

УДК 577.114: 543.544.5.068.7:546.03

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИСАХАРИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЛОДОВ ЧЕРНИКИ КАВКАЗСКОЙ И ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ*

© *Х.А. Ибаева***, *А.А. Шамилов*, *Н.Н. Степанова*, *Е.Р. Гарсия*

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолеГМУ, Калинина пр., 11, Пятигорск, 357532, Россия, ibaeva.hadizhat@mail.ru

Природные высокомолекулярные соединения в медицине играют роль как самостоятельных веществ, так и сопутствующих в составе комплексных препаратов и в качестве транспортных компонентов действующих веществ. Такими компонентами являются полисахариды – растительные полимеры, чьи физико-химические параметры играют важную роль в разработке фармацевтических субстанций растительного происхождения.

Цель: установить физико-химические параметры полисахаридов, полученных из плодов черники кавказской и черники обыкновенной.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: выделить водорастворимые полисахариды (ВРПС) и пектиновые вещества (ПВ), установить их мономерный состав, рассчитать среднюю молекулярную массу вискозиметрическим методом, определить изоэлектрическую точку, коэффициент распределения, поверхностную активность.

Результаты. Содержание ВРПС в плодах черники кавказской составило 2.70%, в плодах черники обыкновенной – 3.62%; содержание ПВ в плодах черники кавказской – 0.67%, в плодах черники обыкновенной – 1.82%. Установлено присутствие 8 моносахаров, кроме глюконовой кислоты в ВРПС из плодов черники кавказской. Основными по количественному содержанию в ВРПС плодов черники являются галактоза и арабиноза, в ПВ – галактуроновая кислота и галактоза. Наибольшую молярную массу имеют ВРПС из плодов черники обыкновенной ($M_{ВРПС} = 11263.82$ г/моль) и ПВ из плодов черники кавказской ($M_{ПВ} = 12289.95$ г/моль). Макромолекулы ВРПС и ПВ находятся в электронейтральном состоянии при значении рН среды меньше 7. Молекулы не влияют на поверхностное натяжение на границе двух фаз, но при этом обладают проникающей способностью между гидрофильной и липофильной средами.

Выводы. Полисахариды из плодов черники кавказской и черники обыкновенной обладают высокой молекулярной массой и могут быть предложены в качестве вспомогательных веществ для коррекции реологических свойств мягкой или жидкой лекарственной формы, а также в качестве транспортных молекул-носителей для действующих веществ. В кислой среде макромолекулы полимеров находятся в электронейтральном состоянии, при этом снижается их растворимость и способность к набуханию. При этом полимеры обладают высокой проникающей способностью через клеточную мембрану. Эти свойства обуславливают транспорт и биодоступность как самих полисахаридов, так и основных действующих веществ.

Ключевые слова: черника кавказская, черника обыкновенная, полисахариды, вязкость, молекулярная масса.

Для цитирования: Ибаева Х.А., Шамилов А.А., Степанова Н.Н., Гарсия Е.Р. Сравнительная характеристика физико-химических свойств полисахаридов, выделенных из плодов черники кавказской и черники обыкновенной // Химия растительного сырья. 2024. №4. С. xxx–xxx. DOI: 10.14258/jcprm.20240414259.

Введение

Природные полимеры – полисахариды – вызывают к себе интерес своей нетоксичностью, доступностью, уникальностью физико-химических свойств. Полисахариды бактериального и растительного происхождения используются как кровезаменители, гипохолестеринемические, иммуностимулирующие средства, входят в состав питательных сред для культивирования бактериальных штаммов, при выращивании тканевых культур [1, 2].

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20240414259s

** Автор, с которым следует вести переписку.

Исследование растительных полисахаридов включают выделение их из лекарственного растительного сырья (ЛРС), анализ структуры и физико-химических параметров современными методами, установление фармакологической активности как самостоятельных субстанций, так и суммарных извлечений из ЛРС. Исследования показывают, что полисахариды оказывают радиопротекторное, регенеративное, иммуномодулирующее, гепатопротекторное действие [1, 2]. Сорбционная способность полисахаридов может влиять на продолжительность действия и биодоступность экстракционных препаратов растительного происхождения, а также использована при разработке средств доставки индивидуальных действующих веществ. Кроме того, полисахариды за счет сорбционной способности могут применяться наравне с синтетическими адсорбентами, оказывая при этом радиопротекторное действие, снижать содержание тяжелых металлов в организме [3–8].

Одним из богатых источников полисахаридов являются плоды, поступающие на переработку на фармацевтические и пищевые предприятия. Так, плоды черники обыкновенной на фармацевтических предприятиях выпускаются как источник дубильных веществ с выраженным вяжущим действием, а также используются для производства препаратов, эффективных при заболеваниях глаз, таких как Миртикам, Стрикс, Миртилене Форте для глаз [9]. В пищевой отрасли плоды входят в состав джемов, кондитерских изделий, молочных продуктов. Наряду с этим плоды черники обыкновенной могут быть источником полисахаридов, которые можно получать как индивидуальную группу биологически активных веществ наряду с основными продуктами переработки плодов. Дополнительным источником к плодам черники обыкновенной можно предложить плоды черники кавказской (*Vaccinium arctostaphylos* L.) – эндемика Северного Кавказа, Ирана, Турции [10]. Плоды черники кавказской могут быть предложены как дополнительный источник биологически активных веществ (БАВ) к плодам черники обыкновенной как фармакопейному виду ЛРС. Имеются фитохимические исследования плодов, в которых обнаружены флавоноиды, в том числе антоцианы, фенолокислоты, полисахариды [11–13].

В связи с малой изученностью и возможного филогенетического родства с черникой обыкновенной предпринята попытка сравнительного анализа ВРПС и ПВ из плодов двух черник.

