

УДК 615.322

DOI: 10.34215/1609-1175-2022-3-75-80



Определение профиля антоцианов и оптимальных параметров их экстрагирования из плодов шикши черной *Empetrum nigrum*

С.Г. Пономарчук¹, А.А. Саликова¹, Н.В. Плаксен¹, Л.В. Устинова¹, В.П. Григорчук²¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия² Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, Владивосток, Россия

Цель исследования – определение профиля антоцианов и оптимальных параметров их экстрагирования из плодов шикши черной. **Материалы и методы.** Объектами исследования служили высушенные плоды шикши черной. Для идентификации антоцианов плодов шикши черной использовали tandem ВЭЖХ и масс-спектрометрии, количественное содержание антоцианов в плодах шикши определяли с помощью дифференциальной спектрофотометрии. **Результаты.** Экспериментально определено содержание в плодах: дельфинидина, цианидина, петунидина, пеонидина, мальвидина. Основными антоцианами плодов шикши являются цианидин-3-галактоза (33,068%), дельфинидина-3 галактоза (21,733%), мальвидин-3-галактоза (15,374%). Экспериментальный подбор оптимальных параметров экстракции позволил определить необходимые условия для предельного извлечения антоцианов из сырья. Установлено, что максимальное количество антоцианов из плодов шикши извлекается при следующих условиях: экстрагент – спирт этиловый 70%-ный, содержащий кислоту хлористоводородную; вес навески 1,0 г; размер частиц сырья 1,0 мм; соотношение сырья и экстрагента 1:70; время экстракции 90 минут. **Заключение.** В плодах *Empetrum nigrum*, собранных в Камчатском крае, было идентифицировано 8 антоцианов, содержание антоцианов в сухих плодах шикши черной составило $5,65 \pm 0,04\%$.

Ключевые слова: шикша черная, *Empetrum nigrum*, плоды, антоцианы, цианидин, дельфинидин, пеонидин, мальвидин, петунидин

Поступила в редакцию 16.03.22. Получена после доработки 22.06.22. Принята к печати 27.06.22

Для цитирования: Пономарчук С.Г., Саликова А.А., Плаксен Н.В., Устинова Л.В., Григорчук В.П. Определение профиля антоцианов и оптимальных параметров их экстрагирования из плодов шикши черной *Empetrum nigrum*.

Тихоокеанский медицинский журнал. 2022;3:75–80. doi: 10.34215/1609-1175-2022-3-75-80

Для корреспонденции: Пономарчук Светлана Григорьевна – старший преподаватель кафедры фармации Тихоокеанского медицинского университета (690002, Владивосток, пр-т Острякова, 2); ORCID: 0000-0002-1060-249X; тел.: +7 (924) 131-17-07; e-mail: ponomarchuk.60@mail.ru

Determination of the anthocyanine profile and optimal parameters of their extraction from *Empetrum nigrum* fruits

S.G. Ponomarchuk¹, A.A. Salikova¹, N.V. Plaksen¹, L.V. Ustinova¹, V.P. Grigorchuk²¹ Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia; ² Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Vladivostok, Russia

Aim. To determine the profile of anthocyanins and optimal parameters of their extraction from *Empetrum nigrum* fruits. **Materials and methods.** Anthocyanins contained in the dried fruits of *Empetrum nigrum* were identified using HPLC and mass spectrometry. The anthocyanin content was determined using differential spectrophotometry. **Results.** *Empetrum nigrum* fruits were found to contain the following substances: delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin. The main anthocyanins comprised cyanidin-3-galactose (33.068%), delphinidin-3-galactose (21.733%), and malvidin-3-galactose (15.374%). The necessary conditions for the maximum extraction of anthocyanins from *Empetrum nigrum* fruits were established to be as follows: the use of 70% ethyl alcohol containing hydrochloric acid as an extractant; a sample weight of 1.0 g; a particle size of 1.0 mm; the 1:70 ratio of raw materials and extractant; an extraction time of 90 min. **Conclusions.** The *Empetrum nigrum* fruits grown in the Kamchatka region were found to contain eight anthocyanins were identified. The anthocyanin content comprised $5.65 \pm 0.04\%$.

