

Роль антоцианидиновых пигментов в клинической офтальмологии: определение их профиля в лекарственных препаратах и пищевых добавках, содержащих экстракт черники



М. Б. Готтих¹



И. В. Воробьева^{2,3}



В. Н. Ташлицкий⁴

¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, Москва, 119992

² Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российская медицинская академия постдипломного образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Баррикадная, д. 2/1, Москва, 123242, Россия

³ Филиал № 1 Городской клинической больницы им. С. П. Боткина, Мамоновский переулок, д. 7, Москва, 123001, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Ленинские горы, д. 1, Москва, 119991, Россия

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. — 2015. — Т. 12, № 1. — С. 83–90

В настоящее время в России зарегистрированы несколько пищевых добавок и лекарственных препаратов офтальмологического профиля, содержащих экстракты черники. Поскольку эффект препаратов черники напрямую зависит от содержания в них антоцианидинов, возникает научно и клинически обоснованная потребность в проведении экспертизы лекарственных препаратов и биологически активных добавок, содержащих экстракт черники, с целью определения их качественного и количественного состава.

Цель. Определение количественного и качественного содержания антоцианидиновых пигментов черники в пищевых добавках и лекарственных средствах.

Материалы и методы. Антоцианидины из пяти образцов были экстрагированы дистиллированной водой из расчета содержания антоцианидинов 0,05–0,2 мг/мл. Для этого образцы получены растворением 1 таблетки или капсулы в 10–50 мл воды. Экстракция проводилась при непрерывном перемешивании на термощейкере. Из полученных растворов отбирались аликвоты объемом 1 мл, которые центрифугировали в течение 10 мин. при 14000 об./мин. и фильтровали через шприцевые фильтры. С помощью ультрафиолетового спектрометрического анализа было исследовано суммарное содержание антоцианидиновых пигментов, т. е. определено количественное и качественное содержание антоцианидиновых пигментов черники в пяти препаратах. Для каждого образца (препарата) эксперимент проводили дважды, а для лекарственного препарата Миртиллене Форте – трижды. Качественный состав антоцианидиновых пигментов определялся методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты. Все исследованные образцы препаратов действительно содержат антоцианидиновые пигменты из экстрактов черники, а не из других природных источников. Количественное содержание этих соединений, определенное методом рН-дифференциальной спектрофотометрии, варьирует в широком диапазоне – от 0,168% до 8,30% – и может значительно отличаться от количества, заявленного производителем, что обусловлено растительным происхождением сырья и сложностями стандартизации содержания в нем активных компонентов.

Заключение. Полученные результаты позволяют оптимизировать выбор необходимой дозы пищевой добавки с экстрактом черники как практикующими офтальмологами, так и пациентами по индивидуальной переносимости, потребности и тяжести заболевания.

Прозрачность финансовой деятельности: Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует.

Ключевые слова: антоцианидины, экстракт черники, диабетическая ретинопатия, ВЭЖХ, рН-дифференциальная спектрофотометрия

Anthocyanidin pigments in clinical ophthalmology. Analysis of their profile in eye supplements and food additives containing bilberry extract

M. B. Gottikh¹, I. V. Vorob'eva^{2,3}, V. N. Tashlitskiy⁴

¹ A.N. Belozersky Institute of Physical Chemical Biology, 1, Leninskiye gory Moscow, 119991, Russia;

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1, Barrikadnaya Str. Moscow, 125993, Russia;

³ S.P. Botkin City Clinical Hospital Branch #1, 5, Mamonovskiy Lane Moscow, 123001, Russia;

⁴ M.V. Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskiye gory Moscow, 119991, Russia

SUMMARY

Currently, several eye nutritional supplements and food additives with bilberry extract are approved in Russia. Bilberry effects directly depend on anthocyanidin content. Hence, the expertise of nutritional supplements and food additives with bilberry extract is required to determine their qualitative and quantitative composition.

Aim. To determine qualitative and quantitative content of bilberry anthocyanidin pigments in food additives.

Materials and methods. Anthocyanidins from five samples were extracted with distilled water per anthocyanidin content. The samples were obtained by the dilution of a pill or capsule in 50 mL of water. Extraction was performed under continuous mixing on hot shaker. 1 mL aliquots were taken from the solutions, centrifuged for 10 min at 14,000 rpm, and filtered through syringe filters. Total level (i.e., quantitative and qualitative content) of bilberry anthocyanidin pigments in five samples was evaluated using UV spectroscopy. Experiment was performed twice for each sample. Qualitative content of anthocyanidin pigments was evaluated using reversed-phase HPLC.

Results. All examined samples contain anthocyanidin pigments from bilberry extracts but no other natural sources. Their quantity which was measured by pH differential spectrophotometry varies greatly (from 0.168% to 8.30%) and may significantly differ from that of declared by manufacturer. This is due to phytogetic raw material and difficulties in standardization of active component content.

Conclusions. The data obtained optimize dosing of food additives with bilberry extract by clinicians and patients considering individual tolerance, needs, and disease severity.

