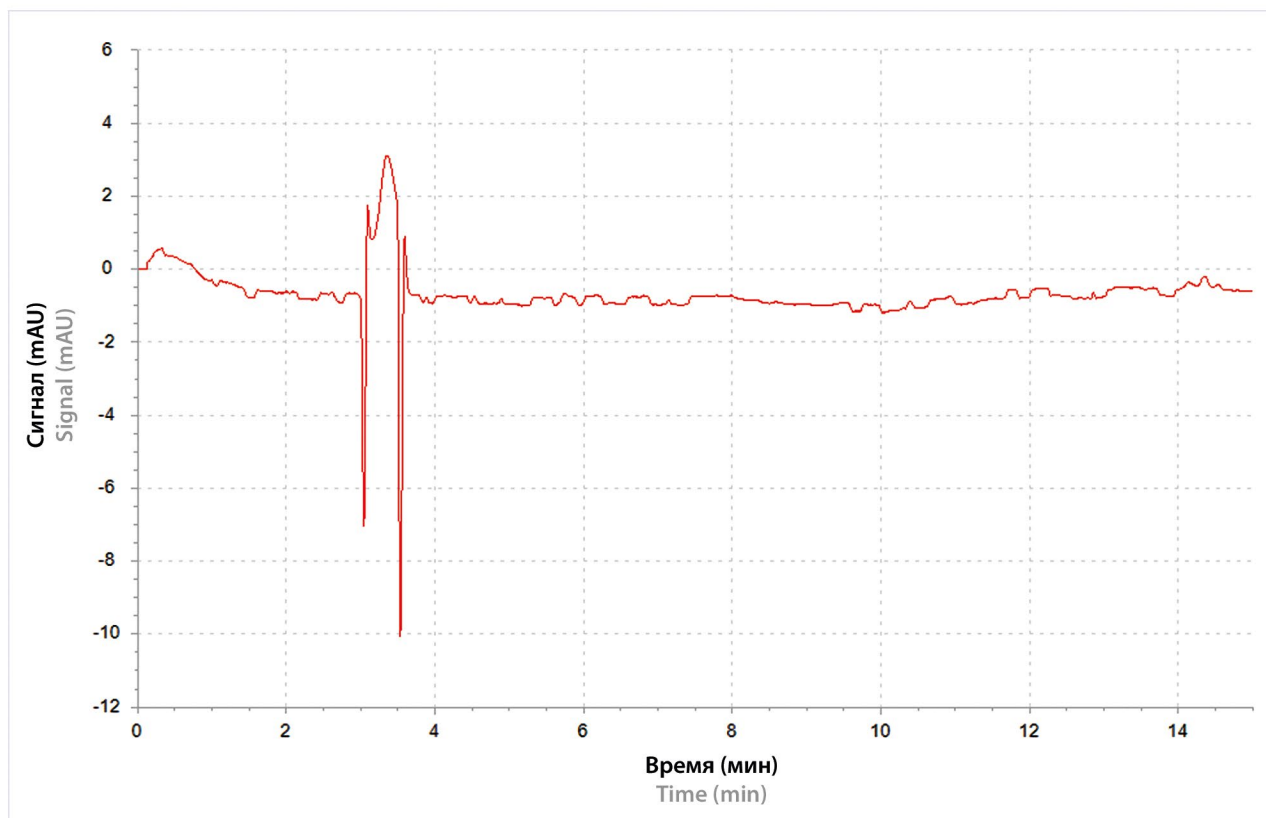


Рисунок 3. Хроматограмма раствора 70%-го этанола (растворителя)

Figure 3. Chromatogram of a solution of 70 % ethanol (solvent)

Как видно из таблицы и рисунков, времена удерживания пика хлорогеновой кислоты на испытуемом и стандартном образцах 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%-го этилового спирта отсутствует пик со временем удерживания хлорогеновой кислоты. Следовательно, методика специфична.

Линейность: 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. Результаты оценки линейности представлены на рисунке 4 и в таблице 3.

Как видно из данных таблицы и рисунка, 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 доказана.