Keywords: black crowberry, *Empetrum nigrum*, fruits, anthocyanins, cyanidin, delphinidin, peonidin, malvidin, petunidin

Received 16 March 2022. Revised 22 June 2022. Accepted 27 June 2022

For citation: Ponomarchuk S.G., Salikova A.A., Plaksen N.V., Ustinova L.V., Grigorchuk V.P. Determination of the anthocyanine profile and optimal parameters of their extraction from *Empetrum nigrum* fruits. *Pacific Medical Journal*. 2022;3:75–80. doi: 10.34215/1609-1175-2022-3-75-80

Corresponding author: Svetlana G. Ponomarchuk, senior lecturer of the Department of Pharmacy Pacific State Medical University (2, Ostryakova Ave., Vladivostok, 690002, Russia Federation); ORCID: 0000-0002-1060-249X, phone: +7 (924) 131-17-07; e-mail: ponomarchuk.60@mail.ru

Фитопрепараты на основе антоцианов являются перспективными для снижения риска развития сердечно-сосудистых и желудочно-кишечных заболеваний, ожирения и диабета [1], поэтому исследование уникальных и малоизученных в фармакологическом аспекте

антоциансодержащих дальневосточных растений является оправданным поиском дополнительных средств для предупреждения вышеназванных состояний. К таким растениям можно отнести вечнозеленый стелющийся кустарничек голарктических и арктических

областей семейства вересковых, с круглыми плодами и листьями, похожими на хвоинки – шикшу черную *Empetrum nigrum* [2].

Шикша (водяника, вороника) дикорастущее ягодное растение, хорошо приспособленное к местным условиям, формирует ягоды черного цвета, в которых содержится многокомпонентный комплекс вторичных соединений: антоцианы, флавоноиды, углеводы, эфирное масло, тритерпеновые сапонины, кумарины, дубильные вещества, витамин С, фенолкарбоновые кислоты [2, 3]. Антоцианы или антоцианины (водорастворимые гликозиды антоцианидинов) относятся к флавоноидам, находятся в вакуолях, представляют собой водорастворимые пигменты, придающие плодам черную окраску [4, 5].

Антиоксидантное, противовоспалительное и сосудукрепляющее действие плодов шикши черной подтверждено в доклинических и клинических исследованиях. Они способны понижать уровень глюкозы в крови, проявляют противогрибковую и антимикробную активность [6, 7].

В результате исследования фармакотерапевтической эффективности сока из плодов шикши черной подтвержден значительный потенциал его компонентов для предотвращения сосудистых нарушений при аллоксановом диабете [8]. Однако дальнейшее изучение фармакологических эффектов антоцианов ограничено ввиду отсутствия данных об условиях их выделения из нативного лекарственного сырья.

Цель настоящей работы состояла в определении профиля антоцианов и оптимальных параметров их экстрагирования из плодов шикши черной.

Материалы и методы

Объектами исследования служили высушенные плоды шикши черной. Заготовка плодов произведена в 2021 году на полуострове Камчатка в период созревания. Установлена подлинность и доброкачественность трех партий сырья. Ягоды шикши водянистые, слегка кислые, имеют вязущий вкус, pH сока составляет 4,5.

Сочные плоды шикши черной содержат высокое количество воды, обеспечивающее высокий уровень биохимических процессов, поэтому сушили их быстро, с частым перемешиванием, при температуре 60–80 °C [9]. В сухих плодах определяли аналитическую влажность [10].

