

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М.СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Суханова Анна Михайловна

**Разработка методик определения Сибутрамина в составе
многокомпонентных лекарственных препаратов и БАД к пище
анорексигенного действия**

14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научные руководители:

кандидат фармацевтических наук, доцент

Родионова Галина Михайловна

доктор химических наук, профессор

Эллер Константин Исаакович

Москва - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Общая характеристика лекарственных средств анорексигенного действия.....	11
1.2. Сибутрамин.....	16
1.2.1. Строение. Физико-химические свойства	16
1.2.2. Методы определения	19
1.2.2.1. Методы определения в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище.....	19
1.2.2.2. Методы определения в биологических жидкостях.....	22
1.2.3. Фармакологические свойства	23
1.3. Биологически активные добавки к пище	26
1.3.1. Методы контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище.....	28
1.3.2. Правовые основы обращения БАД к пище в РФ	30
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Реактивы.....	34
2.2. Оборудование	34
2.3. Объекты исследования	36
2.4. Методы исследования.....	39
2.4.1. Хроматографические методы.....	39
2.4.1.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).....	40
2.4.1.2. Тонкослойная хроматография.....	40
2.4.2. Физический метод.....	41
2.4.2.1. Капиллярный электрофорез	41
2.4.3. Спектральный метод.....	43
2.4.3.1. УФ-спектрофотометрия.....	43
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИБУТРАМИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ-ДМД	45
3.1. Установление параметров ВЭЖХ-ДМД анализа определения Сибутрамина	45
3.2. Условия хроматографического разделения	48
3.3.Пробоподготовка.....	49
3.4. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в анализируемых объектах	51
3.4.1.Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в лекарственных препаратах.....	51

3.4.2. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в биологически активных добавках к пище	57
3.5. Практическое применение разработанной методики	62
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	66
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИБУТРАМИНА МЕТОДОМ КЭ	67
4.1. Установление параметров КЭ	67
4.2. Условия анализа методом КЭ	69
4.3. Пробоподготовка.....	70
4.4. Подготовка капилляра к анализу	71
4.5. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в анализируемых объектах.....	72
4.5.1. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в лекарственных препаратах.....	73
4.5.2. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в биологически активных добавках к пище	79
4.6. Практическое применение разработанных методик.....	84
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	88
ГЛАВА 5. МЕТОДИКИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО И ПОДТВЕРЖДАЮЩЕГО МЕТОДОВ АНАЛИЗА СИБУТРАМИНА В БАД К ПИЦЕ.....	89
5.1. Предварительный метод анализа Сибутрамина – ТСХ.....	89
5.1.1. Разработка методики обнаружения Сибутрамина методом ТСХ.....	89
5.1.2. Техника хроматографирования.....	89
5.1.3. Способы детектирования Сибутрамина в тонком слое сорбента.....	90
5.1.4. ТСХ – скрининг БАД к пище	90
5.2. Подтверждающий метод определения Сибутрамина – ВЭЖХ-МС.....	91
5.2.1. Установление параметров ВЭЖХ-МС	92
5.2.2. Условия хроматографического разделения	92
5.2.3. Пробоподготовка.....	94
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	98
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	99
Практические рекомендации.....	100
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	100
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102
ПРИЛОЖЕНИЕ А	113
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	114

ПРИЛОЖЕНИЕ В	115
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	116
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Проблема сохранения здоровья и увеличения продолжительности жизни человека остается одной из самых важных и актуальных. Значительные перемены в образе жизни населения России в последние десятилетия вызвали увеличение числа пациентов с ожирением и избыточной массой тела [59].

Для решения данной проблемы население прибегает к поиску максимально быстрых и легких, наиболее эффективных способов снижения веса. На отечественном фармацевтическом рынке представлен немногочисленный перечень лекарственных препаратов анорексигенного действия. Один из наиболее эффективных – Сибутрамин, который является ингибитором обратного захвата нейромедиаторов – серотонина и норадреналина, что приводит к активации центральных норадреналин- и серотонинергических систем [33; 36].

Несмотря на высокую фармакологическую активность, Сибутрамин способен вызывать ряд нежелательных побочных эффектов; среди них – депрессия и нарушение психики [33].

Наиболее простым и безопасным способом похудения является прием БАД к пище, содержащих растительные компоненты.

Однако, в последнее время участились случаи недекларируемого добавления активной фармацевтической субстанции (АФС) Сибутрамина в биологически активные добавки к пище для достижения заявленной эффективности. Согласно данным Федеральной таможенной службы за 2019 – 2020 гг. участились факты обнаружения в БАД к пище сильнодействующих веществ, обладающих психоактивными свойствами, что противоречит законодательству Российской Федерации [60].

В значительной степени это относится к группе БАД к пище, используемых при контроле массы тела. Контрольно-аналитические лаборатории Таможенной службы неоднократно фиксировали недекларируемое добавление в ввозимые биологически активные добавки к пище активной фармацевтической субстанции – Сибутрамина, входящего в Перечень сильнодействующих и ядовитых веществ, незаконное распространение которых уголовно наказуемо (ч. 1 ст.226.1 УК РФ) [30].

Для решения проблемы незаконного оборота БАД к пище в рамках государственного задания Роспотребнадзора «Разработка методов контроля синтетических и природных фармакологически активных веществ в БАД к пище на растительной основе» в лаборатории ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» разработан методологический подход к изолированию, обнаружению и количественному определению Сибутрамина в составе многокомпонентных смесей растительного происхождения.

Анализ отечественной литературы свидетельствует об отсутствии систематических исследований методов определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище, что обуславливает актуальность разработки методик обнаружения и количественного определения с использованием современных физико-химических методов с целью дальнейшего включения в нормативную документацию.

В зарубежной литературе имеются разрозненные сведения об анализе субстанции Сибутрамина в USP (ВЭЖХ-УФ); в составе ЛП (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС); в составе БАД к пище (ВЭТСХ; ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС; ГХ-МС); в биологических жидкостях (ГХ-МС; ЯМР). Согласно проведенным экспериментам описанные методики не обладают достаточной воспроизводимостью, кроме того, они не зарегистрированы в Российской Федерации, в связи с чем очевидной является необходимость разработки новых или оптимизации существующих методик. Таким образом, разработка методик количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах, биологически активных добавках к пище, а также предварительного экспресс – анализа и подтверждения Сибутрамина в БАД к пище с целью выявления фальсификации БАД к пище для похудения, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Объектами исследования являются лекарственные препараты, действующим веществом которых является Сибутрамин; биологически активные добавки к пище различных производителей.

Внедрение системы количественной оценки контролируемых и запрещенных веществ в ЛП и БАД к пище, а также предварительного метода – экспресс–анализа и подтверждения наличия активной фармацевтической субстанции Сибутрамина в составе многокомпонентных БАД к пище на растительной основе способствует защите здоровья граждан РФ. Однако, до проведения настоящего исследования работа по экспериментальной разработке изолирования, определения и обнаружения Сибутрамина в БАД к пище и ЛС в РФ не проводилась.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработка унифицированных методик определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище различными аналитическими методами; методик предварительного и подтверждающего анализов Сибутрамина в БАД к пище.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Провести информационно-аналитический обзор литературы по возможным способам идентификации и количественного анализа Сибутрамина в лекарственных средствах и биологически активных добавках к пище. Обосновать общие подходы к аналитическому контролю выбранных объектов, учитывая физико-химические свойства Сибутрамина.

2. Установить оптимальные условия пробоподготовки анализируемых объектов для последующего определения Сибутрамина.

3. Разработать методики количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище с применением методов высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым диодноматричным детектором и капиллярного электрофореза.

4. Провести валидацию разработанных методик количественного определения в соответствии с требованиями ГФ XIV с целью доказательства их пригодности для контроля качества анорексигенных лекарственных средств, зарегистрированных в РФ, а также биологически активных добавок к пище.

5. Разработать методики идентификации Сибутрамина в биологически активных добавках к пище с целью проведения предварительного и подтверждающего анализов с применением ТСХ и ВЭЖХ-МС.

6. Доказать пригодность разработанных методик для проведения контроля лекарственных препаратов и БАД к пище на содержание Сибутрамина.

Научная новизна исследования

Разработаны и валидированы унифицированные методики количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище методами ВЭЖХ-ДМД, КЭ, проблемно и практически ориентированные на проведение контроля качества изучаемых объектов. Доказана взаимозаменяемость методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза, подтвержденная статистической обработкой результатов, которая создала надежную основу определения Сибутрамина в ЛП и БАД к пище. Предварительный и подтверждающий методы исследования характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью, простотой в исполнении и пригодны для скрининга и доказательства наличия Сибутрамина в биологически активных добавках к пище.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены методики пробоподготовки, идентификации и количественного определения Сибутрамина в составе многокомпонентных лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище анорексигенного действия с недеклалируемым содержанием активной фармацевтической субстанции, которые позволили разработать методический системный подход к исследованию данной продукции в контрольно-аналитических лабораториях при производстве, пересечении границ на таможне и мониторингу парафармацевтиков службами Роспотребнадзора.

На основе разработанных методик определения Сибутрамина в ЛП и БАД к пище обоснован подход к выбору каждого из аналитических методов (ВЭЖХ, КЭ) в зависимости от

конкретной задачи исследования. В качестве предварительного и подтверждающего методов анализа БАД к пище на наличие Сибутрамина рекомендованы методы ТСХ и ВЭЖХ-МС соответственно.

Разработанные методики количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище валидированы с целью доказательства их пригодности для анализа соответствующей промышленной продукции.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования основана на аналитическом обобщении и систематизации данных о строении, физико-химических свойствах Сибутрамина, инструментальных методах его определения в лекарственных препаратах, аспектах применения к анализу объектов растительного происхождения.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения OpenLAB CDS ChemStation (Rev. В. 04.03) (Agilent); ВЭЖХ-МС – Thermo Xcalibur (Ver. 4.2.47) (Thermo Scientific); а также Microsoft Office Excel.

Основные положения, выносимые на защиту

- Обоснование условий количественного определения Сибутрамина в ЛП и БАД к пище методами ВЭЖХ-ДМД, КЭ.
- Доказательство пригодности разработанных методик для контроля ЛП анорексигенного действия и установления его наличия в БАД к пище.
- Результаты количественного определения Сибутрамина в 5 ЛП и БАД к пище 22 наименований.
- Рекомендации по проведению предварительного и подтверждающего анализов БАД к пище на наличие Сибутрамина с применением ТСХ и ВЭЖХ-МС.

Достоверность научных положений и выводов

Выводы и рекомендации базируются на достаточном объеме экспериментальных результатов, полученных методами ВЭЖХ-ДМД, КЭ и подвергнутых статистической обработке.

Наличие Сибутрамина в биологически активных добавках к пище доказано с помощью ТСХ, ВЭЖХ-МС как предварительного, так и подтверждающего методов соответственно. Использованное в работе оборудование сертифицировано.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены и обсуждены на III научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (Москва, 2018), международной научно-практической конференции «Современные аспекты медицины и фармации: образование, наука и практика» (Шымкент,

Казахстан, 2019), XXIII Международном Конгрессе «Фитофарм 2019» (Санкт-Петербург, 2019), VII международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, Казахстан, 2020).

Апробация диссертации проведена 13 января 2021 года на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад

Автору принадлежит ведущая роль в выполнении экспериментальных исследований, обработке и обобщении полученных результатов. Лично автором были разработаны и валидированы методики количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище методами ВЭЖХ-ДМД и КЭ; предложены методики предварительного и подтверждающего анализов Сибутрамина в исследуемых объектах. Вклад автора является основополагающим на всех этапах работы: от информационного поиска, теоретического обоснования и эксперимента, проведения исследования до обработки результатов и представления их в публикациях, докладах, внедрения в практическую деятельность контрольно – аналитических лабораторий.

Внедрение результатов исследования

Разработанная методика количественного определения Сибутрамина в биологически активных добавках к пище включена в методические указания (МУК) 4.1.3603-20 «Методика определения Сибутрамина в биологически активных добавках к пище и специализированной пищевой продукции», которая внесена в реестр от 24.07.2020 Государственной системы санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации (Приложение А). Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Приложение Б).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты научно-исследовательской работы соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 3 и 4 паспорта специальности.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом научных исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева

Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) по теме «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (№ государственной регистрации 01.2.011.68237).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 6 – в научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ, из которых 2 статьи – в изданиях, рецензируемых базой Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 121 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, общих выводов, списка литературы из 128 источников (60 из которых – зарубежные), списка используемых сокращений и приложений.

Диссертация иллюстрирована 60 рисунками и включает 35 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика лекарственных средств анорексигенного действия

В настоящее время избыточный вес – актуальная проблема современного общества. По статистическим данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2016 год выявлено более 650 миллионов людей во всем мире (то есть 13%, из них 11% мужчин и 15% женщин), которые страдали ожирением, а более 1,9 миллиарда взрослых (то есть 39%, из них 39% женщин и 40% мужчин) имели лишний вес. Доля детей в возрасте до 5 лет, страдающих ожирением и имеющих лишний вес, составляла 41 миллион [1; 125]. Дети от 5 – 19 лет страдали ожирением в более чем 340 миллионов случаев. Соотношение мальчиков и девочек с ожирением в указанной возрастной категории составляет 6% и 8% соответственно [125].

В соответствии с данными OECD (The Organization for Economic Co-operation and Development) 2017 года более чем один из двух взрослых и один из шести детей страдают ожирением или имеют избыточный вес в странах, состоящих в организации. Стоит отметить, что самый высокий уровень ожирения среди взрослых наблюдается в Соединенных штатах Америки, Мексике, Венгрии, Новой Зеландии, самый низкий уровень – в Японии и Корее [88; 103].

В США и Дании количество 15-летних детей с ожирением и избыточным весом составляет 31% и 10% соответственно. Кроме того, доля мальчиков превышает количество девочек с ожирением и лишним весом [88].

В Российской Федерации число детей в возрасте до 14 лет, страдающих ожирением, возросло на 5% к 2018 году по сравнению с данными 2017 года [24]. Стоит отметить, что тенденция заболеваемости ожирением возрастает с каждым годом.

В 2019 году в РФ число пациентов с ожирением по сравнению с 2018 годом стало выше на 15,8% (зарегистрированные случаи в 2018 году – 446663, в 2019 – 517357) [59].

Ожирение и избыточная масса тела влекут за собой появление таких заболеваний, как ишемическая болезнь сердца, инсульт, заболевания вен, сахарный диабет (СД) II типа, артериальная гипертензия, субклинический атеросклероз [22; 68].

Для профилактики и лечения первичного ожирения ВОЗ был разработан на период 2013-2020 гг. «Глобальный план действий по профилактике неинфекционных заболеваний и борьбе с ними». Целью данной программы является снижение роста ожирения у населения к 2025 г. [12].

Люди, имеющие лишний вес и ожирение, находятся в поиске наиболее быстрых, легких, а также наиболее эффективных способов похудения.

История возникновения лекарственных средств (ЛС) для похудения связана с работами ученых Стэнфордского университета [18]. Одним из первых лекарственных препаратов явилось ЛС с действующим веществом динитрофенол. При приеме данного лекарственного препарата (ЛП) побочные действия начинались с увеличения температуры тела, заканчивались летальным исходом, вследствие чего производство и отпуск ЛП были прекращены в 1938 году [18]. Следом за динитрофенолом появился препарат «Бензедрин», действующее вещество которого – амфетамин – синтетический психостимулятор наркотического действия [106; 113], также был снят с производства из-за регистрации психоактивных свойств и увеличения числа смертельных случаев.

В 1959 году в Соединенных Штатах Америки было зарегистрировано новое лекарственное средство – Фентермин, а в 1960 году – «Obetrol», содержащий амфетамин и метамфетамин; лекарственное средство вызывало зависимость, вследствие чего было запрещено к 1973 году [79]. В 1970 году появился лекарственный препарат Аминорекса фумарат на основе эфедры, но он был запрещен в 2004 году в связи с токсичностью и возникновением серьезных побочных эффектов [89]. В 1973 году под запрет попадает амфетамин, на смену ему приходит фенфлурамин, в комбинации с фентермином входящим в состав ЛС «Fen-Phen» американской компании «American Home Products» - сейчас «Phizer», однако он был снят с производства в 1997 году из-за наличия побочных эффектов. В качестве замены фенфлурамина на фармацевтическом рынке США появилось новое лекарственное средство дексфенфлурамин, входящее в состав препарата «Redux» («American Home Products»), но побочные эффекты оказались такими же, как и при приеме препарата фенфлурамина, поэтому он также был запрещен. В РФ фенфлурамин был запрещен в 2006 году [74].

В 1988 году фармацевтической компанией «Boots Pharmaceuticals» (Великобритания) было синтезировано новое лекарственное средство для похудения – Сибутрамин. В 1995 году после приобретения компанией «Knoll Pharmaceuticals» (Германия) отдела исследований «Boots Pharmaceuticals» на фармацевтический рынок США был выпущен лекарственный препарат Сибутрамин в виде капсул. В скором времени препарат был продан фармацевтической компании «Abbott Laboratories» (США), зарегистрирован под наименованием «Меридиа» и выпускался до 2010 года, когда Сибутрамин был запрещен в США для применения и распространения на основании решения Food and Drug administration (FDA) [78]. В Европе ЛС было запрещено также в 2010 году.

Предшествующим шагом к отказу от распространения Сибутрамина в США было исследование SCOUT (The recent Sibutramine Cardiovascular Outcomes Trial). Во всемирном исследовании участвовали пациенты с возрастом более 55 лет, имеющие сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания или предрасположенность к ним, из 300 медицинских

учреждений 17 стран мира [8]. По итоговым результатам SCOUT в 2010 году Сибутрамин был отозван с американского фармацевтического рынка FDA, а впоследствии и в Европейском союзе [8; 100]. Фармацевтическая компания «Abbott Laboratories» (США) добровольно отозвала выпускаемый лекарственный препарат «Меридиа» с фармацевтического рынка, поэтому в России данное лекарственное средство было запрещено с 26 февраля 2011 года [8; 33].

На сегодняшний день Сибутрамин также запрещен во всех странах мира, кроме России.

Сибутрамин входит в запрещенный список Всемирного антидопингового кодекса 2020 года [9].

В России препараты Сибутрамина разрешены к медицинскому применению и отпускаются по рецепту врача. На российском фармацевтическом рынке Сибутрамин представлен в составе лекарственных препаратов «Редуксин» («Промомед») и «Голдлайн» («Изварино Фарма»).

Для медицинского применения в США и РФ разрешено лекарственное средство «Ксеникал», действующим веществом которого является орлистат. В РФ зарегистрирована субстанция лираглутид в составе препаратов «Виктоза», «Сакдесна», производство Дании, который является ацилированным аналогом глюкагоноподобного пептида-1 человека [17]. Данный ЛП назначают только больным с СД II типа [33].

Лекарственные средства анорексигенного действия классифицируются:

1) Средства, действующие на катехоламинергическую систему (стимулирующие центральную нервную систему (ЦНС)) – *Фепранон, Дезопимон*;

Средства, влияющие на катехоламинергическую систему – структурные аналоги производных фенилалкиламинов. По механизму действия увеличивают выброс из нервных окончаний дофамина, норадреналина и ингибируют обратный их захват. При активации центральных адрено- и дофаминовых рецепторов достигается угнетение центра голода.

Амфепрамон является действующим компонентом Фепранона, оказывает менее сильное возбуждающее действие на ЦНС, но способен вызывать раздражительность, бессонницу [33].

Аналогичными фармакологическими свойствами обладает Дезопимон, который применяется в терапии алиментарного ожирения и гипотиреоза [33].

2) Средства, действующие на катехоламинергическую и серотонинергическую системы – *Мазиндол, Фенфлурамин, Дексфенфлурамин, Сибутрамин*.

Мазиндол является производным имидазола, активирует находящийся в гипоталамусе центра насыщения, уменьшает всасывание глюкозы в кишечнике. Препарат может вызывать привыкание, повышение артериального давления, анурию.

Фенфлурамин, Дексфенфлурамин, Сибутрамин – производные фенилалкиламинов. Фенфлурамин повышает активность серотониновых структур мозга, вследствие чего ингибирует центр насыщения, уменьшает всасывание жиров в кишечнике, имеет гипотензивные и седативные свойства, тем самым приводит к уменьшению массы тела. Также препарат обладает седативным и противосудорожным эффектами. Во время приема лекарственный препарат может вызывать головокружение, сонливость, бессонницу, депрессию, раздражительность [33].

Дексфенфлурамин не вызывает привыкания, несмотря на то, что обладает структурным сходством с фенфлурамином. Дексфенфлурамин увеличивает высвобождение серотонина в синаптическую щель благодаря тому, что является ингибитором обратного захвата серотонина, поэтому чувствительность рецепторов к гормону повышается. Вызывает следующие побочные эффекты: головокружение, огушенность, головную боль, сонливость перепады настроения, поллакиурию, реактивную депрессию.

Сибутрамин – ингибитор обратного захвата нейромедиаторов – серотонина и норадреналина, вследствие чего происходит активация центральных норадреналин- и серотонинергических систем [33].

3) Средства, стимулирующие липолиз и термогенез (агонисты β_3 -адренорецепторов) – *бигуаниды, соматостатин, тироксин*;

Для поддержания нормальной массы тела важен процесс липолиза, который представляет собой расщепление жиров с выделением входящих в состав жирных кислот.

Бигуаниды применяются при терапии сахарного диабета. Применяются для похудения из-за способности усиливать липолиз [33]. Статины (соматостатин) и тиреоидные препараты (тироксин, трийодтиронин) относятся препараты, стимулирующие липолиз и термогенез и обладающие жиромобилизирующим эффектом [33].

4) Средства, нарушающие всасывание жиров в пищеварительном тракте (ингибиторы кишечной липазы) – *Орлистат*

К этой группе относится лекарственное вещество – Орлистат – насыщенное производное липстатина (природного ингибитора липазы поджелудочной железы, выделенного из бактерии *Streptomyces toxytricini*) [93; 96]. Благодаря необратимому ингибированию фермента липазы в желудке и кишечнике, ослаблению гидролиза пищевых триглицеридов до моноглицеридов и свободных жирных кислот, скорость всасывания жиров уменьшается [23]. Потеря массы тела достигается вследствие уменьшения поступления количества калорий. Характерные возможные побочные эффекты: императивные позывы к дефекации, стеаторея, жидкий стул, метеоризм, в связи со сниженным усвоением жира в ЖКТ [33].

Современными лекарственными препаратами для лечения ожирения на мировом фармацевтическом рынке являются: «Орлистат» («Polpharma», Польша); «Ксеникал» («F. Hoffmann-La Roche Ltd», Швейцария; «Ксеналтен» («Оболенское фармацевтическое предприятие», Россия), «Листата» («Изварино фарма», Россия), «Alli» («GlaxoSmithKline», США) [81; 122]. Отпускаются по рецепту врача [33; 122].

В Российской Федерации зарегистрирован ряд средств, действующими веществами которых являются Сибутрамин – ингибитор обратного захвата серотонина и норадреналина (Таблица 1) и орлистат – блокатор всасывания жиров (Таблица 2). В литературе описано применение лираглутида – аналога глюкагоноподобного пептида-1 человека как ЛС для медикаментозного лечения ожирения [17].

Таблица 1 – Лекарственные средства с действующим веществом – Сибутрамин

N п/п	Лекарственное средство	
	Сибутрамин	Производитель
1	Редуксин капсулы (Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг; целлюлоза микрокристаллическая 158,5/153,5 мг)	ООО «ПРОМОМЕД РУС» (Россия)
2	Редуксин Мет капсулы (Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг; целлюлоза микрокристаллическая 158,5/153,5 мг) + метформина таблетки – 850 мг)	
3	Редуксин Форте таблетки (Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг; метформин – 850 мг)	
4	Голдлайн капсулы (Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг)	ООО «Изварино Фарма» (Россия)
5	Голдлайн Плюс капсулы (Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг; целлюлоза микрокристаллическая 158,5/153,5 мг)	

Таблица – 2. Лекарственные средства с действующим веществом – орлистат

N п/п	Лекарственное средство	
	Орлистат	Производитель
1	Орлистат капсулы (орлистат – 120 мг; МКЦ – 59,6 мг)	«Польфарма» (Польша); ООО «Озон Фарм» (Россия); ЗАО «Фармацевтическое предприятие «Оболенское» (Россия)

2	Орлистат мини - таблетки (орлистат – 60 мг)	ООО «Изварино Фарма» (Россия); ОАО «Биохимик» (Россия)
3	Орлистат – Акрихин капсулы (орлистат – 60/120 мг)	«Польфарма» (Польша);
4	Орлистат Канон капсулы (орлистат – 120 мг)	ЗАО «Канонфарма Продакшн» (Россия)
5	Ксеналтен капсулы (орлистат – 120 мг; МКЦ – 59,6 мг)	ЗАО «Фармацевтическое предприятие «Оболенское» (Россия)
6	Орсотен слим капсулы (орлистат – 60 мг)	КРКА – Рус (Россия)
7	Орсотен капсулы (орлистат – 120 мг)	
8	Листата таблетки (орлистат – 120 мг)	ООО «Изварино Фарма» (Россия)
9	Листата Мини – таблетки (орлистат – 60 мг)	
10	Ксеникал капсулы (орлистат – 120 мг)	«Дельфарм Милано С.р.л.» (Италия); «Ф.Хоффман-Ля Рош Лтд. (Швейцария); «Рош С.п.А.» (Италия); ЗАО «Радуга Продакшн» (Россия)
11	Орлимакс капсулы (орлистат – 120 мг)	«Польфарма» (Польша);
12	Орлимакс Лайт капсулы (орлистат – 60 мг)	
13	Ксеналтен Лайт капсулы (орлистат – 60 мг; МКЦ-29,8 мг)	ЗАО «Фармацевтическое предприятие «Оболенское» (Россия)
14	Ксеналтен Слим капсулы (орлистат – 60 мг; МКЦ-49,3 мг)	
15	Ксеналтен Лого капсулы (орлистат – 120 мг; МКЦ-98,6 мг)	
16	Орликсен 60 капсулы (орлистат – 60 мг)	ООО «Озон Фарм» (Россия)
17	Орликсен 120 капсулы (орлистат – 120 мг)	

1.2. Сибутрамин

1.2.1. Строение. Физико-химические свойства

Фармакопейная статья на субстанцию Сибутрамин представлена только в Фармакопее США [120].

Сибутрамина гидрохлорид – (\pm) -1- (п-хлорфенил) - α -изобутил-N, N-диметилциклобутанметанамин гидрохлорид моногидрат (рисунок 1).

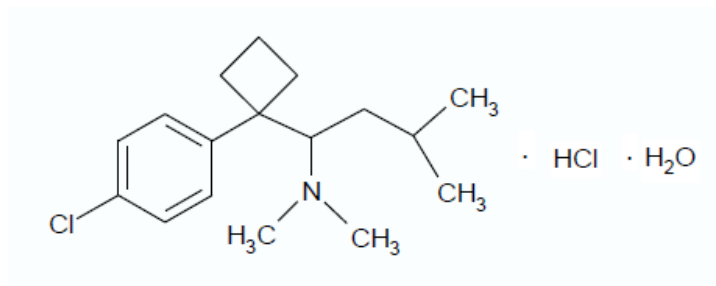


Рисунок 1– Структурная формула сибутрамина гидрохлорида

Молекулярная масса 334,32 г/моль.

Описание. Кристаллический порошок от белого до кремового цвета.

Растворимость. Растворим в воде. pH водного раствора 5,0.

Подлинность. 1) Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия);

2) Реакция на хлорид-ион. При добавлении серебра нитрата в азотнокислой среде выделяется белый осадок, растворимый в 6N растворе аммиака.

3) Оптическое вращение. Между $-0,1^\circ$ и $+0,1^\circ$, определяется при 20° .

Количественное определение. Метод ВЭЖХ с помощью УФ-детектора – 220 нм, скоростью потока – 2 мл/мин, t° колонки – 30° .

ПФ: раствор соли бутансульфоновой кислоты pH=3.0: ацетонитрил: тетрагидрофуран 674:325:10 (по объему).

Раствор внутреннего стандарта: 0,75% раствор 4-бромфенолового синего в метаноле.

Раствор стандарта: раствор сибутрамина гидрохлорида моногидрата 0,1 мг/мл в метаноле.

НФ: хроматографическая колонка C18 размером 3.9 мм x 30 см с размером частиц сорбента 5 μ .

Неорганические примеси: Сульфатная зола, тяжелые металлы.

Родственные примеси: А,В,С,Д, а также общие указанные, любые указанные и общие неуказанные примеси определяются с помощью метода ГХ.