Экспериментальная часть

Объектами исследования являются высушенные плоды черники кавказской, собранной в Апшеронском районе Краснодарского края (конец августа 2021 г.), и черники обыкновенной, полученные от компании «ФитоФарм» (г. Анапа, Россия). Выделяли фракции полисахаридов из плодов, предварительно очищенных от липофильных соединений экстракцией петролейным эфиром и далее от фенольных соединений экстракцией спиртом этиловым 70%, согласно методике [14, 15].

Определение мономерного состава ВРПС и ПВ. Анализ проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектором с предколоночной дериватизацией с 1-фенил-3-метил-5-пиразолоном (ФМП) [16, 17]. Мономерный состав полисахаридных фракций проводили после гидролиза 25 мг каждой фракции. При этом ВРПС выдерживали в среде 72% серной кислоты (0.25 мл) при комнатной температуре 30 мин с периодическим перемешиванием, далее в смесь добавляли 2.75 мл воды очищенной и выдерживали закрытый флакон при 100 °С 2 ч. Фракцию ПВ гидролизовали в 3 мл 2 М раствора трифторуксусной кислоты при 100 °С 8 ч. Далее каждую смесь охлаждали до комнатной температуры. Гидролизат объемом 1.5 мл отбирали в пробирку типа «Эппендорф» и центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об./мин (ВРПС) или 2 мл гидролизата центрифугировали в течение 15 мин при 6000 об./мин (ПВ). Далее надосадочную жидкость объемом 1 мл переносят в другую пробирку типа «Эппендорф», добавляют твердый кальция карбонат до pH 6.5–7.0, суспензию с необходимым pH центрифугируют в течение 1 мин при 14000 об./мин (ВРПС) или 1 мл надосадочной жидкости концентрируют под вакуумом до удаления остатков трифторуксусной кислоты с постепенным добавлением метанола, сухой остаток растворяют в 1 мл воды очищенной и нейтрализуют твердым кальция карбонатом до pH 6.5–7.0 при необходимости, центрифугируют 1 мин при 14000 об./мин (ПВ).

Для предколоночной дериватизации отбирают 50 мкл супернатанта и помещают в пробирку типа «Эппендорф» объемом 5 мл, добавляют 50 мкл 0.6 М раствора натрия гидроксида, 100 мкл 0.5 М раствора ФМП, перемешивают смесь на Вортексе персональном V-1 Plus и выдерживают в термостате при 70 °С в течение 60 мин. Смесь охлаждают до комнатной температуры и нейтрализуют 120 мкл 0.3 М раствора хлористоводородной кислоты, доводят нейтрализованную смесь до 1 мл водой очищенной. Добавляют 1 мл

хлороформа, энергично встряхивают, после расслоения отделяют органический слой, повторяют еще дважды очистку хлороформом. Водный остаток центрифугируют в течение 5 мин при 4000 об./мин, фильтруют через шприцевой фильтр диаметром 0.45 мкм.

Хроматографический анализ полученного извлечения проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1260 в колонке Gemini NX-C18 размером 150×4.6 мм, 5 мкм, с размером пор 110 Å. Условия анализа: скорость потока – 0.6 мл/мин, температура колонки – 30 °С, объем инъекции – 10 мкл, детектир спектрофотометрический при длине волны 245 нм. Режим анализа градиентный: 0–35 мин 88→83% А + 12→17% Б; 35–36 мин 83→80% А + 17→20% Б; 36–45 мин 80% А + 20% Б; 45–46 мин 80→88% А + 20→12% Б; 46–65 мин 88% А + 12% Б.

Стандартные образцы маннозы, рамнозы, глюкоурановой, галактурановой кислот, глюкозы, ксилозы, галактозы и арабинозы в количестве 3 мг гидролизуют в 3 мл 1 М раствора серной кислоты в течение 2 ч при 100 °С (ВРПС) или в 3 мл 2 М раствора трифторуксусной кислоты в течение 8 ч при 100 °С (ПВ), далее нейтрализуют гидролизаты, дериватизацию и хроматографический анализ проводят аналогично испытуемым фракциям.

Расчет количественного содержания моносахаридов проводили по формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot 3 \cdot 100}{S_0 \cdot a_x \cdot 3}, \quad (1)$$

где S_x – площадь пика каждого из моносахаридов на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика каждого из моносахаридов на хроматограмме стандартного раствора; a_x – навеска каждого испытуемого образца, мг; a_0 – навеска стандартного образца каждого из моносахаридов соответственно, мг.

Определение средней молярной массы ВРПС и ПВ вискозиметрическим методом. Вискозиметрическим методом определяли среднюю молекулярную массу ВРПС, полученных из плодов черники. Эксперимент проводили с помощью капиллярного вискозиметра Оствальда с измерением истечения воды и водных растворов полисахаридов различных концентраций (C). Жидкости были взяты одинаковых объемов (15 мл) для определения относительной вязкости растворов полисахаридов с помощью уравнения Пуазейля-Гагена:

$$Q = \frac{V}{t} = \frac{\pi r^4 \Delta p}{8 \eta l}, \quad (2)$$

где Q – объемная скорость течения, равная отношению объема жидкости V ко времени t его протекания по капилляру с радиусом r и длиной l ; Δp – разность давлений на концах капилляра, вызывающая течение жидкости), зная время их вытекания:

$$\eta_{\text{отн.}} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0}, \quad (3)$$

где η и η_0 – динамическая вязкость раствора полисахарида и воды соответственно; t и t_0 – время их вытекания.

Для определения удельной и приведенной вязкости растворов использовали уравнения:

$$\eta_{\text{уд.}} = \eta_{\text{отн.}} - 1 \quad (4)$$

$$\eta_{\text{пр.}} = \frac{\eta_{\text{уд.}}}{C} \quad (5)$$

Среднюю молярную массу ВРПС определяли с помощью уравнения Марка-Хаувинка-Куна, содержащего в себе характеристическую вязкость $[\eta]$:

$$[\eta] = KM^\alpha, \quad (6)$$

где K и α – константы, постоянные для данного полимергомологического ряда и растворителя (константа α учитывает гибкость макромолекул); из литературных данных $K = 1.1 \cdot 10^{-5}$, $\alpha = 1.2$ [18–21].