Для исследования профиля антоцианов использовали сухие плоды шикши черной. Измельченный материал (1,0 г) экстрагировали 2 мл 70% метиловым спиртом с добавлением 2% муравьиной кислоты в течение 30 минут на ультразвуковой бане, затем выдерживали в темноте при комнатной температуре. Через 20 часов полученные экстракты центрифугировали (15 000 g, 10 мин) и фильтровали через 0,45 мкм фильтр (нейлон, Millipore, Bedford, MA, USA). Аликвоту 1 мкл использовали для аналитической хроматографии. Высокоэффективную жидкостную хроматографию

(ВЭЖХ) проводили на хроматографе 1260 Infinity (Agilent, США) с системой насосов высокого давления Quaternary Pump G1311C, автоинжектором G1329B, термостатом колонок G1316A и детектором на диодной матрице G1315D. Для разделения компонентов экстрактов использовали хроматографическую колонку с обращенной фазой Zorbax C18 (150×2,1 мм, 3,5 мкм, Agilent, США). Подвижная фаза состояла из растворов муравьиной кислоты (1%) в деионизированной воде (А) и в ацетонитриле (Б). Элюирование проводили при температуре 40 °C с постоянной скоростью потока растворителей 0,2 мл/мин с использованием следующего градиента: 0% Б, 0–5 мин; 0–20% Б, 5–35 мин; 20–40% Б, 35–50 мин [11]. Длина волны детектирования составила 520 нм. УФ-спектры записывали в диапазоне длин волн от 200 до 800 нм.

Для идентификации антоцианов использовали tandem ВЭЖХ и масс-спектрометрии (МС) Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik, GmbH, Германия). Масс-спектрометрический сигнал записывали в режиме ионизации электрораспылением и регистрации положительных ионов в диапазоне значений m/z 100–800. Тандемную масс-спектрометрию проводили в автоматическом режиме при напряжении фрагментации 1 В.

Для определения содержания суммы антоцианов в плодах шикши черной была взята за основу фармакопейная методика стандартизации плодов аронии черноплодной по содержанию антоцианинов [9].

На процесс экстракции оказывают влияние множество факторов [12], поэтому экспериментально, эмпирически определяли оптимальные параметры извлечения антоцианов: экстрагент, соотношение сырья и экстрагента, размер частиц, время экстракции.

Наиболее подходящими экстрагентами для антоцианов являются полярные растворители (водно-спиртовые растворы) и подкислители [12]. Степень измельчения сырья также оказывает влияние на полноту экстрагирования, при этом диффузионные процессы обеспечиваются выбором оптимального размера частиц [13].

Экстракция при нагревании способствует деградации антоцианов [11]. Извлечение проводили этиловым спиртом в кислой среде (1% соляная кислота) при постоянном перемешивании, без нагрева (при комнатной температуре).

Количественное определение антоцианов в плодах шикши черной определяли по следующей методике: 1,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящего сквозь сито 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и прибавляют 70 мл свежеприготовленного спирта этилового 70%-го, содержащего раствор хлористоводородной кислоты (к 100 мл 70% этанола приливают по каплям 1,0 мл концентрированной хлористоводородной кислоты). Извлечение антоцианов проводят при комнатной температуре в течение 90 мин при постоянном перемешивании. Полученный экстракт фильтровали

через бумажный фильтр в колбу темного стекла (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл раствора А, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 534 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 70%-ный, содержащий хлористоводородную кислоту.

Количественное содержание антоцианов в исследуемых образцах рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{A \times 70 \times 25 \times 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \times a \times 1 \times (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-гликозида при длине волны 534 нм, равный 100;

а – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %

Результаты экспериментов статистически обработаны согласно требованиям ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIV издания с использованием критерия Стьюдента (t) и с расчетом средних арифметических и доверительного интервала ($\bar{x} \pm \Delta x$), стандартного отклонения (s) и относительной ошибки методов количественного определения (ϵ) [9].