Содержание воды в субстанции (от 4,5 до 6%) [120].

Комбинация компонентов, сочетающих гипогликемическое лекарственное средство (Метформин), АФС анорексигенного действия для терапии ожирения (Сибутрамин) и энтеросорбирующее /детоксикационное средство (Целлюлоза микрокристаллическая), является препаратом выбора для многих пациентов с избыточной массой тела – «Редуксин Форте» [31].

Аналитический подход к контролю качества лекарственного средства «Редуксин Форте» предусматривает сочетание химических и физико-химических методов, основанных на кислотно-основных свойствах компонентов.

Согласно ФС.2.1.0137.18 «Метформина гидрохлорид» активная фармацевтическая субстанция представляет собой белый или почти белый кристаллический порошок, легко растворимый в воде, мало растворим в спирте 96%, практически нерастворим в ацетоне. Метформина гидрохлорид – N,N – Диметилимидодикарбоимид диамина гидрохлорид (рисунок 2). Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% метформина гидрохлорида в пересчёте на сухое вещество [14].

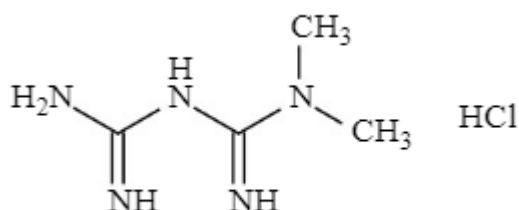


Рисунок 2 – Структурная формула метформина гидрохлорида

Метформин является производным бигуанида, обладает выраженными основными свойствами. Химическая структура Метформина, её функциональные фрагменты являются основой для применения метода ИК – спектрофотометрии с целью доказательства подлинности субстанции [14].

Контроль качества АФС проводят по показателям: температура плавления, родственные примеси (метод ВЭЖХ), потеря в массе при высушивании, сульфатная зола, тяжелые металлы, остаточные органические растворители. Определение количественного содержания проводят методом ацидиметрии в среде муравьиной кислоты и ацетонитрила, титрант – 0,1М раствор хлорной кислоты, КТТ определяют потенциометрически.

Метформин является гипогликемическим лекарственным средством, обладающим множеством плеiotропных эффектов. Метформин подавляет глюконеогенез, снижает абсорбцию глюкозы в кишечнике, регулирует метаболизм липидов, активирует центры регуляции аппетита гипоталамуса, что способствует лечению не только сахарного диабета, но и ожирения [36].

Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ) – растительный полисахарид из группы углеводов, относится к группе пищевых волокон [10].

Исходя из химического строения целлюлозы микрокристаллической (МКЦ) (рисунок 3), практически целесообразным для ее анализа является оптический метод. Согласно литературным источникам вещество анализируют с помощью спектроскопии с преобразованием Фурье, рамановской спектроскопией [71; 75].

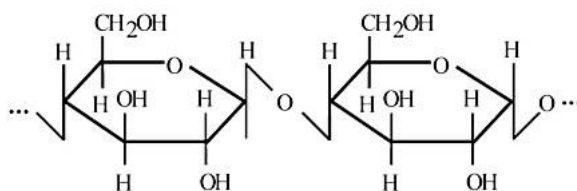


Рисунок 3 – Структурная формула целлюлозы микрокристаллической

Микрокристаллическая целлюлоза, попадая в желудочно-кишечный тракт, набухает под действием жидкостей, посылая сигнал о насыщении в головной мозг. МКЦ не содержит калорий, является энтеросорбентом, обладает дезинтоксикационным действием [10].

1.2.2. Методы определения

1.2.2.1. Методы определения в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище

В результате анализа литературных данных было установлено, что в мировой практике для определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище, биологических жидкостях широко применяются различные виды хроматографии, спектрофотометрии и другие физико-химические методы.

Авторами Maluf D.F., Farago P.V., Barreira S.M.W., Pedroso C.F., Pontarolo R. была разработана и валидирована методика определения Сибутрамина в капсулах с использованием метода УФ-спектроскопии при длине волны 223 нм [98].

Kilicarslan G., Imamoglu E., Kucuk A., Ozdemir A. разработали метод определения Сибутрамина в лекарственных средствах с помощью УФ-спектрофотометрии при аналитической длине волны 224 нм. Авторами определены фармакологически активные метаболиты при 217 и 223 нм. Метод обращено-фазовой ВЭЖХ с ультрафиолетовым диодноматричным детектором плазме человека и капсулах. В качестве подвижной фазы Kilicarslan G. и соавторы применили смесь метанол - ацетонитрил в соотношении 90:10, НФ – С18 [91].

Учитывая специфику спектроскопии в ближней инфракрасной области (спектральный диапазон $14000-4000\text{ см}^{-1}$), авторами Silva N.C., Honorato R.S., Pimentel P.M., Garrigues S., Cervera M.S., Guardia M. представлены две стратегии выявления фальсификации биологически активных добавок к пище растительного происхождения Сибутрамином, а также для проведения количественного анализа, основанного на многовариантной калибровке [112].

Hemdan A. и Tawakol S.M. предложили методику определения Сибутрамина, фенолфталеина в составе растительных лекарственных средств с помощью метода ВЭЖХ-УФ (223 нм) с последующим подтверждением методом ВЭЖХ с применением матричного

фотодиодного детектора и масс – спектрометрии. Подвижная фаза для количественного определения Сибутрамина и фенолфталеина представляла собой ацетонитрил-фосфатный буфер (pH 3) (40:60) [87].

Zhong Y., Sun C., Xiong J., Shi Y. описали методику ВЭЖХ с УФ – детектированием на диодной матрице с использованием фосфорной кислоты и натрия додецилсульфата в качестве подвижной фазы для определения Сибутрамина и других фармацевтических субстанций (фенолфталеин, нуциферин), 5 соединений антрахинона, включая алоэ-эмодин, реин, эмодин, хризофанол, париетин в БАД к пище. В качестве экстрагента использовали 70% метанол. Подвижная фаза состояла из водного раствора метанола 0,05% (о/о) и раствора фосфорной кислоты – 0,025% (м/о). Скорость потока подвижной фазы составляла 0,8 мл/мин при градиентном элюировании. НФ – хроматографическая колонка Luna C18. Валидация методики была проведена с помощью жидкостной хроматографии – МС/МС [128].

Петкова-Георгиева Е., Иванов К., Георгиев С., Михайлова А., Маджаров В., Иванова С. представили методику определения Сибутрамина на фоне растительного матрикса в БАД к пище с помощью метода ультра-ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения, МС/МС-детектором. В качестве экстрагента использовали водный раствор ацетонитрила 80% с последующим разбавлением до 50% ацетонитрила водой. Подвижная фаза А – вода: ацетонитрил (95:5), pH=4.3, 10 мМоль аммония формиата; Подвижная фаза Б – ацетонитрил: вода (95:5), pH=4.3, 10 мМоль аммония формиата. Градиент: 50% ПФ А/ПФ Б. Определяемые массы 279.68; 280.68 m/z [105].

В работе Hammad R., Almardini M. A. приведена методика ВЭЖХ-УФ для определения АФС, используемых для фальсификации БАД к пище: сибутрамина, кофеина, фуросемида, фенолфталеина, флуоксетина и орлистата. НФ – хроматографическая колонка C18, 4.6×250, 5µm, подвижная фаза – ацетатный буфер pH=5 и ацетонитрил в градиентном элюировании от 20 до 100% содержания ацетонитрила [83].

Kamardi T., Fidrianny I., Musadad A. теоретически обосновали и экспериментально доказали преимущества обращено-фазовой твердофазной экстракции (ТФЭ) Сибутрамина из растительных БАД к пище, показано, что оптимальным растворителем является 3% раствор ортофосфорной кислоты. Идентификация Сибутрамина гидрохлорида проводилась с помощью ВЭЖХ при длине волны 222 нм. ПФ: ацетонитрил:фосфатный буфер (градиентное элюирование со скоростью 1 мл/мин) [90].

Твердофазную экстракцию смесью 2% раствора фосфорной кислоты и метанола 1:1 Сибутрамина из БАД к пище использовали Wang Y., Zhang W.-T., Li S.-T., Li Y., Sun C.-J. Полученные экстракты очищали с помощью колонок Osis MCX SPE, а затем концентрировали в слабом потоке азота и восстанавливали ранее указанной смесью. Подвижная фаза –

ацетонитрил с условием предварительной обработки раствором аммиака. Экстрагент аналогичен использованному Kamardi T. и соавторами. Этот метод является экспрессным и обладает высокой специфичностью [124].

Reeuwijk N. и соавторы проанализировали 50 биологически активных добавок к пище с помощью метода ВЭЖХ-ДМД-МС/МС. Помимо Сибутрамина, были обнаружены его фармакологически активные метаболиты – M_1 – десметилсибутрамин (ДМС) и M_2 – дидесметилсибутрамин (ДДМС) (раздел 1.2.3, рисунок 5) [107].

В экспериментальном исследовании Стерн К.И. представлены методики определения структурных аналогов Сибутрамина – M_1 – десметилсибутрамина и M_2 – дидесметилсибутрамина, применяемых для фальсификации БАД к пище анорексигенного действия [42]. Автором проведено комплексное исследование БАД к пище растительного происхождения с использованием фитохимического и инструментального хроматографического методов. Установлено наличие токсикологически значимых производных Сибутрамина в составе БАД к пище методом ГХ с пламенно-ионизационной детекцией (ПВД) и доказано сходство психоактивного эффекта ДМС и ДДМС с Сибутрамином с целью отнесения метаболитов к его аналогам. Методика обнаружения и количественного определения метаболитов методом ГХ в составе БАД к пище основана на извлечении БАВ 95% этиловым спиртом (1:10) или хлороформом (1:10) при pH=9-10 и хроматографировании в условиях: неполярная колонка НР-5 длиной 30 м, газ-носитель (азот) со скоростью потока – 2,4 мл/мин, t° колонки: начальная – 170 $^\circ\text{C}$, скорость нагрева до температуры 220 $^\circ\text{C}$ – 20 $^\circ\text{C}/\text{мин}$, t° детектора – 250 $^\circ\text{C}$, t° испарителя – 230 $^\circ\text{C}$, объём вводимой пробы – 1 мкл с делением потока 1/3 [39; 41; 42].

Zeng Y., Xu Y., Kee C.-L., Low M.-Y., Ge X. описывают параметры определения Сибутрамина в биологически активных добавках к пище двумя методами: жидкостной хроматографией и тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) с мониторингом множественных реакций с эффективным сканированием ионов-продуктов для одновременного определения 40 соединений анорексигенного действия, включая АФС: бисакодила, фенолфталеина, сибутрамина и его метаболитов. Образцы анализировали с использованием Q-Trap 5500 в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией и колонкой ультраэффективной жидкостной хроматографии CORTECS C18 (100 мм × 2,1 мм × 1,6 мкм) [126].

В работе Mathon C., Ankli A., Reich E., Bieri S., Christen P. приведены хроматографические параметры определения Сибутрамина в многокомпонентных БАД к пище с растительными компонентами методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Образцы экстрактов (экстрагент – метанол) наносили на пластинки с тонким слоем силикагеля (5 мкм) в

качестве НФ и разделяли с использованием подвижной фазы – толуол-метанол (9:1). После элюирования Сибутрамин определяли количественно методом УФ-спектрофотометрии при 225 нм с последующим подтверждением масс-спектрометрией. Были исследованы 52 биологически активные добавки к пище для похудения, приобретенные через Интернет. В результате проведенных исследований установлено, что половина БАД к пище были фальсифицированы Сибутрамином в количествах, достигающих 35 мг на капсулу (высшая разовая доза составляет 15 мг). Полученные результаты были подтверждены методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. Концентрации Сибутрамина при применении трех методов не отличались [99].

Предложен метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для подтверждения подлинности и количественного определения Сибутрамина в БАД к пище [123]. Monakhova Y.B., Kuballa T., Löbell-Behrends S., Maixner S., Kohl-Himmelseher M., Ruge W., Lachenmeier D.W. представили методику определения Сибутрамина в растительных биологически активных добавках с помощью метода ЯМР 400 МГц ¹H для идентификации и количественного определения АФС без использования стандарта. Идентификация проводится с помощью библиотеки спектров, если эти данные недоступны – путем прогнозирования спектров ЯМР. Для количественного определения Сибутрамина методом ЯМР без стандарта использовали простое сравнение площади пика определяемого соединения с эталоном – тетраметилсиланом. Относительное стандартное отклонение составляло 5,0% для сравнения площади пика и 3,3% - для внешней калибровки со стандартным веществом [101].

Gilard V., Balayssac S., Malet-Martino M., Martino R. применили оптический метод для определения Сибутрамина на фоне сложного растительного матрикса с использованием корреляционной спектроскопии, гетероядерной множественной квантовой корреляционной спектроскопии [80].

1.2.2.2. Методы определения в биологических жидкостях

При исследовании Сибутрамина многие ученые обращались к методу газовой хроматографии (ГХ). Так Strano-Rossi S., Colamonicì C., Botrè F. приводят хроматографические условия разделения, идентификации и количественного определения метаболитов Сибутрамина в моче с помощью метода ГХ/МС. Образцы мочи предварительно подвергали жидкость-жидкостной экстракции, ферментативному гидролизу, концентрированию в токе азота и дериватизации, при термической инкубации, или под воздействием микроволнового излучения [116].

Предложен метод капиллярного электрофореза с масс-детектированием. Akamatsu S., Mitsuhashi T. осуществляли разделение на капилляре из плавленого кварца без покрытия при 30 кВ в течение 25 минут с использованием 20 ммоль раствора формиата аммония в 20% растворе смеси ацетонитрил-вода (рН 8,0) в качестве электролита. Экстрагентом являлся 5 ммоль

раствор аммония формиата и 0,1% раствор муравьиной кислоты в 50% растворе метанола [69]. Nancu G., Nilochie A., Vlad A-R., Cârje A., Tero-Vescan A. использовали циклодекстрин в качестве хирального селектора для разделения энантиомеров субстанции Сибутрамина. ПФ – 50 ммоль фосфатный буфер, содержащий 10 ммоль метилированного β -циклодекстрина при 15 кВ [84]. Lee Y-J., Choi S., Lee J., Nguyen N.T., Lee K., Kang J.S., Mar W., Kim K.H. предложили методику определения Сибутрамина в лекарственных препаратах с использованием хирального модификатора циклодекстрина одним из наиболее быстро развивающихся методов – капиллярным электрофорезом, а также методику спектроскопии ядерного магнитного резонанса [95].

1.2.3. Фармакологические свойства

Из представленных на фармацевтическом рынке лекарственных средств для похудения одним из наиболее эффективных является Сибутрамин, лекарственные формы которого – капсулы и таблетки.

По механизму действия Сибутрамин – ингибитор обратного захвата серотонина и норадреналина, в меньшей степени – дофамина, при этом в синапсе увеличивается их концентрация, что приводит к повышению чувства насыщения и уменьшению количества принимаемой пищи и, вследствие чего уровень жировой ткани снижается [4; 33].

По химическому строению Сибутрамин схож со структурой амфетамина (рисунок 4) и относится к производным фенилалкиламина [45; 108; 113]. Амфетамин и Сибутрамин оказывают действие на центральную нервную систему, что вызывает ряд серьезных побочных эффектов. В отличие от амфетамина, прием Сибутрамина не вызывает привыкания из-за того, что не увеличивает концентрацию дофамина в синаптической щели в значительной степени. На фармакологическое сходство Сибутрамина и амфетамина также указывает увеличение выделения норадреналина, что вызывает ощущение бодрости, повышение физической активности, но также повышение артериального давления. Различие состоит в том, что Сибутрамин увеличивает выделение и блокирует обратный захват серотонина – гормона, действующего на центр регуляции аппетита, поэтому лекарственный препарат принимают для похудения; а амфетамин – дофамина (стимулятор ЦНС); ранее амфетамин применялся для лечения депрессий, нарколепсии и каталепсии, апатии, недомогания и утомляемости, является наркотическим средством [33; 45; 102; 108].

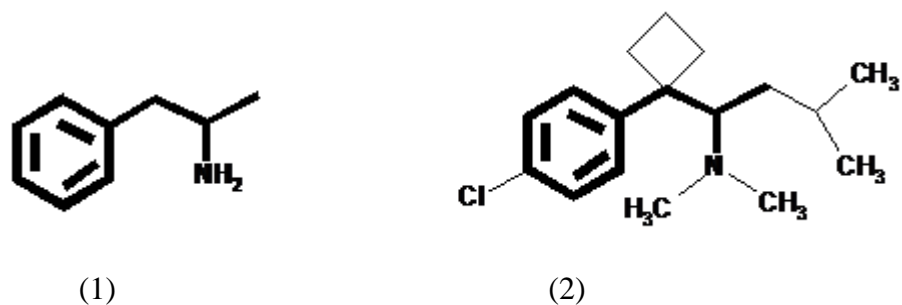


Рисунок 4 – Структурные формулы амфетамина (1) и Сибутрамина (2)

Сибутрамин и амфетамин включены в запрещенный список антидопингового кодекса (группа S6 – стимуляторы) [9].

Эффекты Сибутрамина преимущественно обусловлены двумя образующимися под действием цитохрома P450 изофермента CYP3A4 фармакологически активными метаболитами M_1 – десметилсибутрамин и M_2 – дидесметилсибутрамин (рисунок 5), образующимися в результате N-деметелирования с последующим гидроксированием в циклобутане или изопропиловой цепи (I фаза биотрансформации). Все метаболиты Сибутрамина выводятся из организма в виде глюкуронидов (II фаза биотрансформации) и сохраняют хиральный атом углерода, присутствующий в структуре сибутрамина [34; 94; 116]. $T_{1/2}$ Сибутрамина — 1,1 ч, M_1 – десметилсибутрамина — 14 ч, M_2 – дидесметилсибутрамина — 16 ч. [33].

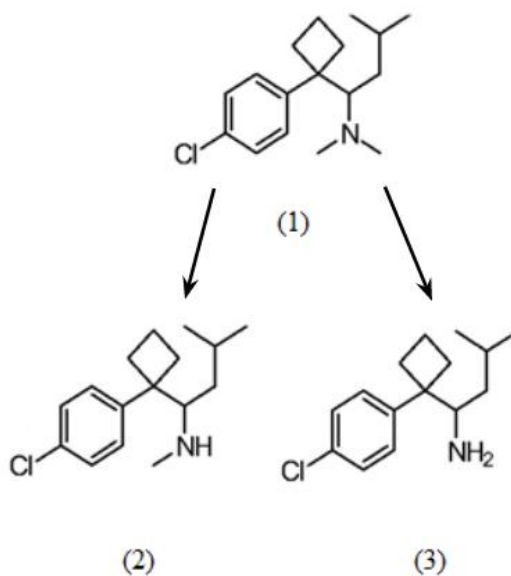


Рисунок 5 – Активные метаболиты Сибутрамина:

- (1) – структурная формула Сибутрамина;
- (2) – структурная формула M_1 – десметилсибутрамина (ДМС);
- (3) – структурная формула M_2 – дидесметилсибутрамина (ДДМС)

В своей научно-исследовательской работе Стерн К.И. доказала схожесть психоактивного действия метаболитов с Сибутрамином, в связи с чем обосновала необходимость включения ДМС и ДДМС в список сильнодействующих веществ [42].

В результате исследований на крысах было установлено, что Сибутрамин стимулирует термогенез, вызывая устойчивое (> 6 ч) увеличение потребления кислорода до 30%. Данный эффект обусловлен активацией центрального отдела симпатической нервной системы, а именно влиянием на бета 3-адренорецепторы [16; 45].

Доказана безопасность и эффективность применения Сибутрамина при лечении ожирения, что подтверждалось снижением индекса массы тела [66].

Сибутрамин применяют не только с целью проведения лекарственной терапии алиментарного ожирения, но и при коррекции избыточной массы тела, возникшей вследствие дислипотеинемии или сахарного диабета II типа, улучшая целевые показатели гликемического профиля, снижая липидные показатели, эффекта липотоксичности, обеспечивает пролонгацию чувства насыщения [1; 28; 36; 65; 82]. Также выявлена тенденция улучшения репродуктивной функции при приеме Сибутрамина и метформина, входящих в состав препаратов «Редуксин Мет» («Промомед», Россия), при синдроме поликистозных яичников на фоне снижения общего тестостерона, андрогенов, что приводит к уменьшению инсулинорезистентности [19]. Несмотря на комплексное действие, Сибутрамин способен к коррекции репродуктивной функции самостоятельно.

В работе Кондрашкиной О.В. показано положительное влияние Сибутрамина на половую функцию у мужчин с ожирением. Так, прием Сибутрамина при комплексной диетотерапии позволяет достичь увеличения содержания тестостерона, улучшения эректильной функции, андрогенного статуса, повышения либидо, при этом не вызывает повышения артериального давления у мужчин и приводит к снижению гиперинсулинемии и улучшению липидного спектра крови [21].

Опубликованы данные о снижении уровня циркулирующего лептина в крови, что приводит к увеличению окисления жира, а в дальнейшем – к уменьшению эффекта потери массы тела при приеме Сибутрамина [2; 16]. В работе Волковой Г.Е. показано влияние Сибутрамина на формирование правильного пищевого поведения, сопровождающегося снижением вероятности возникновения депрессии, и, как следствие, повышение качества жизни [7].

Бирюкова Е.В. доказала, что прием Сибутрамина и Орлистата в комплексе с немедикаментозными методами приводит к улучшению гормонально-метаболических показателей, а также позволяет больным эффективно достигать клинически значимого снижения массы тела в рекомендуемых пределах [4].

Несмотря на высокую эффективность Сибутрамин вызывает ряд нежелательных побочных эффектов со стороны различных систем организма [33]. Например, со стороны сердечно-сосудистой системы наблюдается тахикардия, повышение артериального давления; органов ЖКТ – тошнота, анорексия, диспепсия; опорно-двигательного аппарата – артралгия, миалгия, заболевания суставов; нервной системы – сухость во рту, нервозность, тревога, инсомния, депрессия [16; 33; 104]. Описаны случаи возникновения инсульта на фоне приема Сибутрамина по сравнению с плацебо [34].

Таким образом, можно сделать вывод, что среди современных лекарственных препаратов с целью проведения лечения ожирения одним из наиболее эффективных является Сибутрамин. Однако, из-за существенных побочных эффектов безопасность его применения не является до конца доказанной.

1.3. Биологически активные добавки к пище

Согласно статье 1 Федерального закона № 29 от 2 января 2000 года «О качестве и безопасности пищевых продуктов» биологически активные добавки представляют собой природные (идентичные природным) биологически активные вещества, предназначенные для употребления одновременно с пищей или введения в состав пищевых продуктов [57].

По происхождению БАД к пище могут быть продуктами как растительного, так и животного, минерального, в том числе микробного происхождения или иметь комбинированный состав [3].

Биологически активные добавки к пище представляют собой эволюционно предопределенный сочетанный в многокомпонентный состав биологически активных веществ, поступающих извне, адекватно действующих на метаболические системы организма в условиях реального пищевого и экологического статусов.

Определено многообразие воздействия БАД к пище на организм человека: антиоксидантное действие; поддержание микробиологического гомеостаза; регуляция адаптивно-компенсаторных механизмов; поддержание функциональной активности систем и органов; лечебное и лечебно-профилактическое питание; восполнение дефицита эссенциальных компонентов пищи; направленное изменение метаболизма веществ; повышение неспецифической резистентности организма к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды; связывание и выведение ксенобиотиков [29].

Существуют различные виды классификации БАД к пище [29; 32; 37]:

- 1) функциональная классификация: нутрицевтики, парафармацевтики;
- 2) по компонентному составу (13 групп);
- 3) согласно содержанию биологически активных веществ (15 групп);
- 4) по влиянию на организм (17 групп).

Последняя классификация выделяет группу биологически активных добавок к пище для лиц, контролирующих массу тела.

Наиболее распространенными компонентами и биологически активными веществами, входящими в БАД к пище анорексигенного действия являются:

1) экстракт кожицы плодов гарцинии камбоджийской - гидроксимилимонная кислота – ингибирует действие фермента аденозинтрифосфатцитратлиазы, подавляет синтез жирных кислот, увеличивает скорость синтеза гликогена в печени [85];

2) экстракт листьев толокнянки – арбутин – обладает диуретическими эффектами [114];

3) экстракт листьев сенны – сеннозиды или антрахиноны – усиливают перистальтику кишечника, разжижают его содержимое, ускоряют опорожнение; также установлено, что изучаемые БАВ стимулируют поглощение глюкозы, подавляют активность связанных с ожирением адипокинов [97];

4) экстракт коры крушины – антраценопроизводные (франгулоэмодин) – слабительное действие, аналогичное вызываемому при приеме экстракта листьев сенны [5];

5) экстракт плодов померанца – синефрин – увеличивает скорость метаболизма, теплопродукцию [115];

6) L-карнитин – природная аминокислота – транспортирует жиры к митохондриям, где происходит переработка жира в энергию [72];

7) Спирулина – фикоцианины – снижение липидов и холестерина в крови, повышение резистентности к лептину, ингибирует активность липазы поджелудочной железы, снижая уровень триглицеридов в крови, предотвращение накопления холестерина [76];

8) Экстракт худии гардонии – гордонозид F - активирует рецептор (GPR119), ответственный за метаболический гомеостаз, что приводит к повышенной секреции инсулина и снижению потребления пищи [127];

9) Экстракт зеленого чая – тригонелин, гидроксикоричные кислоты – ингибирование ферментов: липазы поджелудочной железы, амилазы и глюкозидазы, снижают скорость всасывания жиров и сахаров, тем самым уменьшая потребление калорий в организме [110];

10) Экстракт листьев стевии – стевиозид - натуральный сахарозаменитель, обладающий гиполипидемическим, антигиперлипидемическим эффектом, снижает общий холестерин, триглицериды, липопротеины низкой плотности [70].

Основной целью применения БАД является профилактика заболеваний различной этиологии за счет нормализации баланса питательных веществ в организме. БАД не являются лекарственными средствами и не могут быть использованы для лечения заболеваний. Их профилактическое действие достигается благодаря содержанию растительных, животных и

минеральных компонентов, незначительно влияющих на различные функциональные системы организма [109; 121].

1.3.1. Методы контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище

Биологически активные добавки к пище представляют собой сложный многокомпонентный комплекс, в состав которого входят как известные, так зачастую и неизвестные потребителю компоненты. В связи с этим, на сегодняшний день, оценка фармакологической активности известных компонентов проводится, основываясь на литературные данные, а в случае ярко выраженного фармакологического эффекта неизвестного компонента, испытания проводят выборочно. Установление эффективности БАД к пище путем проведения клинических испытаний обязательным пока не является [13].

Безопасность БАД к пище регламентируется показателями, изложенными в СанПин 2.3.2.1078-01, Техническом регламенте Таможенного союза 21, 29 и осуществляется по методикам, представленным в «Руководстве по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище», утверждённым МЗ РФ 30.06.2003. Согласно данной НД, все БАД к пище контролируют на наличие токсичных элементов (свинец, мышьяк, кадмий, ртуть), а в зависимости от состава БАД к пище проводится контроль на наличие [37; 54; 55]:

- микотоксинов;
- нитратов и нитритов;
- n-нитрозаминов;
- биогенных аминов;
- полициклических ароматических углеводородов (ПАУ);
- антибиотиков;
- пестицидов;
- радионуклидов;
- полихлорированных бифенилов.

Контроль качества биологически активных добавок к пище проводится на основе методов, изложенных в выше указанной НД, на этапе экспертизы и регистрации БАД к пище, на стадиях разработки и производства, ввозе, при хранении, при осуществлении транспортировки и реализации на территории РФ. БАД к пище в зависимости от состава подвергаются исследованию на содержание [35]:

- макронутриентов (азотистые соединения, липиды, углеводы);

- микронутриентов (витамины (А, Е, В₂, В₆, С), минеральные вещества (натрий, калий, кальций, магний, железо, марганец, медь, цинк, фосфор, свинец, кадмий, кобальт, никель, хром), микроэлементы (йод, селен));
- биологически активных компонентов БАД (антоцианины, органические кислоты, моно-, дисахара, кофеин, теобромин, теофиллин, химин, коэнзим Q10, L-карнитин, полифенольные соединения, флавоноиды, схизандрин, дубильные вещества, эфирные масла);
- пищевых добавок в составе БАД к пище (консерванты, заменители сахара, ароматизаторы, синтетические пищевые красители).

Таким образом, недостаточный уровень контроля действующих веществ в составе БАД к пище приводит к тому, что большинство биологически активных добавок к пище оцениваются в основном в аспекте общей безопасности, что существенно снижает возможности контроля их подлинности и фактического содержания компонентов.