Для определения характеристической вязкости $[\eta]$ использовали графический способ с построением зависимостей приведенной вязкости растворов полисахаридов от их концентрации, как отрезок, отсекаемый этой линией от оси ординат.

Определение изоэлектрической точки (ИЭТ) ВРПС и ПВ вискозиметрическим методом. Капиллярным вискозиметром Оствальда также определяли ИЭТ. Ацетатные буферные растворы с различным рН объемом по 10 мл с содержанием по 5 мл 1% растворов исследуемых веществ.

В качестве показателя измерения брали время истечения из капилляра приготовленных растворов (t) и такого же объема дистиллированной воды (t_0). Рассчитывают относительную вязкость по уравнению (2).

Объемы уксусной кислоты ($C = 0.2$ моль/л) и ацетата натрия ($C = 0.2$ моль/л), используемые для приготовления буферных растворов с необходимым значением рН, высчитываются с помощью уравнения:

$$pH_{\text{буф. р-ра}} = pK + \lg \frac{V_{CH_3COONa} \cdot C_{CH_3COONa}}{V_{CH_3COOH} \cdot C_{CH_3COOH}} \quad (7)$$

При этом растворы, имеющие наименьшее время истечения из капилляра и, соответственно, наименьшую относительную вязкость, имеют то значение рН, при котором макромолекулы полисахаридов находятся в электронейтральном состоянии, то есть данное значение рН раствора соответствует ИЭТ [22].

Исследование поверхностной активности ВРПС и ПВ. С помощью стагмометрического метода (метод счета капель) и метода Ребиндера (метод наибольшего давления пузырька воздуха при проскакивании его в жидкость) изучают поверхностно-активные свойства ВРПС и ПВ. Единица измерения давления (h) – мм ст.ж.

Уравнение для расчета поверхностного натяжения:

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \frac{n_0 \cdot \rho}{n \cdot \rho_0}, \quad (8)$$

где σ и σ_0 – поверхностное натяжение раствора полисахарида и воды соответственно, Н/м ($\sigma_{H_2O} = 72.28 \cdot 10^{-3}$ Н/м при 23 °С); n и n_0 – число капель раствора полисахарида и воды соответственно при вытекании из капилляра стагмометра; ρ и ρ_0 – плотность раствора полисахарида и воды соответственно, г/см³.

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \frac{h \cdot \rho}{h_0 \cdot \rho_0}, \quad (9)$$

где σ и σ_0 – поверхностное натяжение раствора полисахарида и воды соответственно, Н/м ($\sigma_{H_2O} = 72.28 \cdot 10^{-3}$ Н/м при 23 °С); h и h_0 – высота столба раствора полисахарида и воды соответственно при продавлировании пузырька воздуха в приборе Ребиндера; ρ и ρ_0 – плотность раствора полисахарида и воды соответственно, г/см³.

Определение коэффициентов распределения ВРПС и ПВ между двумя жидкими фазами. С помощью кондуктометрического метода определили коэффициенты распределения ВРПС и ПВ между двумя жидкими фазами с целью исследования транспорта веществ через клеточные мембраны [20–22]. Серия водных растворов ВРПС и ПВ, приготовленных путем разбавления вдвое, с содержанием 30 мл органического растворителя (этилацетата) в качестве экстрагента. Экстрагировали 40 мин. После чего с помощью кондуктометра «Эксперт-002» измеряли сопротивление (R) исходных водных растворов исследуемых веществ и водных растворов после экстракции.

При предварительном определении константы ячейки (K_a) измерением сопротивления стандартного 0.02 М раствора хлорида калия с известной удельной электрической проводимостью при температуре опыта $T = 21$ °С:

$$R_{KCl} = 371.3 \text{ Ом}; \quad \kappa_{KCl} = 0.002553 \text{ Ом}^{-1}\text{см}^{-1} = 0.2553 \text{ Ом}^{-1}\text{м}^{-1}$$

$$K_a = \kappa_{KCl} \cdot R_{KCl} = 0.2553 \text{ Ом}^{-1}\text{м}^{-1} \cdot 371.3 \text{ Ом} = 94.793 \text{ м}^{-1}$$

$$\kappa_i = K_a/R_i [\text{Ом}^{-1}\text{м}^{-1}] = K_a/R_i [\text{См/м}] = 1000 \cdot K_a/R_i [\text{мСм/м}]$$

Удельную электрическую проводимость растворов (κ) рассчитывали по уравнению

$$\kappa = \frac{K_d}{R} \quad (10)$$

После экстракции в водных растворах определили концентрацию (C_1) путем построения прямо пропорциональной зависимости концентрацией раствора слабого электролита от его удельной электропроводности. Концентрацию веществ в органической фазе нашли по разнице: $C_2 = C_0 - C_1$.

Для определения коэффициенты распределения ВРПС и ПВ между этилацетатом и водой использовали закон распределения Нернста:

$$K = \frac{C_1}{C_2^n}, \quad (11)$$

где C_1 – равновесная концентрация извлекаемого вещества в водной фазе, C_2 – его концентрация в органической фазе, n – степень ассоциации (показатель при данной температуре, обусловленный свойствами всех трех компонентов системы).

Степень ассоциации и коэффициент распределения определяли уравнением Нернста в линейной форме, в которую привели путем логарифмирования. Отрезок, отсекаемый полученной прямой на оси ординат, равен $\lg K$, а тангенс ее наклона равен n .