Правильность: для исследования правильности готовили испытуемые растворы 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 6), содержание действующего вещества в которых различается более чем в 5 раз. Для приготовления 10 и 200 % растворов брали аликвоты 0,1 и 2,0 исходного раствора испытуемого образца соответственно. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 3. Результаты оценки линейности

Table 3. Results of linearity assessment

| 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 |

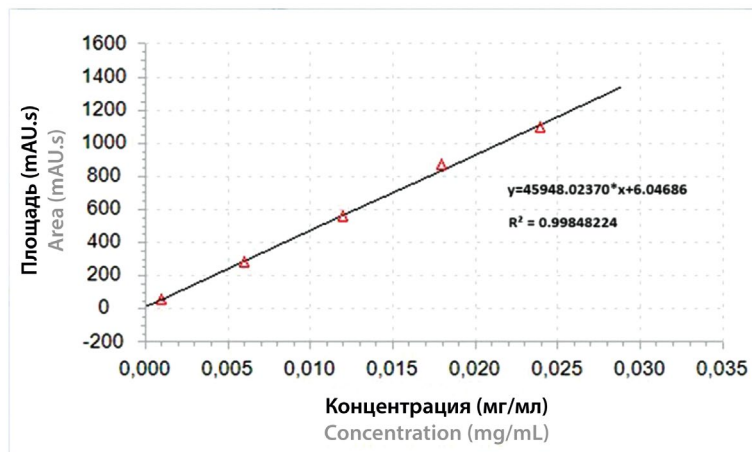


Рисунок 4. График зависимости величины площади пика от концентрации хлорогеновой кислоты в нормализованных координатах

Figure 4. Graph of the dependence of the peak area on the concentration of chlorogenic acid in normalized coordinates

Таблица 4. Результаты оценки правильности

Table 4. Correctness assessment results

| Введенное значение, $\times 10^{-3}$ мг/мл Entered value, $\times 10^{-3}$ mg/ml | Измеренное значение, $\times 10^{-3}$ мг/мл Measured value, $\times 10^{-3}$ mg/ml | Z (открываемость) Z (openability) | $\frac{ Z - Z_{cp.} }{ Z - Z_{avg.} }$ |
|---|---|--------------------------------------|--|
| 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 |
| $Z_{cp.}$ $Z_{avg.}$ | | 99,99 | |
| Доверительный интервал Confidence interval | | 0,95 | |
| RSD, % | | 1,2 | |
| $\frac{ 100 - Z_{cp.} }{ 100 - Z_{avg.} }$ | | 0,0098 | |

Как видно из данных таблицы, значения открываемости находятся в диапазоне от 98 до 102 %, полученные значения находятся внутри доверительного интервала, что говорит об отсутствии систематической ошибки методики.

Прецизионность: оценивали сходимость и внутрилабораторную прецизионность. Результаты представлены в таблице 5.

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 различаться, что, вероятно, приводит к увеличению погрешности измерений. В связи с этим порог RSD измерений методики был увеличен до 3,0 %. Значение критерия Фишера по результатам измерений двух химиков составило менее 5,05, а критерия Стьюдента – менее 2,23 (табличные значения). Следовательно, выборки сходимы и их средние значения статистически достоверно не отличаются друг от друга.

Таблица 5. Результаты оценки сходимости

Table 5. Results of convergence assessment

| Измерение Measurement | Значения химика 1, % Chemist 1 values, % | Значения химика 2, % Chemist 2 values, % |
|------------------------------|---|---|
| 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 F-test | 1,74 | |
| Критерий Стьюдента t-test | 1,32 | |

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 до

0,025 мг/мл. Это следует из соответствия показателей «линейность», «правильность» и «прецизионность» предписанным требованиям в пределах данных концентраций.

Преимуществами разработанной методики относительно литературных вариантов является сокращенное время пробоподготовки образца (однократная экстракция на УЗ-ванне), использование менее концентрированного раствора кислоты (0,05 % ТФУ), время записи хроматограммы – 23 мин. Это позволяет существенно минимизировать затраты на проведение анализа и продлить срок эксплуатации основных узлов прибора. Кроме того, подобранные условия хроматографирования позволяют за короткое время разделить смесь из более чем 6 веществ (рисунки 5–6).

Оценка сортовых преимуществ листовой ботанической формы сельдерея пахучего: результаты оценки сортовых преимуществ листовой формы сельдерея пахучего по содержанию хлорогеновой кислоты представлены в таблице 6. Хроматограммы исследуемых растворов приведены на примере сорта Нежный различного произрастания (рисун-

ки 5–6). На рисунке 7 приведены сравнительные диаграммы содержания хлорогеновой кислоты в сортах сельдерея пахучего.