Вместе с тем в США законодательным документом, осуществляющим контроль качества БАД к пище, является USP, где представлен раздел «Dietary supplements». В данном разделе представлены общие статьи по показателям качества: микробиологическая чистота, распадаемость, растворение, однородность дозирования и статьи, в которых описаны методики определения витаминов, минералов и других биологически активных веществ, входящих в многокомпонентный состав БАД к пище [119].

Кроме того, облегченная процедура вывода на рынок БАД к пище, по сравнению с ЛС, привела к тому, что зачастую в их состав вводят сильнодействующие активные фармацевтические субстанции, а также запрещенные или малоизученные вещества [109].

Недобросовестные производители, пользуясь данной лазейкой, включают в многокомпонентные БАД сильнодействующие, а иногда наркотические и психотропные вещества, такие как силденафил, тадалафил, фенолфталеин, фенфлурамин, амфепрамон, римонабант, фентермин, эфедрин, фурсемид, диазепам, сибутрамин [25; 53; 63; 67; 109].

Содержание данных веществ в биодобавках может вызывать серьезные неблагоприятные последствия для здоровья пациентов вследствие случайного неправильного употребления, злоупотребления или взаимодействия с лекарственными средствами, используемыми при совместном приеме с БАД. Достоверно установить качество БАД к пище не представляется возможным, вследствие того, что для большинства компонентов БАД не установлены биологически активные вещества и, как следствие, отсутствует НД.

Кроме того, Сибутрамин входит в Перечень сильнодействующих и ядовитых веществ, незаконное распространение которых регулируется законом и является уголовно наказуемым на основании действия статей 234 УК РФ (незаконный оборот сильнодействующих или ядовитых веществ в целях сбыта), 226 (незаконное перемещение через таможенную границу

Таможенного союза в рамках ЕврАзЭС либо Государственную границу Российской Федерации с государствами - членами Таможенного союза в рамках ЕврАзЭС сильнодействующих, ядовитых, веществ) УК РФ [30; 40; 60].

Актуальной задачей является разработка методических подходов и аналитических методик определения биологически активных компонентов БАД к пище для контроля их качества, обеспечения безопасности и выявления фальсифицированной продукции. Это имеет непосредственное отношение и к биологически активным добавкам к пище, содержащих Сибутрамин.

1.3.2. Правовые основы обращения БАД к пище в РФ

Главной государственной структурой, отвечающей за качество и безопасность БАД к пище, является Роспотребнадзор. Его полномочия закреплены в «Положении о федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека». В задачи территориальных органов Роспотребнадзора входит проверка производителей БАД и аптечных учреждений, осуществляющих розничную продажу, на предмет выявления и изъятия фальсифицированных, недоброкачественных биодобавок. Из-за участившихся случаев фальсификации БАД к пище с 2015 года, разрабатываются поправки к законодательным актам. Кроме того, иеициинским обществом рассматривается целесообразность передачи функций по контролю БАД от Роспотребнадзора в ведомства Росздравнадзора, который занимается контролем ЛП [11; 27; 63; 67].

В РФ зарегистрирован перечень документов, регулирующих оборот БАД к пище: Федеральные законы (№№ 29, 52, 38, 2300-1, 184), постановления и приказы (№№ 982, 146, 2; 117, 89), СанПины, руководства, методические указания и методические разработки, а также технические регламенты (основополагающими из них являются ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевых продуктов», ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств»).

Перечисленные нормативные документы преследуют цель установления на единой таможенной территории Таможенного союза единых обязательных требований оборота БАД к пище на рынке: состава, разработки, технологического процесса производства, регистрации, хранения, транспортировки, маркировки, рекламы, работы с претензиями, изъятия и отзыва [11; 26].

В соответствии с СанПиНом 2.3.2.1290-03 «Гигиенические требования к организации производства и оборота биологически активных добавок к пище (БАД)»: постановка на производство новых БАД, производство и оборот БАД допускается только после проведения подтверждения их соответствия действующим нормативным документам и техническим регламентам (регистрации) в порядке, установленном действующим законодательством» [38].

Проблема заключается в том, что БАД к пище не подвергаются обязательной проверке качества (сертификации) после регистрации, то есть нет никаких независимых исследований, доказывающих соответствие содержащихся компонентов в данной продукции к заявленному составу на этикетке. Это происходит из-за того, что отнесение БАД к пищевым продуктам позволяет производителям утверждать, что их товар содержит абсолютно безвредные компоненты и, следовательно, не требует дополнительной независимой оценки.

Другой проблемой, связанной с законодательством, является нарушение условий продажи БАД к пище. Их реализация должна осуществляться только через аптечные учреждения, либо специальные магазины по продаже диетической продукции или через продовольственные магазины, имеющие специальные секции для данного вида товара. Также в СанПиНе 2.3.2.1290-03 строго прописано, что продажа БАД к пище не допускает дистанционной розничной реализации или реализации при помощи курьерских служб. Данные нарушения влекут за собой наложение административного штрафа на юридических лиц в соответствии со статьей 14.15 Кодекса Российской Федерации об административных нарушениях (КоАП РФ). Несмотря на это, имеется множество интернет-ресурсов, которые публикуют ассортимент БАД к пище, но избегают административного наказания в связи с тем, что они размещают товар по принципу публичной оферты, без возможности заключить договор купли-продажи в интернете и оплатить свою покупку. Автоматически такой тип продажи перестает считаться дистанционным [20; 38; 64].

Еще одна проблема при обороте БАД к пище в России заключается в рекламе продукции. По ФЗ №38 «О рекламе» БАД к пище не должны создавать впечатления, что они обладают лечебными свойствами, а тем более, являются лекарственными средствами. Несмотря на данные законодательные акты, в печатные, телевизионные и другие средства массовой информации до сих пор проникает реклама БАД, содержащая нарушения. Например, в них присутствуют фразы «способствует избавлению от головокружений и шума в ушах», «может применяться для профилактики и лечения заболеваний ЖКТ» и так далее. Такая реклама является недоброкачественной [57, 58].

Несмотря на то, что БАД присутствуют на российском рынке с конца прошлого столетия, правовая база для регулирования их оборота до сих пор требует усовершенствования.

На основании выше изложенного, можно сделать вывод, что нормативно-правовая база требует дальнейшего развития и совершенствования: необходимо разработать и принять самостоятельный федеральный закон РФ «О биологических добавках к пище». Внутри этого закона должно быть отражено разделение ЛС, БАД к пище и пищевых добавок, введение обязательной сертификации Минздравом, а также проведение клинических испытаний для доказательства эффективности и безопасности их продукции. Требуется обоснование

нормативных показателей качества БАД к пище и методов контроля для включения нормативной документации, утвержденной в установленном порядке [40].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. В результате информационно-аналитического исследования литературных данных показано, что в современных условиях проблема избыточного веса приобретает особую значимость. Систематизированы современные анорексигенные лекарственные препараты: моно- и многокомпонентные. Показано, что одним из наиболее эффективных лекарственных средств для снижения веса является Сибутрамин.

2. Описаны физико-химические свойства Сибутрамина, методы и условия определения в лекарственных препаратах, БАД к пище, биологических жидкостях. Отмечено, что наиболее распространённым методом определения Сибутрамина является ВЭЖХ-УФ.

3. Описаны фармакологические свойства Сибутрамина, применение его в клинической практике. Указана активность метаболитов и период их выведения, охарактеризованы побочные эффекты и возможная опасность для организма от приёма данного лекарственного препарата.

4. Представлены биологически активные добавки к пище и компоненты, входящие в их состав; охарактеризовано применение БАД к пище.

5. Проведенный анализ действующей нормативно-правовой базы РФ в сфере производства, оборота, использования БАД к пище определяет целесообразность внесения предложения в соответствующие органы о разработке федерального закона РФ «О биологически активных добавках к пище».

6. Обоснована необходимость разработки методических подходов анализа Сибутрамина в лекарственных препаратах для обеспечения контроля их качества, а также для определения недекларируемого добавления Сибутрамина в БАД к пище с целью выявления фальсифицированной продукции.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Реактивы

В ходе исследования были использованы следующие реактивы:

- аммиак, водный раствор, 25% (ч.д.а. «Химмед», Россия);
- аммония формиат («Honeywell», Германия);
- ацетон («PanReac AppliChem», Германия);
- ацетонитрил ультра-градиентный («PanReac AppliChem», Германия);
- висмут субнитрат 98% (х.ч., «Химмед», Россия);
- вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72;
- вода Milli-Q («Agilent», США);
- диоксан («Sigma Aldrich», США);
- диэтиламин («Acros Organics», США);
- йод сублимированный (х.ч., «Химмед», Россия);
- калия йодид (х.ч., «Химмед», Россия);
- кальция стеарат («Kaipataru Organics Pvt. Ltd.», Индия);
- кислота муравьиная («Sigma – Aldrich», США);
- метанол ультра-градиентный («J.T. Baker», Польша);
- натрия дигидрофосфат (х.ч., «Химмед», Россия);
- раствор натрия гидроксида 0,1М («Agilent», США);
- раствор натрия гидроксида 1М («Agilent», США);
- толуол безводный, 99,8% («Sigma Aldrich», США);
- уксусная кислота ледяная (х.ч., «Химмед», Россия);
- фосфатный буфер 50 ммоль рН=7.0 («Agilent», США);
- хлороформ, 99,8% («Sigma Aldrich», США);

Стандартные образцы:

- метформина гидрохлорид (№ 1115-70-4, 1396309, соответствуют USP, Sigma, США);
- сибутрамина гидрохлорид (№ 84485-00-7, 2290, Tocris, Великобритания, годен до 01.2021);
- целлюлоза микрокристаллическая (№ 9004-34-6, 435236, Sigma Aldrich, США, годен до 12.2021).

2.2. Оборудование

Оборудование:

- высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., США), оснащенный дегазатором (G 1379A JP 13203437), градиентным насосом (G 1312A DE 14911527), термостатируемым автосамплером (G 1313A DE 14919729), термостатом колонок (G 1316A DE 14928677), диодно-матричным детектором (G 1315B DE 22616489, Agilent Technologies Inc., США) под управлением программного обеспечения OpenLAB CDS ChemStation (Rev. В. 04.03);
- высокоэффективный жидкостной хроматограф “Ultimate 3000”, оснащенный дегазатором, трехканальным насосом, термостатом колонок, термостатируемым автосамплером, диодно-матричным спектрофотометрическим детектором (ДМД) и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором (МС) “TSQ Endura” (Thermo Scientific, США) под управлением программного обеспечения Thermo Xcalibur (Ver. 4.2.47);
- система капиллярного электрофореза Agilent 7100 (Agilent Technologies Inc., США) под управлением программного обеспечения OpenLAB CDS ChemStation (Rev. В. 04.03);
- хроматографическая камера для пластин с крышкой 27x26,5x7 см («Camag», Швейцария);
- пластинки 10x20, толщина 200 мкм, силикагель 60, концентрирующая зона 2,5x20 см («Merck», США);
- ИК-спектрометр 70 («Bruker Vertex», Германия), программное обеспечение OPUS 5.5;
- хроматографическая колонка MACHERRY-NAGEL NUCLEOSIL 5 мкм C18 150x4.6 мм;
- СЕ капилляры для капиллярного электрофореза 50 мкм x 56 см Agilent Technologies Inc., Германия);
- микрошприц на 5 мкл («ILS», Германия);
- распылитель стеклянный для ТСХ («Merck», США);
- йодная камера («Химмед», Россия);
- ультразвуковая водяная баня Codyson (Китай);
- ультрацентрифуга «Eppendorf» 5424 (Германия);
- весы аналитические («A and D» Япония);
- весы аналитические OHAUS Explorer (США);
- дозатор 1-канальный с переменным объемом (1000-5000) мкл «Eppendorf» (Германия);

- дозатор 1-канальный с переменным объемом (100-1000) мкл «Eppendorf» (Германия);
- пробирки типа Эппендорф («Экохим», Россия);
- колбы мерные ёмкостью 10; 25; 50; 100; 250 мл (ГОСТ 1770-74);
- стаканы мерные ёмкостью 500 и 1000 мл (ГОСТ 1770-74).

2.3. Объекты исследования

Объектами исследования явились лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище анорексигенного действия, представленные в таблицах 3, 4. Наименования БАД к пище не разглашались в целях соблюдения конфиденциальности (Приложение В).

Таблица 3 – Лекарственные препараты

№	Наименование	Форма выпуска	Состав	Производитель
1	Редуксин 	Капсулы	Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг; МКЦ – 158,5/153,5 мг; Кальция стеарат – 1,5/1,5 мг	ООО «ПРОМОМЕД РУС» (Россия)
2	Редуксин Мет 	Набор таблеток и капсул	Таблетки: Метформина гидрохлорид – 850 мг; МКЦ – 158,5/153,5 мг; Капсулы: Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг; МКЦ – 158,5/153,5 мг; Кальция стеарат – 1,5/1,5 мг	ООО «ПРОМОМЕД РУС» (Россия)
3	Редуксин Форте 	Таблетки	Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг; Метформин – 850 мг; МКЦ – 158,5/153,5 мг; Магния стеарат – 1,5/1,5 мг	ООО «ПРОМОМЕД РУС» (Россия)
4	Голдлайн	Капсулы	Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг; МКЦ – 158,5/153,5 мг;	ООО «Изварино Фарма» (Россия)



			Кальция стеарат – 1,5/1,5 мг	
5	Голдлайн Плюс 	Капсулы	Сибутрамина гидрохлорида моногидрат – 10/15 мг; МКЦ – 158,5/153,5 мг; Кальция стеарат – 1,5/1,5 мг	ООО «Изварино Фарма» (Россия)

Таблица 4 – Биологически активные добавки анорексигенного действия

№ БАД	Форма выпуска	Состав действующих веществ	Производитель
БАД №1	Капсулы	Конъюгированная липоевая кислота	Россия
БАД №2	Фильтр-пакеты	Кора крушины, корни одуванчика, плоды укропа, плоды фенхеля, листья мяты перечной	Россия
БАД №3	Капсулы	Лимон, пектин, тыква диковинная, айва, нони, спирулина	Китай
БАД №4	Капсулы	Экстракт померанца горького 10%, экстракт мушмулы японской, псиллиум, форсколин 10%, экстракт момордики харанции, порошок экстракт пуэрарии	Россия (По заказу Германии)
БАД №5	Отруби	Пшеничные отруби, ферментированные винными дрожжами	Россия
БАД №6	Фильтр-пакеты	Цветки розы суданской (гибискус), листья сенны	Россия
БАД №7	Фильтр-пакеты	Листья сенны, листья крапивы двудомной, трава череды, листья мяты перечной, цветки бессмертника, трава тысячелистника, лепестки розы суданской (гибискуса)	Россия
БАД №8	Фильтр-пакеты	Гарциния камбоджийская, листья мяты, трава хвоща полевого, листья березы, кукурузные рыльца	Россия
БАД	Капсулы	Люцерна, гриб пория кокосовидная, орехи	Китай

№9		колы, семена гуараны, экстракт колеуса, вытяжка плодов гарцинии камбоджийской, пажитник греческий, мандарин	
БАД №10	Капсулы	Экстракт листьев лотоса, цедра мандарина, ламинария, экстракт ягод боярышника.	Россия
БАД №11	Капсулы	Пектин яблочный, микрокристаллическая целлюлоза, желатин, хитозан, лигнин гидролизный	Россия
БАД №12	Капсулы	Экстракт плодов гарцинии камбоджийской, экстракт листьев кассии остролистной, лактоза, лигнин гидролизный очищенный, экстракт плодов фенхеля обыкновенного, экстракт листьев подорожника большого	Россия
БАД №13	Капсулы	Порошковый экстракт зелёного чая, боярышника, цветки хризантемы, листья периллы, семена кассии тора, цветки эльшотии ресничатой	Китай
БАД №14	Фильтр-пакеты	Ягоды эмблики лекарственной, чайный лист, лист брусники обыкновенной, семена кассии тора, кожура незрелого мандарина, пахима кокосовидная	Китай
БАД №15	Капсулы	Конъюгированная линолевая кислота 93.75%, порошковый экстракт райского ореха, пчелиный воск, коэнзим Q10	Корея
БАД №16	Капсулы	Хитоолигосахарид, хитозан, экстракт соцветий гибискуса	Корея
БАД №17	Капсулы	Экстракты: из семян аниса, листьев серого дерева, черного чая, спиреи японской, плодов кактуса, зеленого кофе, корня одуванчика, гибискуса изменчивого, гарцинии гуммигутовой	Китай
БАД №18	Капсулы	Экстракты: яблока, гуараны, индийского лотоса, киви, апельсина	Китай
БАД	Капсулы	Спирулина, кассия тора, кора шелковицы,	Китай

№19		засушенная кожица мандарина	
БАД №20	Капсулы	Хитин, L-карнитин, вытяжка из плодов гуммигутовой гарцинии, поливитамины, клетчатка, растительные экстракты	Китай
БАД №21	Капсулы	Худия гордони, колеус форсколии, конъюгированная линолевая кислота, глюкоманнан (конняку), ирвингия габонская, масло примулы вечерней, экстракт корня якона, липаза и протеаза	Россия
БАД №22	Капсулы	Экстракты гуараны, зелёного чая, зелёного кофе	Россия

2.4. Методы исследования

Контроль качества лекарственных средств основан на применении комплекса методов фармакопейного анализа.

Учитывая физико-химические свойства сибутрамина гидрохлорида, его анализ в составе многокомпонентных лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище проводят следующими инструментальными методами: количественное определение [44; 46; 47; 49; 50; 52; 69; 84; 87; 91; 99; 118]:

- 1) ВЭЖХ – ДМД;
- 2) КЭ.

Для идентификации и подтверждения наличия Сибутрамина используют методы [43; 48; 86; 105; 117; 118; 128]:

- 1) ТСХ;
- 2) ВЭЖХ-МС.

2.4.1. Хроматографические методы

Хроматографические методы вследствие успехов в измерительной технике в последнее десятилетие достигли высокого уровня эффективности. Разновидности жидкостной хроматографии: ТСХ и ВЭЖХ являются надежными методами контроля лекарственных средств [83; 84; 86; 87; 91; 99; 105; 128].

В связи с низкой стоимостью, чувствительностью и селективностью метод ТСХ был использован в качестве экспресс-метода – скрининга биологически активных добавок к пище для обнаружения недекларируемой АФС Сибутрамина с последующим подтверждением инструментальными методами [86].

Для количественного определения Сибутрамина как в лекарственных препаратах, так и в биологически активных добавках к пище, применяли метод ВЭЖХ с использованием ультрафиолетового диодноматричного детектора. На основании результатов собственных исследований, проведенных в ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» разработана и валидирована методика с использованием данного метода, продемонстрированы его преимущества перед описанными в литературе [39; 83; 87; 91; 128].

2.4.1.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

В настоящее время для использования высокоэффективной жидкостной хроматографии с целью анализа Сибутрамина применяют следующие детекторы: ультрафиолетовый и масс-спектрометрический. Для достижения наиболее высокой эффективности анализа Сибутрамина применяли обращено-фазовую ВЭЖХ. В качестве стационарной (неполярной) фазы наиболее распространенными химически модифицированными сорбентами являются вещества с привитыми октадецильными (C_{18}) и октильными (C_8) радикалами [62; 87; 105; 111; 128].

В качестве подвижной (полярной) фазы рекомендованы вода, буферные растворы с различными рН, полярные органические растворители (метанол, ацетонитрил) [62; 83; 99; 111; 128].

На основании физико-химических свойств аналита экспериментально подбирается соотношение компонентов подвижной фазы, рН буферных систем, скорость потока, а также растворитель.

Обязательным критерием в оценке метода ВЭЖХ является пригодность хроматографической системы: коэффициент емкости (k'), эффективность (число теоретических тарелок) (N), фактор асимметрии пика (A_s), разрешение (R_s) [14].

Методики определения Сибутрамина в лекарственных препаратах, биологически активных добавках к пище, биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии опубликованы в работах [83; 99; 128].

2.4.1.2. Тонкослойная хроматография

Доступность и простота методов планарной хроматографии, широкий ряд решаемых с её помощью аналитических задач, сделало метод ТСХ незаменимым тестом для проведения скрининговых исследований многокомпонентных смесей.

Среди преимуществ ТСХ выделяют: простую пробоподготовку, визуальное определение результата, низкую стоимость, большую гибкость хроматографических систем, высокую воспроизводимость, минимальное потребление растворителей [48; 56; 62; 86].

В качестве подвижной фазы используют смесь органических растворителей, имеющих сродство к Сибутрамину.

Однако, тонкослойная хроматография обладает низкой селективностью и чувствительностью, по сравнению с другими хроматографическими методами, что требует подтверждения полученных результатов инструментальными методами [48; 62].

Для оценки количественного содержания Сибутрамина необходимо прибегать к использованию ВЭТСХ с масс-спектрометрическим детектированием [48; 105; 128].

Разработанная методика идентификации Сибутрамина в БАД к пище позволяет за короткий промежуток времени одновременно проанализировать от 2 до 50 проб на пластинке с минимальным расходом реагентов и достоверной интерпретацией полученных результатов.

2.4.2. Физический метод

Использование физических методов становится более актуальным и перспективным вектором развития фармацевтического анализа. Физические методы являются оптимальными для проведения идентификации веществ различной природы [14; 62; 69; 84; 95].

2.4.2.1. Капиллярный электрофорез

Капиллярный электрофорез является как основным, так и дополнительным к инструментальным, методом разделения полярных и ионных компонентов. Метод основывается на принципе разной скорости миграции заряженных частиц в постоянном электрическом поле [14; 51].

Условия проведения метода КЭ: растворитель, электролит, рН, сила тока, напряжение и температура подбираются экспериментально. Увеличение рН изменяет электроосмотический поток в сторону его ускорения. Для увеличения растворимости анализируемого компонента в пробе к буферному раствору добавляют органические модификаторы (метанол, ацетонитрил), что приводит к уменьшению электроосмотического потока, в том числе, влияет на достигаемое разрешение, поэтому использование органических веществ для проведения метода КЭ не приводит к получению правильных результатов. В буферные растворы также добавляют хиральные модификаторы (циклодекстрины) с целью разделения оптических изомеров [14; 62; 69; 84; 95].

Капиллярный электрофорез объединяет различные методы электрофореза и хроматографии в отдельный метод, который позволяет определить даже следовые количества веществ за короткий промежуток времени. Неоспоримыми преимуществами являются малый расход электролита, необходимого для заполнения капилляра; минимальная дозировка объема

исследуемой пробы; простая пробоподготовка; дешевизна - отсутствие дорогостоящих колонок [62; 92].

По сравнению с ВЭЖХ метод обладает меньшей воспроизводимостью и ограниченной чувствительностью. Недостатками являются ограниченный выбор подходящих детекторов, непостоянство времени удерживания за счет использования буфера и частой его замене [62; 92].

Характеристики ВЭЖХ-ДМД и КЭ даны в сравнительной таблице 5.

Таблица 5 – Сравнительные характеристики ВЭЖХ и КЭ

Характеристика	ВЭЖХ-ДМД	КЭ
Определяемые вещества	Органические и ионные неорганические вещества, растворимые в каком-либо растворителе	Полярные и ионные вещества, растворимые в воде
Разделение осуществляется на основе	Различия коэффициентов распределения веществ между ПФ и НП	Различия скорости движения растворенного вещества в электрическом поле
Предел обнаружения	1 мкг	1 мкг
Расход подвижной фазы (за 1 анализ в разработанных методиках)	40 мл	1 мл
Время анализа (в разработанных методиках)	8 мин	8 мин
Область применения	– Производство – постадийный контроль качества продукции; – Контроль качества готовой продукции: ЛП, БАД к пище, пищевая продукция; – Биохимия, клиническая химия, биотехнология; – Экология – мониторинг загрязняющих веществ в объектах окружающей среды	– Контроль качества готовой продукции: ЛП, БАД к пище, пищевая продукция; – Экология – анализ природной, питьевой и сточных вод, почвы; – Контроль пищевой продукции и продовольственного сырья; – Ветеринария – анализ кормов и сырья для их производства;
Преимущества	– Точность; – Высокая чувствительность; – Универсальность	– Высокая эффективность; – Высокая пропускная способность; – Экспрессность; – Экономичность
Недостатки	– Использование органических растворителей; – Дорогостоящее	– Ограниченная чувствительность; – Низкая воспроизводимость;

	оборудование	– Площадь пика зависит от напряжения разделения
Стоимость	>	

Методы являются взаимозаменяемыми, выбор каждого из них зависит от оснащенности контрольно-аналитической лаборатории.

2.4.3. Спектральный метод

В настоящее время в фармацевтическом анализе для определения химического состава и их количественного определения применяют оптические методы. Для идентификации Сибутрамина используют метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра [91; 98; 112].

2.4.3.1. УФ-спектрофотометрия

Метод УФ-спектрофотометрии как оптический метод используется для подтверждения подлинности, определения примесей и количественного содержания лекарственных веществ, имеющих в структуре кратные связи. В случае Сибутрамина – ароматическое кольцо [14; 73; 98].

Метод используют для идентификации лекарственных веществ путем сравнения спектров поглощения анализируемого и стандартного растворов и определения максимумов спектра при определенных длинах волн, а также удобным приемом является определение отношения величин поглощения при двух максимумах. Предельные концентрации ЛС, определяемые методом УФ-спектрофотометрии меньше, чем в титриметрических и гравиметрических методах [14].

В качестве растворителей используют вещества, не поглощающие в анализируемой области спектра (от 200 до 350 нм), а также лекарственный препарат не должен вступать в реакцию с растворителем [14; 73; 98].

Метод прост и быстр в использовании, обладает высокой чувствительностью, но имеет недостаточную избирательность.

Нами был снят УФ-спектр поглощения раствора сибутрамина 0,1 мг/мл (растворитель – метанол), представленный на рисунке 6.

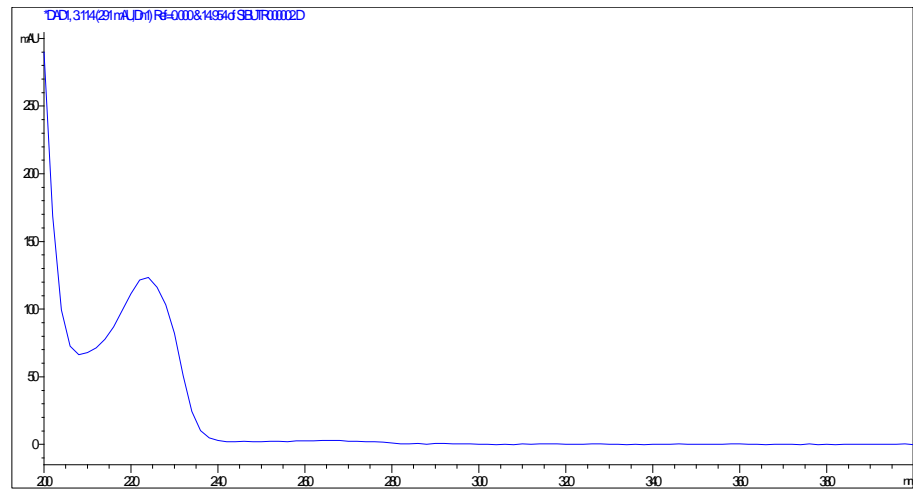


Рисунок 6. Спектр поглощения стандартного раствора Сибутрамина 0,1 мг/мл
(растворитель – метанол)

Максимум поглощения находится в области 225 ± 2 нм [98].

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИБУТРАМИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ-ДМД

В многообразии современных физико-химических методов хроматография занимает одно из ведущих мест, так как позволяет осуществить разделение веществ, их идентификацию и количественное определение. Среди хроматографических методов высокоэффективной жидкостной хроматографии занимает прочные позиции как селективный высокоточный метод анализа многокомпонентных лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище. Решение поставленных задач базировалось на анализе литературных данных об условиях ВЭЖХ – определения Сибутрамина и собственных экспериментальных исследованиях.

3.1. Установление параметров ВЭЖХ-ДМД анализа определения Сибутрамина

Для разработки методики определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище с применением ВЭЖХ был проведен выбор следующих параметров: состав неподвижной и подвижной фаз, растворителя для анализируемых веществ и объектов при соответствующей пробоподготовке.

Качество анализа напрямую зависит от правильного выбора условий хроматографического разделения. Выбор хроматографической колонки основывается на физико-химических свойствах анализируемых веществ. На хроматографическое разделение также влияет рН подвижной фазы, соотношение органических и водных компонентов, наличие ионов-модификаторов для образования ионных пар в случае необходимости.