Коэффициенты распределения исследуемых ВРПС и ПВ по уравнению Нернста и степень извлечения веществ в органическую фазу, которые рассчитаны с путем определения степени ассоциации графическим методом, по уравнению:

$$\alpha = 1 - \frac{KV_1}{KV_1 + V_2} = \frac{1}{K + 1}, \quad (12)$$

где V_1 и V_2 – объем исходного раствора исследуемого вещества и объем экстрагента соответственно ($V_1 = V_2 = 30$ мл).

Обсуждение результатов

Нами установлено, что в исследуемых образцах плодов черники кавказской содержится $2.70 \pm 0.10\%$ ВРПС и $0.67 \pm 0.03\%$ ПВ, в плодах черники обыкновенной – $3.62 \pm 0.14\%$ ВРПС, $1.82 \pm 0.08\%$ ПВ.

Идентификацию пиков на хроматограммах испытуемых растворов ВРПС и ПВ проводили по совпадению времени удерживания с пиками на хроматограмме смеси стандартных образцов моносахаридов (рис. 1 электронного приложения). Установлено, что ВРПС из плодов черники кавказской состоят из маннозы, рамнозы, галактуроновой кислоты, глюкозы, ксилозы, галактозы и арабинозы, при этом основными по содержанию являются арабиноза и галактоза. В ВРПС плодов черники обыкновенной найдена также глюкуроновая кислота, основными моносахарами являются галактоза и арабиноза (табл. 1, рис. 2 и 3 электронного приложения). Пектиновые вещества из плодов черники кавказской найдены все моносахара из перечня используемых стандартных образцов, основными по содержанию являются галактуроновая кислота и галактоза, в ПВ из плодов черники обыкновенной – также галактуроновая кислота и галактоза (табл. 1, рис. 4 и 5 электронного приложения).

Большинство свойств высокомолекулярных веществ, к которым относятся полисахариды, определяются их молекулярной массой, от чего зависит и способность к набуханию и растворению.

Экспериментальные и расчетные данные представлены в таблице 2.

Согласно полученным результатам, молекулярная масса ВРПС плодов черники обыкновенной в 17 раз больше, чем у черники кавказской.

Аналогично была определена молярной массы пектиновых веществ, выделенных из плодов черники. Экспериментальные и расчетные данные представлены в таблице 3.

Согласно полученным результатам, молекулярная масса ПВ плодов черники кавказской в 3 раза больше, чем у черники обыкновенной.

Водные растворы ВРПС и ПВ проводят электрический ток, в связи с чем их относят к полиэлектролитам, которые используются как ионообменники ПАВ, структурообразователи, загустители и др. Макромолекулы ВМВ содержат кислотные и основные группы, поэтому относятся к полиамфолитам, обладающим изоэлектрическим состоянием (ИЭС) при необходимом рН, которое называется изоэлектрической точкой (ИЭТ).

ИЭС характеризуется одинаковым количеством ионизированных основных и кислотных групп и отсутствием заряда, при котором макромолекулы принимают глобулярную конформацию. В таком состоянии резко меняются свойства: вязкость уменьшается, набухание и растворимость снижаются. Вследствие чего ИЭТ относится к одним из основных характеристик полиамфолитов. Макромолекулы ВРПС и ПВ включают в себя больше диссоциирующих кислотных групп, чем основных – они более сильные кислоты, чем основания, из-за чего их ИЭТ предположительно меньше 7. Результаты экспериментов представлены в таблицах 4, 5.

Полученные результаты подтверждают электронейтральное состояние полисахаридных комплексов при рН меньше 7. Более низкое значение рН, при котором установлена ИЭТ полисахаридных фракций, связано с высоким содержанием галактуроновой кислоты и свободных карбоксильных групп, особенно в ПВ.

Таблица 1. Содержание моносахаридов в полисахаридных фракциях, выделенных из плодов видов черник, %

Образец	Манноза	Рамноза	Глюкуроно- вая кислота	Галактуроно- вая кислота	Глюкоза	Ксилоза	Галактоза	Араби- ноза
Черника кавказская (плоды) ВРПС	0.07±0.01	0.03±0.01	–	0.73±0.03	0.60±0.02	0.76±0.03	1.45±0.04	1.83±0.07
Черника обыкновенная (плоды) ВРПС	0.03±0.01	0.19±0.01	0.41±0.02	0.16±0.01	0.90±0.03	1.15±0.05	5.12±0.12	3.55±0.09
Черника кавказская (плоды) ПВ	0.42±0.02	1.00±0.04	1.89±0.06	8.90±0.14	0.89±0.03	0.48±0.02	3.86±0.08	1.95±0.07
Черника обыкновенная (плоды) ПВ	0.14±0.01	1.78±0.06	1.53±0.05	14.11±0.16	0.73±0.03	0.48±0.3	4.60±0.10	1.08±0.05

Таблица 2. Вязкость водных растворов ВРПС, выделенных из плодов черники кавказской и черники обыкновенной (температура 21 °С)

№	Концентрация С, %	Время истечения t, с	$\eta_{отн}$	$\eta_{уд}$	$\eta_{пр}$	Характеристическая вязкость $[\eta]$	Молярная масса М, г/моль
<i>ВРПС черники кавказской</i>							
H ₂ O	–	24.72	–	–	–	0.0267	662.11
1	0.2	25.09	1.02	0.02	0.07		
2	0.4	26.82	1.09	0.09	0.21		
3	0.6	28.78	1.16	0.16	0.27		
4	0.8	31.33	1.27	0.27	0.33		
5	1.00	34.64	1.40	0.40	0.33		
<i>ВРПС черники обыкновенной</i>							
H ₂ O	–	24.72	–	–	–	0.8006	11263.82
1	0.2	29.07	1.18	0.18	0.81		
2	0.4	33.49	1.35	0.35	0.82		
3	0.6	37.46	1.52	0.52	0.79		
4	0.8	44.02	1.78	0.78	0.90		
5	1.00	46.47	1.88	0.88	0.81		