Результаты исследования

Полученное извлечение анализировали с использованием аналитического оборудования ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. ВЭЖХ-УФ профиль извлечения, записанный при $\lambda = 520$ нм (рис. 1 а), показал наличие 8 компонентов, характеризующихся как антоцианы. Идентификацию компонентов проводили путем сравнения полученных данных: последовательности элюирования компонентов, УФ- и МС-параметров (рис. 1, табл. 1) с ранее опубликованными для семейства *Empetrum* [14].

Для определения оптимальных параметров извлечения антоцианов из плодов шикши были выбраны экстрагенты следующей концентрации: спирт этиловый 40, 70 и 95%. Результаты эксперимента показывают целесообразность использования спирта этилового 70% (табл. 2)

Для определения соотношения сырья и экстрагента использовали различные количества этанола при постоянном весе навески (1,0 г) (табл. 3).

Изучение степени измельченности плодов шикши показывает, что максимальная экстракция антоцианов происходит при размерах частицы, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм (табл. 4).

Извлечение антоцианов из плодов шикши проводилось без нагревания, при постоянном перемешивании в течение 60, 90 и 120 минут.

Результаты исследования показывают, что максимальная экстракция антоцианов из плодов шикши происходит в течение 90 минут (табл. 5).

В результате проведенных экспериментов установлены оптимальные условия экстракции антоцианов из плодов шикши черной: экстрагент – спирт этиловый 70%, размер частиц 1,0 мм, соотношение сырья и экстрагента 1:70, время экстракции 90 минут.

Количественное содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-гликозид в плодах шикши черной составляет $5,65 \pm 0,04\%$ (табл. 6).

Обсуждение полученных данных

Антоцианы, содержащиеся в коже плодов шикши, активно препятствуют окислительному стрессу клеток организма, снижают перекисное окисления липидов, уменьшают проницаемость и хрупкость капилляров и укрепляют мембраны, обладают гипогликемической и гиполипидемической активностью [5, 6].

В экспериментах использовали экстракционные методы выделения антоциановых комплексов как наиболее информативные. Получение окрашенных форм

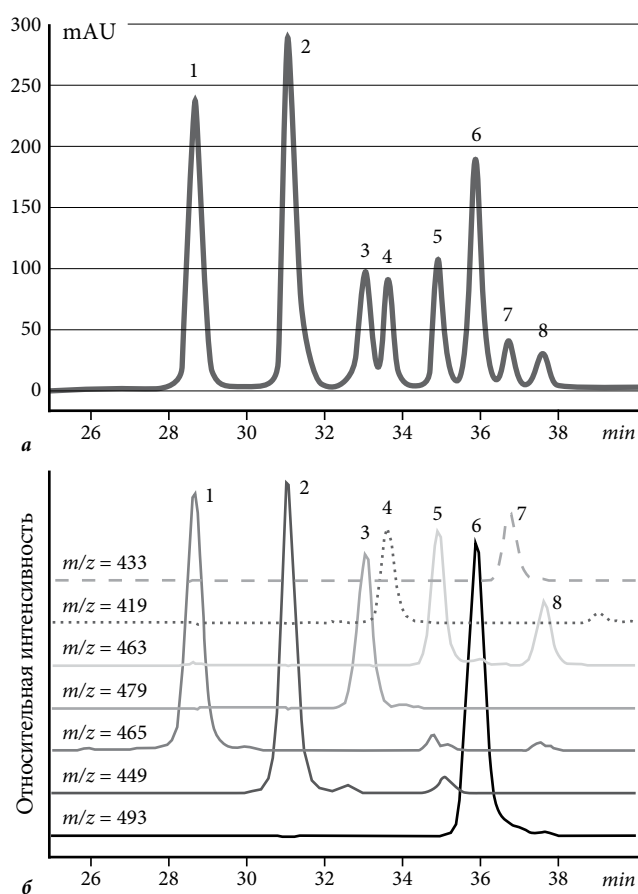


Рис. 1. Профили ВЭЖХ-анализа метанольных экстрактов антоцианов плодов шикши черной: а – ВЭЖХ-УФ-профиль, зарегистрированный при длине волны детектирования $\lambda = 520$ нм; б – ВЭЖХ-МС-хроматограммы по выбранным ионам $[M]^+$. Нумерация пиков соответствует представленной в таблицах.