Таблица 6. Количественное содержание хлорогеновой кислоты в сортах сельдерея пахучего

Table 6. Quantitative content of chlorogenic acid in varieties of fragrant celery

| Название сорта Variety name | Содержание хлорогеновой кислоты, % (n = 5) Content of chlorogenic acid, % (n = 5) | |
|--------------------------------|---|-------------------------------------|
| | СНТ «Ручей» SNT "Ruchey" | Пос. Лемболово Village Lembolovo |
| Нежный Nezhny | 0,464 ± 0,012 | 0,111 ± 0,008 |
| Бодрость Bodrost | 0,382 ± 0,012 | 0,074 ± 0,006 |
| Ванюша Vanyusha | 0,190 ± 0,030 | 0,040 ± 0,010 |
| Летний бум Summer Boom | | 0,179 ± 0,030 |
| Юта Utah | | 0,175 ± 0,014 |
| Пучковый Puchkovy | | 0,129 ± 0,030 |

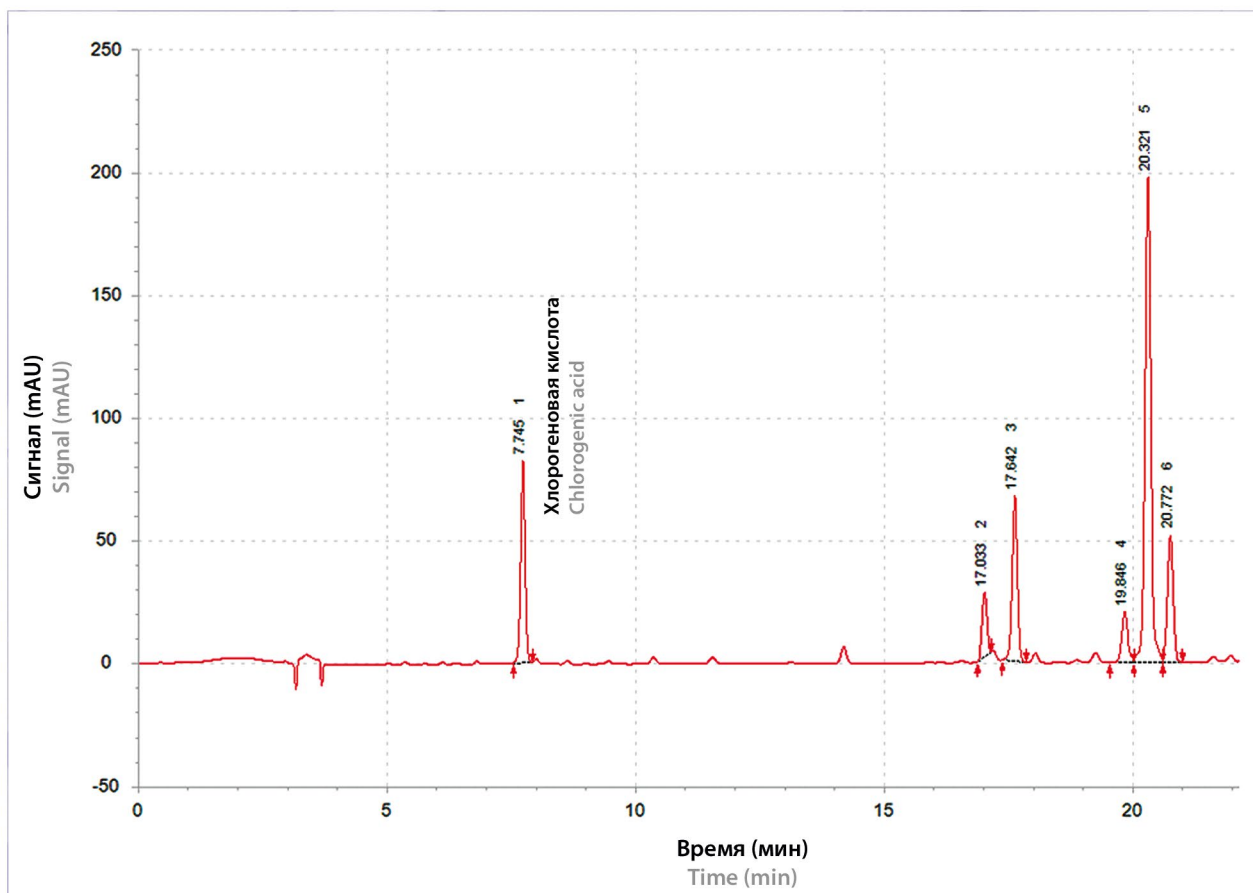


Рисунок 5. Хроматограмма испытуемого раствора сельдерея сорта Нежный (СНТ «Ручей»)

Figure 5. Chromatogram of the test solution of celery variety Nezhn (SNT "Ruchey")

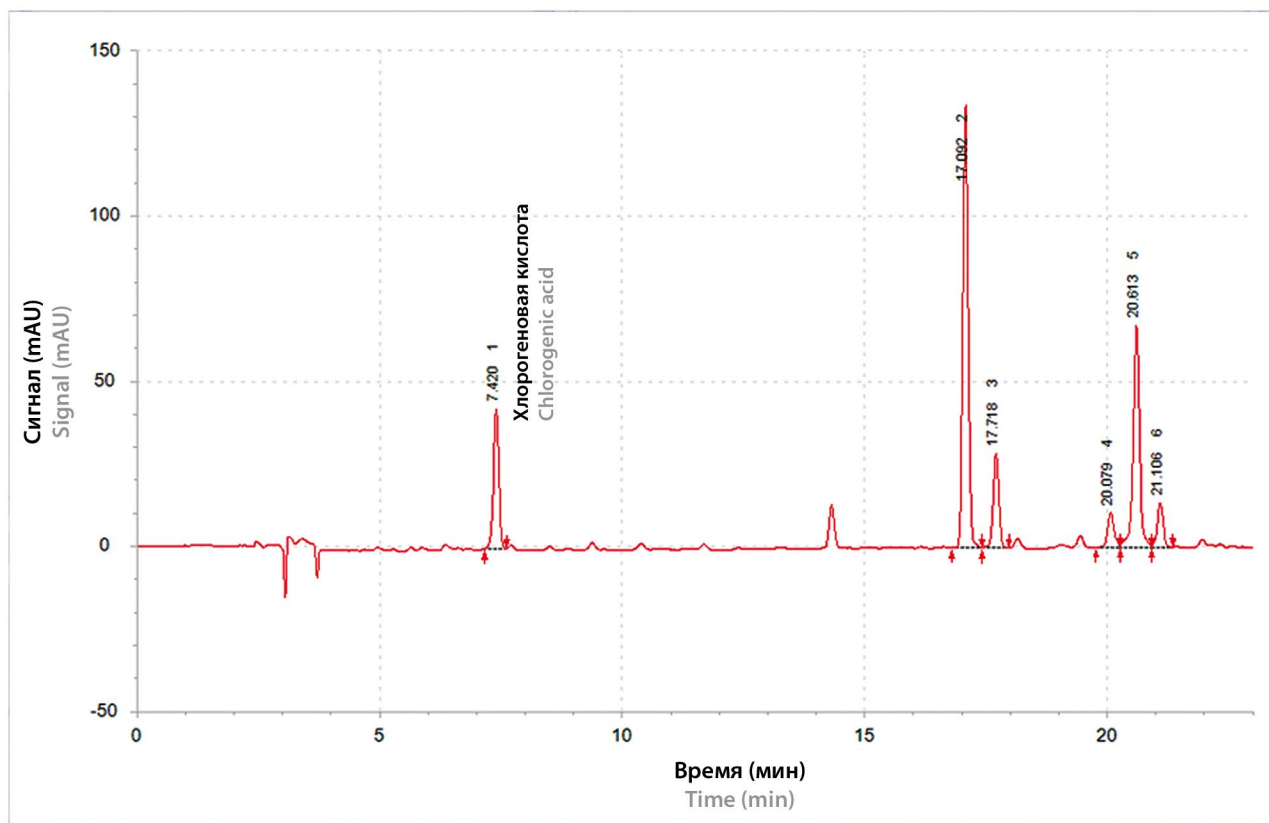


Рисунок 6. Хроматограмма испытуемого раствора сельдерея сорта Нежный (пос. Лемболово)