Таблица 3. Вязкость водных растворов ПВ, выделенных из плодов черники кавказской и черники обыкновенной (температура 21 °С)

№	Концентрация С, %	Время истечения t, с	$\eta_{отн}$	$\eta_{уд}$	$\eta_{пр}$	Характеристическая вязкость $[\eta]$	Молярная масса М, г/моль
<i>ПВ черники кавказской</i>							
H ₂ O	–	24.72	–	–	–	0.8889	12289.95
1	0.2	30.26	1.22	0.22	1.10		
2	0.4	38.82	1.57	0.57	1.40		
3	0.6	48.36	1.96	0.96	1.57		
4	0.8	62.58	2.53	1.53	1.88		
5	1.0	76.16	3.08	2.08	2.05		
<i>ПВ черники обыкновенной</i>							
H ₂ O	–	24.72	–	–	–	0.2175	3802.38
1	0.2	25.73	1.04	0.04	0.20		
2	0.4	27.26	1.10	0.10	0.25		
3	0.6	28.34	1.15	0.15	0.24		
4	0.8	29.00	1.17	0.17	0.21		
5	1.0	30.76	1.24	0.24	0.24		

Большинство природных полисахаридов и пектиновых веществ обладают поверхностной активностью, определяющей их применение. Нами экспериментально доказано, что ВРПС и ПВ из плодов черники кавказкой и черники обыкновенной относятся к поверхностно неактивным веществам (ПНАВ) (результаты эксперимента находятся в пределах погрешности измерения). В ходе эксперимента установлен одинаковый характер истечения из сталагмометра серии растворов полисахаридов и растворителя – воды, а также одинаковый уровень поднятия жидкости в приборе Ребиндера.

Результаты расчета коэффициентов распределения и степени ассоциации полисахаридов и пектиновых веществ, выделенных из плодов черники кавказкой и черники обыкновенной, представлены в таблицах 6, 7.

Таблица 4. Определение ИЭТ водорастворимых полисахаридов, выделенных из плодов черники кавказкой и черники обыкновенной (температура 21 °С)

№	1	2	3	4	5	6	H ₂ O
V _{CH₃COOH} , мл	9.7	9.2	7.8	5.2	2.6	1.0	–
V _{CH₃COONa} , мл	0.3	0.8	2.2	4.8	7.4	9.0	–
pH раствора	3.2	3.7	4.2	4.7	5.2	5.7	–
<i>ВРПС черники кавказкой</i>							
Время истечения <i>t</i> , с	24.15	24.57	24.43	24.86	24.77	25.68	24.72
Относительная вязкость $\eta_{\text{отн}}$	0.97	0.99	0.98	1.01	1.00	1.04	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	3.2						
<i>ВРПС черники обыкновенной</i>							
Время истечения <i>t</i> , с	28.92	31.47	28.99	29.14	28.80	29.47	24.72
Относительная вязкость $\eta_{\text{отн}}$	1.17	1.27	1.17	1.18	1.16	1.19	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	5.2						

Таблица 5. Определение ИЭТ пектиновых веществ, выделенных из видов плодов черники кавказкой и черники обыкновенной

№	1	2	3	4	5	6	H ₂ O
V _{CH₃COOH} , мл	9.7	9.2	7.8	5.2	2.6	1.0	–
V _{CH₃COONa} , мл	0.3	0.8	2.2	4.8	7.4	9.0	–
pH раствора	3.2	3.7	4.2	4.7	5.2	5.7	–
<i>ПВ черники кавказкой</i>							
Время истечения <i>t</i> , с	29.72	33.11	29.30	29.92	29.93	29.18	24.72
Относительная вязкость $\eta_{\text{отн}}$	1.20	1.34	1.19	1.21	1.21	1.18	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4.2						
<i>ПВ черники обыкновенной</i>							
Время истечения <i>t</i> , с	25.19	25.65	25.42	25.64	25.86	25.69	24.72
Относительная вязкость $\eta_{\text{отн}}$	1.02	1.04	1.03	1.04	1.05	1.04	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	3.2						

Таблица 6. Экспериментальные данные и результаты определения коэффициента распределения и степени извлечения ВРПС, выделенных из плодов черники кавказкой и черники обыкновенной

№	C ₀ , %	R ₀ , Ом/см	R ₁ , Ом/см	C ₁	C ₂	lg C ₁	lg C ₂	K _{граф}	n	K	α, %	
<i>ВРПС черники кавказкой</i>												
1	0.1	7987	8380	0.10	0.005	-1.02	-2.33	1.31	0.48	1.27	43	
2	0.2	4249	4588	0.19	0.02	-0.73	-1.83			1.42		
3	0.3	3375	3917	0.26	0.04	-0.58	-1.38			1.21		
4	0.4	2673	3120	0.34	0.06	-0.46	-1.24			1.37		
										K _{сред} =	1.32	
<i>ВРПС черника обыкновенная</i>												
1	0.1	20114	21166	0.10	0.01	-0.99	-2.27	0.49	0.30	0.49	66	
2	0.2	8310	13202	0.14	0.08	-0.86	-1.09			0.29		
3	0.3	7610	9684	0.26	0.07	-0.59	-1.16			0.57		
4	0.4	4669	5915	0.34	0.09	-0.46	-1.04			0.70		
										K _{сред} =	0.51	

Таблица 7. Экспериментальные данные и результаты определения коэффициента распределения и степени извлечения ПВ, выделенных из плодов черники кавказской и черники обыкновенной

