

УДК 615.322:543.422.3

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ АНТОЦИАНОВ В ПЛОДАХ *MALPIGHIA EMARGINATA*

© *Е.Е. Курдюков^{1*}, И.Я. Моисеева¹, Е.Ф. Семенова², А.С. Феднина¹, Е.О. Гаранина¹*

¹ Пензенский государственный университет, ул. Красная, 40, Пенза, 440026, Россия, e.e.kurdyukov@mail.ru

² Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И.Вернадского», бул. Ленина, 5/7, Симферополь, 295006, Россия

Объектами исследования служили зрелые высушенные плоды мальпигии окаймленной (*Malpighia Emarginata*, сем. *Malpighiaceae* (Мальпигиевые)). Плоды мальпигии находят широкое применение в зарубежной медицинской практике в качестве антиоксидантного средства. Плоды мальпигии содержат антоцианы, витамины, каротиноиды. Наиболее распространенным методом количественного определения антоцианов является спектрофотометрия. Цель настоящей работы – определение содержания суммы антоцианов в плодах мальпигии методом спектрофотометрии.

Проведено количественное определение суммы антоцианов в плодах мальпигии методом прямой спектрофотометрии. Значения оптической плотности раствора антоцианов регистрировались при длине волны в области 250–700 нм. Определены аналитические максимумы исследуемых соединений при 534 нм, характерный для цианидин-3-О-глюкозида. Определены оптимальные условия экстракции антоцианов из сырья данного растения (экстрагент – 40% этанол; соотношение «сырье – экстрагент» – 1 : 50; время экстракции – 30 мин; степень измельченности сырья – 1.0 мм). Определено, что ошибка единичного определения содержания антоцианов в плодах мальпигии с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 6.79\%$.

Ключевые слова: мальпигия окаймленная, антоцианы, цианидин-3-О-глюкозид, спектрофотометрия, ацерола.

Для цитирования: Курдюков Е.Е., Моисеева И.Я., Семенова Е.Ф., Феднина А.С., Гаранина Е.О. Методика количественного определения суммы антоцианов в плодах *Malpighia emarginata* // Химия растительного сырья. 2024. №3. С. 207–212. DOI: 10.14258/jcprm.20240312951.

Введение

Мальпигия окаймленная (в народе Ацерола) относится к семейству Мальпигиевые (*Malpighiaceae*) [1–3]. Плоды мальпигий (рис. 1) богаты полифенолами: каротиноидами, антоцианами, витамином С, дубильными веществами. Плоды мальпигии содержат антоцианы в виде цианидин-3-О-глюкозида, цианидин-3-рутинозида, цианидин-3-альфа-О-рамнозид и пеларгонидин-3-альфа-О-рамнозид. Цианидин-3-О-глюкозид является основным антоцианом, присутствующим в плодах мальпигии [4–9].



Рис. 1. Плоды мальпигий

Содержание действующих веществ считается одним из важных нормируемых показателей качества растительного сырья, необходимо проводить исследования по разработке методики количественного определения данных групп биологически активных соединений [10]. Плоды мальпигии обладают антиоксидантной и противовоспалительной активностью. Данные виды фармакологической активности за счет определенного набора биологически активных соединений – антоцианов и флавоноидов [11–15].

* Автор, с которым следует вести переписку.

По литературным данным, одной из доминирующих групп биологически активных соединений в плодах мальпигии являются антоцианы, среди которых преобладают цианидин-3-О-глюкозид [5, 6]. Однако методики количественного определения антоцианов отсутствуют.

Цель настоящей работы – определение содержания суммы антоцианов в плодах мальпигии окаймленной методом спектрофотометрии.

Экспериментальная часть

Объектами служили зрелые высушенные плоды мальпигии окаймленной. Извлечение антоцианов из плодов мальпигии осуществляли путем однократной экстракции водой, этанолом (95, 70, 40 и 20%) при нагревании на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Для измерений на спектрофотометре СФ-200 использовали кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Спектры собственного поглощения антоцианов плодов мальпигии регистрировали в интервале длин волн 250–700 нм. Для количественного определения антоцианов в извлечениях из плодов мальпигии применяли метод прямой спектрофотометрии. Статистическую обработку осуществляли по методике, описанной в ГФ XIII [16].