Figure 6. Chromatogram of the test solution of celery variety Nezhny (Lembolovo village)

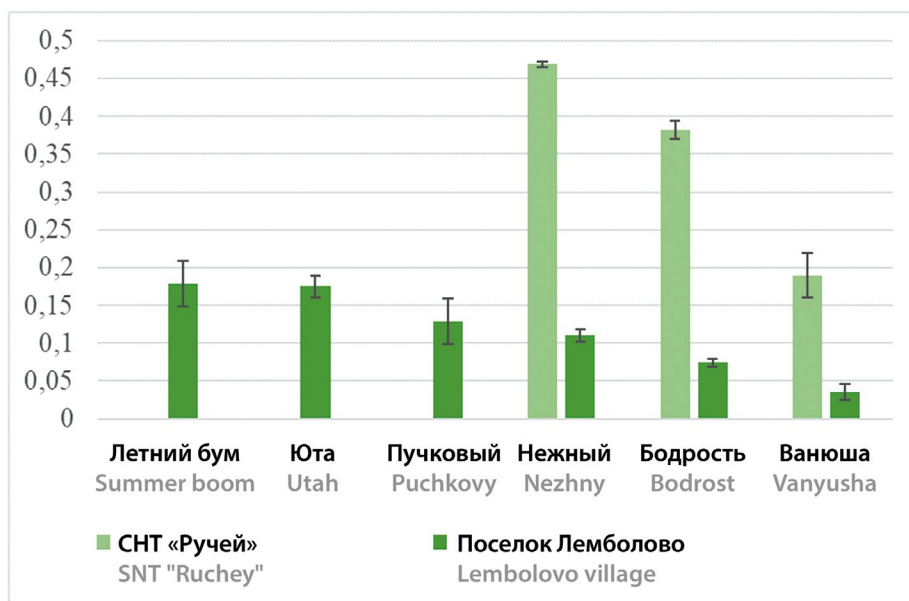


Рисунок 7. Содержание хлорогеновой кислоты в разных сортах сельдерея листового (произрастание – СНТ «Ручей» и поселок Лемболово)

Figure 7. The content of chlorogenic acid in different varieties of leaf celery (growing in SNT "Ruchey" and the village of Lembolovo)

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 (см. таблица 6) несмотря 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 агротехнические условия, так и конкретный сорт сырья.

Помимо пика хлорогеновой кислоты, на хроматограммах испытуемых образцов наблюдаются пики еще 5 соединений, которые, исходя из идентификации по УФ-спектрам (рисунок 8), относятся к гликозидам флавоноидов – предположительно, производным апигенина (рисунок 8 А, Г) [15], лютеолина (рисунок 8 Б, Д) [16] и кемпферола (рисунок 8 В) [17].

Как видно из представленных выше данных, качественный состав соединений не зависит 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 в зависимости от места произрастания, а также от сорта (в 2–5 раз).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована методика определения хлорогеновой кислоты – функционального ингредиента с рядом фармакологических свойств – в сырье пищевой культуры *Arium graveolens* L. и проведена оценка сортовых преимуществ растений, выращенных на двух локациях с различными агротехническими условиями.

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 сырье сельдерея листового, в пределах которого методика обеспечивает требуемую линейность, правильность и прецизионность, составляет от 0,001 до 0,025 мг/мл. Преимуществами методики является ее экспрессность и ресурсосберегаемость.

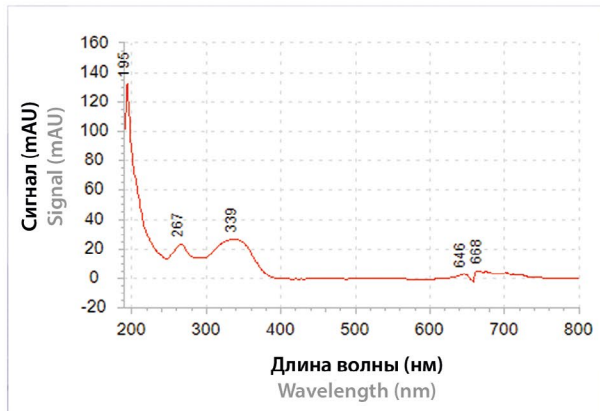
Результаты оценки сортовых преимуществ сельдерея показали, что количественное содержание хлорогеновой кислоты и других БАВ фенольного происхождения (гликозидов флавоноидов) отличается в зависимости от места произрастания сырья, а также от конкретного сорта растения. Наибольшее накопление БАВ продемонстрировал 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).