Financial disclosure: Authors have no financial or property interests related to this article.

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Key words: anthocyanidins, bilberry extract, diabetic retinopathy, HPLC, pH-differential spectrophotometry.

Ophthalmology in Russia. — 2015. — Vol. 12, No 1. — P. 83–90

ВВЕДЕНИЕ

О пользе черники для глаз известно давно. Первыми пользу черники оценили долгожители планеты — японцы. В России изучалась не только сама черника, но и лекарственные препараты, сделанные на основе этой ягоды. На сегодняшний день накоплено значительное количество научных публикаций, посвященных антоцианидинам черники и эффектам их применения в клинической офтальмологии.

Отечественные ученые Егоров Е.А. и Ставицкая Т.В. в начале 2000-х гг. изучали эффективность препарата «Миртиллен форте», содержащего антоцианидины черники, у больных с сухой формой возрастной макулодистрофии. Оценивая изменения параметров макулярной электроретинографии (ЭРГ), авторы установили, что увеличение амплитуды волн макулярной ЭРГ наблюдается более чем у 75% больных, что положительно сказывается на зрении [1, 2].

В ходе исследования эффективности антоцианидинов у пациентов с сахарным диабетом было продемонстрировано, что применение препарата «Миртиллен

форте» при непролиферативной диабетической ретинопатии с макулопатией позволяет улучшить остроту зрения, уменьшить отек сетчатки и количество твердых экссудативных очагов [3, 4].

Кроме того, проведены эксперименты по изучению влияния препаратов черники («Стрикс» и «Стрикс форте») на зрительные функции у больных с возрастной патологией сетчатки и зрительного нерва [5, 6] и эффекта антоцианидинов при заболеваниях с повышенной ломкостью капилляров [7].

Rispoli и соавт. анализировали скотопический пороговый ответ (СПО) сетчатки у пациентов с диабетом при хорошем метаболическом контроле и без каких-либо клинических признаков диабетической ретинопатии. Показано, что СПО является ранним маркером нарушения функции сетчатки [8].

Таким образом, благодаря антиоксидантному действию антоцианидины и флавоноиды, содержащиеся в листьях и плодах черники (*Vaccinium myrtillus*), способны связывать радикалы в клетках сетчатки, но при этом активность антоцианидинов должна

быть очень высока [9]. Исследование экстракта черники выявило наличие у него противоопухолевого эффекта в отношении клеток карциномы прямой кишки человека. Было обнаружено, что антоцианидины способны защищать ДНК от повреждений [10]. Нейропротекторное действие антоцианидинов заключается в их способности положительно влиять на мозговую деятельность. При этом улучшаются способность к обучению и память. Антоцианы могут замедлять процессы старения и развитие болезни Альцгеймера [11]. Антоцианидины экстракта черники и биофлавоноиды обладают противовоспалительным действием, которое заключается в существенном снижении содержания факторов воспаления в плазме крови, таких как С-реактивный белок, концентрация которого определяется высокочувствительными методами (hsCRP), и растворимая молекула клеточной адгезии (sVCAM-1), а также в уменьшении содержания липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и повышении содержания липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), что является благоприятным индикатором лечения атеросклероза [12]. Рядом исследователей была установлена способность антоцианидинов препятствовать накоплению жировых отложений и развитию преддиабетических состояний, а также облегчать течение диабета второго типа [13].

В настоящее время в России зарегистрированы несколько лекарственных препаратов черники и несколько пищевых добавок, содержащих экстракты черники, которые используются в клинической офтальмологии. Определить наиболее эффективные из них на сегодняшний день непросто. Результаты фармакокинетических исследований у здоровых добровольцев [14] свидетельствуют о наличии четких дозозависимых характеристик при оральном приеме антоцианидинов: при удвоении дозы принимаемого продукта C_{\max} и AUC увеличиваются вдвое. Доклинические исследования на животных продемонстрировали дозозависимый эффект антоцианидинов, который заключается в их способности предотвращать повреждение сосудов микроциркуляторного русла. Следовательно, концентрация антоцианидинов в существующих препаратах черники должна быть как можно выше. Поскольку эффект препаратов черники напрямую зависит от содержания в них антоцианидинов, возникает научно и клинически обоснованная потребность в проведении экспертизы лекарственных препаратов и биологически активных добавок, содержащих экстракт черники, с целью определения их качественного и количественного состава.

Этот анализ проводился с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и рН-дифференциальной ультрафиолетовой (УФ) спектрофотометрии, описанных ранее [15].

ВЭЖХ — это современная методика разделения и анализа сложных субстанций, в которой подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкост-

ной хроматографии выполняет важную функцию, т.к. обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии). В ВЭЖХ природа подвижной фазы имеет большое значение. В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа различных по составу подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого числа встречающихся на практике задач. Метод ВЭЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, при этом разделение с помощью ВЭЖХ обычно происходит при комнатной температуре [16].