Сибутрамина гидрохлорид является гидрофильной молекулой небольшого размера, поэтому в качестве неподвижной фазы (неполярной) использовали хроматографическую колонку с химически модифицированным сорбентом с привитыми октадециловыми радикалами – С18 размером 150x4.6 мм 5 мкм для осуществления обращено-фазовой высокоэффективной хроматографии.

Были протестированы различные подвижные фазы (полярные) для получения оптимального хроматографического разделения в течение наиболее короткого времени с целью усовершенствования аналитической процедуры.

Сибутрамин является средне полярным веществом, поэтому в процессе подбора подвижной фазы были использованы различные компоненты, такие как ацетонитрил, буферные системы с различными значениями рН, 0,1% раствор муравьиной кислоты.

Для ион-парной хроматографии апробирована система элюентов [120]: гексансульфоновая кислота 0,007М рН=3,0±0,1 (в качестве динамического модификатора):ацетонитрил: тетрагидрофуран в соотношении 85:15:5 (по объему). Однако полученный пик не

соответствовал требованиям по параметрам пригодности хроматографической системы: коэффициент емкости (k'), эффективность (число теоретических тарелок) (N), фактор асимметрии пика (A_s), разрешение (R_s) (п. 2.4.1.1) (рисунок 7).

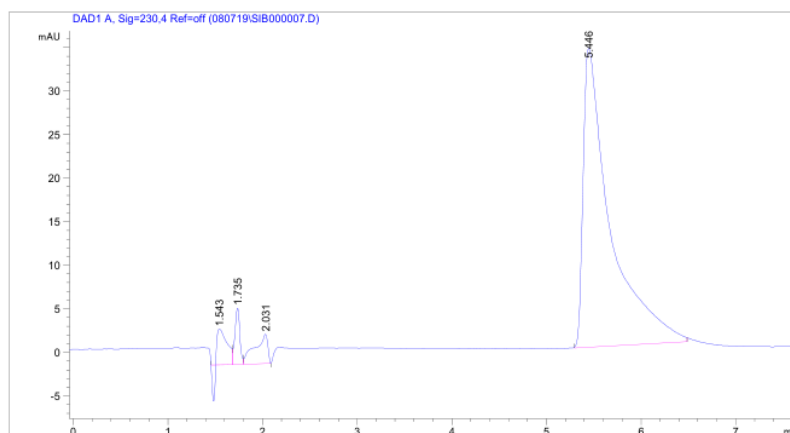
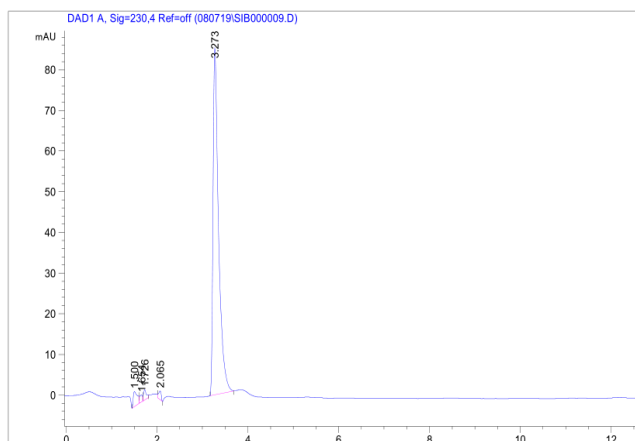
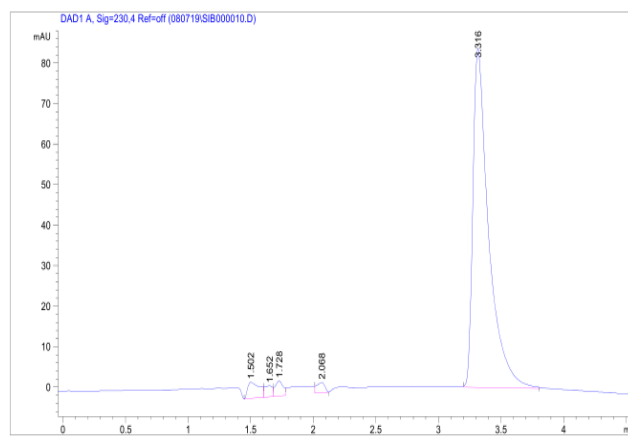


Рисунок 7 – Хроматограмма раствора Сибутрамина 0,1 мг/мл (растворитель – метанол) (ПФ – гексансульфовая кислота $pH=3,0\pm 0,1$:ацетонитрил:тетрагидрофуран в соотношении 85:15:5) (по объему).

Нами была апробирована система элюентов додецилсульфата натрия $pH=3,0\pm 0,1$ (в качестве динамического модификатора):ацетонитрил:тетрагидрофуран 80:15:5 (по объему) (рисунок 8 (1)), а также смесь додецилсульфата натрия $pH=3,0\pm 0,1$ и ацетонитрила в соотношении 70:30 (по объему) (рисунок 8 (2)). Однако данная система при различном варьировании соотношений компонентов не обеспечила удовлетворительного хроматографического разделения.



(1)



(2)

Рисунок 8 – Хроматограммы растворов Сибутрамина 0,1 мг/мл:

- 1) ПФ – додецилсульфата натрия $pH=3,0\pm 0,1$:ацетонитрил:тетрагидрофуран 80:15:5 (по объему);
- 2) ПФ – додецилсульфата натрия $pH=3,0\pm 0,1$ и ацетонитрил 70:30 (по объему)

Согласно литературным данным рКа Сибутрамина составляет 9,77, он является соединением основного характера [77]. В связи с этим была опробована система, содержащая раствор кислоты муравьиной 0,1%. При различных соотношениях органической составляющей и кислоты не было достигнуто хроматографического разделения (рисунок 9).

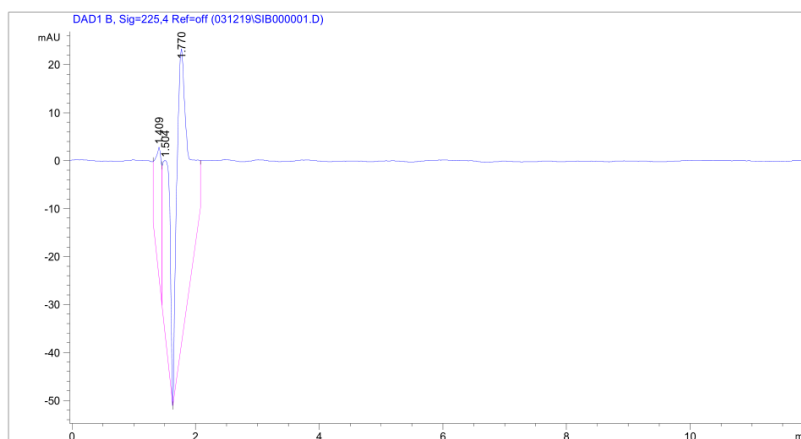


Рисунок 9 – Хроматограмма раствора Сибутрамина 0,1 мг/мл (ПФ – ацетонитрил:муравьиная кислота 0,1% 70:30 (по объему))

Была протестирована система, содержащая раствор соли (формиат аммония) 50 ммоль – ацетонитрил:формиат аммония 75:25 (по объему). В этой системе получали широкие пики.

Для того, чтобы добиться сужения пиков, понижали рН раствора соли, входящей в состав ПФ, от $6 \pm 0,1$ до $3 \pm 0,1$, добавляя к раствору формиата аммония муравьиную кислоту. Установлено оптимальное значение рН – $4,0 \pm 0,1$.

Таким образом, в качестве подвижной фазы была выбрана система растворителей: ацетонитрил: формиатный буфер рН= $4,0 \pm 0,1$ 60:40 (по объему). При использовании данного элюента примерное время удерживания Сибутрамина составляло 5 минут (рисунок 10) [52].

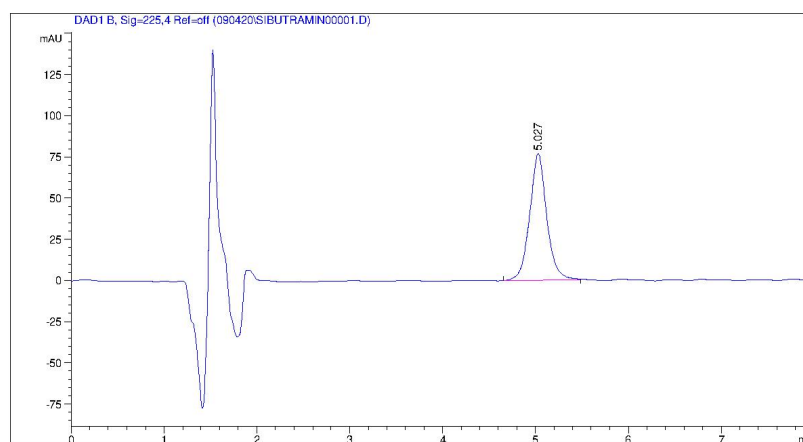


Рисунок 10 – Хроматограмма раствора Сибутрамина 0,1 мг/мл (ПФ – ацетонитрил:формиатный буфер рН= $4,0 \pm 0,1$ 60:40 (по объему))

Элюирование проводили в изократическом режиме, поскольку компоненты матрицы выходят с растворителем, следовательно, нет необходимости прибегать к градиентному элюированию с целью экономии времени перехода к начальному составу элюента, уравниванию системы.

В качестве растворителя для приготовления испытуемых растворов Сибутрамина был выбран метанол. Этот растворитель рекомендован для приготовления испытуемых растворов Сибутрамина при применении метода ВЭЖХ-ДМД для контроля качества субстанции и капсул Сибутрамина 10 и 15 мг, а также определения Сибутрамина в БАД к пище [14; 40; 80; 90; 91; 111]. Экспериментально установлено, что при определении Сибутрамина в анализируемых объектах для его извлечения оптимальным растворителем является абсолютный метанол.

Выбор аналитической длины волны. Для дальнейшей работы была выбрана оптимальная длина волны – максимум поглощения в УФ – 225 ± 2 нм (рисунок 6).

3.2. Условия хроматографического разделения

Экспериментально установленные оптимальные условия хроматографического разделения представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Параметры хроматографического разделения

Параметры	
Насос	
– состав подвижной фазы	А – формиатный буфер 50 ммоль рН=4,0±0,1 В - ацетонитрил
– режим элюирования	Изократическое элюирование А:В (40:60)
– скорость потока	1,0 мл/мин
Инжектор	
– объем ввода	5 мкл
Термостат колонок	
– температура	40°C
Детектирование	УФ-спектрофотометрическое при $\lambda=225 \pm 2$ нм
Хроматографические характеристики методики	
– примерное время удерживания, мин. (t_R)	5 мин

Параметры пригодности хроматографической системы для осуществления контроля качества Сибутрамина методом ВЭЖХ-ДМД оценивали способом многократного хроматографирования раствора стандартного образца Сибутрамина с концентрацией 0,1 мг/мл (растворитель – метанол) [14]:

- 1) коэффициент емкости (k') = 2,222 (более 2,0);
- 2) эффективность (число теоретических тарелок) (N) = 5776 (более 5000);
- 3) фактор асимметрии пика (A_s) = 0,939 (не более 1,5).
- 4) разрешение (R_s) не определяется, так как в системе наблюдается только один пик.

По полученным результатам доказана пригодность хроматографической системы.

3.3.Пробоподготовка

Приготовление исходного раствора стандарта Сибутрамина

Навеску стандартного образца Сибутрамина около 10 мг (здесь и далее: точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляли 8 мл метанола, перемешивали до полного растворения, доводили объем до метки метанолом и перемешивали, получая исходный раствор с концентрацией около 1 мг/мл.

Приготовленный раствор хранили при температуре 4-8°C в течение 6 месяцев.

Приготовление раствора стандарта Сибутрамина

1 мл приготовленного исходного раствора стандарта Сибутрамина помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки метанолом, перемешивали, получая раствор стандарта Сибутрамина с концентрацией 0,1 мг/мл.

Приготовление подвижной фазы

Приготовление водного раствора формиата аммония (50 ммоль NH_4HCO_2) $\text{pH}=4,0\pm 0,1$

Для приготовления раствора формиата аммония NH_4HCO_2 с концентрацией 50 ммоль в стакан объемом 500 мл отмеривали 450 мл воды Milli-Q и, тщательно перемешивая, прибавляли 1575 мг формиата аммония. Содержимое переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводили значение pH раствора до $4,0\pm 0,1$ раствором муравьиной кислоты, доводили водой Milli-Q до метки и перемешивали.

Подготовка лекарственного препарата с дозировкой 10 мг/капс. к анализу

Содержимое 5 капсул извлекали из оболочки, брали навеску усредненного образца, соответствующую 10,0 мг Сибутрамина. Навеску пробы помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 100 мл метанола. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирали 1,5 мл экстракта в центрифужную пробирку. Пробирку центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. Надосадочную жидкость использовали для анализа

с помощью ВЭЖХ-ДМД.

Подготовка лекарственного препарата с дозировкой 15 мг/капс. к анализу

Содержимое 5 капсул извлекали из оболочки, брали навеску усредненного образца, соответствующую 15,0 мг Сибутрамина. Навеску пробы помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 100 мл метанола. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирали 1,5 мл экстракта в центрифужную пробирку. Пробирку центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. Надосадочную жидкость использовали для анализа с помощью ВЭЖХ-ДМД.

Подготовка образца (БАД к пище) к анализу

Содержимое 5 капсул извлекали из оболочки, брали навеску усредненного образца, соответствующую 1,0 г образца. Навеску пробы помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 25 мл метанола. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирали 1,5 мл экстракта в центрифужную пробирку. Пробирку центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. Надосадочную жидкость анализируют с помощью ВЭЖХ-ДМД.

*В случае высоких концентраций Сибутрамина (более 0,12 мг/мл) из объема V (100 мл) отбирали аликвоту в 10 мл и разбавляли метанолом в N раз. Разбавление учитывали при расчете концентрации.

Определение содержания Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище проводили по формуле:

$$X = \frac{S_{\text{сиб}} \times C \times V \times N \times m_{\text{капс./табл.}}}{S_{\text{std}} \times m_{\text{навески}}}$$

где:

X – количество Сибутрамина в анализируемом образце, мг/капс., табл.;

$S_{\text{сиб}}$ – площадь пика анализируемого образца Сибутрамина;

S_{std} – площадь пика стандарта Сибутрамина;

V – объем раствора пробы, мл;

C – концентрация раствора стандарта Сибутрамина, мг/мл;

$m_{\text{навески}}$ – навеска образца, взятая на анализ, г.;

N – коэффициент разбавления пробы;

$m_{\text{капс./табл.}}$ – масса лекарственной формы, г.

3.4. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в анализируемых объектах

Валидацию аналитической методики (п. 3.2) проводили в соответствии с ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики», ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIV [6; 14].

3.4.1. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в лекарственных препаратах

Было проведено определение полноты извлечения Сибутрамина из лекарственной формы на модельных смесях субстанции Сибутрамина и плацебо в том соотношении, в котором они содержатся в капсулах.

Для этого около 0,010 г ($0,010 \text{ г} \pm 0,002 \text{ г}$ ($\pm 20\%$)) субстанции Сибутрамина и около 0,156 г плацебо (целлюлоза микрокристаллическая, кальция стеарат) переносили в мерные колбы вместимостью 10 мл, прибавляли 8 мл метанола и помещали в ультразвуковую ванну на 20 мин. Объем содержимого колб перемешивали, доводили до метки тем же растворителем, отбирали 1,5 мл экстракта в центрифужные пробирки. Пробирки центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки метанолом, перемешивали.

Для оценки содержания Сибутрамина в модельных смесях готовили раствор стандартного образца Сибутрамина с концентрацией 0,1 мг/мл (п. 3.3).

Специфичность методики доказана на основании сопоставления полученных хроматограмм стандартного раствора Сибутрамина, модельной смеси с концентрацией Сибутрамина 0,1 мг/мл и используемого растворителя – метанола (рисунки 6-9). Для доказательства специфичности методики для лекарственного препарата «Редуксин Форте», содержащего метформин, представлена его хроматограмма, что также доказывает специфичность методики в отношении всех исследуемых лекарственных средств (рисунок 11–15).

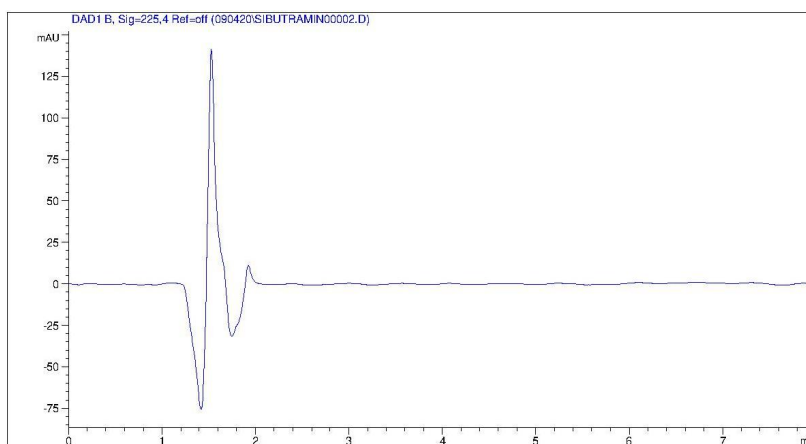


Рисунок 11 – Хроматограмма растворителя (метанола)

Условия – раздел 3.2

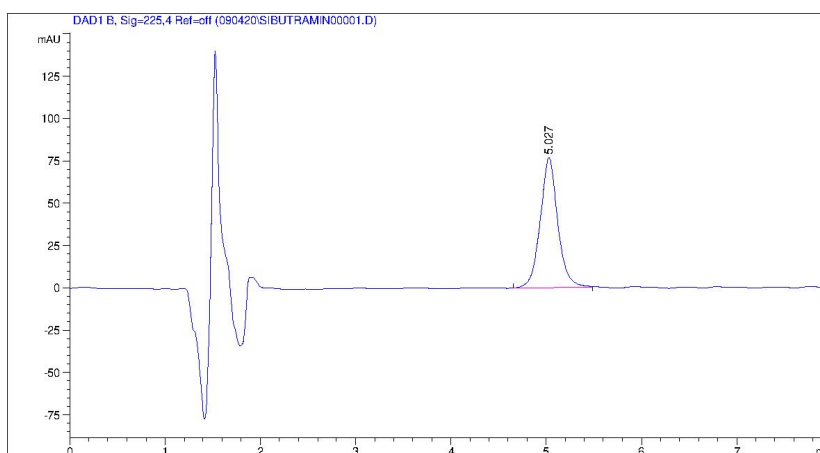


Рисунок 12 – Хроматограмма раствора стандарта Сибутрамина 0,1 мг/мл

Условия – раздел 3.2

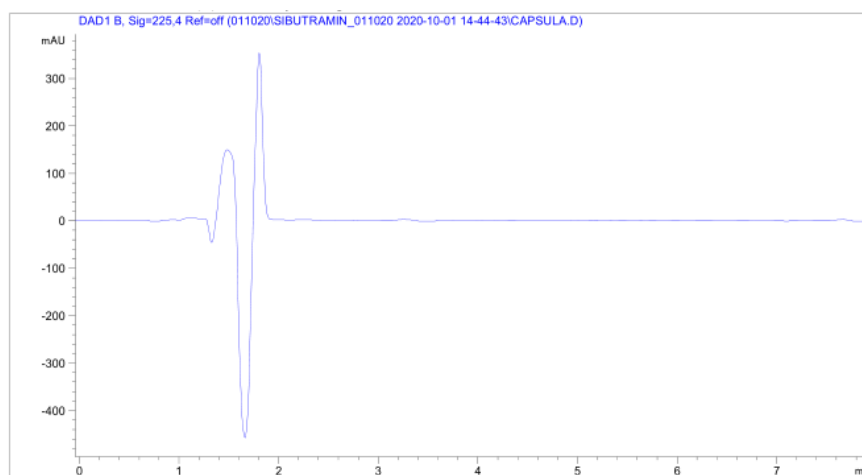


Рисунок 13 – Хроматограмма плацебо

Условия – раздел 3.2

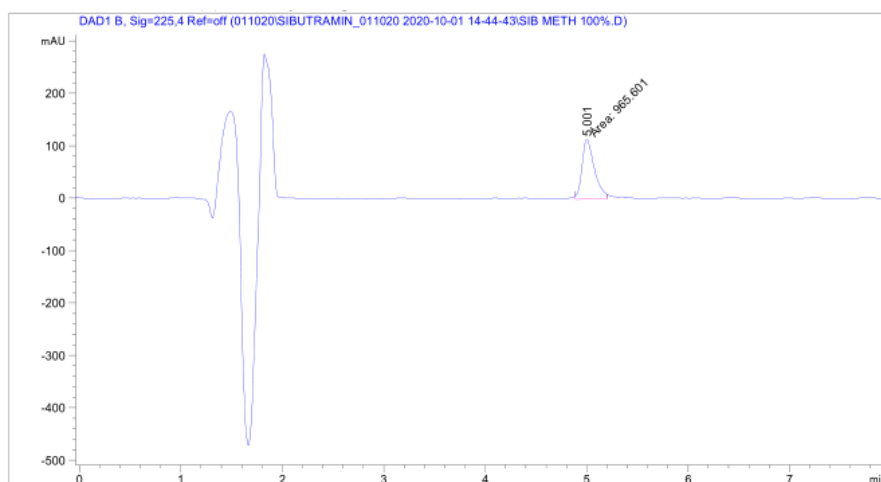


Рисунок 14 – Хроматограмма модельной смеси

Условия – раздел 3.2

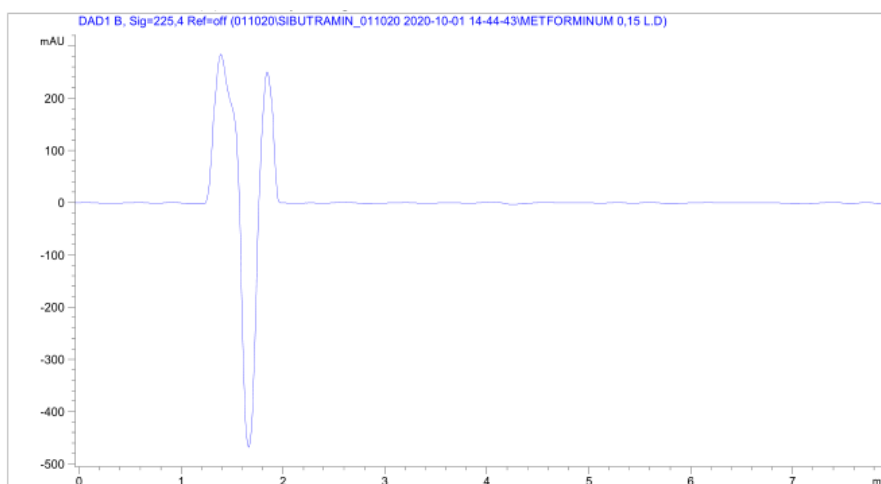


Рисунок 15 – Хроматограмма раствора метформина с концентрацией 0,85 мг/мл
(растворитель – метанол)

Условия – раздел 3.2

Установлено, что время удерживания Сибутрамина составляет 5 мин. Представленные хроматограммы свидетельствуют о том, что компоненты модельной смеси и метформин не мешают определению Сибутрамина благодаря хорошему разделению пиков определяемого и сопутствующих веществ [52].

Аналитическая область методики определения Сибутрамина в лекарственных препаратах определялась по результатам анализа 9 модельных смесей (содержание анализируемого вещества от 80 до 120% от возможно предполагаемого исходного значения 10 мг). На основании графика зависимости площади полученных пиков от концентрации Сибутрамина в модельных смесях была доказана линейность методики в диапазоне концентраций Сибутрамина от 0,08 до 0,12 мг/мл (рисунок 16) [14; 52].

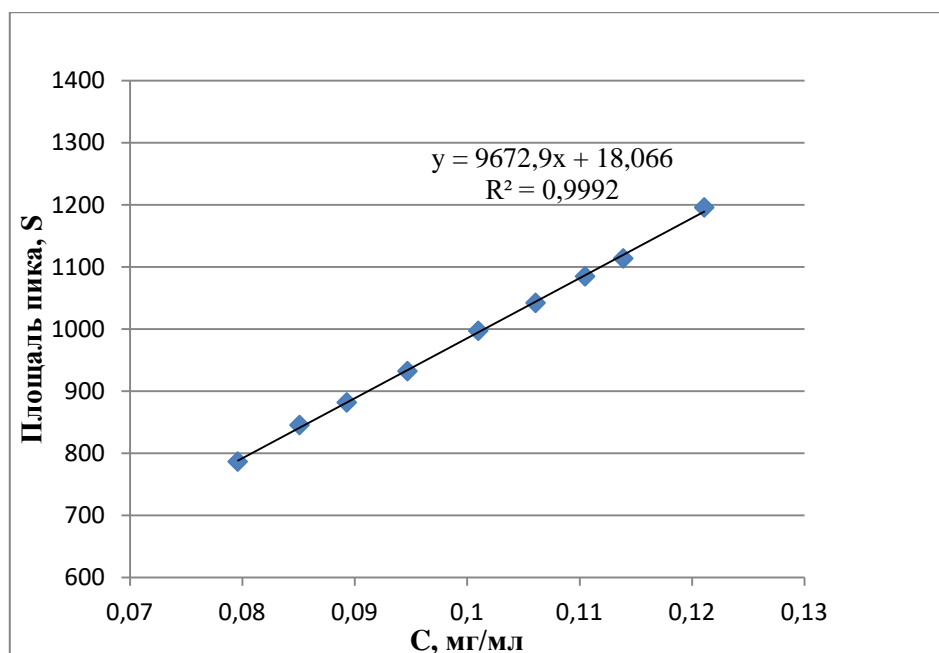


Рисунок 16 – График линейной зависимости площади пика (S) от концентрации (C) раствора Сибутрамина (мг/мл)

Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9992$ (более 0,9950) при $y = 9672,9 x - 18,066$ (x – концентрация (мг/мл), y – площадь пика).

Правильность методики доказана определением степени извлечения Сибутрамина, введенного в модельные смеси.

Статистические параметры представлены в таблице 7. Извлечение Сибутрамина из модельных смесей в условиях эксперимента составляет в количестве от 98,96% до 100,86%, Относительная ошибка единичного определения не превышает $\pm 1,5\%$ (0,70%). Доверительный интервал $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ ($100,22\% \pm 0,70\%$) включает 100%, расчетное значение критерия Стьюдента $t_{расч}$ (2,14) меньше табличного $t_{табл}$ (2,26), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует [14; 52].

Таблица 7 – Результаты количественного определения Сибутрамина в модельных смесях (ЛП) методом ВЭЖХ-ДМД

№	Взято, мг/мл (C_1)	Найдено, мг/мл (C_2)	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=C_2- C_1$)	Относительная ошибка, % ($Y=dx100/C_1$)	Найдено, %	Метрологические характеристики (P=95%, n=9)
1	0,0800	0,0796	-0,0004	-0,50	99,50	n=9 $\bar{X} = 100,22$ $S = 0,93$
2	0,0847	0,0851	0,0004	0,47	100,47	
3	0,0900	0,0893	-0,0007	-0,78	99,22	
4	0,0949	0,0947	-0,0002	-0,21	99,79	

5	0,0999	0,1010	0,0011	1,10	101,10	$S_{\bar{x}} = 0,31$ $\Delta\bar{X} = 0,70$ $\bar{\epsilon} = 0,70\%$ $t_{\text{расч}} = 2,14$ $t_{\text{табл}} = 2,26$ RSD = 0,93%
6	0,1052	0,1061	0,0009	0,86	100,86	
7	0,1101	0,1105	0,0004	0,36	100,36	
8	0,1151	0,1139	-0,0012	-1,04	98,96	
9	0,1200	0,1221	0,0021	1,75	101,75	

Для оценки прецизионности (сходимости) результатов был рассчитан коэффициент вариации (RSD), не превышающий 1% (0,93%).

Предел обнаружения (LOD) Сибутрамина был установлен на уровне 0,004 мг/мл. Предел количественного определения (LOQ) составил 0,01 мг/мл. Пределы устанавливали согласно отклонениям сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика.

Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам определения Сибутрамина в образцах: 2 раствора, приготовленные разными химиками-аналитиками с добавлением плацебо. Анализ проводили по методике определения Сибутрамина методом ВЭЖХ-ДМД (п. 3.2). Навеска стандартного образца Сибутрамина для первого химика составила 10,0 мг, для второго – 10,1 мг. Каждый раствор хроматографировали 5 раз по три повторности.

Результаты проведенного анализа обобщены в таблицах 8 – 9.