Следовательно, наиболее перспективным среди рассмотренных сортов является сорт Летний бум. Однако результаты исследования показали, что накопление действующих веществ также сильно зависит и от условий культивирования. Таким образом, актуальна коллаборация с учеными агропромышленного комплекса, подбор условий культивирования и дальнейший анализ сортовых преимуществ сельдерея пахучего и других сельскохозяйственных культур. Трансфер аналитических методик из фармацевтической индустрии в пищевую позволит обеспечить надлежащий контроль качества продуктов функционального и специализированного питания.

Предложенный аналитический подход к оценке сортовых преимуществ по содержанию целевых компонентов даст возможность выбрать оптимальные сорта для последующей разработки качественных продуктов, способствующих улучшению здоровья населения. Разработка экспрессных и селективных аналитических методик позволит проводить направленную оценку качества исходного сырья и разработанных продуктов.

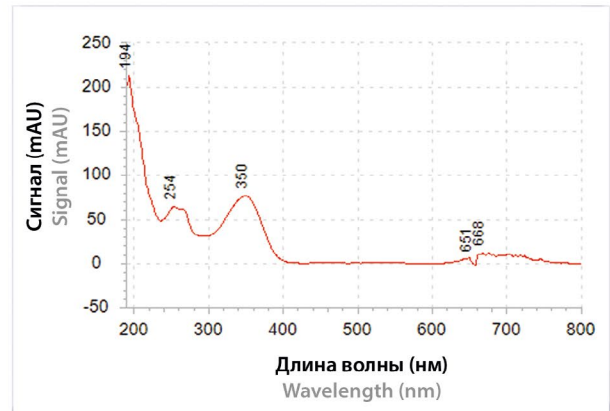
ЛИТЕРАТУРА

1. Golovinskaia O., Wang C.-K. The hypoglycemic potential of phenolics from functional foods and their mechanisms. *Food Science and Human Wellness*. 2023;12(4):986–1007. DOI: 10.1016/j.fshw.2022.10.020.
2. Fraga C. G., Oteiza P. I., Hid E. J., Galleano M. (Poly)phenols and the regulation of NADPH oxidases. *Redox Biology*. 2023;67:102927. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102927.
3. Cheng C., Li Z., Zhao X., Liao C., Quan J., Bode A. M., Cao Y., Luo X. Natural alkaloid and polyphenol compounds targeting lipid metabolism: Treatment implications in metabolic diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2020;870:172922. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.172922.
4. Петрухина Д. А., Плетнева И. В., Сысцев Б. Б. Современные лекарственные средства (ассортимент) и тенденции в совершенствовании лекарственных форм гепатопротекторных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):38–46. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-38-46.
5. Kumar B. R. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017;7(6):349–364. DOI: 10.1016/j.jpha.2017.06.005.