Таблица 1

Список основных антоцианов, идентифицированных в плодах шикши черной методом ВЭЖХ-УФ-МС

№ пика	$t_{уд}$, мин.	λ_{max} , нм	$[M]^+$, m/z	МС/МС-фрагментация, m/z	Идентификация
1	28,8	522	465	303	дельфинидин-3-галактозид
2	31,1	514	449	287	цианидин-3-галактозид
3	33,1	525	479	317	петунидин-3-галактозид
4	33,7	515	419	287	цианидин-3-арабинозид
5	34,9	516	463	301	пеонидин-3-галактозид
6	35,9	525	493	331	мальвинидин-3-галактозид
7	36,7	518	433	301	пеонидин-3-арабинозид
8	37,6	527	463	331	мальвинидин-3-арабинозид

Таблица 2

Влияние концентрации этилового спирта на выход антоцианов из плодов шикши черной

Экстрагент	Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, %
Спирт этиловый 40%	$4,26 \pm 0,05$
Спирт этиловый 70%	$4,61 \pm 0,01$
Спирт этиловый 95%	$3,64 \pm 0,02$

Таблица 3

Результаты эксперимента при изменении навески сырья, объема экстрагента

Соотношение навески и экстрагента	Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, %
1:20	$4,31 \pm 0,01$
1:30	$4,51 \pm 0,01$
1:50	$4,67 \pm 0,01$
1:70	$4,83 \pm 0,03$
1:100	$4,46 \pm 0,02$

Таблица 4

Влияние размеров частиц сырья на выход антоцианов

Размер частиц сырья	Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, %
0,5 мм	$2,09 \pm 0,01$
1,0 мм	$4,63 \pm 0,01$
2,0 мм	$1,67 \pm 0,04$

Таблица 5

Результаты продолжительности экстракции изучаемого сырья

Время экстракции	Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, %
60 минут	$3,91 \pm 0,02$
90 минут	$5,64 \pm 0,04$
120 минут	$4,80 \pm 0,02$

Таблица 6

Характеристика результатов определения количественного содержания антоцианов в плодах шикши черной в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид с учетом наиболее оптимальных условий

Исследуемый объект	n	f	\bar{x} , %	s	s^2	P , %	$t(P, f)$	Δx	ε , %
Плоды шикши черной	5	4	5,65	0,0284	0,0008087	95	2,78	0,04	0,62

антоцианов зависит от кислотности создаваемой среды ($\text{pH} \leq 1$). В сильноокислых растворах антоцианы находятся в окрашенной флавилиевой форме, при повышении pH флавилиевая форма переходит в малоустойчивую бесцветную форму псевдооснования. Именно окрашенные антоцианы проявляют высокую антиоксидантную активность [14].

Для разделения смесей и идентификации антоцианов использовали тандем ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Из 20 наиболее известных антоцианидинов наиболее широко распространены: пеларгонидин, цианидин, дельфинидин и мальвидин.

В плодах шикши преобладают компоненты цианидинового ($33,068\% \pm 7,889\%$), мальвидинового ($15,374\% \pm 1,640\%$) и дельфинидинового ($21,733\%$) ряда, также обнаружены в незначительных количествах компоненты пеонидина ($8,641\% \pm 2,504\%$) и петунидина ($9,150\%$).

Для определения суммарного содержания антоцианов в исследуемых образцах использовали спектрофотометрический метод с пересчетом на цианидин-3-глюкозид ($5,65 \pm 0,04\%$). Во избежание гидролиза гликозидных связей в процессе экстракции не допускается нагревание экстрагента. Полученный экстракт наряду с мономерными антоцианами также содержит их полимерные формы. Дифференциальный спектрофотометрический метод применяется для определения именно мономерных антоцианов в сырье [14].