Таблица 8 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения Сибутрамина в модельной смеси ЛП с применением ВЭЖХ-ДМД (Аналитик 1, прибор 1)

№		1	2	3	Ср. значение	Количественное содержание сибутрамина, %
1 испытуемый раствор	t, мин	5,027	5,030	5,025	5,027	99,74
	S	1018,6	1013,8	1010,6	1014,3	
2 испытуемый раствор	t, мин	5,026	5,031	5,028	5,028	100,23
	S	1019,9	1018,9	1019,2	1019,3	
3 испытуемый раствор	t, мин	5,025	5,026	5,028	5,026	100,32
	S	1020,8	1021,8	1018,1	1020,3	
4 испытуемый раствор	t, мин	5,024	5,026	5,028	5,026	100,10
	S	1016,4	1018,3	1019,4	1018,0	

5 испытуемый раствор	t, мин	5,027	5,029	5,027	5,028	100,18
	S	1017,4	1018,9	1020,2	1018,8	
$\bar{X}, \%$	100,11					
$S, \%$	0,22					
RSD, %	0,22					

Таблица 9 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения Сибутрамина в модельной смеси ЛП с применением ВЭЖХ-ДМД (Аналитик 2, прибор 2)

№		1	2	3	Ср. значение	Количественное содержание сIBUTРАМИНА, %
1 испытуемый раствор	t, мин	5,025	5,027	5,030	5,027	99,90
	S	1024,9	1025,6	1027,3	1025,9	
2 испытуемый раствор	t, мин	5,027	5,027	5,026	5,027	100,21
	S	1028,4	1029,9	1029,2	1029,2	
3 испытуемый раствор	t, мин	5,028	5,027	5,030	5,028	101,16
	S	1030,1	1028,4	1027,9	1028,8	
4 испытуемый раствор	t, мин	5,028	5,029	5,025	5,027	101,03
	S	1028,5	1026,5	1027,3	1027,4	
5 испытуемый раствор	t, мин	5,027	5,030	5,029	5,029	101,02
	S	1027,4	1026,8	1027,9	1027,4	
$\bar{X}, \%$	100,26					
$S, \%$	0,51					
RSD, %	0,51					

Среднее значение содержания Сибутрамина при проведении 10 измерений – 100,39%, стандартное отклонение – 0,50%, относительное стандартное отклонение RSD – 0,50%. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Внутрилабораторная прецизионность» (значение RSD должно быть не более 3%) для 10 параллельных измерений.

3.4.2. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в биологически активных добавках к пище

Были приготовлены модельные смеси БАД к пище согласно таблице 10. При хроматографировании всех анализируемых БАД к пище, не содержащих Сибутрамин, в условиях разработанной методики не наблюдалось появления пика на уровне 5 минут, что свидетельствует о том, что находящиеся в их составе растительные компоненты не мешают определению Сибутрамина. В этой связи нами был выбран БАД № 4 для приготовления модельных смесей.

Для приготовления модельных смесей в отдельные мерные колбы вместимостью 10 мл помещали содержимое одной капсулы БАД к пище и определенное количество Сибутрамина (таблица 10), растворяли в 8 мл метанола, перемешивали, экстрагировали на ультразвуковой водяной бане в течение 20 минут, доводили до метки растворителем и перемешивали. Отбирали 1,5 мл экстракта в центрифужную пробирку. Пробирку центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки метанолом, перемешивали.

Для оценки содержания Сибутрамина в модельных смесях готовили раствор стандартного образца Сибутрамина с концентрацией 0,1 мг/мл в метаноле (п. 3.3).

Таблица 10 – Приготовление модельных смесей БАД к пище

№ модельной смеси	Необходимо внести сибутрамина, г	V колбы, мл	Кратность разведения
1	0,0010	10	10
2	0,0025	10	10
3	0,0050	10	10
4	0,0075	10	10
5	0,0100	10	10
6	0,0250	10	10
7	0,0500	10	10
8	0,0750	10	10
9	0,1000	10	10

Для доказательства специфичности методики ВЭЖХ-ДМД получали хроматограмму растворителя (метанол), биологически активной добавки к пище, раствора стандарта Сибутрамина, модельной смеси №5 (среднее содержание Сибутрамина) (рисунки 17-20).

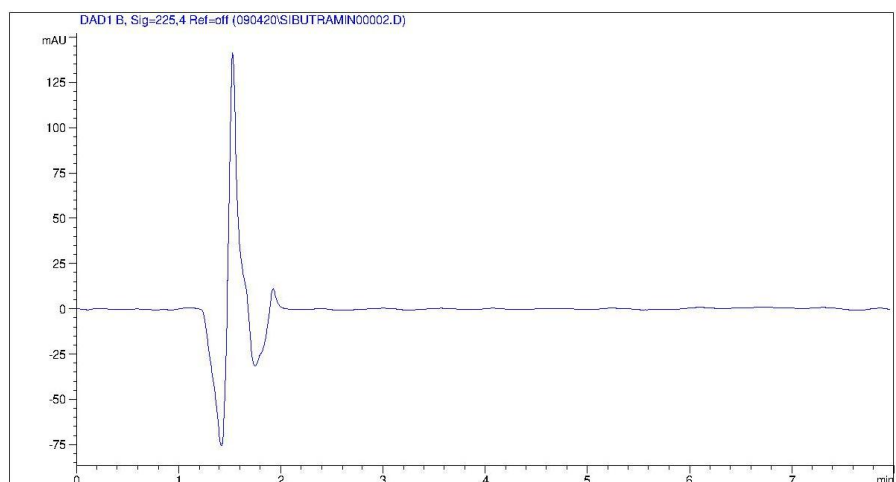


Рисунок 17 – ВЭЖХ-хроматограмма растворителя (метанол)

Условия – раздел 3.2

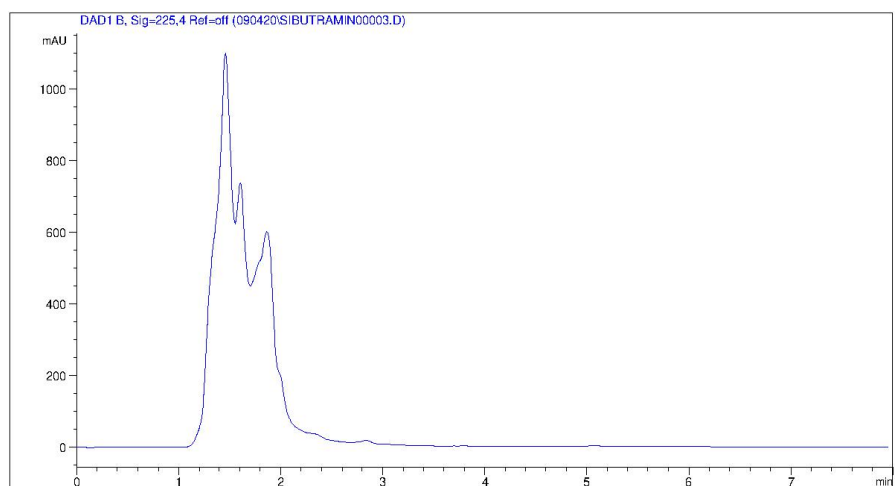


Рисунок 18 – ВЭЖХ-хроматограмма БАД к пище №4

Условия – раздел 3.2

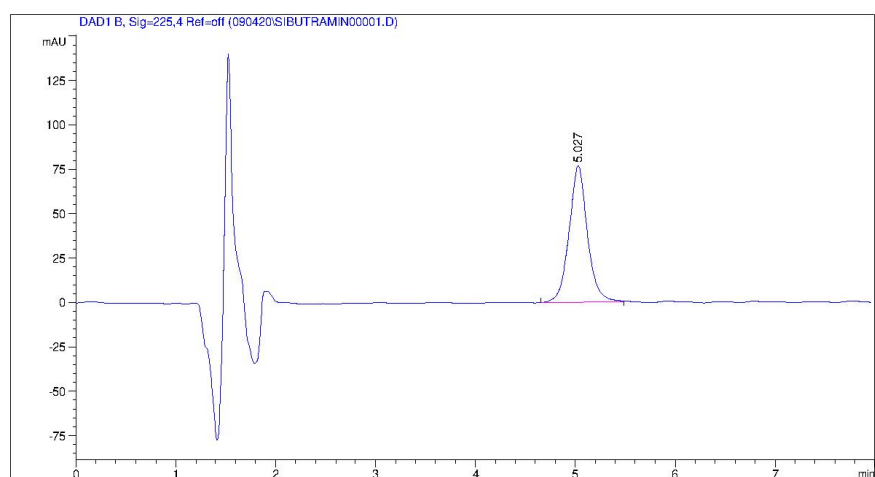


Рисунок 19 – ВЭЖХ-хроматограмма раствора стандарта Сибутрамина 0,1 мг/мл

(растворитель – метанол)

Условия – раздел 3.2

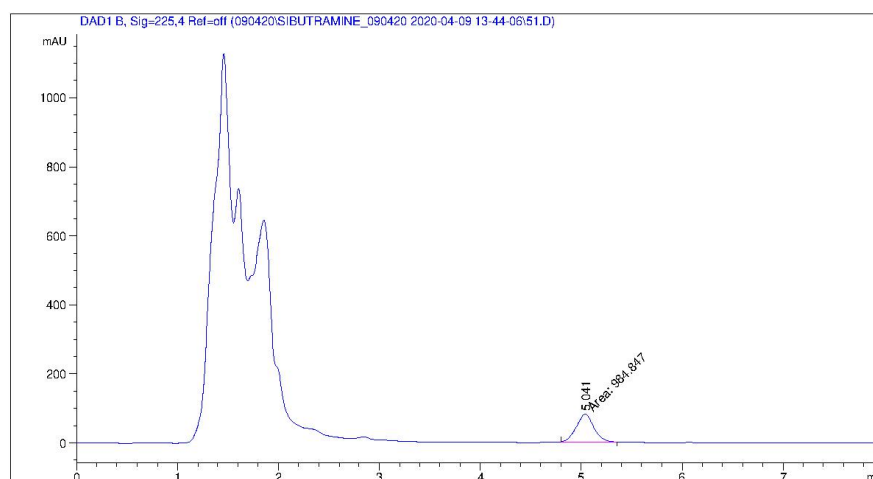


Рисунок 20 – ВЭЖХ-хроматограмма модельной смеси

Условия – раздел 3.2

Полученные хроматограммы показывают, что время удерживания сибутрамина составляет 5 мин., сопутствующих компонентов – от 1,2 до 2 мин. Как следует из рисунка 20, пики этих веществ не мешают определению Сибутрамина в условиях предложенной методики.

Линейность методики доказана результатами анализа 9 модельных смесей (рисунок 21).

Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9993$ (более 0,9950) при $y = 10434x - 23,273$ (x – концентрация (мг/мл), y – площадь пика).

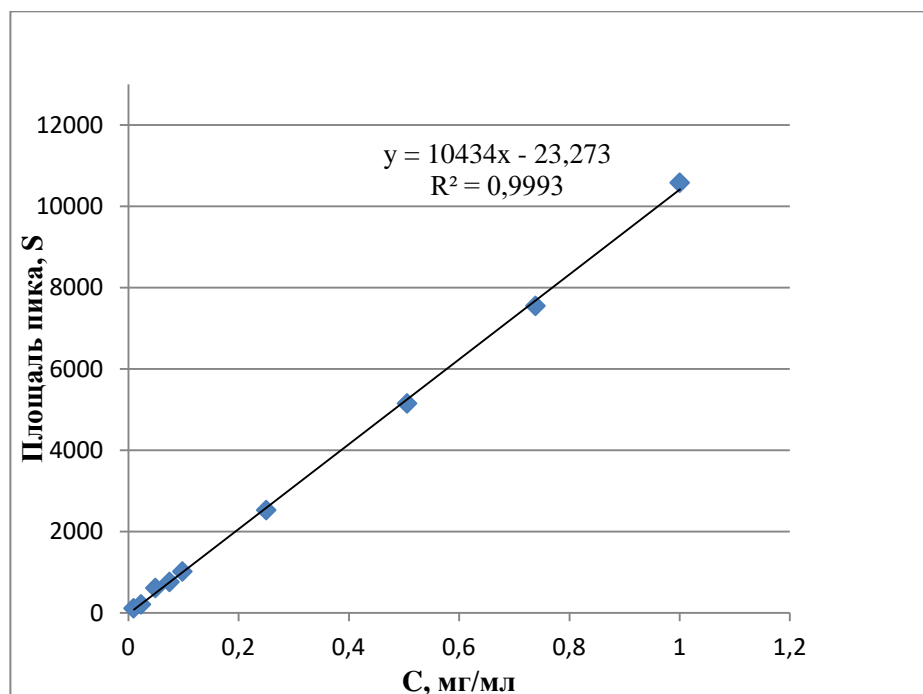


Рисунок 21 – График линейной зависимости площади пика (S) от концентрации (C) раствора Сибутрамина (мг/мл)

Правильность методики подтверждена определением степени извлечения Сибутрамина, введенного в модельные смеси [50].

Из результатов, представленных в таблице 11, следует, что извлечение Сибутрамина из модельных смесей в условиях эксперимента проходит в количестве от 98,34% до 100,76%, относительная ошибка единичного определения не превышает 1,5% (0,64%). Доверительный интервал $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ (99,54% \pm 0,64%) включает 100%, расчетное значение критерия Стьюдента $t_{\text{расч}}$ (1,62) меньше табличного $t_{\text{табл}}$ (2,26), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует.

Таблица 11 – Результаты количественного определения Сибутрамина в модельных смесях (БАД к пище + сибутрамин) методом ВЭЖХ-ДМД

№	Взято, мг/мл (C ₁)	Найдено, мг/мл (C ₂)	Абсолютная ошибка, мг/мл (d=C ₂ - C ₁)	Относительная ошибка, % (Y=dx100/C ₁)	Найдено, %	Метрологические характеристики (P=95%, n=9)
1	0,0101	0,0100	-0,0001	-1,00	99,00	n=9 $\bar{X} = 99,54$ $S = 0,85$ $S_{\bar{x}} = 0,28$ $\Delta\bar{X} = 0,64$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,64\%$ $t_{\text{расч}} = 1,62$ $t_{\text{табл}} = 2,26$ RSD = 0,86%
2	0,0241	0,0237	-0,0004	-1,66	98,34	
3	0,0496	0,0494	-0,0002	-0,40	99,60	
4	0,0748	0,0751	0,0003	0,40	100,40	
5	0,0998	0,0984	-0,0014	-1,40	98,60	
6	0,2486	0,2505	0,0019	0,76	100,76	
7	0,5062	0,5059	-0,0003	-0,06	99,94	
8	0,7497	0,7420	-0,0077	-1,03	98,97	
9	1,012	1,0145	0,0025	0,25	100,25	

Для оценки прецизионности (сходимости) результатов был рассчитан коэффициент вариации (RSD), не превышающий 1% (0,86%).

Предел обнаружения (LOD) Сибутрамина был установлен на уровне 0,004 мг/мл. Предел количественного определения (LOQ) составил 0,01 мг/мл. Пределы устанавливали согласно отклонениям сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика.

Внутрилабораторную прецизионность устанавливали по результатам определения Сибутрамина в образцах: 2 раствора, приготовленных разными химиками-аналитиками с добавлением БАД к пище №4 к каждому (согласно приготовлению модельной смеси №5). Анализ проводили согласно методике определения Сибутрамина методом ВЭЖХ-ДМД. Навеска стандартного образца Сибутрамина для первого химика составила 10,2 мг, для второго – 10,4 мг. Каждый раствор хроматографировали 5 раз по три повторности.

Результаты проведенного анализа отражены в таблицах 12,13. Проведен расчет значений стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения между результатами.

Таблица 12 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения Сибутрамина в модельной смеси №5 БАД к пище с применением ВЭЖХ-ДМД (Аналитик 1, прибор 1)

№		1	2	3	Ср. значение	Количественное содержание сибутрамина, %
1 испытуемый раствор	t, мин	5,036	5,035	5,041	5,037	100,10
	S	1036,9	1034,9	1042,3	1038,0	
2 испытуемый раствор	t, мин	5,038	5,045	5,037	5,040	100,47
	S	1039,6	1046,8	1039,2	1041,9	
3 испытуемый раствор	t, мин	5,040	5,037	5,037	5,038	99,93
	S	1032,9	1039,4	1036,6	1036,3	
4 испытуемый раствор	t, мин	5,034	5,030	5,040	5,035	100,05
	S	1039,7	1031,8	1041,1	1037,5	
5 испытуемый раствор	t, мин	5,043	5,045	5,038	5,042	100,15
	S	1032,8	1040,3	1042,6	1038,6	
$\bar{X}, \%$		100,14				
S., %		0,20				
RSD, %		0,20				

Таблица 13 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения Сибутрамина в модельной смеси №5 БАД к пище с применением ВЭЖХ-ДМД (Аналитик 2, прибор 2)

№		1	2	3	Ср. значение	Количественное содержание сибутрамина, %
1 испытуемый раствор	t, мин	5,044	5,038	5,032	5,038	99,94
	S	1057,8	1058,1	1056,2	1057,4	
2 испытуемый раствор	t, мин	5,047	5,040	5,042	5,043	100,08
	S	1056,2	1060,6	1059,8	1058,9	
3	t, мин	5,050	5,043	5,040	5,044	100,26

испытуемый раствор	S	1060,6	1061,9	1059,8	1060,8	
4 испытуемый раствор	t, мин	5,040	5,043	5,045	5,043	100,36
	S	1061,9	1062,1	1061,4	1061,8	
5 испытуемый раствор	t, мин	5,045	5,038	5,039	5,041	99,92
	S	1056,9	1057,9	1056,5	1057,1	
$\bar{X}, \%$	100,11					
S, %	0,19					
RSD, %	0,19					

Среднее значение содержания Сибутрамина при проведении 10 измерений составило 100,13%, стандартное отклонение – 0,19%, относительное стандартное отклонение RSD – 0,19%. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Внутрилабораторная прецизионность» (значение RSD должно быть не более 3%) для 10 параллельных измерений.

Обработка результатов количественного определения проводилась с помощью Microsoft Excel.

3.5. Практическое применение разработанной методики

Разработанная методика была апробирована на лекарственных препаратах, представленных на отечественном фармацевтическом рынке. Приведены результаты количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах: «Редуксин 10 мг»– капсулы; «Редуксин Форте 10 мг»– таблетки (таблицы 14,15). В Приложении Г выборочно представлены полученные хроматограммы.

Таблица 14 – Результаты количественного определения Сибутрамина в лекарственном препарате «Редуксин 10 мг»

№ навески	Взято (соответствует массе сибутрамина), мг	Найдено сибутрамина, мг	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=C_2-C_1$)	Относительная ошибка, % ($Y=d \times 100 / C_1$)	Найдено сибутрамина, %	Статистические характеристики
1	10,02	10,03	+ 0,01	+ 0,10	100,10	$\bar{X} = 100,24$ $S = 0,52$ $\bar{Sx} = 0,23$ $\Delta \bar{X} = 0,59$
2	10,00	10,01	+ 0,01	+ 0,10	100,10	
3	10,02	9,98	-0,04	-0,40	99,60	

4	9,96	10,00	+ 0,04	+ 0,40	100,40	$\bar{\varepsilon} = 0,59\%$ $t_{\text{расч}} = 0,47$ $t_{\text{табл}} = 2,57$ RSD = 0,52%
5	9,89	9,99	+ 0,10	+ 1,01	101,01	

Таблица 15 – Результаты количественного определения Сибутрамина
в лекарственном препарате «Редуксин Форте 10 мг»

№ навески	Взято (соответствует массе сибутрамина), мг	Найдено сибутрамина, мг	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=C_2- C_1$)	Относительная ошибка, % ($Y=dx100/C_1$)	Найдено сибутрамина, %	Статистические характеристики
1	9,98	10,00	+ 0,02	+ 0,20	100,20	$\bar{X} = 100,32$ $S = 0,52$ $S_{\bar{x}} = 0,23$ $\Delta\bar{X} = 0,60$ $\bar{\varepsilon} = 0,60\%$ $t_{\text{расч}} = 0,62$ $t_{\text{табл}} = 2,57$ RSD = 0,52%
2	9,95	10,02	+ 0,07	+ 0,70	100,70	
3	10,01	9,99	-0,02	- 0,20	99,80	
4	9,92	10,02	+ 0,10	+ 1,01	101,01	
5	10,00	9,99	- 0,01	- 0,10	99,90	

Аналогичным образом определено содержание Сибутрамина в других объектах исследования.

В таблице 16 представлены результаты количественного определения Сибутрамина в исследуемых препаратах.

Таблица 16 – Результаты определения количественного содержания Сибутрамина
в исследуемых препаратах, установленное методом ВЭЖХ-ДМД

Наименование ЛП	Номинальное содержание, мг/ЛФ	Найденное содержание, мг/ЛФ	Полученное значение, %
«Редуксин»	10 мг/капс.	10,02 мг/капс.	100,2%±10%
«Редуксин»	15 мг/капс.	15,02 мг/капс.	100,1%±10%
«Редуксин Мет»	10 мг/капс.	10,01 мг/капс.	100,1%±10%
«Редуксин Мет»	15 мг/капс.	14,99 мг/капс.	99,9%±10%
«Редуксин Форте»	10 мг/табл.	10,32 мг/табл.	100,3%±10%
«Редуксин Форте»	15 мг/табл.	15,00 мг/табл.	100,0%±10%

«Голдлайн»	10 мг/капс.	10,04 мг/капс.	100,4%±10%
«Голдлайн»	15 мг/капс.	15,02 мг/капс.	100,1%±10%
«Голдлайн Плюс»	10 мг/капс.	9,98 мг/капс.	99,8%±10%
«Голдлайн Плюс»	15 мг/капс.	15,05 мг/капс.	100,3%±10%

На основании экспериментальных данных методом ВЭЖХ-ДМД были проанализированы БАД к пище в количестве 22 единиц, в 6 из них был обнаружен Сибутрамин, при этом он не был заявлен в их составе. Результаты анализа БАД к пище №17, 19 приведены в таблицах 17, 18. Количественное содержание Сибутрамина в БАД к пище приведено в таблице 19.

Таблица 17 – Результаты определения содержания Сибутрамина
в БАД №17 к пище

№ навески	Взято образца, г	Найдено сибутрамина, мг	Статистическая обработка результатов
1	1,01	12,31	$\bar{X} = 12,29$ $S = 0,03$ $S\bar{x} = 0,01$ $\Delta\bar{X} = 0,03$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,22\%$ $t_{\text{расч}} = 0,51$ $t_{\text{табл}} = 2,57$ RSD = 0,19%
2	0,98	12,28	
3	1,02	12,33	
4	0,91	12,25	
5	0,89	12,29	

Таблица 18 – Результаты определения содержания Сибутрамина
в БАД №19 к пище

№ навески	Взято образца, г	Найдено сибутрамина, мг	Статистическая обработка результатов
1	0,98	21,09	$\bar{X} = 21,06$ $S = 0,07$ $S\bar{x} = 0,03$ $\Delta\bar{X} = 0,09$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,40\%$ $t_{\text{расч}} = 0,33$ $t_{\text{табл}} = 2,57$
2	1,02	20,98	
3	0,94	21,15	
4	1,01	21,10	
5	0,90	20,99	

			RSD = 0,35%
--	--	--	-------------

Таблица 19 – Результаты количественного определения Сибутрамина в фальсифицированных БАД к пище

№ БАД к пище	Масса содержимого капсулы, мг	Разведение, мл	Найдено сибутрамина, %	Содержание сибутрамина, мг/капс.
БАД №3	150	250	2,5	3,7±10%
БАД №9	200	25	0,15	0,3±10%
БАД №17	300	250	4,1	12,3±10%
БАД №18	250	250	2,5	5,5±10%
БАД №19	350	250	6	21,1±10%
БАД №20	350	250	4,3	15,0±10%

Полученные экспериментальные результаты показывают, что содержание недекларируемого Сибутрамина в БАД к пище составляет от 0,15 до 6% (от 0,3±10% до 21,0±10% мг/капс.), что превышает разовую дозу (высшая разовая доза-15 мг).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Установлены оптимальные условия определения Сибутрамина с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым диодноматричным детектором: НФ – Хроматографическая колонка MACHERRY-NAGEL NUCLEOSIL 5 мкм C18 150x4.6 мм; ПФ – ацетонитрил:формиатный буфер 60:40 (по объему); скорость потока – 1 мл/мин; t° термостата колонки – 40°C; длина волны – 225 нм. Примерное время удерживания Сибутрамина – 5 мин. Охарактеризованы параметры пригодности хроматографической системы.

2. Разработана методика определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище. Установлены пределы обнаружения (LOD) и количественного определения (LOQ) на уровне 0,004 мг/мл; 0,01 мг/мл соответственно.

3. Проведена валидация методики количественного определения Сибутрамина с помощью метода ВЭЖХ-ДМД. На модельных смесях лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище установлено, что унифицированная методика отвечает требованиям специфичности, линейности, правильности и прецизионности (сходимости).

4. Показана пригодность разработанной методики для определения Сибутрамина в промышленных образцах лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище.

5. Установлено количественное содержание Сибутрамина в лекарственных препаратах на уровне $99,8\% \pm 10\%$ – $100,4\% \pm 10\%$ от заявленного. В 6 БАД к пище выявлено наличие Сибутрамина при отсутствии его в их составе. Установлено, что его содержание составило $0,3 \pm 10\%$ – $21,0 \pm 10\%$ мг в 1 капсуле, что превышало разовую терапевтическую дозу 15 мг.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИБУТРАМИНА МЕТОДОМ КЭ

Для обеспечения воспроизводимости методики определения Сибутрамина методом капиллярного электрофореза необходимо подобрать условия и последовательность промывания капилляра растворами и наполнением буферными системами. Это требует установления адекватных условий для достижения приемлемого разделения активной фармацевтической субстанции и сопутствующих веществ.

4.1. Установление параметров КЭ

При разработке методики определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище с применением метода капиллярного электрофореза необходимо подобрать аналитически значимые капилляр, электролит для получения надлежащих результатов разделения компонентов.

Для проведения анализа методом КЭ используют кварцевые капилляры различной длины. Капилляр имеет внешнее полимерное (полиимидное) покрытие для повышения механической прочности. Длина капилляра может составлять от нескольких сантиметров, достигая 1 метра (в зависимости от анализируемых веществ); внутренний диаметр капилляров – от 25 до 200 микрон.

В ходе эксперимента был выбран кварцевый капилляр длиной 56 см с внутренним диаметром 50 мкм, что позволяет достичь примерное время удерживания – 6 минут, в связи с чем общее время анализа составляет 8 минут.

Были апробованы различные подвижные фазы (электролиты), обеспечивающие пригодность системы: кажущееся число теоретических тарелок (N), разрешение (R_s), фактор симметричности (A_s).

При использовании в качестве электролита 50 ммоль раствора боратного буфера $pH=9,3\pm 0,1$ наблюдалось появление широких пиков, вследствие чего были апробованы другие системы (рисунок 22).

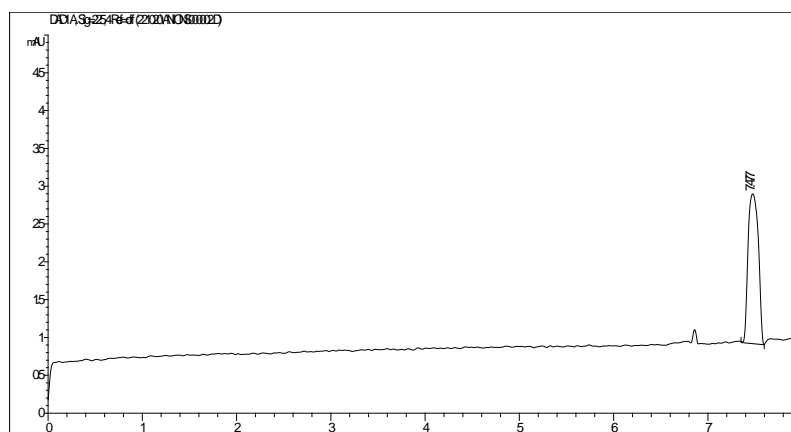


Рисунок 22 – Электрофореграмма раствора Сибутрамина 0,1 мг/мл; электролит – 50 ммоль боратный буфер рН=9,3±0,1

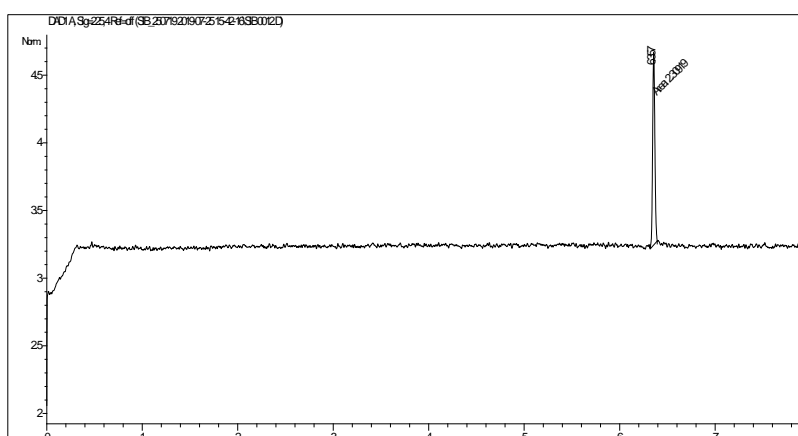
Согласно литературным данным фосфатный буфер с различными значениями концентраций и рН использовался в качестве рабочего электролита [69; 84; 95].