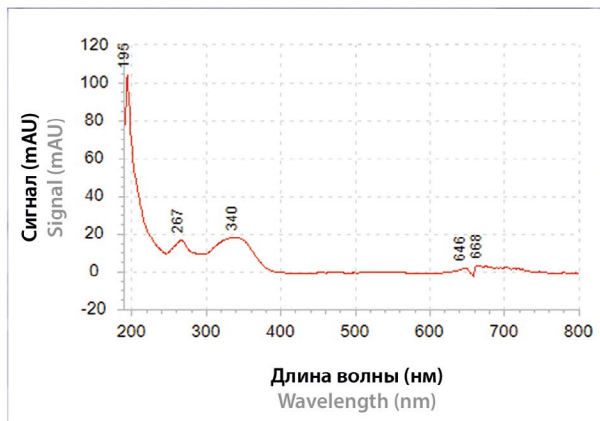
— Время 17.826 мин
Time 17.826 min

А
А



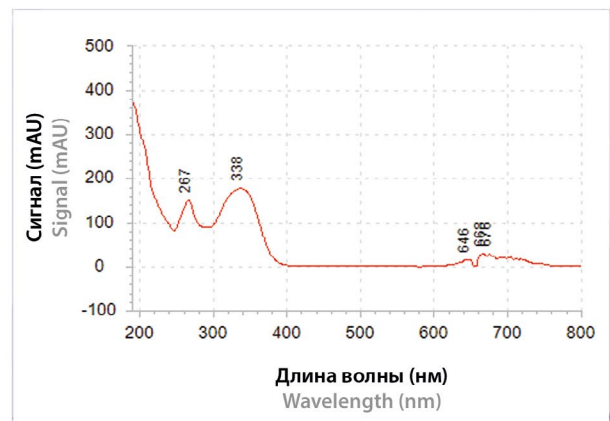
— Время 18.477 мин
Time 18.477 min

Б
В



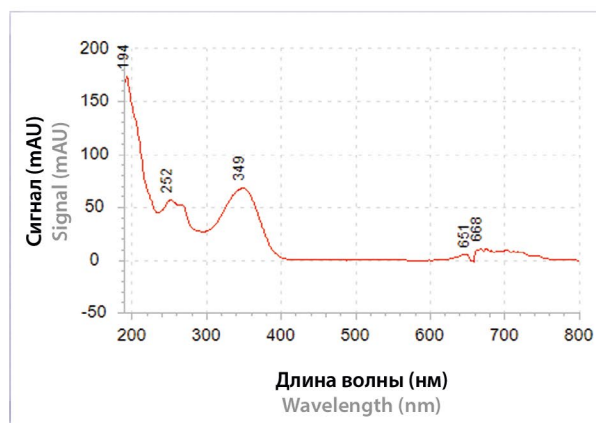
— Время 20.764 мин
Time 20.764 min

В
С



— Время 21.264 мин
Time 21.264 min

Г
Д



— Время 20.764 мин
Time 20.764 min

Д
Е

Рисунок 8. УФ-спектры пиков соединений № 2 (А), № 3 (Б), № 4 (В), № 5 (Г), № 6 (Д)

Figure 8. UV spectra of the peaks of majority compounds No. 2 (A), No. 3 (B), No. 4 (C), No. 5 (D), No. 6 (E)