1.0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой и прибавляют 50 мл спирта этилового, содержащего 1% хлористоводородной кислоты концентрированной, и взвешивали с погрешностью ± 0.01 г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 мин при перемешивании. Извлечение охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и при необходимости доводили до первоначальной массы спиртом, концентрация которого соответствовала используемой для экстракции. Полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр в колбу темного стекла, отбрасывая при этом первые 10 мл экстракта (раствор А). 5.0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 534 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый соответствующей концентрации, содержащий 1% хлористоводородной кислоты концентрированной.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидина-3-О-глюкозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{100 \cdot m \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность раствора Б; 100 – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 534 нм; m – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %.

Обсуждение результатов

Одним из наиболее быстрых и доступных методов количественного определения антоцианов является спектрофотометрический метод, основанный на определении оптической плотности раствора анализируемых веществ при определенной длине волны [17–21].

При изучении спектральных характеристик извлечений из плодов мальпигии, полученных различными экстрагентами (водно-спиртовые смеси различной концентрации, содержащие 1% кислоты хлористоводородной), наблюдали основной максимум поглощения в области 534 ± 2 нм, характерный для антоцианов (рис. 2) [16, 19]. В ходе эксперимента нами изучены условия экстракции антоцианов в зависимости от экстрагента, степени измельченности, времени экстрагирования, соотношения сырья и экстрагента. При выборе оптимальной концентрации экстрагента использовали воду, этанол, концентрация которого составляла 20, 40, 70 и 95%. Известно, что антоцианы остаются стабильными при нагревании до 80 °С. При дальнейшем повышении температуры происходит деструкция антоцианов. Стабилизирующее воздействие на антоциановые пигменты оказывает высокая концентрация сахаров, дубильные вещества, которые в большом количестве присутствуют в мальпигии, в связи с этим в нашем опыте не произошла деструкция антоцианов и они остались стабильными при 90 °С.

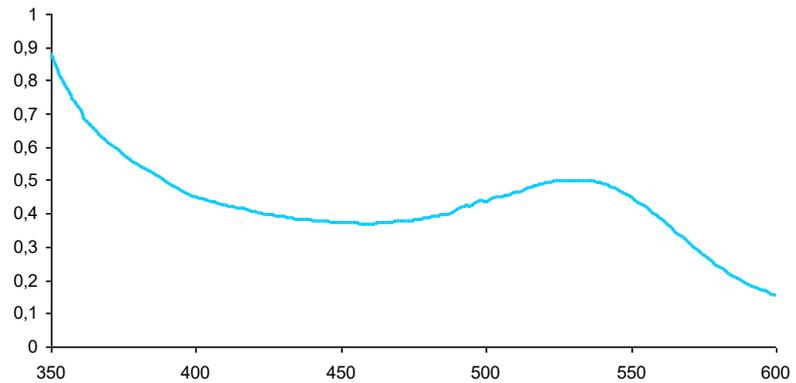


Рис. 2. УФ-спектр спиртового экстракта мальпигии

С целью разработки проекта методики количественного определения суммы антоцианов определены оптимальные условия экстракции: экстрагент – 40% этанол; соотношение «сырье – экстрагент» – 1 : 50; время экстракции – в течение 30 мин; степень измельченности сырья – 1.0 мм (табл. 1).

Определены максимумы поглощения антоцианов в извлечении из плодов мальпигии – 534 ± 2 нм (максимум). Положение максимумов не меняется при использовании в качестве экстрагента воды, этанола 20, 40, 70 и 95%.

Выявлено, что содержание суммы антоцианов при использовании в качестве экстрагента этанола 40% в плодах мальпигии окаймленной составляет 0.39% (табл. 1). Полученные результаты позволяют поставить плоды мальпигий окаймленной по содержанию антоцианов в один ряд с известными лекарственными растениями – источниками антоцианов.

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антоцианов в извлечении из плодов мальпигий окаймленной методом прямой спектрофотометрии указаны в таблице 2. Результаты статистической обработки свидетельствуют о том, что средняя ошибка определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более $\pm 5.03\%$ при определении суммы антоцианов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид.