Применяемый в нашем исследовании обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ (оф-ВЭЖХ) имеет ряд преимуществ перед другими вариантами жидкостной хроматографии. Во-первых, это очень гибкий метод: изменяя состав водно-органических смесей, используемых в качестве подвижной фазы, можно добиться разделения соединений различной природы на одной колонке. Во-вторых, селективность данного метода почти всегда значительно выше, чем других вариантов хроматографии для всех соединений. В-третьих, при использовании гидрофобизированных силикагелей быстро устанавливается равновесие между подвижной и неподвижной фазами, а сорбенты отличаются высокой эффективностью разделения [16].

УФ-спектрофотометрия — простой и широко применяемый метод, пригодный для решения множества химико-аналитических задач. В фармацевтическом анализе с его помощью проводят испытание подлинности и доброкачественности лекарственных препаратов, а также количественное определение их активных компонентов. За последние годы разработано немало новых методик анализа лекарственных форм и препаратов по их УФ спектрам поглощения. В смесях, содержащих одно действующее соединение, его содержание обычно определяют по собственному светопоглощению при заранее выбранной аналитической длине волны (АДВ). Расчет концентраций обычно ведут с применением метода внешнего стандарта [17].

ЦЕЛЬ

Определение количественного и качественного содержания антоцианидиновых пигментов черники в пяти продуктах — «Фокус» (АКВИОН, Россия), «Миртиллене форте» (S.I.F.I., Италия), «Черника-форте» (Эвалар, Россия), «Окулист» (ДИОД, Россия), «Стрикс» (Ferrosan, Дания).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения данного исследования были приобретены пять коммерческих образцов лекарственных средств и биологически активных добавок к пище, в составе которых имеется экстракт черники: «Миртиллене форте», «Фокус», «Стрикс», «Окулист», «Черника-форте».

Таблица 1. Расчет среднего содержания суммы антоцианидиновых пигментов в образцах № 1-5 методом pH-дифференциальной спектрофотометрии.

№ образца	A510 pH 1	A700 pH 1	A510 pH 4,5	A700 pH 4,5	F	m капсулы (таблетки), мг	C образца, г/л	Суммарная С антоцианидиновых пигментов, %	Масса суммы антоцианидиновых пигментов в капсуле (таблетке), мг	Средняя масса антоцианидиновых пигментов в капсуле (таблетке), мг	σ массы суммы антоцианидиновых пигментов в капсуле (таблетке), мг
1	1,0375	0,0015	0,0755	0,0032	50	484,74	9,69	8,30	40,23	36,11	4,33
	0,8178	0,0020	0,0618	0,0029	50	486,86	9,74	6,49	31,60		
	0,9473	0,0014	0,0750	0,0035	50	482,66	9,65	7,56	36,50		
2	0,2832	0,0007	0,0258	0,0030	50	408,85	8,18	2,65	10,84	11,45	0,86
	0,3145	0,0002	0,0263	0,0010	50	398,83	7,98	3,03	12,06		
3	0,4581	0,0000	0,0521	0,0012	50	498,94	9,98	3,41	17,00	19,09	2,96
	0,558	0,0001	0,0525	0,0021	50	508,1	10,16	4,17	21,19		
4	0,2506	0,0033	0,0220	0,0018	20	367,77	7,36	1,03	3,79	4,50	1,00
	0,3366	0,0032	0,0226	0,0014	20	385,33	7,71	1,35	5,21		
5*	0,1142	0,0004	0,0141	0,0011	20	1010,13	20,20	0,168	1,70	1,87	0,24
	0,1366	0,0004	0,0151	0,0012	20	1002,78	20,06	0,204	2,04		

Примечание: F — фактор разбавления, C — концентрация, σ — стандартное отклонение. * — для образца №5 все данные приводятся из расчета на 4 таблетки.

Table 1. Average concentration of total anthocyanidins in samples 1-5 measured with pH differential spectrophotometry.

Sample	A510 pH 1	A700 pH 1	A510 pH 4.5	A700 pH 4.5	F	m of capsule (pill), mg	C of sample, g/L	Total C of anthocyanidin pigments, %	Mass of total anthocyanidin pigments in a capsule (pill), mg	Average mass of anthocyanidin pigments in a capsule (pill), mg	SD of mass of total anthocyanidin pigments in a capsule (pill), mg
1	1.0375	0.0015	0.0755	0.0032	50	484.74	9.69	8.30	40.23	36.11	4.33
	0.8178	0.0020	0.0618	0.0029	50	486.86	9.74	6.49	31.60		
	0.9473	0.0014	0.0750	0.0035	50	482.66	9.65	7.56	36.50		
2	0.2832	0.0007	0.0258	0.0030	50	408.85	8.18	2.65	10.84	11.45	0.86
	0.3145	0.0002	0.0263	0.0010	50	398.83	7.98	3.03	12.06		
3	0.4581	0.0000	0.0521	0.0012	50	498.94	9.98	3.41	17.00	19.09	2.96
	0.558	0.0001	0.0525	0.0021	50	508.1	10.16	4.17	21.19		
4	0.2506	0.0033	0.0220	0.0018	20	367.77	7.36	1.03	3.79	4.50	1.00
	0.3366	0.0032	0.0226	0.0014	20	385.33	7.71	1.35	5.21		
5*	0.1142	0.0004	0.0141	0.0011	20	1010.13	20.20	0.168	1.70	1.87	0.24
	0.1366	0.0004	0.0151	0.0012	20	1002.78	20.06	0.204	2.04		

Note: F — dilution factor, C — concentration, SD — standard deviation. * — per 4 tablets.