В результате подбора концентрации буферного раствора от 10 до 50 ммоль, раствор с наибольшей концентрацией явился аналитически обоснованным в силу основных свойств Сибутрамина ($pK_a=9,77$) [77]. Нами был апробован электролит – 50 ммоль раствор фосфатного буфера, имеющий значение рН от $3,0\pm 0,1$ до $10,0\pm 0,1$.

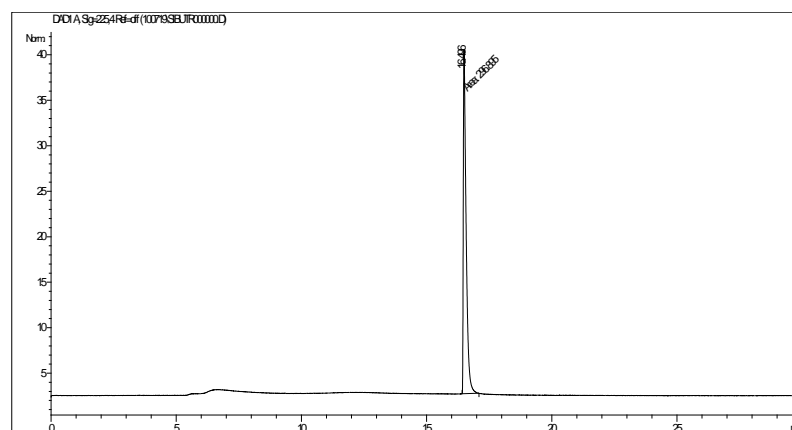
Известно, что электроосмотический поток ускоряется в результате увеличения рН.

В этой связи в ходе эксперимента нами была подобрана система - фосфатный буфер 50 ммоль рН=7,0±0,1, поскольку данный электролит соответствует кислотно-основным свойствам Сибутрамина ($pK_a = 9,77$) методом капиллярного электрофореза [51].

При использовании фосфатного буфера рН=3,0±0,1 время выхода Сибутрамина составляло 16,5 мин, в отличие от электролита с рН=7,0±0,1 – 6,4 мин. (рисунок 23 (1,2)).



(1)



(2)

Рисунок 23 – Электрофореграммы: (1) – раствора Сибутрамина 0,1 мг/мл; электролит-фосфатный буфер рН=3,0±0,1;

(2) – раствора Сибутрамина 0,1 мг/мл; электролит-фосфатный буфер рН=7,0±0,1

Анализ электрофореграмм 1 и 2 показывает, что увеличение рН влияет на сокращение времени удерживания Сибутрамина.

При использовании метода капиллярного электрофореза в качестве растворителя применяют водные растворы, поскольку присутствие органической фазы влияет на достигаемое разрешение, уменьшая электроосмотический поток, что не приводит к четкому разделению пиков [92].

Также неоспоримым достоинством применения водного растворителя является незначительная экстракция многих компонентов БАД к пище в процессе пробоподготовки.

В этой связи в качестве растворителя был использован рабочий электролит фосфатный буфер 50 ммоль рН=7,0±0,1.

Аналитическая длина волны была выбрана согласно параметрам метода ВЭЖХ-ДМД, а именно 225±2 нм.

4.2. Условия анализа методом КЭ

Параметры капиллярного электрофореза для определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище были подобраны экспериментально и представлены в таблице 20 [51].

Таблица 20 – Условия проведения КЭ

Параметры	
– рабочий электролит	Фосфатный буфер 50 ммоль рН=7,0±0,1
Капилляр	
– температура	20°C
– напряжение	+ 20 кВ
– сила тока	100 мА
Детектирование	УФ-спектрофотометрическое при $\lambda=225$ нм
Характеристики методики	
– примерное время удерживания, мин. (t_R)	6 мин

На основании экспериментальных данных были определены параметры пригодности системы [14]:

- 1) кажущееся число теоретических тарелок (N) = 27146;
- 2) разрешение (R_s) = 8,26;
- 3) фактор симметричности (A_s) = 0,938.

На основании полученных результатов доказана пригодность системы.

4.3. Пробоподготовка

Приготовление рабочего электролита

Приготовление водного раствора фосфатного буфера 50 ммоль рН=7,0±0,1 (NaH₂PO₄; NaOH)

Для приготовления раствора фосфатного буфера 50 ммоль рН=7±0,1 в мерный стакан объемом 1000 мл отмеривали 950 мл воды Milli-Q и, тщательно перемешивая, прибавляли 6000 мг натрия дигидрофосфата. Содержимое переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, 1М раствором NaOH доводили рН до значения 7,0±0,1, доводили водой Milli-Q до метки и перемешивали.

Приготовление исходного раствора стандарта Сибутрамина

Навеску Сибутрамина около 10 мг (здесь и далее – точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляли 8 мл рабочего электролита, перемешивали до полного растворения, доводили объем до метки раствором электролита и перемешивали, получая исходный раствор с концентрацией 1,0 мг/мл.

Приготовленный раствор хранят при температуре 4-8°C в течение 1 месяца.

Приготовление раствора стандарта Сибутрамина

1 мл приготовленного исходного раствора стандарта Сибутрамина помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки раствором рабочего электролита, получая раствор стандарта Сибутрамина с концентрацией 0,1 мг/мл.

Подготовка лекарственного препарата с дозировкой 10 мг/капс. к анализу

Содержимое 5 капсул извлекали из оболочки, брали навеску усредненного образца, соответствующую 10,0 мг Сибутрамина. Навеску пробы помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 100 мл рабочего электролита. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирали 1,5 мл экстракта в центрифужную пробирку. Пробирку центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. Надосадочную жидкость анализировали методом КЭ.

Подготовка лекарственного препарата с дозировкой 15 мг/капс. к анализу

Содержимое 5 капсул извлекали из оболочки, брали навеску усредненного образца, соответствующую 15,0 мг Сибутрамина. Навеску пробы помещали в мерную колбу вместимостью 150 мл, добавляли 150 мл электролита. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирали 1,5 мл экстракта в центрифужную пробирку. Пробирку центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. Надосадочную жидкость анализировали методом КЭ.

Подготовка образца (БАД) к анализу

Содержимое 5 капсул извлекали из оболочки, брали навеску усредненного образца, соответствующую 1,0 г образца. Навеску пробы помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 100 мл рабочего электролита. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирали 1,5 мл экстракта в центрифужную пробирку. Пробирку центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. Надосадочную жидкость анализировали методом КЭ.

*В случае высоких концентраций Сибутрамина (более 0,12 мг/мл) из объема V (100 мл) отбирали аликвоту в 10 мл и разбавляли рабочим электролитом в N раз. Разбавление учитывали при расчете концентрации.

4.4. Подготовка капилляра к анализу

Условия подготовки капилляров к анализу:

Новый капилляр промывали следующими растворами [95]:

1. 1М раствором NaOH – 10 минут;
2. 0,1М раствором NaOH – 10 минут;
3. 0,1М раствором H₃PO₄ – 10 минут;
4. Водой деионизированной Milli-Q – 10 минут.

Капилляр между анализами промывали растворами в следующей последовательности:

1. 0,1М раствором NaOH – 10 минут;
2. Водой деионизированной Milli-Q – 10 минут;
3. Рабочим электролитом – фосфатным буфером pH=7,0±0,1 – 20 минут.

В случае ежедневного использования системы капиллярного электрофореза в конце анализа капилляр промывали водой Milli-Q, 0,1М раствором NaOH, водой деионизированной, метанолом 5 мин, продували воздухом и оставляли концы капилляра на ночь в пустых виалах.

Расчёт содержания Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище проводили по формуле:

$$X = \frac{S_{\text{сиб}} \times C \times V \times N \times m_{\text{капс./табл.}}}{S_{\text{std}} \times m_{\text{навески}}}$$

где:

X – количество Сибутрамина в анализируемом образце, мг/капс., табл.;

S_{сиб} – площадь пика анализируемого образца Сибутрамина;

S_{std} – площадь пика стандарта Сибутрамина;

V – объем раствора пробы, мл;

C – концентрация раствора стандарта Сибутрамина, мг/мл;

m_{навески} – навеска образца, взятая на анализ, г.;

N – коэффициент разбавления пробы;

m_{капс./табл.} – масса лекарственной формы, г.

4.5. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в анализируемых объектах

Валидацию методики определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище методом капиллярного электрофореза проводили в соответствии с ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики», ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIV [6; 14].

4.5.1. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в лекарственных препаратах

Проведено определение полноты извлечения Сибутрамина из лекарственной формы на модельных смесях субстанции Сибутрамина и плацебо в том соотношении, в котором они содержатся в капсулах.

Для этого, около 0,010 г ($0,010 \text{ г} \pm 0,002 \text{ г} (\pm 20\%)$) субстанции Сибутрамина и около 0,156 г плацебо помещали в мерные колбы вместимостью 10 мл, прибавляли 8 мл раствора рабочего электролита и затем помещали в ультразвуковую ванну на 20 мин. Затем объем содержимого колбы доводили до метки тем же растворителем, перемешивали, отбирали 1,5 мл экстракта и центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки электролитом, перемешивали и анализировали методом КЭ.

Для оценки содержания Сибутрамина в модельных смесях готовили раствор стандартного образца Сибутрамина с концентрацией 0,1 мг/мл в растворе рабочего электролита (п. 5.3).

Доказательство специфичности методики проводили путем сравнения электрофореграмм: растворителя – подвижной фазы, раствора стандарта Сибутрамина, целлюлозы микрокристаллической, метформина, модельной смеси (Сибутрамин и МКЦ), модельной смеси (сибутрамин и метформин) (рисунки 24 – 29).

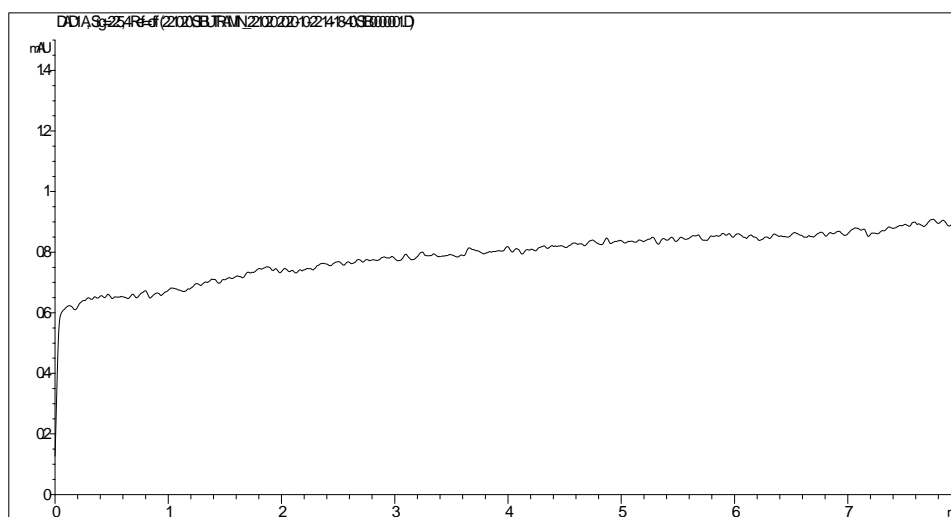


Рисунок 24 – Электрофореграмма растворителя (рабочего электролита)

Условия – раздел 4.2

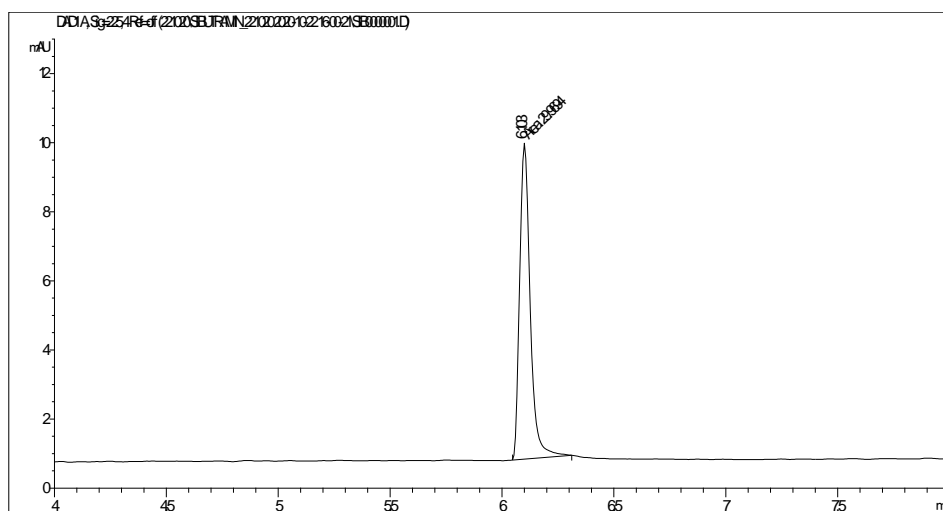


Рисунок 25 – Электрофореграмма раствора стандарта Сибутрамина 0,1 мг/мл

Условия – раздел 4.2

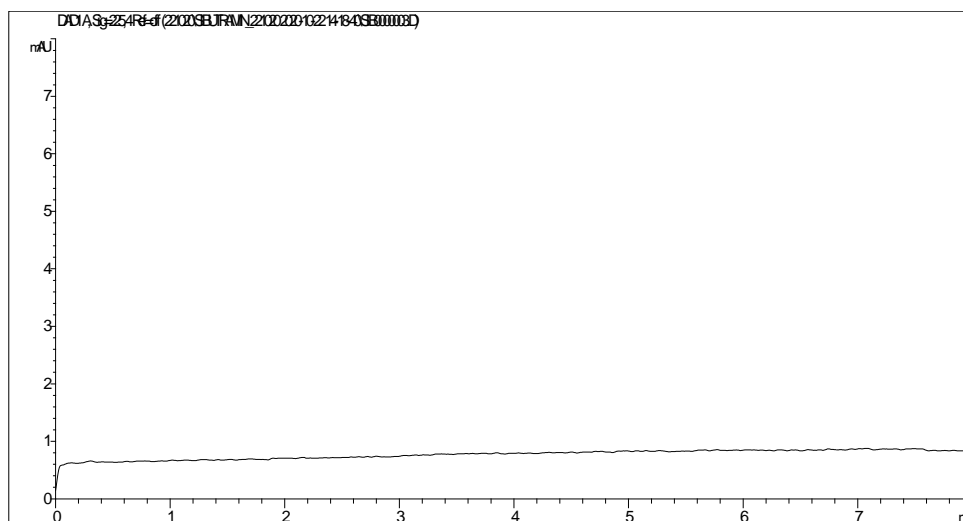


Рисунок 26 – Электрофореграмма плацебо

Условия – раздел 4.2

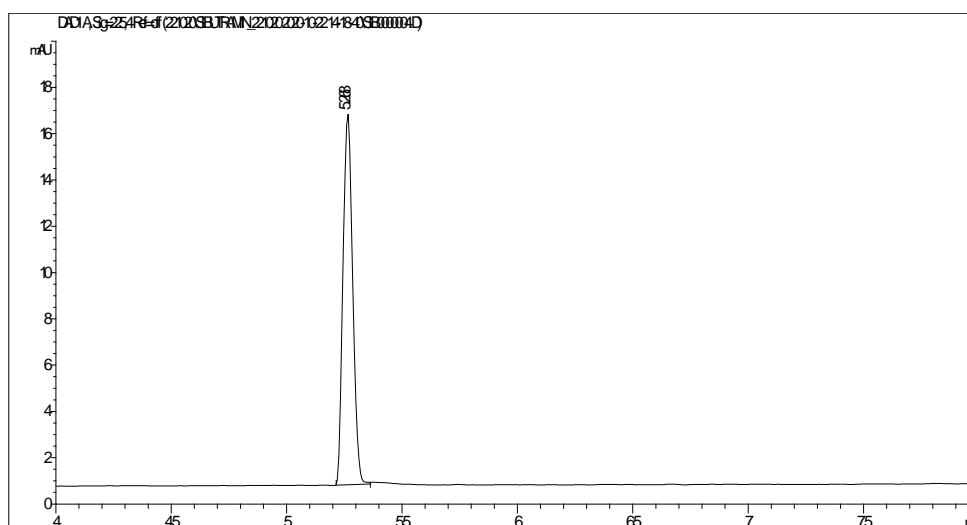


Рисунок 27 – Электрофореграмма раствора метформина 0,85 мг/мл

Условия – раздел 4.2

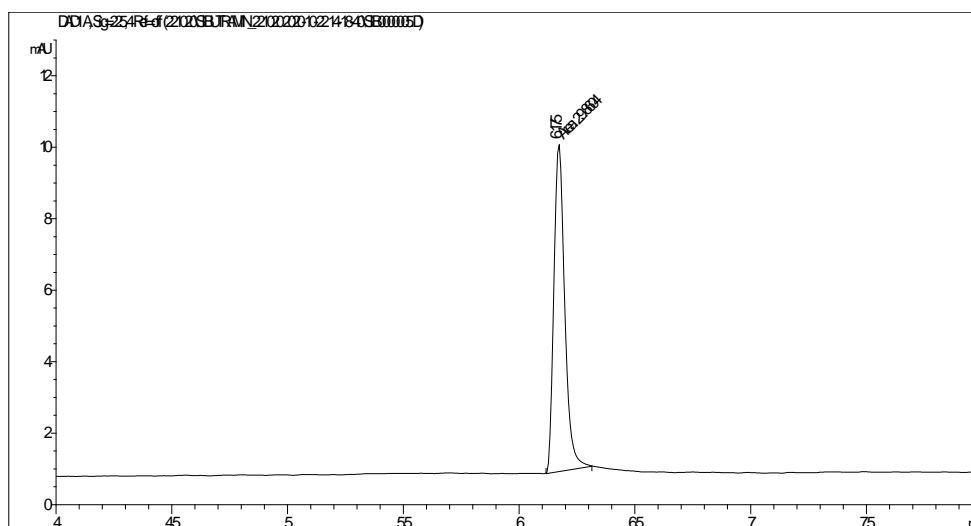


Рисунок 28 – Электрофореграмма модельной смеси (Сибутрамин и плацебо)
Условия – раздел 4.2

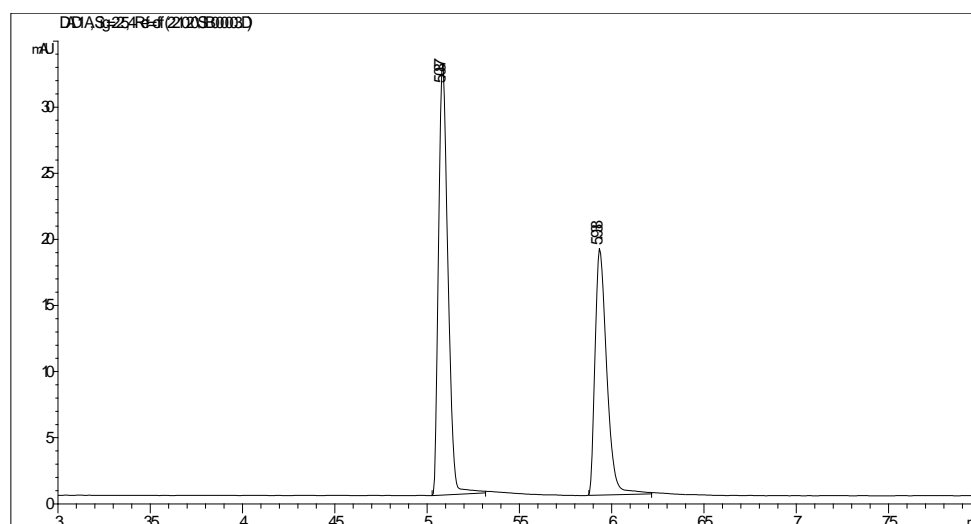


Рисунок 29 – Электрофореграмма модельной смеси (Сибутрамин и метформин)
Условия – раздел 4.2

Таким образом, доказана специфичность разрабатываемой методики. Растворитель и другие компоненты не мешают определению Сибутрамина в составе лекарственных препаратов. Время удерживания Сибутрамина составляет 6,1 мин.

Линейность валидируемой методики определяли на основании полученного графика зависимости площади полученных пиков от концентрации Сибутрамина в 9 модельных смесях (содержание действующего вещества от 80 до 120% от возможно предполагаемого исходного значения) (рисунок 30).

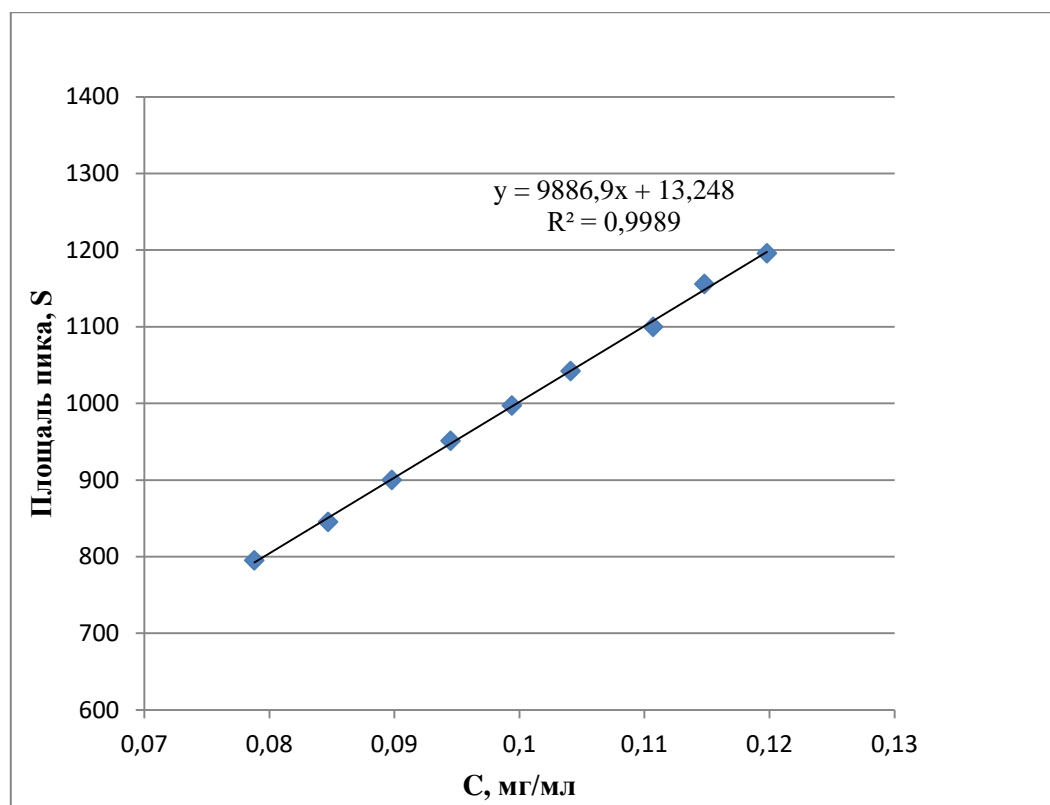


Рисунок 30 – График линейной зависимости площади пика (S) от концентрации (C) раствора Сибутрамина

Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9989$ (более 0,9950) при $y = 9886,9x - 13,248$, где x – концентрация (мг/мл); y – площадь пика.

Правильность методики подтверждена определением степени извлечения Сибутрамина, введенного в модельные смеси.

Из таблицы 21 следует, что извлечение Сибутрамина из модельных смесей в условиях эксперимента проходит в количестве от 99,24% до 100,45%, относительная ошибка единичного определения не превышает 1,5% (0,44%). Доверительный интервал $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ ($99,89\% \pm 0,44\%$) включает 100%, расчетное значение критерия Стьюдента $t_{\text{расч}}$ (1,73) меньше табличного $t_{\text{табл}}$ (2,36), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует.

Таблица 21 – Результаты количественного определения Сибутрамина в модельных смесях (ЛП) методом КЭ

№	Взято, мг/мл (C_1)	Найдено, мг/мл (C_2)	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=C_2- C_1$)	Относительная ошибка, % ($Y=dx100/C_1$)	Найдено, %	Метрологические характеристики (P=95%, n=9)
1	0,0791	0,0788	-0,0003	-0,38	99,62	n=9
2	0,0845	0,0847	0,0002	0,24	100,24	

3	0,0903	0,0898	-0,0005	-0,55	99,45	$\bar{X} = 99,89$ $S = 0,59$ $S\bar{x} = 0,20$ $\Delta\bar{X} = 0,44$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,44\%$ $t_{\text{расч}} = 1,73$ $t_{\text{табл}} = 2,36$ RSD = 0,59%
4	0,0950	0,0945	-0,0005	-0,53	99,47	
5	0,0997	0,0994	0,0003	0,30	99,70	
6	0,1049	0,1041	0,0008	0,76	99,24	
7	0,1102	0,1107	0,0005	0,45	100,45	
8	0,1151	0,1148	-0,0003	-0,26	99,74	
9	0,1197	0,1198	0,0001	0,08	100,08	

Для оценки прецизионности (сходимости) результатов был рассчитан коэффициент вариации (RSD), не превышающий 1% (0,59%).

Предел обнаружения (LOD) Сибутрамина был установлен на уровне 0,005 мг/мл. Предел количественного определения (LOQ) – 0,0125 мг/мл. Пределы устанавливали согласно отклонениям сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика.

Внутрилабораторную прецизионность определяли по результатам анализа 2 образцов стандартных растворов Сибутрамина с добавлением плацебо (согласно получению модельных смесей), приготовленных двумя разными химиками-аналитиками. Анализ проводили по методике определения Сибутрамина методом КЭ. Навеска стандартного образца Сибутрамина для первого химика составила 9,9 мг, для второго – 10,0 мг. Каждый раствор хроматографировали 5 раз по три повторности.

Результаты анализа представлены в таблицах 22, 23. Рассчитаны величины стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения между результатами.

Таблица 22 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения Сибутрамина в модельной смеси ЛП (Аналитик 1, прибор 1)

№		1	2	3	Ср. значение	Количественное содержание сибутрамина, %
1 испытуемый раствор	t, мин	6,175	6,205	6,058	6,146	100,00
	S	29,7	29,8	29,6	29,70	
2 испытуемый раствор	t, мин	6,200	6,089	6,186	6,158	100,22
	S	29,9	29,7	29,7	29,77	
3 испытуемый раствор	t, мин	6,104	6,199	6,184	6,162	99,55
	S	29,6	29,5	29,6	29,57	

4 испытуемый раствор	t, мин	6,201	6,109	6,089	6,133	99,78
	S	29,8	29,6	29,5	29,63	
5 испытуемый раствор	t, мин	6,133	6,179	6,201	6,171	99,89
	S	29,6	29,7	29,7	29,67	
Ср,%	99,89					
Ст. откл., %	0,25					
RSD, %	0,25					

Таблица 23 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения Сибутрамина в модельной смеси ЛП (Аналитик 2, прибор 2)

№		1	2	3	Ср. значение	Количественное содержание сибутрамина, %
1 испытуемый раствор	t, мин	6,170	6,165	6,204	6,180	99,89
	S	30,0	30,1	29,8	29,97	
2 испытуемый раствор	t, мин	6,105	6,114	6,199	6,139	99,89
	S	29,9	30,0	30,0	29,97	
3 испытуемый раствор	t, мин	6,200	6,165	6,186	6,184	100,44
	S	30,1	30,2	30,1	30,13	
4 испытуемый раствор	t, мин	6,156	6,187	6,190	6,177	99,78
	S	29,8	30,0	30,0	29,93	
5 испытуемый раствор	t, мин	6,201	6,174	6,189	6,188	100,11
	S	29,9	30,1	30,1	30,03	
Ср,%	100,02					
Ст. откл., %	0,26					
RSD, %	0,26					

Показатель среднего значения содержания Сибутрамина из 10 измерений – 99,96%, стандартное отклонение – 0,25%, относительное стандартное отклонение RSD – 0,25%. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю

«Внутрилабораторная прецизионность» (значение RSD должно быть не более 3%) для 10 параллельных измерений.