Таблица 1. Влияние различных факторов на полноту извлечения антоцианов

Экстрагент	Соотношение «сырье – экстрагент»	Степень измельченности, мм	Время экстракции, мин	Температура, °С	Содержание суммы антоцианов
Влияние степени измельченности					
Этанол 70%	1 : 10	0.5	60	90	0.20±0.02
Этанол 70%	1 : 10	1.0	60	90	0.21±0.02
Этанол 70%	1 : 10	2.0	60	90	0.19±0.02
Этанол 70%	1 : 10	3.0	60	90	0.19±0.03
Влияние экстрагента					
Вода	1 : 10	1.0	60	90	0.15±0.03
Этанол 20%	1 : 10	1.0	60	90	0.20±0.03
Этанол 40%	1 : 10	1.0	60	90	0.23±0.02
Этанол 70%	1 : 10	1.0	60	90	0.21±0.02
Этанол 95%	1 : 10	1.0	60	90	0.11±0.02
Влияние соотношения «сырье – экстрагент»					
Этанол 40%	1 : 10	1.0	60	90	0.20±0.02
Этанол 40%	1 : 25	1.0	60	90	0.23±0.03
Этанол 40%	1 : 50	1.0	60	90	0.33±0.02
Этанол 40%	1 : 100	1.0	60	90	0.18±0.01
Влияние температуры экстрагирования					
Этанол 40%	1 : 50	1.0	60	комнатная	0.10±0.03
Этанол 40%	1 : 50	1.0	60	20	0.12±0.02
Этанол 40%	1 : 50	1.0	60	60	0.24±0.03
Этанол 40%	1 : 50	1.0	60	90	0.33±0.03
Влияние времени экстрагирования					
Этанол 40%	1 : 50	1.0	15	90	0.21±0.01
Этанол 40%	1 : 50	1.0	30	90	0.39±0.02
Этанол 40%	1 : 50	1.0	60	90	0.25±0.03
Этанол 40%	1 : 50	1.0	90	90	0.22±0.02

Таблица 2. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антоцианов в плодах мальпигии окаймленной

ЛРС	F	\bar{X}	S ²	S	P, %	t (P, f)	$\Delta \bar{X}$	E, %
Мальпигия окаймленная	5	0.39	0.00028	0.01167	95	2.776	±0.146	±5.03

Предложена методика количественного определения суммы антоцианов (прямая спектрофотометрия), определены параметры УФ-спектра водно-спиртового извлечения из плодов мальпигий максимум при $\lambda=534\pm 2$ нм. Положение максимумов не меняется при использовании в качестве экстрагента воды, этанола 20, 40, 70 и 95%.

Для экстракции антоцианов из плодов мальпигии целесообразно использование этанола 40%, так как интенсивность пиков в воде, 20, 70 и 95%-ных спиртовых экстрактах меньше, по сравнению с 40%.

Содержание антоцианов в сырье, равное 0.39%, достигается применением подобранных условий экстракции: степень измельчения – 1.0 мм, экстрагент – 40% этанол, соотношение «сырье – экстрагент» 1 : 10 и экстракцией на кипящей водяной бане в течение 30 мин.

Финансирование

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Пензенского государственного университета и Медицинской академии имени С.И. Георгиевского. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажите, были ли внесены изменения.

Список литературы

- Hanamura T., Uchida E., Aoki H. Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2008. Vol. 88. Pp. 1813–1820.
- Delva L., Schneider R.G. Acerola (*Malpighia emarginata* DC): production, postharvest handling, nutrition, and biological activity // Food Reviews International. 2013. Vol. 29, no. 2. Pp. 107–126.
- Prakash A., Baskaran R. Acerola, an untapped functional superfruit: a review on latest frontiers // J. Food Sci. Technol. 2018. Vol. 55, no. 9. Pp. 3373–3384.
- De Rosso V., Hillebrand V., Montilla S., Bobbio E.C., Winterhalter F.O., Mercadante A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and acai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS // Journal of Food Composition and Analysis. 2008. Vol. 21. Pp. 291–299.
- Hanamura T., Hagiwara T., Kawagishi H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2005. Vol. 69. Pp. 280–286.
- Kay C.D., Pereira-Caro G., Ludwig I.A., Clifford M.N., Crozier A. Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: A review of recent evidence // Annual Review of Food Science and Technology. 2017. Vol. 8. Pp. 155–180.
- Medina-Medrano J.R., Almaraz-Abarca N., González-Elizondo M.S., Uribe-Soto J.N., González-Valdez L.S., Herrera-Arrieta Y. Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (Solanaceae) // Botanical Studies. 2015. Vol. 56, no. 24. Pp. 1–13.
- Santos-Buelga C., Scalbert A. Proanthocyanidins and tanninlike compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000. Vol. 80. Pp.1094–1117.
- Castaneda Ovando A., Pacheco Hernandez M.L., Paez Hernandez M.E., Rodríguez J.A., Galan Vidal C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review // Food Chemistry. 2009. Vol. 113. Pp. 859–871.
- Самылина И.А., Баландина И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация // Фармация. 2004. №2. С. 39–41.
- Belwal T., Devkota H. P., Hassan H.A., Ahluwalia S., Ramadan M.F., Mocan A., Atanasov A.G. Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food // Trends in Food Science & Technology. 2015. Vol. 74. Pp. 99–106.
- Delva L., Goodrich-Schneider R. Antioxidant activity and antimicrobial properties of phenolic extracts from acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruit // International Journal of Food Science and Technology. 2013. Vol. 48. Pp. 1048–1056.