В исследовании имеющиеся образцы были зашифрованы следующим образом:

- 1 — «Миртиллене форте» (S. I. F. I., Италия)
- 2 — «Фокус» (АКВИОН, Россия)
- 3 — «Стрикс» (Ferrosan, Дания)
- 4 — «Окулист» (ДИОД, Россия)
- 5 — «Черника-форте» (Эвалар, Россия)

Подготовка образцов для проведения исследования

Антоцианидины из образцов были экстрагированы дистиллированной водой из расчета содержания антоцианидинов 0,05-0,2 мг/мл [9]. Для этого образцы № 1-4 получены растворением 1 таблетки или капсулы в 50 мл воды, а образец № 5 — растворением 4 таблеток в 50 мл воды. Экстракция проводи-

лась при непрерывном перемешивании на термошейкере C24KC Refrigerated incubator shaker (Edison, США) при 160 об./мин. и температуре 37°C в течение 30 мин. Из полученных растворов отбирались аликвоты объемом 1 мл, которые центрифугировали в течение 10 мин. при 14000 об./мин., фильтровали через шприцевые фильтры Millex-GP Filter Unit 0.22 диаметром 13 мм с мембраной MILLIPORE и хранили при -10°C.

Определение суммарного содержания антоцианидиновых пигментов методом pH-дифференциальной спектрофотометрии

Для метода pH-дифференциальной спектрофотометрии были использованы буферные растворы № 1 и № 2.

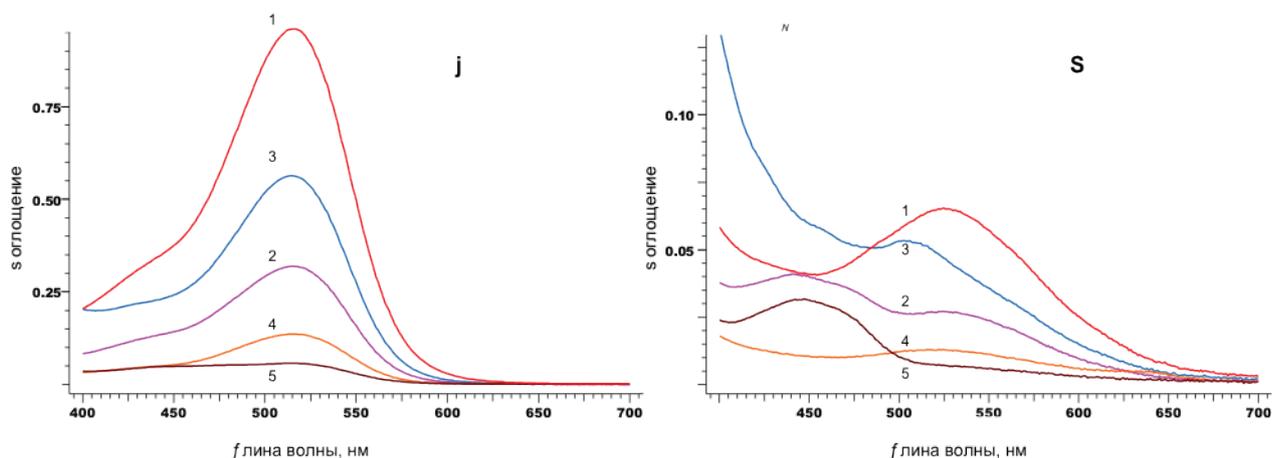


Рис. 1. Примеры спектров поглощения растворов образцов при pH 1,0 (А) и 4,5 (Б), где 0 – базовая линия, 1-5 – образцы №№ 1-5.
 Fig. 1. Absorption spectrum of sample solutions (A – pH = 1.0, B – pH = 4.5). 0 – baseline, 1-5 – samples 1-5.