Окрашенные флавилиевые формы антоцианов, устойчивые в сильноокислой среде, определяли при длине волны 534 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Изучение оптимальных параметров экстрагирования антоцианов подтверждает специфичность их для каждого вида сырья. В работе были изучены некоторые технологические параметры выхода антоцианов из плодов шикши. Лучшим экстрагентом является водно-спиртовая смесь с содержанием спирта этилового 70% при соотношении сырье/экстрагент 1:70.

Оптимальным является измельчение плодов до размера частиц, проходящих сквозь сито диаметром 1 мм. Более крупные частицы сырья содержат мелкие семена, которых в плодах (ягодообразной многокосточковой костянке) от 6 до 11 штук. При измельчении сырья до частиц размером 0,5 мм в процессе экстракции растительного материала происходит разрушение клеток балластных веществ и дальнейшее их набухание [6]. Наиболее результативной является экстракция антоцианов из плодов шикши на протяжении 90 минут. Более продолжительное время экстракции способствует набуханию нестабильных и реакционноспособных антоциановых пигментов [14].

Выводы

В плодах шикши черной содержатся следующие компоненты антоцианов: дельфинидин-3-галактозид ($21,733\%$), цианидин-3-галактозид ($33,068\%$),

петунидин-3-галактозид ($9,150\%$), цианидин-3-арабиноза ($7,889\%$), пеонидин-3-арабиноза ($2,504\%$), мальвидин-3-галактозид ($15,374\%$), пеонидин-3-арабиноза ($2,504\%$), мальвидин-3-арабиноза ($1,640\%$).

Экспериментально найдены оптимальные условия экстракции антоцианов из плодов шикши черной: экстрагент – этанол 70%-ный; навеска 1,0 г; размер частиц 1,0 мм; соотношение сырья и экстрагента 1:70; время экстракции 90 минут.

Определено содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в плодах шикши черной – $5,65 \pm 0,04\%$.

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

Источник финансирования: авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – СГП, ААС, ВПП

Сбор и обработка материала – СГП, ААС

Статистическая обработка – СГП, НВП

Написания текста – СГП, ААС, ЛВУ

Редактирование – ЛВУ, ВПП, НВП

Литература / References

1. Колдаев В.М., Кропотов А.В. Антоцианы в практической медицине. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2021;3(85): 24–8. [Koldaev VM, Kropotov AV. Anthocyanins in practical medicine. *Pacific Medical Journal*. 2021;3(85):24–8. (In Russ.)] doi: 10.34215/1609-1175-2021-3-24-28
2. Андреева Н.В., Малогулова И.Ш. Виды шикши как перспективный источник БАВ в условиях Якутии. *Современные наукоемкие технологии*. 2013;9:51–2. [Andreeva NV, Malogulova ISH. Shiksha species as a prospective source of bas in the conditions of Yakutia. *Modern high technologies*. 2013;9:51–2. (In Russ.)]
3. Юдина В.Ф., Максимова Т.А. *Сезонное развитие растений болот*. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1993. [Yudina VF, Maksimova TA. *Sезонное razvitiye rasteniy bolot*. Petrozavodsk: Karelskiy nauchnyy centr RAN; 1993. (In Russ.)]
4. Красильникова Л.А., Авксентьева О.А., Жмурко В.В., Садовниченко Ю.А. Биохимия растений. Ростов н/Д: Феникс, Харьков: Торсинг, 2004. [Krasilnikova LA, Avksenteva OA, Zhmurko VV, Sadovnichenko YuA. *Biohimiya rasteniy*. Rostov n/D: Feniks, Xarkov: Torsing; 2004. (In Russ.)]
5. Ким И.В., Волков Д.И., Захаренко В.М., Захаренко А.М., Голыхваст К.С., Клыков А.Г. Состав и содержание антоцианов в диетических сортах картофеля (*Solanum tuberosum* L.), перспективных для выращивания и селекции в условиях Дальнего Востока России. *Сельскохозяйственная биология*. 2020; 55(5):995–1003. [Kim IV, Volkov DI, Zakharenko VM, Zakharenko AM, Golohvast KS, Klykov AG. Composition and quantification of antocians in healthy-diet potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties for growing and selection in the Russian far East. *Selskokhozyaystvennaya biologiya*. 2020; 55(5):995–1003 (In Russ.)] doi: 10.15389/agrobiologiya.2020.5.995ru
6. Яковлева К.М., Кириллина К.С. Лекарственные растения в традиционной медицине эвенков Якутии. *Современная научная мысль*. 2021;5:169–76. [Yakovleva KM, Kirilina KS. Herbs in traditional medicine of evenks of Yakutia. *Sovremennaya nauchnaya mysl*. 2021; 5:169–76. (In Russ.)] doi: 10.24412/2308-264X-2021-5-169-176