13. Kumari M., Jain S. Tannins: An antinutrient with positive effect to manage diabetes // *Research Journal of Recent Sciences*. 2012. Vol. 1. Pp. 10–73.
14. Mezadr T., Villano D., Fernandez-Pancho M.S., García-Parrilla M.C., Troncoso A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruits and derivatives // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008. Vol. 21, no. 4. Pp. 282–290.
15. Дейнека Л.А. Антоцианы: Природные антиоксиданты и не только // *Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина и фармация*. 2006. Т. 4, №3. С. 92–100.
16. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. М., 2018. Т. 2. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
17. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Староверов В.М. Исследование антоцианов черники в плодах и препаратах на ее основе // *Заводская лаборатория*. 2006. №3. С. 16–20.
18. Сорокопудов В.Н., Дейнека В.И., Лукина И.П., Дейнека Л.А. Антоцианы плодов некоторых видов рода *Rubus* L. из коллекции ботанического сада БелГУ // *Химия растительного сырья*. 2005. №4. С. 61–65.
19. Курдюков Е.Е., Митишев А.В., Водопьянова О.А. и др. Спектрофотометрическая методика количественного определения суммы антоцианов в сырье Эвтерпы овощной (*Euterpe oleracea*) // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2021. Т. 62, №6. С. 523–525.
20. Дейнека Л.А. Антоцианы плодов вишни и родственных растений // *Научные ведомости БелГУ*. 2011. Т. 15/1, №9. С. 364.
21. Куркин В.А., Рязанова Т.К. Определение антоцианов в плодах черники обыкновенной // *Фармация*. 2012. №2. С. 10–13.

Поступила в редакцию 9 мая 2023 г.

После переработки 4 декабря 2023 г.

Принята к публикации 11 апреля 2024 г.

Kurdyukov E.E.^{1}, Moiseeva I.Ya.¹, Semenova E.F.², Fednina A.S.¹, Garanina E.O.¹ METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE AMOUNT OF ANTHOCYANINS IN THE FRUITS OF MALPIGHIA EMARGINATA*

¹ *Penza State University, Krasnaya st., 40, Penza, 440026, Russia, e.e.kurdyukov@mail.ru*

² *Medical Academy named after S.I. Georgievsky, Kazan Federal University named after V.I. Vernadsky, bul. Lenina, 5/7, Simferopol, 295006, Russia*

The objects of the study were mature dried fruits of the fringed malpighia (*Malpighia Emarginata*, fam. Malpighiaceae). The fruits of malpighia are widely used in foreign medical practice as an antioxidant. The fruits of malpighia contain anthocyanins, vitamins, carotenoids. The most common method of quantitative determination of anthocyanins is spectrophotometry. The purpose of this work is to determine the amount of anthocyanins in the fruits of malpighia by spectrophotometry.

Quantitative determination of the amount of anthocyanins in the fruits of malpighia by direct spectrophotometry was carried out. The values of the optical density of the anthocyanin solution were recorded at a wavelength in the region of 250–700 nm. The analytical maxima of the studied compounds at 534 nm characteristic of cyanidin-3-O-glucoside were determined. Optimal conditions for the extraction of anthocyanins from the raw materials of this plant were determined (extractant – 40% ethanol; the ratio of "raw material – extractant" – 1 : 50; extraction time – 30 minutes; the degree of grinding of raw materials – 1.0 mm). It was determined that the error of a single determination of the content of anthocyanins in the fruits of malpighia with a confidence probability of 95% is ±6.79%.

Keywords: Malpighia Emarginata, anthocyanins, cyanidin-3-O-glucoside, spectrophotometry, acerola.

For citing: Kurdyukov E.E., Moiseeva I.Ya., Semenova E.F., Fednina A.S., Garanina E.O. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 3, pp. 207–212. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240312951.