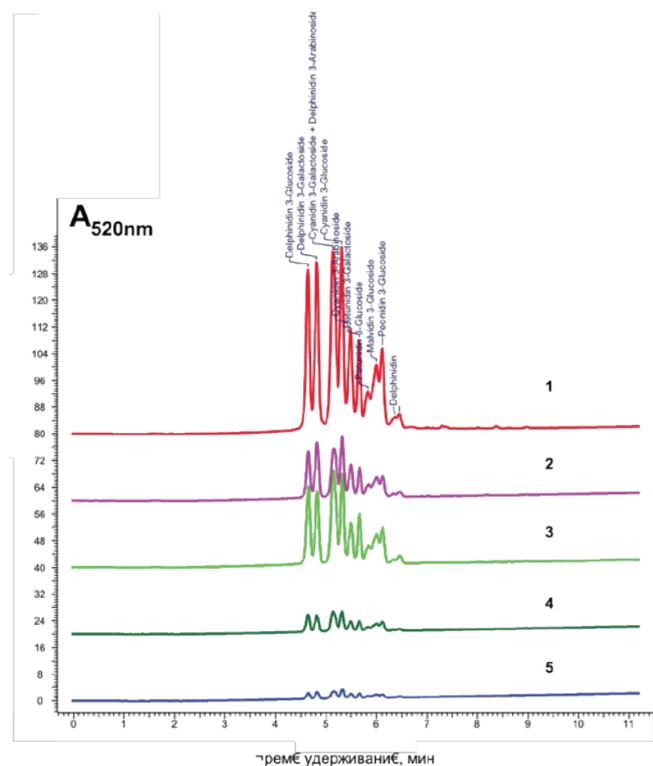


Рис. 2. Примеры хроматограмм экстрактов образцов № 1-5, полученные градиентным методом оф-ВЭЖХ с детекцией при 520 нм.
 Fig. 2. Chromatograms of sample (1-5) extracts (gradient reversed-phase HPLC, detection at 520 nm).

Раствор №1: pH 1 — 4,05 мг хлорида калия и 1,238 мл концентрированной соляной кислоты в 100 мл воды.

Раствор №2: pH 4,5 — 1,64 г натрия ацетата в 100 мл воды и соляная кислота до pH 4,5.

К 0,96 мл буферного раствора № 1 или №2 добавляли 40 мкл экстракта, приготовленного, как описано выше, и определяли оптическую плотность при 510 нм и 700 нм с соответствующим буфером в качестве раствора сравнения на УФ-спектрофотометре Cary 50bio

(Varian, США). Для каждого образца эксперимент проводили дважды.

Суммарное содержание антоцианиновых пигментов рассчитывали по формуле [7]:

$$C(\sum \text{антоцианин, масс. \%}) = 100\% \times [(A_{510\text{pH}1} - A_{700\text{pH}2}) - (A_{510\text{pH}4,5} - A_{700\text{pH}4,5})] \times MW \times F / (\epsilon \times l \times C),$$

где:

ϵ и MW — коэффициенты молярного поглощения и молекулярная масса антоцианина, используемого в качестве стандарта (для цианидин-3-глюкозида эти значения составляют 26900 и 449,2, соответственно);

F = 25 — коэффициент разведения;

l = 1 — длина оптического пути кюветы, см;

C — концентрация приготовленного раствора образца, г/л.

Определение качественного состава антоцианидиновых пигментов методом ВЭЖХ

Качественный состав антоцианидиновых пигментов определялся методом обращенно-фазной ВЭЖХ (оф-ВЭЖХ) на колонке Gemini C18 (2) 4,6г 150 мм (5 мкм) производства Phenomenex (США). Использовалось градиентное элюирование с подвижной фазой А (0,151% раствор трифторуксусной кислоты в воде) и подвижной фазой В (0,151% раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле) по программе 5-40% В за 11 мин. при скорости потока 1,5 мл/мин. и температуре 25°C с УФ-детекцией при 520 нм и УФ-спектральными данными от 230 нм до 800 нм. Исследование проводилось с использованием хроматографа Agilent1100, состоящего из четырехканального градиентного насоса с дегазатором, автосамплера, термоста и диодно-матричного детектора. Сбор и обработка хроматограмм осуществлялись с помощью программ «ChemStation B.01.03» и «ACD/SpecManager 12.01».

Таблица 2. Средние времена удерживания и площади хроматографических пиков, полученных при ВЭЖХ-анализе образцов № 1-5.

№	Название компонента	Время удерживания, мин	Площадь пика при 520 нм, мкВ × сек				
			№1	№2	№3	№4	№5*
1	Дельфинидин-3-глюкозид	4,65	2,59E + 05	7,34E + 04	1,26E + 05	2,79E + 04	9,37E + 03
2	Дельфинидин-3-галактозид	4,82	2,93E + 05	9,15E + 04	1,20E + 05	2,79E + 04	1,15E + 04
3	Цианидин-3-галактозид + дельфинидин-3-арабинозид	5,14	3,96E + 05	1,08E + 05	2,04E + 05	4,33E + 04	1,68E + 04
4	Цианидин-3-глюкозид	5,32	2,82E + 05	9,20E + 04	1,36E + 05	2,96E + 04	1,35E + 04
5	Цианидин-3-арабинозид	5,49	1,91E + 05	5,79E + 04	7,25E + 04	1,81E + 04	7,78E + 03
6	Петунидин-3-галактозид	5,66	1,43E + 05	4,36E + 04	7,39E + 04	1,51E + 04	6,99E + 03
7	Петунидин-3-глюкозид	5,84	8,33E + 04	2,62E + 04	3,72E + 04	8,22E + 03	3,84E + 03
8	Мальвидин-3-глюкозид	6,00	1,55E + 05	4,63E + 04	7,01E + 04	1,69E + 04	7,81E + 03
9	Пеонидин-3-глюкозид	6,12	1,44E + 05	3,55E + 04	6,13E + 04	1,65E + 04	5,57E + 03
10	Дельфинидин	6,34	3,12E + 04	5,49E + 03	7,12E + 03	1,45E + 03	8,31E + 02

* – для образца №5 все данные приводятся из расчета на 4 таблетки.