№	$C_0, \%$	$R_0, \text{Ом/см}$	$R_1, \text{Ом/см}$	C_1	C_2	$\lg C_1$	$\lg C_2$	$K_{\text{граф}}$	n	K	$\alpha, \%$
<i>ПВ черники обыкновенной</i>											
1	0.10	3652	4414	0.08	0.02	-1.07	-1.76	1.50	0.72	1.53	40
2	0.20	2265	2919	0.16	0.05	-0.80	-1.34			1.45	
3	0.31	1700	2248	0.23	0.07	-0.64	-1.13			1.49	
4	0.41	1392	1868	0.30	0.10	-0.52	-0.98			1.54	
									$K_{\text{сред}} =$	1.50	
<i>ПВ черноголовки крупноцветковой</i>											
1	0.1	3420	4037	0.09	0.02	-1.07	-1.81	2.61	0.82	2.70	28
2	0.2	1689	2091	0.16	0.04	-0.79	-1.41			2.40	
3	0.3	1342	1651	0.25	0.06	-0.61	-1.25			2.65	
4	0.4	1237	1531	0.33	0.08	-0.49	-1.11			2.71	
									$K_{\text{сред}} =$	2.61	

Коэффициенты распределения, рассчитанные по уравнению закона распределения Нернста, сопоставимы с найденным графически, что говорит о достоверности полученных результатов. Таким образом, наилучшей проникающей способностью обладают ВРПС из плодов черники обыкновенной (коэффициент распределения составил 0.51, степень извлечения 66%) и ПВ из плодов черники кавказской (коэффициент распределения составил 1.5, степень извлечения 40%).

Выводы

Из плодов черники обыкновенной и черники кавказской выделены полисахаридные фракции: водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества. Далее установлены следующие характеристики выделенных полисахаридных фракций:

1. Полисахариды состоят из 8 моносахаров: маннозы, рамнозы, глюконовой, галактуриновой кислот, глюкозы, ксилозы, галактозы и арабинозы. В состав ВРПС из плодов черники кавказской не входит глюконовая кислота. Основными по количественному содержанию в ВРПС плодов черник являются галактоза и арабиноза, в ПВ – галактуриновая кислота и галактоза.

2. Наибольшую молярную массу и, следовательно, самый большой размер молекул и меньшую растворимость имеют ВРПС черники обыкновенной ($M_{\text{ВРПС}} = 11263.82 \text{ г/моль}$) и ПВ черники кавказской ($M_{\text{ПВ}} = 12289.95 \text{ г/моль}$).

3. Исследуемые ВРПС и ПВ являются полиэлектролитами. Более низкое значение рН, при котором возникает электронейтральное состояние макромолекул в растворе, установлено для ПВ за счет преобладания в макромолекулах кислотных групп галактуриновой кислоты.

4. ВРПС и ПВ являются поверхностно неактивными веществами и не могут быть использованы в качестве стабилизаторов за счет отсутствия поверхностной активности.

5. Процесс перехода ВРПС в органический слой в изобарно-изотермических условиях протекает самопроизвольно. Наибольшая эффективность этого перехода наблюдается у ВРПС, выделенных из плодов черники обыкновенной, и ПВ, выделенных из плодов черники кавказской. Для этих веществ выявлены наименьшая величина коэффициента распределения и наибольшая степень перехода в неполярную (органическую) фазу: для ВРПС черники обыкновенной $K \approx 0.51$, $\alpha = 66\%$; для ПВ черноголовки обыкновенной $K \approx 1.5$, $\alpha = 40\%$.

Установленные физико-химические характеристики полисахаридных комплексов из плодов черники обыкновенной и черники кавказской позволяют разработать эффективную лекарственную форму с необходимыми параметрами растворимости, высвобождения действующих веществ, их биодоступности и проницаемости через биологические мембраны организма, выраженности и длительности фармакологического эффекта.

Дополнительная информация

В электронном приложении к статье (DOI: <http://www.doi.org/10.14258/jcprtm.20240414259s>) приведен дополнительный экспериментальный материал, раскрывающий основные положения, изложенные в статье.