4.5.2. Валидация разработанной методики определения Сибутрамина в биологически активных добавках к пище

По результатам анализа всех исследуемых БАД к пище, не содержащих Сибутрамин, с помощью метода КЭ, не наблюдалось появление пика в примерное время удерживания – 6 мин. В этой связи в качестве примера нами был выбран БАД к пище №4 (по аналогии с методикой ВЭЖХ-МДМ) для приготовления модельных смесей.

Для приготовления модельных смесей в отдельные мерные колбы вместимостью 10 мл помещали содержимое одной капсулы БАД к пище №4 и определенное количество Сибутрамина (таблица 24), растворяли в 8 мл рабочего электролита, перемешивали, экстрагировали на ультразвуковой водяной бане в течение 20 мин. Затем объем содержимого колбы доводили до метки тем же растворителем, перемешивали, отбирали 1,5 мл экстракта в центрифужную пробирку и центрифугировали в течение 10 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 5000 g. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора в колбе до метки раствором электролита, перемешивали.

Раствор СО готовили согласно пункту 5.3.

Таблица 24 – Приготовление модельных смесей БАД к пище

№ модельной смеси	Необходимо внести, г	V колбы, мл	Кратность разведения
1	0,0010	10	10
2	0,0025	10	10
3	0,0050	10	10
4	0,0075	10	10
5	0,0100	10	10
6	0,0250	10	10
7	0,0500	10	10
8	0,0750	10	10
9	0,1000	10	10

Специфичность разработанной методики подтверждали сопоставлением полученных электрофореграмм: растворителя (подвижной фазы), раствора стандарта Сибутрамина,

биологически активной добавки к пище, модельной смеси (Сибутрамин и БАД к пище) (рисунки 31 – 34).

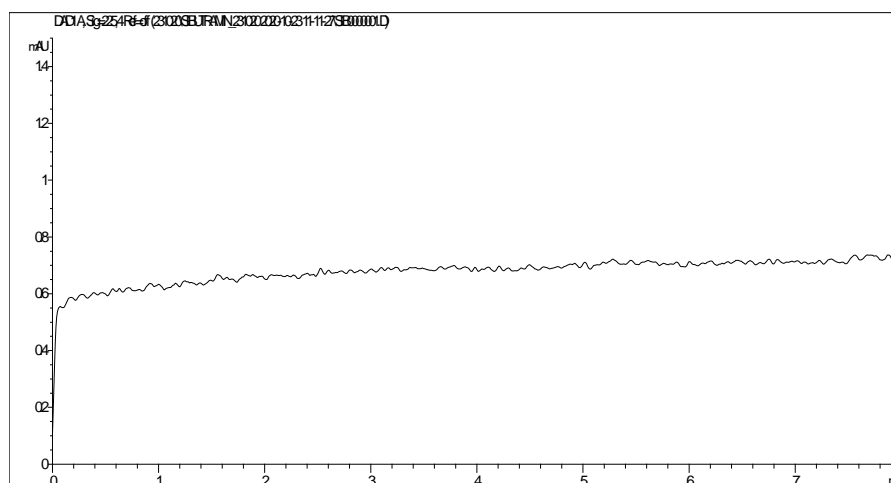


Рисунок 31 – Электрофореграмма растворителя

Условия – раздел 4.2

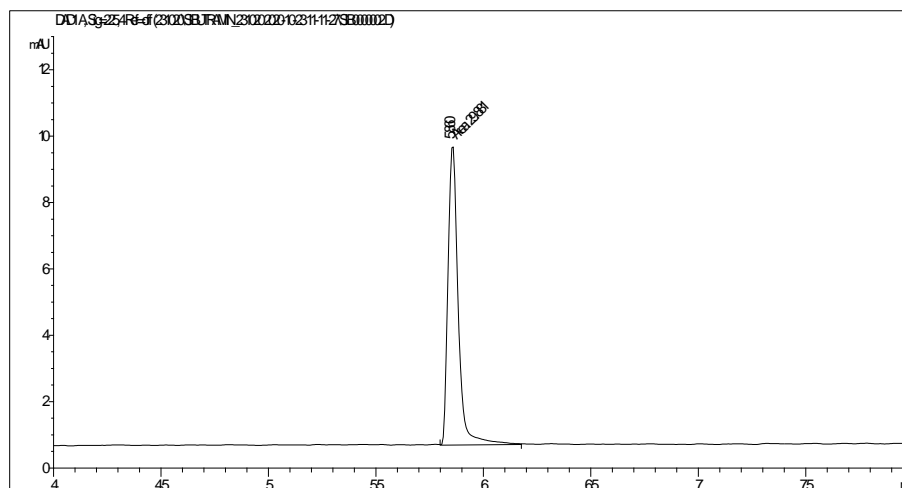


Рисунок 32 – Электрофореграмма раствора стандарта Сибутрамина 0,1 мг/мл

Условия – раздел 4.2

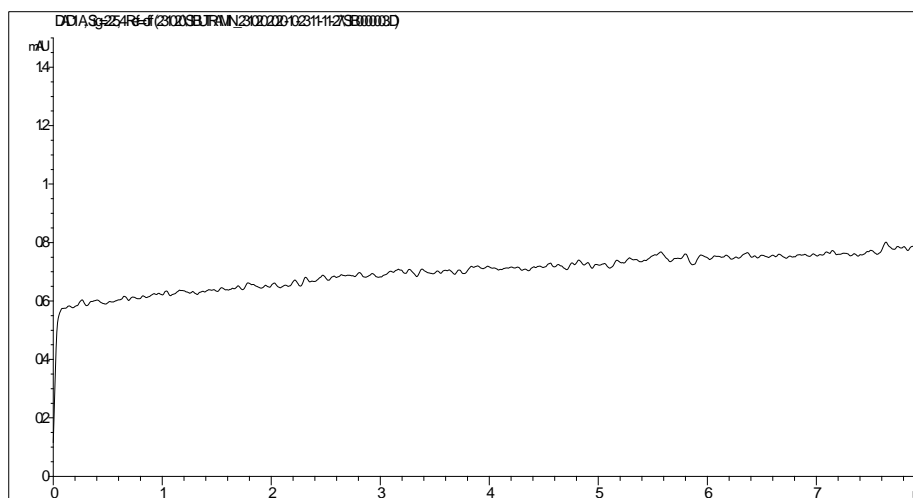


Рисунок 33 – Электрофореграмма БАД к пище №4

Условия – раздел 4.2

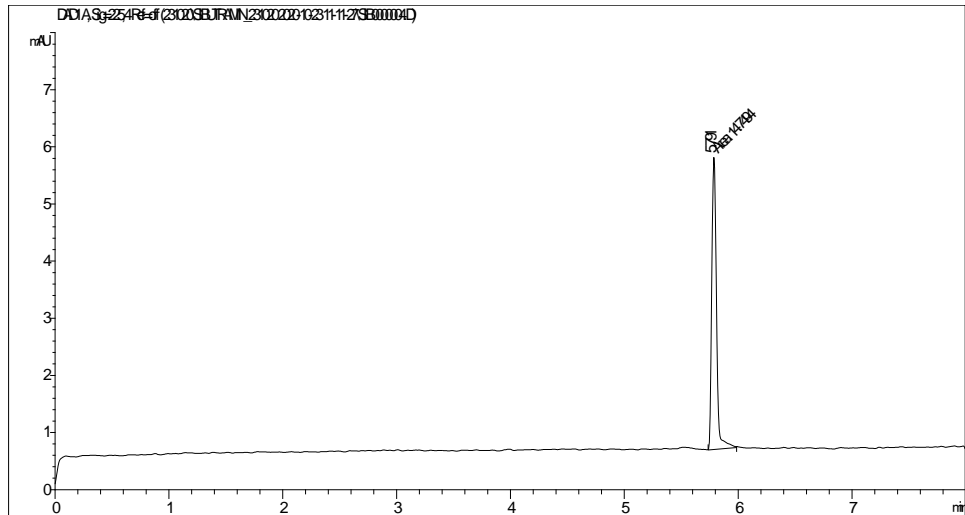


Рисунок 34 – Электрофореграмма модельной смеси (Сибутрамин и БАД к пище №4)
Условия – раздел 4.2

Полученные результаты свидетельствуют о том, что компоненты БАД к пище не мешают определению Сибутрамина методом КЭ в выбранных условиях.

Линейность методики была подтверждена результатами анализа 9 модельных смесей (рисунок 35).

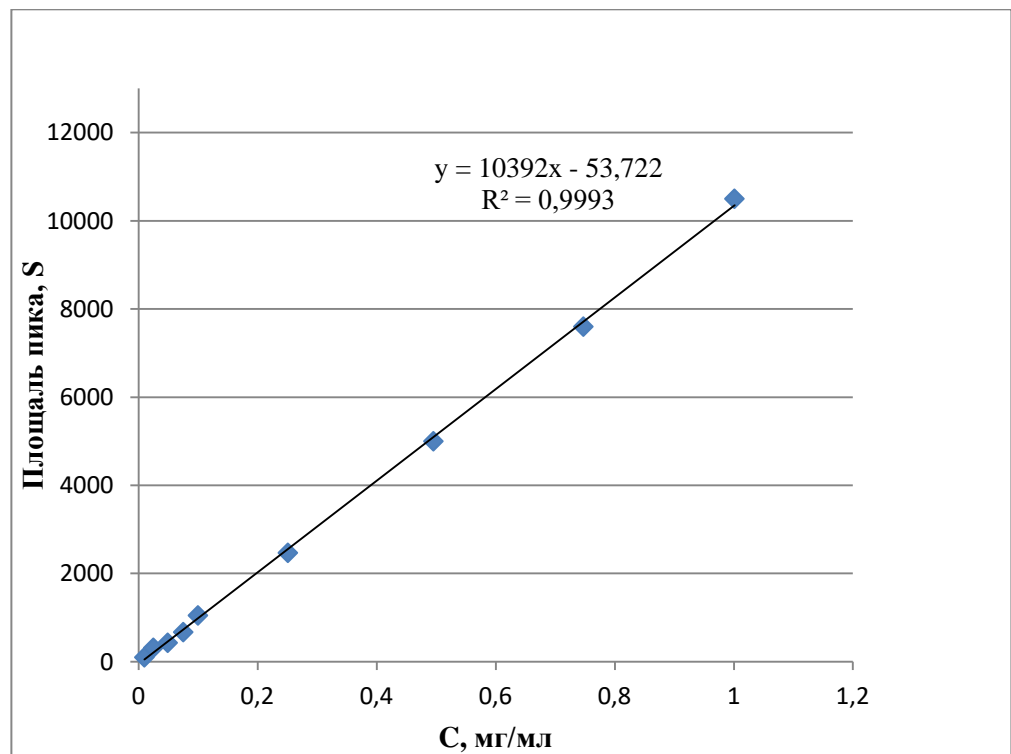


Рисунок 35 – График линейной зависимости площади пика (S) от концентрации (C) раствора Сибутрамина

Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9993$ (более 0,9950) при $y = 10392x - 53,722$, где x – концентрация (мг/мл); y – площадь пика.

Правильность методики подтверждена определением степени извлечения Сибутрамина, добавленного в модельные смеси.

Из таблицы 25 следует, что извлечение Сибутрамина из модельных смесей в условиях эксперимента проходит в количестве от 98,40% до 100,81%, относительная ошибка единичного определения не превышает 1,5% (0,74%). Доверительный интервал $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ (99,57% \pm 0,97%) включает 100%, расчетное значение критерия Стьюдента $t_{\text{расч}}$ (1,34) меньше табличного $t_{\text{табл}}$ (2,26), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует.

Таблица 25 –Результаты количественного определения Сибутрамина в модельных смесях (БАД к пище) методом КЭ

№	Взято, мг/мл (C ₁)	Найдено, мг/мл (C ₂)	Абсолютная ошибка, мг/мл (d=C ₂ - C ₁)	Относительная ошибка, % (Y=dх100/C ₁)	Найдено, %	Метрологические характеристики (P=95%, n=9)
1	0,0101	0,0099	-0,0002	-1,00	99,00	n=9 $\bar{X} = 99,57$ $S = 0,97$ $S\bar{x} = 0,32$ $\Delta\bar{X} = 0,73$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,74\%$ $t_{\text{расч}} = 1,34$ $t_{\text{табл}} = 2,26$ RSD = 0,98%
2	0,0248	0,0250	0,0002	0,81	100,81	
3	0,0499	0,0491	-0,0008	-1,60	98,40	
4	0,0750	0,0752	0,0002	0,27	100,27	
5	0,1001	0,0999	-0,0002	-0,20	99,80	
6	0,2502	0,2510	0,0008	0,32	100,32	
7	0,5022	0,4955	-0,0067	-1,33	98,67	
8	0,7499	0,7474	-0,0025	-0,33	99,67	
9	0,9998	1,0012	0,0014	0,14	100,14	

Для оценки прецизионности (сходимости) результатов был рассчитан коэффициент вариации (RSD), не превышающий 1% (0,98%).

Предел обнаружения (LOD) Сибутрамина был установлен на уровне 0,005 мг/мл. Предел количественного определения (LOQ) составил 0,0125 мг/мл. Пределы устанавливали согласно отклонениям сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика.

Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам определения Сибутрамина в образцах: 2 стандартных растворах, приготовленных разными химиками-аналитиками с добавлением Сибутрамина в БАД к пище (согласно приготовлению модельных смесей). Анализ проводили согласно методике определения Сибутрамина методом КЭ. Навеска стандартного образца Сибутрамина для первого химика составила 10,1 мг, для второго – 10,2 мг. Каждый раствор хроматографировали 5 раз по три повторности.

Результаты проведенного анализа отражены в таблицах 26, 27. На основании полученных данных рассчитаны величины стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения между результатами.

Таблица 26 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения Сибутрамина в модельной смеси №5 БАД к пище (Аналитик 1, прибор 1)

№		1	2	3	Ср. значение	Количественное содержание сибутрамина, %
1 испытуемый раствор	t, мин	5,860	5,842	5,806	5,836	100,11
	S	30,3	30,4	30,3	30,33	
2 испытуемый раствор	t, мин	5,871	5,789	5,774	5,811	99,89
	S	30,2	30,3	30,3	30,27	
3 испытуемый раствор	t, мин	5,789	5,803	5,836	5,809	100,22
	S	30,4	30,4	30,3	30,37	
4 испытуемый раствор	t, мин	5,799	5,801	5,816	5,805	99,56
	S	30,3	30,1	30,1	30,17	
5 испытуемый раствор	t, мин	5,808	5,775	5,745	5,776	99,78
	S	30,2	30,2	30,3	30,23	
$\bar{X}, \%$		99,91				
S, %		0,26				
RSD, %		0,26				

Таблица 27 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения Сибутрамина в модельной смеси №5 БАД к пище (Аналитик 2, прибор 2)

№		1	2	3	Ср. значение	Количественное содержание сибутрамина, %
1 испытуемый раствор	t, мин	5,816	5,768	5,756	5,780	99,78
	S	30,6	30,5	30,5	30,53	
2	t, мин	5,772	5,710	5,723	5,735	100,11

испытуемый раствор	S	30,7	30,6	30,6	30,63	
3 испытуемый раствор	t, мин	5,754	5,804	5,776	5,778	100,22
	S	30,5	30,7	30,8	30,67	
4 испытуемый раствор	t, мин	5,769	5,774	5,815	5,786	100,33
	S	30,6	30,8	30,7	30,17	
5 испытуемый раствор	t, мин	5,808	5,768	5,774	5,783	99,67
	S	30,6	30,5	30,4	30,50	
$\bar{X}, \%$	100,02					
S, %	0,29					
RSD, %	0,29					

Среднее значение содержания Сибутрамина из 10 измерений – 99,97%, стандартное отклонение – 0,27%, относительное стандартное отклонение RSD – 0,27%. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Внутрилабораторная прецизионность» (значение RSD должно быть не более 3%) для 10 параллельных измерений.

Обработка результатов количественного определения проводилась с помощью Microsoft Excel.

4.6. Практическое применение разработанных методик

Разработанная методика была апробирована на лекарственных препаратах, представленных на отечественном фармацевтическом рынке. Приведены результаты количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах: «Редуксин 10 мг» – капсулы; «Редуксин Форте 10 мг» – таблетки (таблицы 28, 29). В Приложении Д выборочно представлены полученные электрофореграммы.

Таблица 28 – Результаты количественного определения Сибутрамина в лекарственном препарате «Редуксин 10 мг»

№ навески	Взято (соответствует массе сибутрамина), мг	Найдено сибутрамина, мг	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=C_2-C_1$)	Относительная ошибка, % ($Y=dx100/C_1$)	Найдено сибутрамина, %	Статистические характеристики
1	10,04	10,00	- 0,04	- 0,40	99,60	$\bar{X} = 100,16$ $S = 0,56$
2	9,98	10,04	+ 0,06	+ 0,60	100,60	

3	9,89	9,98	+ 0,09	+ 0,91	100,91	$S_{\bar{x}} = 0,25$ $\Delta\bar{X} = 0,65$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,65\%$ $t_{\text{расч}} = 0,29$ $t_{\text{табл}} = 2,57$ RSD = 0,56%
4	10,04	10,02	- 0,02	- 0,20	99,80	
5	10,00	9,99	- 0,01	- 0,10	99,90	

Таблица 29 – Результаты количественного определения Сибутрамина в лекарственном препарате «Редуксин Форте 10 мг»

№ навески	Взято (соответствует массе сибутрамина), мг	Найдено сибутрамина, мг	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=C_2 - C_1$)	Относительная ошибка, % ($Y=dx100/C_1$)	Найдено сибутрамина, %	Статистические характеристики
1	9,98	10,01	+ 0,03	+ 0,30	100,30	$\bar{X} = 99,92$ $S = 0,36$ $S_{\bar{x}} = 0,16$ $\Delta\bar{X} = 0,42$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,42\%$ $t_{\text{расч}} = 0,22$ $t_{\text{табл}} = 2,57$ RSD = 0,36%
2	10,02	9,99	- 0,03	- 0,30	99,70	
3	10,00	9,98	- 0,02	- 0,20	99,80	
4	9,91	9,94	+ 0,03	+ 0,30	100,30	
5	10,01	9,96	- 0,05	- 0,50	99,50	

По полученным площадям пиков электрофореграмм, было рассчитано содержание Сибутрамина в лекарственных препаратах, результаты представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Результаты определения количественного содержания Сибутрамина в исследуемых лекарственных препаратах

Наименование ЛП	Номинальное значение, мг/ЛФ	Полученное значение, мг/ЛФ	Полученное значение, %
«Редуксин»	10 мг/капс.	10,16 мг/капс.	100,2%±10%
«Редуксин»	15 мг/капс.	15,00 мг/капс.	100,0%±10%
«Редуксин Мет»	10 мг/капс.	10,02 мг/капс.	100,2%±10%
«Редуксин Мет»	15 мг/капс.	15,06 мг/капс.	100,4%±10%
«Редуксин Форте»	10 мг/табл.	99,92 мг/табл.	99,9%±10%

«Редуксин Форте»	15 мг/табл.	14,94 мг/табл.	99,6%±10%
«Голдлайн»	10 мг/капс.	9,99 мг/капс.	99,9%±10%
«Голдлайн»	15 мг/капс.	15,03 мг/капс.	100,2%±10%
«Голдлайн Плюс»	10 мг/капс.	10,01 мг/капс.	100,1%±10%
«Голдлайн Плюс»	15 мг/капс.	15,03 мг/капс.	100,2%±10%

С помощью разработанной методики проанализированы 22 БАД к пище, в 6 из которых был выявлен Сибутрамин, в составе которых он не заявлен. Результаты определения на двух примерах анализируемых образцов приведены в таблицах 31, 32. Количественное содержание Сибутрамина в БАД к пище приведено в таблице 33.

Таблица 31 – Результаты определения содержания Сибутрамина в БАД №17 к пище

№ навески	Взято образца, г	Найдено сибутрамина, мг	Статистическая обработка результатов
1	1,06	12,27	$\bar{X} = 12,30$ $S = 0,01$ $S\bar{x} = 0,02$ $\Delta\bar{X} = 0,04$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,29\%$ $t_{\text{расч}} = 0,51$ $t_{\text{табл}} = 2,57$ RSD = 0,25%
2	0,89	12,30	
3	0,91	12,29	
4	1,02	12,33	
5	0,92	12,32	

Таблица 32 – Результаты определения содержания Сибутрамина в БАД №19 к пище

№ навески	Взято образца, г	Найдено сибутрамина, мг	Статистическая обработка результатов
1	0,98	20,96	$\bar{X} = 20,98$ $S = 0,08$ $S\bar{x} = 0,04$ $\Delta\bar{X} = 0,10$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,45\%$ $t_{\text{расч}} = 0,33$ $t_{\text{табл}} = 2,57$ RSD = 0,39%
2	1,02	20,93	
3	0,94	21,06	
4	1,01	21,08	
5	0,90	20,89	

Таблица 33 – Результаты количественного определения Сибутрамина в фальсифицированных БАД к пище

№ БАД к пище	Масса капсулы, мг	Разведение, мл	Полученный результат – количественное содержание сибутрамина, %	Полученный результат – количественное содержание сибутрамина, мг/капс.
БАД №3	150	250	2,4	3,6±10%
БАД №9	200	25	0,14	0,28±10%
БАД №17	300	250	3,7	12,3±10%
БАД №18	250	250	2,4	6,0±10%
БАД №19	350	250	7,4	21,0±10%
БАД №20	350	250	4,3	15,0±10%

Согласно полученным результатам содержание Сибутрамина в БАД к пище составляло от 0,14 до 7,4% (от 0,28±10% до 21,0±10% мг/капс.), что превышает разовую дозу (высшая разовая доза-15 мг).

Полученные результаты сопоставимы с результатами, полученными с помощью метода ВЭЖХ-ДМД.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Разработана унифицированная методика количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище с применением метода капиллярного электрофореза. Показано, что оптимальными условиями являются: кварцевый капилляр длиной 56 см с внутренним диаметром 50 мкм; фосфатный буфер 50 ммоль рН=7,0±0,1; длина волны – 225±2 нм. Примерное время удерживания – 6 мин. Охарактеризованы параметры пригодности хроматографической системы.

2. Установлены пределы обнаружения (LOD) и количественного определения (LOQ) на уровне 0,005 мг/мл; 0,0125 мг/мл соответственно.

3. Проведена валидация методики определения Сибутрамина с применением КЭ. По результатам анализа методом КЭ модельных смесей ЛП и БАД к пище. Доказана специфичность предлагаемой методики, линейность, правильность, прецизионность (сходимость).

4. Показана пригодность разработанной методики для определения Сибутрамина в промышленных образцах лекарственных препаратов и выявления его в БАД к пище, в составе которых он не обозначен.

5. Установлено количественное содержание Сибутрамина в лекарственных препаратах от 99,6%±10% до 100,4%±10% от заявленного. В результате анализа БАД к пище 22 наименований, в 6 из них доказано его наличие и установлено содержание в пределах 0,28±10% – 21,0±10% мг/капс., что превышает разовую дозу 15 мг.

ГЛАВА 5. МЕТОДИКИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО И ПОДТВЕРЖДАЮЩЕГО МЕТОДОВ АНАЛИЗА СИБУТРАМИНА В БАД К ПИЩЕ

5.1. Предварительный метод анализа Сибутрамина – ТСХ

Метод тонкослойной хроматографии является оптимальным для проведения скринингового анализа БАД к пище на наличие в них Сибутрамина.

5.1.1. Разработка методики обнаружения Сибутрамина методом ТСХ

Разработка методики обнаружения Сибутрамина в составе БАД к пище методом ТСХ предполагает решение двух основных вопросов:

- 1) подбор условий хроматографического разделения Сибутрамина и компонентов БАД к пище;
- 2) обнаружение Сибутрамина в тонком слое сорбента на фоне многокомпонентной матрицы БАД к пище.

Эффективность хроматографического разделения обусловлена прежде всего выбором сорбента, подвижной фазы, воспроизводимостью значений R_f , стандартизацией методики и в какой-то мере техникой эксперимента и условиями проведения хроматографического анализа.

Известно, что при выборе систем растворителей пользуются элюотропными рядами с учётом физико-химических свойств разделяемых веществ и применяемых сорбентов [61].

Как следует из обзора литературы [56; 86] для обнаружения Сибутрамина методом ТСХ предложено несколько систем растворителей, из которых в ходе предварительных исследований были выбраны наиболее эффективные – S1 и S2:

S1. Ацетон – хлороформ – 25% аммиак – диоксан (5:45:2,5:47,5)

S2. Тoluол – диэтиламин (10:0,3)

В работе в качестве неподвижной фазы использовали силикагель, нанесенный на подложку фирмы Merck – TLC Silica gel 60.

Раствор стандарта Сибутрамина готовили согласно пунктам 3.3.

Раствор анализуемых объектов готовили согласно пунктам 3.3.

5.1.2. Техника хроматографирования

Использован общепринятый метод восходящей хроматографии. На хроматографическую пластинку размером 10x20 см на расстоянии 1,5 см от нижнего края и 1,0 см от правого и левого краев с помощью микрошприца наносили по 2 мкл стандартного раствора Сибутрамина в метаноле с концентрацией 0,1 мг/мл и экстрактов анализируемых БАД к пище в токе

холодного воздуха. Герметично закрытую хроматографическую камеру насыщали парами подвижной фазы в течение 20 минут и хроматографировали до достижения ПФ линии финиша.

После удаления растворителя в токе холодного воздуха пятна Сибутрамина детектировали предложенными способами. Исследование в каждой системе растворителей проводили в шести повторях с последующей статистической обработкой полученных результатов.

5.1.3. Способы детектирования Сибутрамина в тонком слое сорбента

Исходя из того, что Сибутрамин представляет собой соль азотистого основания, нами были предложены два реактива:

1. Пары йода (универсальный детектирующий реагент) [61].

Приготовление: на дно герметично закрытой стеклянной камеры помещают несколько кристаллов йода и насыщают камеру его парами.

2. Реактив Драгендорфа готовили согласно ОФС.1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы» [14].

После хроматографирования пластинок в системах S1 и S2 и удаления остатков органических растворителей проводили детектирование Сибутрамина, помещая хроматограммы в йодную камеру, при этом появлялись пятна темно-коричневого цвета; при обработке пластинок реактивом Драгендорфа Сибутрамин визуализировался в виде ярко-оранжевых пятен, полученных только в S1, что свидетельствует о влиянии компонентов системы S2 на реакцию взаимодействия Сибутрамина с общеалкалоидным реактивом.

Значение R_f Сибутрамина – стандарта в системе S1 – $0,92 \pm 0,02$; в системе растворителей – S2 – $0,72 \pm 0,02$. Величина R_f Сибутрамина, соответствующая значению $0,92$ в системе S1, не является хроматографически оптимальной.

В этой связи, в результате экспериментальных исследований нами была предложена трехкомпонентная система растворителей состава – хлороформ:ацетон:диоксан (9:1:9,5) с оптимальным значением R_f – $0,67 \pm 0,02$ и возможностью обнаружения Сибутрамина двумя реагентами – парами йода и реактивом Драгендорфа.

Предел обнаружения Сибутрамина в парах йода составляет 1 мкг, при детектировании реактивом Драгендорфа – 0,5 мкг вещества в зоне.

5.1.4. ТСХ – скрининг БАД к пище

Проводили скрининг 22 БАД к пище (табл. 4) на основе предложенных хроматографических параметров (система S3, детектирование: пары йода, реактив Драгендорфа). Схема анализа БАД к пище (№3,9,17-20) в системе S3 приведена на рисунке 36.

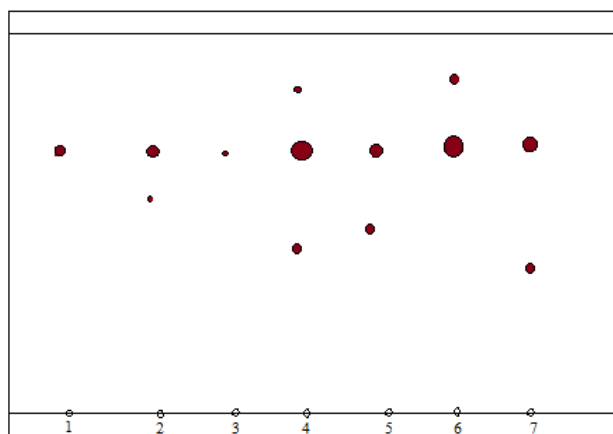


Рисунок 36 – Схема ТСХ – скрининга БАД к пище (детектирующий реагент – пары йода):

1 – стандарт Сибутрамина с концентрацией 0,1 мг/мл;

2 – БАД к пище №3;

3 – БАД к пище №9;

4 – БАД к пище №17;

5 – БАД к пище №18;

6 – БАД к пище №19;

7 – БАД к пище №20

При обработке хроматографической пластинки реактивом Драгендорфа пятна приобретают ярко-оранжевую окраску.