Table 2. Average hold times and areas under HPLC peaks (samples 1-5).

№	Component	Hold time, min	Peak area at 520 nm, mAU × sec				
			№1	№2	№3	№4	№5*
1	Delphinidin 3-Glucoside	4.65	2.59E + 05	7.34E + 04	1.26E + 05	2.79E + 04	9.37E + 03
2	Delphinidin 3-Galactoside	4.82	2.93E + 05	9.15E + 04	1.20E + 05	2.79E + 04	1.15E + 04
3	Cyanidin 3-Galactoside + Delphinidin 3-Arabinoside	5.14	3.96E + 05	1.08E + 05	2.04E + 05	4.33E + 04	1.68E + 04
4	Cyanidin 3-Glucoside	5.32	2.82E + 05	9.20E + 04	1.36E + 05	2.96E + 04	1.35E + 04
5	Cyanidin 3-Arabinoside	5.49	1.91E + 05	5.79E + 04	7.25E + 04	1.81E + 04	7.78E + 03
6	Petunidin 3-Galactoside	5.66	1.43E + 05	4.36E + 04	7.39E + 04	1.51E + 04	6.99E + 03
7	Petunidin 3-Glucoside	5.84	8.33E + 04	2.62E + 04	3.72E + 04	8.22E + 03	3.84E + 03
8	Malvidin 3-Glucoside	6.00	1.55E + 05	4.63E + 04	7.01E + 04	1.69E + 04	7.81E + 03
9	Peonidin 3-Glucoside	6.12	1.44E + 05	3.55E + 04	6.13E + 04	1.65E + 04	5.57E + 03
10	Delphinidin	6.34	3.12E + 04	5.49E + 03	7.12E + 03	1.45E + 03	8.31E + 02

* – per 4 tablets.

Для ВЭЖХ-анализа образцов № 1, 4, 5 с концентрацией 20 мг/мл использовалась аликвота 1 мкл, а для образцов № 2 и 3 с концентрацией 40 и 50 мг/мл — аликвота 10 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При помощи УФ-спектрометрического анализа определялось общее содержание антоцианидиновых пигментов во всех имеющихся образцах (см. Табл. 1 и Рис. 1).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что все анализируемые образцы содержат антоцианидиновые пигменты, при этом их содержание в разных образцах варьирует в широком диапазоне — от 0,168% до 8,30%, а абсолютное содержание в одной

таблетке или капсуле составляет от 1,87 мг до 36,11 мг.

Для определения качественного состава образцов применялся метод оф-ВЭЖХ (см. Рис. 2).

Отнесение пиков проводилось на основании времени удерживания и соотношения площадей (см. Табл. 2). Как видно из полученных хроматограмм и таблицы 2, качественный состав и соотношение компонентов во всех исследованных образцах практически одинаковы (в пределах погрешности метода определения площади плохо разрешенных пиков) и соответствуют литературным данным для экстрактов черники.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты качественного анализа методом оф-ВЭЖХ свидетельствуют о том, что все исследованные

ВЫСОКИЙ ЗАРЯД ЧЕРНИКИ

ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ВАШИХ ГЛАЗ

- Высокий заряд черники в каждой капсуле*
- Способствует снижению нагрузки на глаза
- Способствует улучшению зрения в темноте
- Помогает улучшению остроты зрения и замедляет прогрессирование глазных болезней

**ООО «НоваМедика», 125047, Москва,
ул. 1-ая Брестская, д. 29,
Телефон: +7(495)2300290
www.novamedica.com**

Регистрационное удостоверение: П №014749/01
РИМ №27

ИНСТРУКЦИЯ по применению лекарственного препарата для медицинского применения МИРТИЛЕНЕ ФОРТЕ