Финансирование

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Пятигорского медико-фармацевтического института. 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 укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Генералов Е.А. Физико-химические подходы к анализу природных полисахаридов // Auditorium. 2015. №4(8). С. 38–54.
2. Оленников Д.Н., Кашенко Н.И. Полисахариды. Современное состояние изученности: экспериментально-наукометрическое исследование // Химия растительного сырья. 2014. №1. С. 5–26. <https://doi.org/10.14258/jcprm.1401005>.
3. Huang G., Mei X., Hu J. The Antioxidant Activities of Natural Polysaccharides // Curr. Drug Targets. 2017. Vol. 18 (11). Pp. 1296–1300. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170123145357>.
4. Wang W., Xue C., Mao X. Radioprotective effects and mechanisms of animal, plant and microbial polysaccharides // Int. Biol. Macromol. 2020. Vol. 153. Pp. 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.203>.
5. Grassino A.N., Barba F.J., Brnčić M., Lorenzo J.M., Lucini L., Brnčić S.R. Analytical tools used for the identification and quantification of pectin extracted from plant food matrices, wastes and by-products: A review // Food Chem. 2018. Vol. 266. Pp. 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.105>.
6. Аджихметова С.Л., Мыкоц Л.П., Червонная Н.М., Харченко И.И., Туховская Н.А., Оганесян Э.Т. Изучение реологических и сорбционных свойств пектинсодержащих растворов из листьев рябины рябинолистного // Фармация и фармакология. 2017. Т. 5, №5. С. 442–456. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-08-06>.
7. Селина И.И., Пеливанова С.Л., Андреева О.А., Лигай Л.В., Мыкоц Л.П., Оганесян Э.Т. Физико-химические характеристики пектинов и водорастворимых полисахаридов крыжовника отклоненного (*Grossularia reclinata* L. Mill.), листьев шелковицы черной (*Morus nigra* L.) и шелковицы белой (*Morus alba* L.) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. Т. 11, №10. С. 20–25.
8. Халиков Д.Х., Мирзоева Р.С., Бободжонова Г.Н., Горшкова Р.М., Халикова С., Авлоев Х.Х. О сорбционной активности пектиновых полисахаридов по отношению к ионам металлов // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. 2017. Т. 60, №7-8. С. 333–341.
9. Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс]. URL: <https://grls.rosminzdrav.ru>.
10. The World Flora Online (WFO). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.worldfloraonline.org>.
11. Ayaz F.A., Hayirlioglu-Ayaz S., Gruz J., Novak O., Strnad M. Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) fruit by HPLC-MS // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. Vol. 53(21). Pp. 8116–8122. <https://doi.org/10.1021/jf058057y>.
12. Jooyandeh H., Noshad M., Khamirian R.A. Modeling of ultrasound-assisted extraction, characterization and in vitro pharmacological potential of polysaccharides from *Vaccinium arctostaphylos* L. // International journal of biological macromolecules. 2018. Vol. 107. Pp. 938–948. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.077>.
13. Lähti A.K., Kainulainen P.S., Hayirlioglu-Ayaz S., Ayaz F.A., Riihinen K.R. Characterization of anthocyanins in Caucasian blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) native to Turkey // Journal of agricultural and food chemistry. 2009. Vol. 57(12). Pp. 5244–5249. <https://doi.org/10.1021/jf9005627>.
14. Шамилов А.А. Полисахаридный состав травы черноголовки разрезной (*Prunella laciniata* L.), произрастающей на Северном Кавказе // Современные проблемы науки и образования. 2015. №2-2. 5 с.
15. Шамилов А.А. Анализ полисахаридного, аминокислотного и элементного состава травы черноголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.), произрастающей на Северном Кавказе // Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. №3. С. 271–277.
16. Cebin A.V., Komes D., Ralet M-C. Development and Validation of HPLC-DAD Method with Pre-Column PMP Derivatization for Monomeric Profile Analysis of Polysaccharides from Agro-Industrial Wastes // Polymers. 2022. Vol. 14 (3). 544. <https://doi.org/10.3390/polym14030544>.
17. Sun X., Wang H., Han X., Chen S., Zhu S., Dai J. Fingerprint analysis of polysaccharides from different Ganoderma by HPLC combined with chemometrics methods // Carbohydrate Polymers. 2014. Vol. 114. Pp. 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.048>.
18. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. М., 1964. 720 с.
19. Гарсия Е.Р., Мыкоц Л.П., Лигай Л.В., Шамилов А.А., Коновалов Д.А. Качественный состав и некоторые физико-химические показатели полисахаридных фракций из травы татарника колючего // Химия растительного сырья. 2021. №4. С. 65–73. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2021049074>.

20. Червонная Н.М., Харченко И.И., Аджиахметова С.Л., Мыкоц Л.П., Андреева О.А., Оганесян Э.Т. Определение некоторых физико-химических свойств пектиновых веществ из шрота соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) // Фармация и фармакология. 2017. Т. 5, №3. С. 267–282. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2017-5-3-267-282>.
21. Аджиахметова С.Л., Мыкоц Л.П., Степанова Н.Н., Червонная Н.М. Изучение реологических свойств растворов пектиновых веществ, полученных из растительного сырья // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». 2020. Т. 22, №6. С. 88–92. <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-6-88-92>.
22. Шукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия. М., 2006. 444 с.

Поступила в редакцию 5 декабря 2023 г.

После переработки 5 мая 2024 г.

Принята к публикации 17 мая 2024 г.

*Ibayeva Kh.A.**, *Shamilov A.A.*, *Stepanova N.N.*, *Garsiya Ye.R.* COMPARATIVE STUDY OF PHYSIC-CHEMICAL PROPERTIES OF POLYSACCHARIDES SELECTED FROM FRUITS OF *VACCINIUM ARCTOSTAPHYLOS* L. AND *VACCINIUM MYRTILLUS* L.

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education VolgSMU, Kalinina av., 11, Pyatigorsk, 357532, Russia, ibayeva.hadizhat@mail.ru

In medicine we use natural high-molecular weight substances as individual or as secondary agents in complex preparations and as transport agents for the main substances. Polysaccharides as plant polymers may be as these agents and we need to know their physical and chemical features in the development of the pharmaceutical substances of plant origin.

Aim. Investigation of physical and chemical features of polysaccharides from fruits of *Vaccinium arctostaphylos* L. and *Vaccinium myrtillus* L. For this aim, we solved the following tasks: isolate water-soluble polysaccharides (WSPS) and pectinic substances (PS), establish monomer content, estimate medium molecular weight of by viscosimeter, isoelectric point, distribution coefficient, superficial activity.

Results. Amount of WSPS from *V. arctostaphylos* fruits is 2.70%, from *V. myrtillus* – 3.62%; amount of PS from *V. arctostaphylos* is 0.67%, from *V. myrtillus* – 1.82%. We identified eight monosaccharides from all fractions except glucuronic acid in the WSPS from *V. arctostaphylos* fruits. The main compounds of WSPS from *Vaccinium* fruits are galactose and arabinose, of PS – galacturonic acid and galactose. WSPS from *V. myrtillus* has largest molecular weight (11263.82 g/mol) and PS from *V. arctostaphylos* has largest molecular weight (12289.95 g/mol). Macromolecules of WSPS and PS are electroneutral in the solution with pH<7. The molecules do not affect the surface tension at the boundary of the two phases, but at the same time they have a penetrating ability.

Conclusions. Polysaccharides from *V. arctostaphylos* and *V. myrtillus* fruits have high molecular weight and may be used as secondary substances for correction of rheological properties of semisolid and liquid dosage forms and also as transport carrier molecule for the main substances. Macromolecules are electroneutral in the acidic environment and insoluble in water solution and have small ability to swell. Polymers have high penetrating ability through the cell membrane. These properties determine transport and bioavailability of polysaccharides and main compounds.