7. Park SY, Lee SP. Effectiveness of crowberry on plasma total antioxidant status, lipid profile and homocysteine. *J Food Nutr Res.* 2013;1(4):37–41.
8. Плаксен Н. В., Устинова Л.В., Пономарчук С.Г., Логунова Л.Н., Ли О.Н., Мотлукх Е.А. Биохимические маркеры влияния сока шикши черной (*Empetrum nigrum*) на течение аллоксанового диабета *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2021;3(85):59–62. [Plaksen NV, Ustinova LV, Ponomarchuk SG, Logunova LN, Li ON, Motlukh EA. Biochemical markers influence of black shiksha juice (*Empetrum nigrum*) on the process of alloxan diabetes. *Pacific Medical Journal.* 2021;3(85):59–62. (In Russ.)] doi: 10.34215/1609-1175-2021-3-59-62
9. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. [Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdaniya (In Russ.)] URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (Accessed October 9, 2021).
10. Щеколдина З.Н., Кизим Н.Ф. Влияние внешних факторов на извлечение антоцианов и дубильных веществ из плодов боярышника. *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки.* 2017;3:42–9. [Shchekoldina ZN, Kizim NF. Influence of the external factors on the extraction of anthocyanins and tannins from Hawthorn fruits. *Izvestiya Tulsogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki.* 2017;3:42–9. (In Russ.)]
11. Дейнека В.И., Олейниц Е.Ю., Павлов А.А., Михеев А.Ю., Шелепова О.В., Волкова О.Д., Хлебникова Е.И. Определение антоцианов плодов некоторых растений рода *Ribes* методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и гидрофильной хроматографии. *Химия растительного сырья.* 2020;1:81–8. [Deineka VI, Oleinits EYu, Pavlov AA, Mikheev AYU, Shelepova OV, Volkova OD, Khlebnikova EI. Determination of anthocyanins of fruits of some plants of the genus *ribes* by reversed-phase HPLC and hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya,* 2020;1:81–8. (In Russ.)] doi: 10.14258/jcprm.2020016331
12. Саласина Я. Ю. Калинкин Д.А., Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Некоторые закономерности экстракции антоцианов из растительных источников. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2020;10(4):691–9. [Salasina YYu, Kalinikin DA, Deineka VI, Deineka LA. Some regularities in the process of anthocyanin extraction from vegetable sources. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2020;10(4):691–9. (In Russ.)] doi: 10.21285/2227-2925-2020-10-4-691-699
13. Дубашинская Н.В., Хишова О.М., Шимко О.М. Некоторые особенности экстрагирования лекарственного растительного сырья (часть I). *Вестник фармации.* 2006;4(34):62–72. [Dubashinskaya NV, Khishova OM, Shimko OM. Some features of extraction of vegetable matter. *Vestnik farmatsii.* 2006;4(34):62–72. (In Russ.)]
14. Ogawa K. et al. Anthocyanin composition and antioxidant activity of the crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2008;56(12):4457–62.