Регистрационный номер: П №014749/01. Торговое название: Миртиллене форте. Лекарственная форма: капсулы. Состав. Одна капсула содержит: активный компонент: черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.) плодов экстракт сухой с содержанием суммы антоцианидинов 25% (76-153:1)-177 мг; вспомогательные вещества: соевых бобов масло 131 мг; масло растительное гидрированное 40 мг; оболочка капсуль: желатин 94 мг; глицерол 36 мг; краситель железа оксид красный 0,5 мг; краситель железа оксид черный 1,2 мг; этилпарагидроксibenзоат натрия 0,4 мг; пропилпарагидроксibenзоат натрия 0,2 мг. Описание. Мягкие желатиновые капсулы овальной формы коричневого цвета. Содержимое капсулы — густая маслянистая масса черного цвета. Фармакотерапевтическая группа. Растительного происхождения средство для регенерации фоторецепторов сетчатки. Код АТХ: S01 XA. Фармакологические свойства. Фармакодинамика. Антоцианоиды черники (*Vaccinium myrtillus* L.) стимулируют синтез и регенерацию родопсина, светочувствительного пигмента сетчатки, повышая её чувствительность к изменению интенсивности света, улучшают остроту зрения и адаптацию к темноте при пониженной освещённости, способствуют улучшению кровоснабжения сетчатки. Показания к применению. Миопия средней и высокой степени, приобретенная гемалопия, диабетическая ретинопатия, нарушение механизмов адаптации зрения к темноте (при ночном и сумеречном зрении), мышечная астения, центральная атеросклеротическая дегенерация сетчатки типа Кунт-Юниуса, тапеторетинальная абитрофия сетчатки (пигментная дегенерация сетчатки). Противопоказания. Индивидуальная повышенная чувствительность к действующему веществу препарата или к каким-либо вспомогательным ингредиентам, входящим в его состав. Поскольку нет данных по использованию препарата во время беременности, в период кормления грудью и у детей, не следует применять препарат у этих категорий пациентов. Способ применения и дозы. Внутрь по 1 капсуле 3 раза в сутки. Курс лечения - 1 месяц. Побочные эффекты. Возможны аллергические реакции на компоненты препарата. Передозировка. Сведения о передозировке препарата отсутствуют. Взаимодействие с другими лекарственными средствами. Сведения относительно взаимодействий Миртиллене форте с другими препаратами отсутствуют. Форма выпуска. Капсулы 177 мг. По 20 капсул в контурную ячейковую упаковку из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой. По 1 контурной ячейковой упаковке вместе с инструкцией по применению в пачку картонную. Условия хранения. При температуре не выше 25 °С. Хранить в недоступном для детей месте. Срок годности. 2,5 года. Не использовать препарат после истечения срока годности, указанного на упаковке. Условия отпуска из аптек. Без рецепта. Юридическое лицо, на имя которого выдано регистрационное удостоверение: С.И.Ф.И. С.п.А. Виа Эрколе Патти, 36, 95020, Аци С. Антонио, Катания, Италия. Производитель, осуществляющий выпускающий контроль качества: С.И.Ф.И. С.п.А. Виа Эрколе Патти, 36, 95020, Аци С. Антонио, Катания, Италия. Производитель готовой лекарственной формы: Каталент Италия С.п.А. Виа Неттуненсе 20 КМ., 100-04011, Априла (Латина), Италия. В случае необходимости претензии потребителей направлять по адресу: ООО «НоваМедика», Россия, 125047, Москва, 1-я Брестская ул., д. 29, Бизнес-центр «Капитал Тауэр», тел/факс +7 (495) 230-02-90.

* активный компонент: черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.) плодов экстракт сухой с содержанием суммы антоцианидинов 25% (76 -153:1)

Является лекарственным препаратом

Произведено в Италии

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ

Таблица 3. Количественное содержание антоцианидиновых пигментов из экстрактов черники в исследуемых образцах.

№ образца	Препарат	Содержание, мг/таблетка (концентрация, %)	Заявленное содержание, мг/таблетка
1	«Миртиллене форте» (S. I. F. I., Италия)	36,11 (7,45%)	44,25
2	«Фокус» (АКВИОН, Россия)	11,45 (2,84%)	12,5
3	«Стрикс» (Ferrosan, Дания)	19,09 (3,79%)	31
4	«Окулист» (ДИОД, Россия)	4,60 (1,22%)	10
5	«Черника-форте» (4 табл.) (Эвалар, Россия)	0,47 (0,19%)	1,2

образцы действительно содержат антоцианидиновые пигменты из экстрактов черники, а не из других растительных материалов. Количественное содержание этих веществ, определенное при помощи рН-дифференциальной спектрофотометрии, варьирует в широком диапазоне. В таблице 3 приведены сравнительные данные по количественному содержанию антоцианидиновых

Table 3. Content of anthocyanidin pigments from bilberry extracts in the samples.

Sample	Supplement	Content, mg per tablet (concentration, %)	Declared content, mg per tablet
1	«Mirtilene-forte» (S. I. F. I., Italy)	36.11 (7.45%)	44.25
2	«Focus» (AQUION, Russia)	11.45 (2.84%)	12.5
3	«Strix» (Ferrosan, Denmark)	19.09 (3.79%)	31
4	«Oculist» (DIOD, Russia)	4.60 (1.22%)	10
5	«Chernika-forte» (4 tablets) (Evalar, Russia)	0.47 (0.19%)	1.2

пигментов, определенному экспериментально и заявленному производителем.