References

1. Hanamura T., Uchida E., Aoki H. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, vol. 88, pp. 1813–1820.
2. Delva L., Schneider R.G. *Food Reviews International*, 2013, vol. 29, no. 2, pp. 107–126.
3. Prakash A., Baskaran R. *J. Food Sci. Technol.*, 2018, vol. 55, no. 9, pp. 3373–3384.
4. De Rosso V., Hillebrand V., Montilla S., Bobbio E.C., Winterhalter F.O., Mercadante A.Z. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, vol. 21, pp. 291–299.
5. Hanamura T., Hagiwara T., Kawagishi H. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, vol. 69, pp. 280–286.
6. Kay C.D., Pereira-Caro G., Ludwig I.A., Clifford M.N., Crozier A. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2017, vol. 8, pp. 155–180.

* Corresponding author.

7. Medina-Medrano J.R., Almaraz-Abarca N., González-Elizondo M.S., Uribe-Soto J.N., González-Valdez L.S., Herrera-Arrieta Y. *Botanical Studies*, 2015, vol. 56, no. 24, pp. 1–13.
8. Santos-Buelga C., Scalbert A. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol. 80, pp.1094–1117.
9. Castaneda Ovando A., Pacheco Hernandez M.L., Paez Hernandez M.E., Rodríguez J.A., Galan Vidal C.A. *Food Chemistry*, 2009, vol. 113, pp. 859–871.
10. Samylin I.A., Balandina I.A. *Farmatsiya*, 2004, no. 2, pp. 39–41. (in Russ.).
11. Belwal T., Devkota H. P., Hassan H.A., Ahluwalia S., Ramadan M.F., Mocan A., Atanasov A.G. *Trends in Food Science & Technology*, 2015, vol. 74, pp. 99–106.
12. Delva L., Goodrich-Schneider R. *International Journal of Food Science and Technology*, 2013, vol. 48, pp. 1048–1056.
13. Kumari M., Jain S. *Research Journal of Recent Sciences*, 2012, vol. 1, pp. 10–73.
14. Mezadr T., Villano D., Fernandez-Panchon M.S., García-Parrilla M.C., Troncoso A.M. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, vol. 21, no. 4, pp. 282–290.
15. Deyneka L.A. *Nauchnyye vedomosti BelGU. Seriya: Meditsina i farmatsiya*, 2006, vol. 4, no. 3, pp. 92–100. (in Russ.).
16. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. 14-ye izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed.]. Moscow, 2018, vol. 2. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. (in Russ.).
17. Deyneka V.I., Grigor'yev A.M., Deyneka L.A., Shaposhnik Ye.I., Staroverov V.M. *Zavodskaya laboratoriya*, 2006, no. 3, pp. 16–20. (in Russ.).
18. Sorokopudov V.N., Deyneka V.I., Lukina I.P., Deyneka L.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2005, no. 4, pp. 61–65. (in Russ.).
19. Kurdyukov Ye.Ye., Mitishev A.V., Vodop'yanova O.A. i dr. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2: Khimiya*, 2021, vol. 62, no. 6, pp. 523–525. (in Russ.).
20. Deyneka L.A. *Nauchnyye vedomosti BelGU*, 2011, vol. 15/1, no. 9, p. 364. (in Russ.).
21. Kurkin V.A., Ryazanova T.K. *Farmatsiya*, 2012, no. 2, pp. 10–13. (in Russ.).

Received May 9, 2023

Revised December 4, 2023

Accepted April 11, 2024

Сведения об авторах

Курдюков Евгений Евгеньевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры общей и клинической фармакологии, e.e.kurdyukov@mail.ru

Моисеева Инесса Яковлевна – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой общей и клинической фармакологии, профессор, moiseeva_pharm@mail.ru

Семенова Елена Федоровна – кандидат биологических наук, профессор кафедры фармации, sef1957@mail.ru

Феднина Анастасия Сергеевна – студентка, e.e.kurdyukov@mail.ru

Гаранина Екатерина Олеговна – студентка, e.e.kurdyukov@mail.ru

Information about authors

Kurdyukov Evgeny Evgenievich – candidate of pharmaceutical sciences, associate professor of the department of general and clinical pharmacology, e.e.kurdyukov@mail.ru

Moiseeva Inessa Yakovlevna – doctor of medical sciences, head of the department of general and clinical pharmacology, professor, moiseeva_pharm@mail.ru

Semenova Elena Fedorovna – candidate of biological sciences, professor of the department of pharmacy, sef1957@mail.ru

Fednina Anastasia Sergeevna – student, e.e.kurdyukov@mail.ru

Garanina Ekaterina Olegovna – student, e.e.kurdyukov@mail.ru