- Rashmi H. B., Negi P. S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*. 2020;136:109298. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109298.
- Молчанова А. В., Голубкина Н. А., Кошеваров А. А., Харченко В. А., Шевченко Ю. П. Биохимическая характеристика сортов петрушки различных разновидностей (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ex A.W. Hill.). *Овощи России*. 2019;(3):74–79. DOI: 10.18619/2072-9146-2019-3-74-79.
- Lin L.-Z., Lu S., Harnly J. M. Detection and quantification of glycosylated flavonoid malonates in celery, Chinese celery, and celery seed by LC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(4):1321–1326. DOI: 10.1021/jf0624796.
- Скибина А. А., Боков Д. О., Гравель И. В., Ермакова В. А., Самылина И. А. ВЭЖХ-анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):98–102. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
- Altemimi A., Watson D. G., Choudhary R., Dasari M. R., Lightfoot D. A. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0148758. DOI: 10.1371/journal.pone.0148758.
- Vinson J. A., Chen X., Garver D. D. Determination of Total Chlorogenic Acids in Commercial Green Coffee Extracts. *Journal of Medicinal Food*. 2019;22(3):314–320. DOI: 10.1089/jmf.2018.0039.
- Wen J., Kang L., Liu H., Xiao Y., Zhang X., Chen Yu. A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching, Polypodiaceae. *Pharmacognosy Research*. 2012;4(3):148–153. DOI: 10.4103/0974-8490.99076.
- Craig A. P., Fields C., Liang N., Kitts D., Erickson A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta*. 2016;154:481–485. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.03.101.
- Wen J., Kang L., Liu H., Xiao Y., Zhang X., Chen Yu. A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching, Polypodiaceae. *Pharmacognosy Research*. 2012;4(3):148–153. DOI: 10.4103/0974-8490.99076.
- Li B., Robinson D. H., Birt D. F. Evaluation of properties of apigenin and [G-3H]apigenin and analytic method development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(6):721–725. DOI: 10.1021/js960383s.
- Kumar V. Structural Characterization of Luteolin Glycosides Flavonoids from Indian Plantation White Sugar. *Oriental Journal of Chemistry*. 2020;36(4):773–779. DOI: 10.13005/ojc/360425.
- Luan G., Wang H., Lv H., Hu N., Suo Y., Wang X. Separation and Purification of Five Flavone Glucosides and One Lignan from *Caragana korshinskii* Kom. by the Combination of HSCCC and Semi-preparative RPLC. *Chromatographia*. 2016;79:823–831 DOI: 10.1007/s10337-016-3090-4.
- Kumar B. R. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017;7(6):349–364. DOI: 10.1016/j.jpaha.2017.06.005.
- Rashmi H. B., Negi P. S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*. 2020;136:109298. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109298.
- Molchanova A. V., Golubkina N. A., Koshevarov A. A., Kharchenko V. A., Shevchenko J. P. Biochemical characteristics of parsley varieties (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ex A.W. Hill.). *Vegetable crops of Russia*. 2019;(3):74–79. (In Russ.) DOI: 10.18619/2072-9146-2019-3-74-79.
- Lin L.-Z., Lu S., Harnly J. M. Detection and quantification of glycosylated flavonoid malonates in celery, Chinese celery, and celery seed by LC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(4):1321–1326. DOI: 10.1021/jf0624796.
- Skibina A. A., Bokov D. O., Gravel I. V., Ermakova V. A., Samylyna I. A. HPLC-Analysis of Phenolic Complex in Pectoral Species № 4 and its Dry Extract. *Drug development & registration*. 2019;8(2):98–102. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
- Altemimi A., Watson D. G., Choudhary R., Dasari M. R., Lightfoot D. A. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0148758. DOI: 10.1371/journal.pone.0148758.
- Vinson J. A., Chen X., Garver D. D. Determination of Total Chlorogenic Acids in Commercial Green Coffee Extracts. *Journal of Medicinal Food*. 2019;22(3):314–320. DOI: 10.1089/jmf.2018.0039.
- Wen J., Kang L., Liu H., Xiao Y., Zhang X., Chen Yu. A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching, Polypodiaceae. *Pharmacognosy Research*. 2012;4(3):148–153. DOI: 10.4103/0974-8490.99076.
- Craig A. P., Fields C., Liang N., Kitts D., Erickson A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta*. 2016;154:481–485. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.03.101.
- Wen J., Kang L., Liu H., Xiao Y., Zhang X., Chen Yu. A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching, Polypodiaceae. *Pharmacognosy Research*. 2012;4(3):148–153. DOI: 10.4103/0974-8490.99076.
- Li B., Robinson D. H., Birt D. F. Evaluation of properties of apigenin and [G-3H]apigenin and analytic method development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(6):721–725. DOI: 10.1021/js960383s.
- Kumar V. Structural Characterization of Luteolin Glycosides Flavonoids from Indian Plantation White Sugar. *Oriental Journal of Chemistry*. 2020;36(4):773–779. DOI: 10.13005/ojc/360425.
- Luan G., Wang H., Lv H., Hu N., Suo Y., Wang X. Separation and Purification of Five Flavone Glucosides and One Lignan from *Caragana korshinskii* Kom. by the Combination of HSCCC and Semi-preparative RPLC. *Chromatographia*. 2016;79:823–831 DOI: 10.1007/s10337-016-3090-4.

REFERENCES

- Golovinskaia O., Wang C.-K. The hypoglycemic potential of phenolics from functional foods and their mechanisms. *Food Science and Human Wellness*. 2023;12(4):986–1007. DOI: 10.1016/j.fshw.2022.10.020.
- Fraga C. G., Oteiza P. I., Hid E. J., Galleano M. (Poly)phenols and the regulation of NADPH oxidases. *Redox Biology*. 2023;67:102927. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102927.
- Cheng C., Li Z., Zhao X., Liao C., Quan J., Bode A. M., Cao Y., Luo X. Natural alkaloid and polyphenol compounds targeting lipid metabolism: Treatment implications in metabolic diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2020;870:172922. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.172922.
- Petrukhina D. A., Pletneva I. V., Sysuev B. B. Modern Medicines (Assortment) and Trends in the Improvement of Dosage Forms of Hepatoprotective Agents (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(3):38–46. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-38-46.