Полученные результаты позволяют оптимизировать выбор лекарственного средства с экстрактом черники как практикующими офтальмологами, так и пациентами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

- Egorov E.A., Stavitskaya T.V., Strizhkova A.V. [The study of «Mirtilene forte» efficacy in age-related macular degeneration patients]. *Izucheniye effektivnosti primeneniya preparata «Mirtilene forte» u bol'nykh s vozrastnoy makulyarnoy degeneratsiyey*. [Clinical Ophthalmology]. *Klinicheskaya oftalmologiya*. 2005; 46: 163. (in Russ.).
- Stavitskaya T.V. [Bilberry extract use in ophthalmology]. *Primeneniye ekstrakta cherniki v oftalmologii*. [Clinical Ophthalmology]. *Klinicheskaya oftalmologiya*. 2002; 3 (2): 86. (in Russ.).
- Milen'kaya T. M. [Efficacy of anthocyanidines in non-proliferative diabetic retinopathy treatment]. *Effektivnost' primeneniya antotsianidinov v lechenii bol'nykh s neproliferativnoy diabeticheskoy retinopatiyey*. [Clinical Ophthalmology]. *Klinicheskaya oftalmologiya*. 2008; 4: 159. (in Russ.).
- Milen'kaya T. M., Bessmertnaya E.G., Aleksandrova V.K., Ishchenko I.M. [Diabetic retinopathy and antioxidants]. *Diabeticheskaya retinopatiya i antioksidanty*. [Diabetes]. *Sakharnyy diabet*. 2003; 2: 32-34. (in Russ.).
- Malishevskaya T.N., Dolgova D.L., Ortenberg E.A. [Strix and Strix Forte effect on visual functions in age-related retinal and optic nerve disorders]. *Izucheniye vliyaniya preparatov Strix i Strix forte na zritel'nye funktsii bol'nykh s vozrastnoy patologiyei setchatki i zritel'nogo nerva*. [Clinical Ophthalmology]. *Klinicheskaya oftalmologiya*. 2008; 1: 20. (in Russ.).
- Egorov E.A., Romanenko I.A. [Modern aspects of pathogenesis, diagnosis, clinical and treatment of age-related macular degeneration]. *Sovremennyye aspekty patogeneza, diagnostiki, kliniki i lecheniya vozrastnoy makulyarnoy degeneratsii*. [Ophthalmology]. *Oftalmologiya*. 2009; 6 (1): 51-55. (in Russ.).
- Yang Y., Shi Z., Reheman A., Jin J.W., Li C., Wang Y., Andrews M.C., Chen P., Zhu G., Ling W., Ni H. Plant food delphinidin-3-glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: novel protective roles against cardiovascular diseases. *PLoS ONE*. 2012; 7 (5): e37323.
- Rispoli E., Tommasini P., Carrozzoni M.P., De Leo A., Guizzi M., Rispoli M. Studio della scotopic threshold response su pazienti miopi e diabetici prima e dopo trattamento con antocianosidi. *Boll. Oculistica*. 1995; 74 (6): 5.
- Hwang J.W., Kim E.K., Lee S.J., Kim Y.S., Moon S.H., Jeon B.T., Sung S.H., Kim E.T., Park P.J. Antioxidant activity and protective effect of anthocyanin oligomers on H2O2-triggered G2/M arrest in retinal cells. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60 (17): 4282-4288.
- Esselen M., Fritz J., Hutter M., Teller N., Baechler S., Boettler U., Marczylo T.H., Gescher A.J., Marko D. Anthocyanin-rich extracts suppress the DNA-damaging effects of topoisomerase poisons in human colon cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55 (S1): 143-153.
- Shih, P. H., Chan Y.C., Liao J.W. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morusatropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 2010; 21 (7): 598-605.
- Zhu Y., Ling W., Guo H., Song F, Ye Q, Zou T, Li D, Zhang Y, Li G, Xiao Y, Liu F, Li Z, Shi Z, Yang Y. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: A randomized controlled trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2013; 23 (9): 843-849.
- Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 56 (1): 159-170.
- Seymour E.M., Lewis S.K., Urcuyo-Llanes D.E., Tanone I.I., Kirakosyan A., Kaufman P.B., Bolling S.F. Anthocyanin pharmacokinetics and dose-dependent plasma antioxidant pharmacodynamics following whole tart cherry intake in healthy humans. *J. Funct. Foods*. 2014; 11: 509-516.
- Gottikh M.B., Tashlitskiy V.N. [Expertise of eye supplements and biologically active additives. Qualitative and quantitative assessment of anthocyanidin pigments]. [Annals of Optometry]. *Vestnik optometrii*. 2010; 1: 50-53. (in Russ.).
- Shapovalova E.N., Pirogov A.V. [Chromatography: Guidelines for a specialized course]. *Khromatograficheskie metody analiza: Metodicheskoe posobie dlya spetsial'nogo kursa*. Moscow, Moscow State University, 2007.
- Vlasova I.V., Shilova A.V., Fokina Yu.S. [Spectrophotometric methods in drug analysis (a review)]. *Spektrofotometricheskie metody v analize lekarstvennykh preparatov (obzor)*. [Factory Laboratory. Diagnostics of Materials]. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov*. 2011; 77 (1): 21-28. (in Russ.).