Keywords: *Vaccinium arctostaphylos*, *Vaccinium myrtillus*, polysaccharides, viscosity, molecular weight.

For citing: Ibayeva Kh.A., Shamilov A.A., Stepanova N.N., Garsiya Ye.R. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 4, pp. xxx–xxx. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240414259.

References

1. Generalov Ye.A. *Auditorium*, 2015, no. 4(8), pp. 38–54. (in Russ.).
2. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2014, no. 1, pp. 5–26. <https://doi.org/10.14258/jcprm.1401005>. (in Russ.).
3. Huang G., Mei X., Hu J. *Curr. Drug Targets*, 2017, vol. 18 (11), pp. 1296–1300. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170123145357>.
4. Wang W., Xue C., Mao X. *Int. Biol. Macromol.*, 2020, vol. 153, pp. 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.203>.
5. Grassino A.N., Barba F.J., Brnčić M., Lorenzo J.M., Lucini L., Brnčić S.R. *Food Chem.*, 2018, vol. 266, pp. 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.105>.
6. Adzhiakhmetova S.L., Mykots L.P., Chervonnaya N.M., Kharchenko I.I., Tukhovskaya N.A., Oganesyana E.T. *Farmatsiya i farmakologiya*, 2017, vol. 5, no. 5, pp. 442–456. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-08-06>. (in Russ.).

* Corresponding author.

7. Selina I.I., Pelivanova S.L., Andreyeva O.A., Ligay L.V., Mykots L.P., Oganeyan E.T. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*, 2013, vol. 11, no. 10, pp. 20–25. (in Russ.).
8. Khalikov D.Kh., Mirzoyeva R.S., Bobodzhonova G.N., Gorshkova R.M., Khalikova S., Avloyev Kh.Kh. *Doklady Akademii nauk Respubliki Tadjikistan*, 2017, vol. 60, no. 7-8, pp. 333–341. (in Russ.).
9. *Gosudarstvennyy reyestr lekarstvennykh sredstv*. [State Register of Medicines]. URL: <https://grls.rosminzdrav.ru>. (in Russ.).
10. *The World Flora Online (WFO)*. URL: <http://www.worldfloraonline.org>.
11. Ayaz F.A., Hayirlioglu-Ayaz S., Gruz J., Novak O., Strnad M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53(21), pp. 8116–8122. <https://doi.org/10.1021/jf058057y>.
12. Jooyandeh H., Noshad M., Khamirian R.A. *International journal of biological macromolecules*, 2018, vol. 107, pp. 938–948. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.077>.
13. Lähti A.K., Kainulainen P.S., Hayirlioglu-Ayaz S., Ayaz F.A., Riihinen K.R. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009, vol. 57(12), pp. 5244–5249. <https://doi.org/10.1021/jf9005627>.
14. Shamilov A.A. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, 2015, no. 2-2, 5 p. (in Russ.).
15. Shamilov A.A. *Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*, 2018, no. 3, pp. 271–277. (in Russ.).
16. Cebin A.V., Komes D., Ralet M-C. *Polymers*, 2022, vol. 14 (3), 544. <https://doi.org/10.3390/polym14030544>.
17. Sun X., Wang H., Han X., Chen S., Zhu S., Dai J. *Carbohydrate Polymers*, 2014, vol. 114, pp. 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.048>.
18. Tsvetkov V.N., Eskin V.Ye., Frenkel' S.Ya. *Struktura makromolekul v rastvorakh*. [Structure of macromolecules in solutions]. Moscow, 1964, 720 p. (in Russ.).
19. Garsiya Ye.R., Mykots L.P., Ligay L.V., Shamilov A.A., Kononov D.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2021, no. 4, pp. 65–73. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2021049074>. (in Russ.).
20. Chervonnaya N.M., Kharchenko I.I., Adzhiakhmetova S.L., Mykots L.P., Andreyeva O.A., Oganeyan E.T. *Farmatsiya i farmakologiya*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 267–282. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2017-5-3-267-282>. (in Russ.).
21. Adzhiakhmetova S.L., Mykots L.P., Stepanova N.N., Chervonnaya N.M. *Mediko-farmatsevticheskiy zhurnal «Pul's»*, 2020, vol. 22, no. 6, pp. 88–92. <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-6-88-92>. (in Russ.).
22. Shchukin Ye.D., Pertsov A.V., Amelina Ye.A. *Kolloidnaya khimiya*. [Colloid chemistry]. Moscow, 2006, 444 p. (in Russ.).

Received December 5, 2023

Revised May 5, 2024

Accepted May 17, 2024

Сведения об авторах

Ибаева Хадижат Альвиевна – аспирант,
ibaeva.hadizhat@mail.ru

Шамилов Арнольд Алексеевич – кандидат
фармацевтических наук, доцент кафедры
фармакогнозии, ботаники и технологии
фитопрепаратов, shamilovxii@yandex.ru

Степанова Наталья Николаевна – кандидат
фармацевтических наук, доцент кафедры
неорганической, физической и коллоидной химии,
stepanova131265@gmail.com

Гарсия Екатерина Робертовна – кандидат
фармацевтических наук, преподаватель кафедры
фармакогнозии, ботаники и технологии
фитопрепаратов, x-pharm@mail.ru

Information about authors

Ibaeva Khadizhat Alviyevna – postgraduate student,
ibaeva.hadizhat@mail.ru

Shamilov Arnold Alekseevich – candidate of pharmaceutical
sciences, associate professor of the department of
pharmacognosy, botany and technology of herbal
preparations, shamilovxii@yandex.ru

Stepanova Natalia Nikolaevna – candidate of
pharmaceutical sciences, associate professor of the
department of inorganic, physical and colloidal chemistry,
stepanova131265@gmail.com

Garcia Ekaterina Robertovna – candidate of pharmaceutical
sciences, lecturer of the department of pharmacognosy,
botany and technology of herbal preparations, x-pharm@mail.ru