Время анализа составило 20 минут.

В результате ТСХ – скрининга 22 наименований БАД к пище Сибутрамин был обнаружен в 6 образцах: БАД к пище №3, 9, 17-20.

Следующим этапом нашей работы было изучение влияния компонентов БАД к пище на результаты ТСХ – скрининга.

Из полученной схемы анализа следует, что входящие в состав БАД к пище вещества не мешают определению Сибутрамина во всех анализируемых образцах в разработанных параметрах ТСХ – скрининга (рисунок 36).

5.2. Подтверждающий метод определения Сибутрамина – ВЭЖХ-МС

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектора является перспективным в области аналитической химии и фармакопейного анализа. Он используется для идентификации и количественного определения активных фармацевтических субстанций в лекарственных препаратах, компонентов в сложном матрице биологически активных добавок к пище, а также позволяет определять следовые количества примесных веществ. Метод сочетает в себе возможность не только разделения компонентов, но и проведение масс – анализа, то есть дает возможность в точности определить

анализируемый компонент с наиболее высокой точностью. Полученная масс-спектрометрическая информация, масса молекул или их фрагментов – это важный параметр для качественного анализа, который выполняется на рутинном уровне путем сравнения масс – спектра, полученного при анализе со стандартными спектрами. Такую возможность дают системы обработки данных с соответствующим программным обеспечением и наборами спектров для сравнения. Таким образом, масс-спектрометрический может заменить все обычные детекторы. Высокая степень ионизации у этих детекторов означает высокую чувствительность, а возможность разделения по массам – уникальную селективность.

В этой связи, нами проведены исследования по применению ВЭЖХ-МС для определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и БАД к пище.

5.2.1. Установление параметров ВЭЖХ-МС

Условия детектирования на масс-спектрометрическом детекторе нами были установлены экспериментально.

Неподвижную фазу подбирали, основываясь на результатах исследования по применению метода высокоэффективной хроматографии с ультрафиолетовым диодноматричным детектором, используя аналогичную хроматографическую колонку 5 мкм C18 150x4.6 мм. Скорость потока была снижена до 0,5 мл/мин; использован градиентный режим элюирования благодаря высокой чувствительности МС-детектора.

Выбор подвижной фазы сделан в пользу водного раствора формиата аммония 10 ммоль, что отличается от концентрации раствора данной соли, используемой в ВЭЖХ-ДМД (50 ммоль). Это связано с тем, что масс-детектор чувствителен к растворам солей высоких концентраций.

В качестве растворителя использовали метанол безводный.

5.2.2. Условия хроматографического разделения

Условия хроматографического разделения представлены в таблицах 34, 35.

Таблица 34 – Параметры хроматографического разделения

Параметры	
Насос	
– состав подвижной фазы	А - водный раствор формиата аммония 10 ммоль В - ацетонитрил
– режим элюирования	Градиентное элюирование (таблица 38)

Параметры	
– скорость потока	0,5 мл/мин
Рабочие параметры:	
Температура колонки, °С	30
Объем вводимой пробы	5 мкл
Сканирование масс	
– источник ионизации	прогреваемый электроспрей
– режим работы	регистрация положительных ионов
– диапазон детектируемых масс веществ, Да	200 – 1000
– детектируемые массы, Да	280, 282
– напряжение на капилляре, кВ	3,5
– поток газа-осушителя (азот), л/мин	10,0
– температура газа, °С	350
Хроматографические характеристики методики	
– примерное время удерживания, мин. (t _R)	10,8 мин.

Таблица 35 – Режим градиентного элюирования

Время, мин	Объем элюента В (ацетонитрил), %
0-3,0	80
3,0-6,0	85
6,0-8,0	90
8,0-10,0	95
10,0-12,0	100
12,1-12,8	95
12,8-13,5	90
14,2-14,9	85
14,9-15,0	80
15,0-20,0	80

Общее время анализа составило 15 мин.

5.2.3. Пробоподготовка

Приготовление подвижной фазы

Приготовление водного раствора формиата аммония (10 ммоль NH_4HCO_2)

Для приготовления раствора формиата аммония NH_4HCO_2 с концентрацией 10 ммоль в стакан объемом 500 мл отмеряли 450 мл воды Milli-Q и, тщательно перемешивая, прибавляли 315 мг формиата аммония. Содержимое переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, довели водой Milli-Q до метки и перемешивали.

Приготовление раствора стандарта Сибутрамина 0,01 мг/мл

1 мл приготовленного раствора стандарта Сибутрамина (п.3.3) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, довели до метки метанолом, перемешивали, получая раствор стандарта Сибутрамина с концентрацией 0,01 мг/мл.

Приведены хроматограммы растворителя, раствора стандарта Сибутрамина, БАД к пище №4, модельной смеси Сибутрамина и БАД к пище №4 (рисунки 37 – 42).

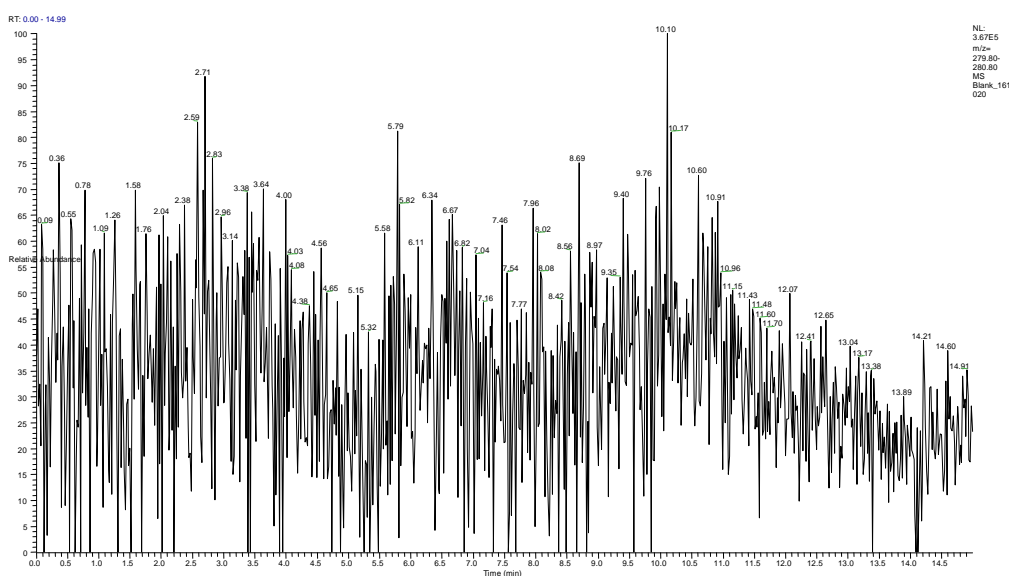


Рисунок 37 –Хроматограмма метанола

Условия – раздел 5.2.2

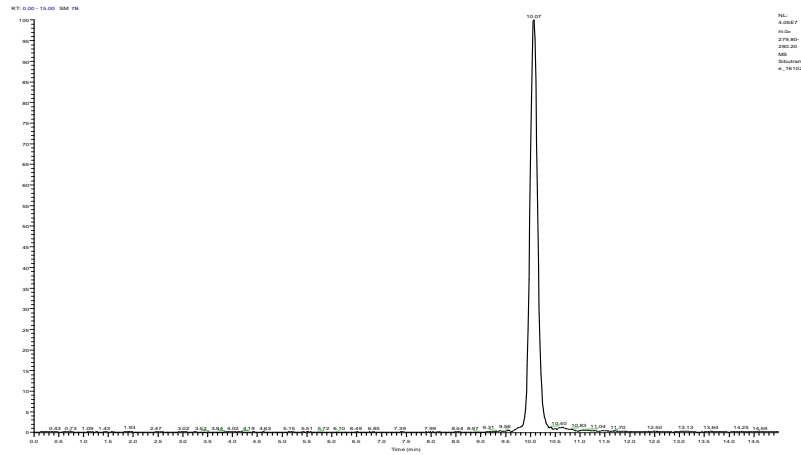


Рисунок 38 – Хроматограмма раствора стандарта Сибутрамина 0,1 мг/мл
Условия – раздел 5.2.2

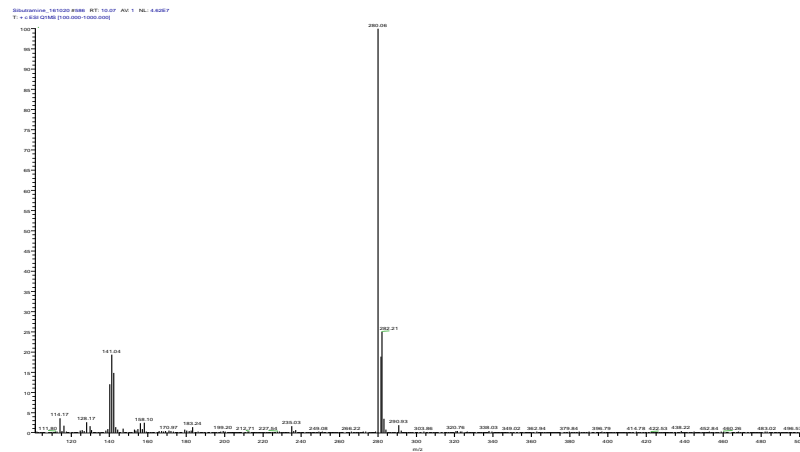


Рисунок 39 – Масс-спектр раствора стандарта Сибутрамина
Условия – раздел 5.2.2

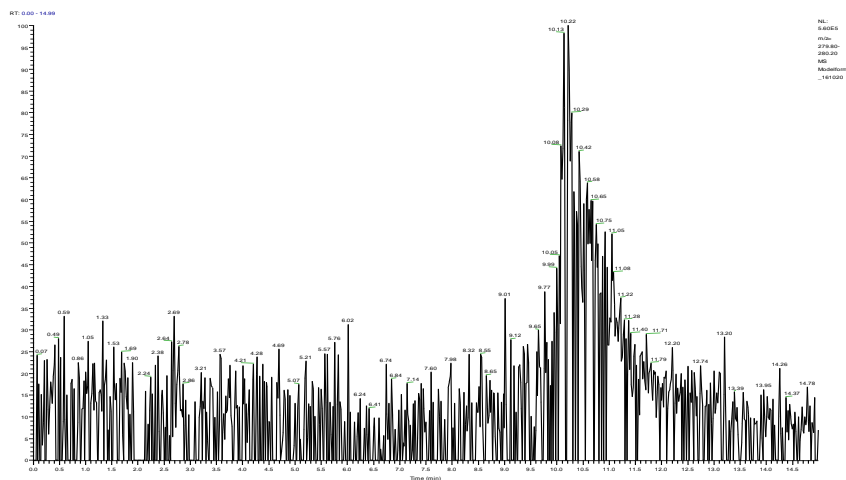


Рисунок 40 – Хроматограмма БАД к пище №4
Условия – раздел 5.2.2

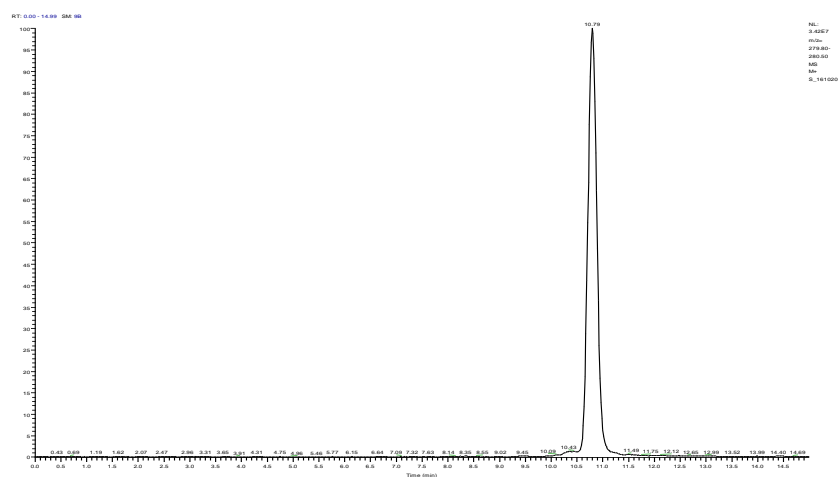


Рисунок 41 – Хроматограмма модельной смеси (Сибутрамин и БАД к пище)

Условия – раздел 5.2.2

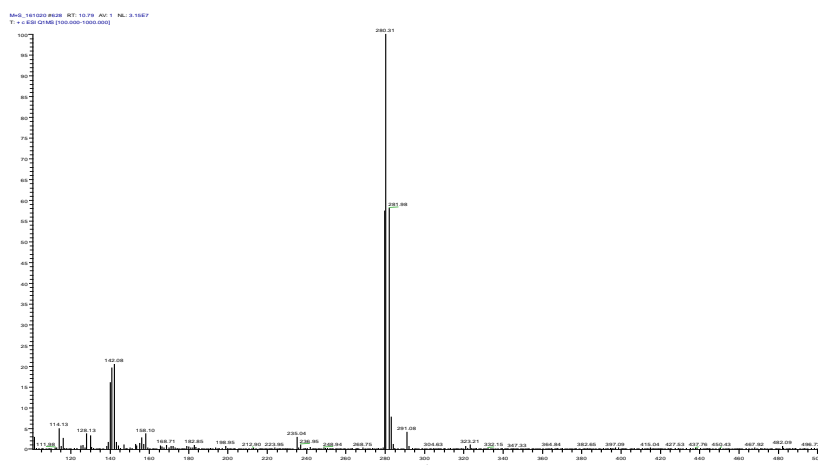


Рисунок 42 – Масс-спектр модельной смеси (Сибутрамин и БАД к пище)

Условия – раздел 5.2.2

Метформин также не влиял на определение Сибутрамина.

С помощью данного метода можно обнаружить Сибутрамин в БАД к пище (рисунки 43, 44).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработана схема предварительного скрининга многокомпонентных БАД к пище анорексигенного действия на наличие Сибутрамина с применением метода ТСХ.

2. Установлены оптимальные условия обнаружения Сибутрамина в БАД к пище: НФ – силикагель Мерск 60; ПФ – S1–S3. Показаны преимущества S3, разработанной в результате собственных экспериментальных исследований ($R_f = 0,67$). Для детектирования Сибутрамина в тонком слое сорбента предложено два реагента: пары йода и реактив Драгендорфа.

3. Установлено, что компоненты БАД к пище, экстрагируемые в процессе пробоподготовки объектов, не влияют на результаты предварительного определения Сибутрамина в них.

4. В качестве подтверждающей разработана методика определения Сибутрамина в биологически активных добавках к пище с применением метода ВЭЖХ-МС. Условия анализа: НФ – хроматографическая колонка MACHERRY-NAGEL NUCLEOSIL 5 мкм C18 150x4.6 мм; ПФ – ацетонитрил: раствор формиата аммония 60:40; режим элюирования – градиентное; скорость потока – 0,5 мл/мин; детектируемые массы – 280, 282 Да. Примерное время удерживания – 10,8 мин.

5. Установлено, что предел обнаружения Сибутрамина в биологически активных добавках к пище по методике ВЭЖХ-МС составляет 0,0005 мг/мл.

6. Показано, что в условиях разработанной методики растворитель и вспомогательные компоненты БАД к пище не влияют на определение Сибутрамина.

7. Доказано наличие Сибутрамина в 6 БАД к пище (БАД №3, 9, 17, 18, 19, 20) при отсутствии его в их составе, что соотносится с результатами, полученными с применением метода ВЭЖХ-ДМД.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено информационно-аналитическое исследование данных литературы по вопросам идентификации и количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище. Установлено, что приоритетное значение имеют методы ВЭЖХ-ДМД и КЭ, позволяющие достоверно определять его в объектах сложного состава. Обоснованы общие подходы к аналитическому контролю ЛП и БАД к пище с учетом свойств Сибутрамина и состава объектов исследования.

2. Установлены оптимальные условия пробоподготовки ЛП и БАД к пище для последующего определения Сибутрамина. Показано, что для экстракции Сибутрамина с целью проведения хроматографических методов оптимальным растворителем является метанол; при использовании КЭ – рабочий электролит.

3. Разработана и валидирована унифицированная методика количественного определения Сибутрамина в лекарственных средствах и биологически активных добавках к пище с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым диодноматричным детектором. Оптимальные условия анализа: НФ – Хроматографическая колонка MACHERRY-NAGEL NUCLEOSIL 5 мкм C18 150x4.6 мм; ПФ – ацетонитрил:формиатный буфер 60:40 (по объему); скорость потока – 1 мл/мин; t° термостата колонки – 40°C; длина волны – 225 нм. Примерное время удерживания Сибутрамина – 5 мин. Предел обнаружения составил 0,004 мг/мл, предел количественного определения – 0,01 мг/мл.

4. Разработана и валидирована унифицированная методика количественного определения Сибутрамина в лекарственных препаратах и БАД к пище с применением метода капиллярного электрофореза. Оптимальные условия анализа: кварцевый капилляр длиной 56 см с внутренним диаметром 50 мкм; рабочий электролит – фосфатный буфер 50 ммоль рН=7,0±0,1; t° – 20°C; напряжение - +20 кВ; сила тока – 100 мА; длина волны – 225 нм. Примерное время удерживания Сибутрамина – 6 мин. Предел обнаружения и предел количественного определения составляют 0,005 мг/мл, 0,0125 мг/мл соответственно.

5. Для проведения предварительного и подтверждающего анализов исследуемых биологически активных добавок к пище разработаны методики с применением ТСХ и ВЭЖХ-МС.

6. Доказана возможность применения разработанных методик для контроля лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище на содержание Сибутрамина. Содержание Сибутрамина в лекарственных препаратах, установленное методами ВЭЖХ-ДМД и КЭ, находится в пределах 99,8%±10% – 100,4%±10%; 99,6%±10% – 100,4%±10% соответственно. При анализе БАД к пище 22 наименований, в 6 выявлено наличие

недекларированного компонента – Сибутрамина – в количестве $0,3 \pm 10\% - 21,0 \pm 10\%$ мг/капс.; $0,28 \pm 10\% - 21,0 \pm 10\%$ мг/капс. с применением ВЭЖХ-ДМД и КЭ соответственно, при высшей суточной дозе 15 мг, что дает основание отнести эти объекты к фальсифицированной продукции.

Практические рекомендации

Разработанные методики целесообразно использовать при проведении контроля качества лекарственных препаратов на стадиях производства лекарственных форм и сертификации готовой продукции, а также БАД к пище в лабораториях Таможенного союза и Роспотребнадзора с целью выявления Сибутрамина и его количественного определения на основе комплекса методов высокоэффективной жидкостной хроматографии, капиллярного электрофореза, а также методик предварительного и подтверждающего анализа.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспектива дальнейшего применения разработанных методик определяется включением их в нормативную документацию как на активную фармацевтическую субстанцию Сибутрамина, так и на лекарственные препараты анорексигенного действия. Внедрение данных методик в практику работы контрольно – аналитических лабораторий различного уровня направлено на повышение эффективности контроля ЛП, усиление мониторинга БАД к пище на наличие сильнодействующих фармацевтических субстанций. Разработанные методики с применением ВЭЖХ-ДМД и КЭ рекомендуются для контроля ЛС анорексигенного действия, содержащих Сибутрамин; анализа БАД к пище – с целью выявления в них данной фармацевтической субстанции и решения вопроса об отнесении такой продукции к фальсифицированной.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФС – активная фармацевтическая субстанция
- БАВ – биологически активное вещество
- БАД – биологически активные добавки
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭЖХ-ДМД – высокоэффективная хроматография с диодно-матричным детектированием
- ВЭЖХ-МС – высокоэффективная хроматография с масс-спектрометрией
- ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная хроматография с УФ-детектированием
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
- ГХ – газовая хроматография
- ДДМС – М₂ – дидесметилсIBUTРАМИН
- ДМД – детектор на диодной матрице
- ДМС – М₁ – десметилсIBUTРАМИН
- ИК – спектроскопия – инфракрасная спектроскопия
- КЭ – капиллярный электрофорез
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛПВП – липопротеиды высокой плотности
- ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
- ЛС – лекарственное средство
- МКЦ – целлюлоза микрокристаллическая
- ПИД – пламенно-ионизационный детектор
- СД – сахарный диабет
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- ТФЭ – твердофазная экстракция
- ЦНС – центральная нервная система
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- FDA – food and drug administration
- OECD - The Organization for Economic Co-operation and Development

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аметов А.С., Прудникова М.А. Роль препаратов для снижения массы тела в поэтапном управлении сахарным диабетом типа 2: фокус на сибутрамин / А.С. Аметов, М.А. Прудникова // Эндокринология: новости. Мнения. Обучение. - 2017. – №1. – С. 52 – 56.
2. Аникина Н. В. Клинико-лабораторная характеристика различных форм ожирения женщин с оценкой эффективности комплексного терапевтического лечения: дис. ...канд. мед. наук: 14.01.04/Аникина Наталья Вадимовна. – Пермь, 2016. – 131 с.
3. Биологически активные добавки к пище / под ред. Г.В. Раменской – М.: Издательство Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, 2013. – 192 с.
4. Бирюкова Е. В. Молекулярно-генетические, гормонально-метаболические и клинические аспекты метаболического синдрома: дис. ...д-р. мед. наук: 14.00.03/Бирюкова Елена Валерьевна. – М., 2009. – 394 с.
5. Боровикова Н.А. Экстракционные препараты из коры крушины и методологические подходы к определению антраценпроизводных в них // Химия растительного сырья. – 2019. – №2. – С. 73 – 81.
6. Валидация аналитических методик для производителей лекарств / Под редакцией В.В. Береговых – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.
7. Волкова Г.Е. Пищевое поведение, эмоционально-личностные особенности и медиаторы энергетического обмена у больных ожирением: ...канд. мед. наук: 14.01.02/Волкова Гюзель Евгеньевна. – М., 2011. – 153 с.
8. Волкова Н.И. Современные подходы к патогенетической терапии ожирения / Н.И. Волкова // Ожирение и метаболизм. – 2007. – №4. – С. 14 – 18.
9. Всемирный антидопинговый кодекс. Международный стандарт. Запрещенный список 2020 года.
10. Выдрыч А.Н. Ожирение в практике врача-гениколога: клинический случай // Consilium Medicum. – 2015. – Vol. 17. – №6. – Р. 49–55.
11. Гаммель И.В. Современные аспекты классификации и регулирования оборота биологически активных добавок к пище / И.В. Гаммель, О.В. Суворова, Л.И. Запорожская // Медицинский альманах. – 2017. – Т. 46. – №1. – С. 94–98.
12. Глобальный план действий по профилактике неинфекционных заболеваний и борьбе с ними на 2013-2020 гг. – Женева: Всемирная организация здравоохранения. – 2014. – 107 с.

13. ГОСТ Р 56202-2014 Продукция пищевая специализированная. Биологически активные добавки к пище. Требования к производству в соответствии с принципами надлежащей производственной практики. – М.: Стандартиформ, 2018. – 19 с.
14. Государственная Фармакопея Российской Федерации 14 издание: офиц. текст. – М: Федеральная электронная медицинская библиотека, 2018.
15. Давыдов С. А. Posteriori: БАД и другие / С. А. Давыдов // Ремедиум. – 2013. – С. 50 – 55.
16. Далантаева Н. С. Центральные механизмы, регулирующие энергетический обмен, и сибутрамин / Н. С. Далантаева, Е. А. Пигарова, Л. К. Дзеранова // Ожирение и метаболизм. – 2012. – №3. – С. 33-36.
17. Дедов И.И. Национальные клинические рекомендации по лечению морбидного ожирения у взрослых. Пересмотр 3-й (Лечение морбидного ожирения у взрослых) / И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко, М.В. Шестаков [и др.] // Ожирение и метаболизм. – 2018. – Т. 15 – №1. – Р. 53–70.
18. Жукова О. Таблетки для стройности: история и современность / О. Жукова // Аптекарь. – 2013. – №10 (99).
19. Калинин С.Ю. Влияние ожирения и инсулинорезистентности на репродуктивное здоровье женщин / С. Ю. Калинин, Л.О. Ворслов, И.А. Тюзиков [и др.] // Медицинский совет. – 2015. – №4. – С. 82–87.
20. «Кодекс Российской Федерации об административных правонарушениях» от 30.12.2001 №195-ФЗ (ред. от 18.02.2020) // Собрание законодательства РФ. – 07.01.2002. – №1 (ч. 1), ст. 1.
21. Кондрашкина О.В. Влияние сибутрамина на половую функцию у мужчин с ожирением: дис. ...канд. мед. наук: 14.00.25/Кондрашкина Ольга Викторовна. – М., 2007. – 79 с.
22. Лерман О.В. Медикаментозное лечение ожирения: особенности врачебных назначений, информированность, приверженность и отношение больных к лекарственной терапии ожирения / О.В. Лерман, Ю.В. Лукина, Н.П. Кутищенко [и др.] // Клиницист. – 2019. – Т. 13. – №1–2. – С. 27–33.
23. Мельниченко Г.А. Опыт применения препарата Орсотен (орлистат) у больных ожирением / Г.А. Мельниченко, К.А. Комшилова, М.А. Берковская // Ожирение и метаболизм. – 2010. – №1. – С. 46 – 50.
24. Министерство Здравоохранения Российской Федерации [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/ru>.
25. Мохов А.А. Правовой режим наименований биологически активных добавок / А.А. Мохов, Ю.С. Харитонов // Актуальные проблемы российского права. – 2017. – Т. 84. – №11– С. 103 – 114.

26. Петренко А.С. Законодательное регулирование обращения биологически активных добавок к пище в Европейском союзе и отдельных странах Европы. Часть 1 / А.С. Петренко, М.Н. Пономарева, Б.П. Суханов // Вопросы питания. - 2014. – Т. 83. – №3. – С. 32 – 40.
27. Петров В.А. Основные проблемы, ассоциируемые с производством, оборотом и применением биологически активных добавок к пище и пути их решения / В.А. Петров, А.А. Важенина, А.В. Посохова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2015. – Т. 62 – №4. – С. 89 – 95.
28. Петунина Н.А. Опыт применения сибутрамина в комбинации с микрокристаллической целлюлозой в клинической практике / Н.А. Петунина, М.Э. Тельнова, Е.В. Гончарова [и др.] // Медицинский совет. - 2019. - №21. – С. 214 –218.
29. Пилат Т.Л., Иванов А.А. Биологически активные добавки к пище: (теория, производство, применение). М.: Авваллон, 2002. – 710 с.
30. Постановление Правительства РФ от 29 декабря 2007 г. N 964 "Об утверждении списков сильнодействующих и ядовитых веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации, а также крупного размера сильнодействующих веществ для целей статьи 234 Уголовного кодекса Российской Федерации" (с изменениями и дополнениями).
31. Пьяных О.П. Преимущества долгосрочного управления метаболическим здоровьем у пациентов с ожирением и ранними нарушениями углеводного обмена / О.П. Пьяных, Д.Г. Гусенбекова, А.С. Аметов // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2020. – Т. 9. – №2. – С. 40–48.
32. Регистр БАД – Единый Электронный Справочник Биологически Активных Добавок [Электронный ресурс] // <http://www.registrbad.ru/>.
33. Регистр лекарственных средств России [Электронный ресурс] // <https://www.rlsnet.ru/>.
34. Романцова Т.И. Сибутрамин: Эффективность и безопасность применения в рутинной клинической практике / Т.И. Романцова // Ожирение и метаболизм. – 2015. – Т. 8. – №3. – С. 18 – 24.
35. Р 4.1.1672-03. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище» МЗ РФ 30.06.2003.
36. Руюткина Л.А. Ожирение: «перекрестки» мнений, знаний и возможностей / Л.А. Руюткина, Д.С. Руюткин // Медицинский совет. – 2020. – №7. – С. 108–120.
37. СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» // Российская газета. – 15.06.2002. – №106.

38. СанПиН 2.3.2.1290-03 «Гигиенические требования к организации производства и оборота биологически активных добавок к пище (БАД)» // Российская газета. – 05.06.2003. – №108.
39. Стерн К. И. Исследование биологически активной добавки для похудения методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором / К. И. Стерн // Украшський медичний альманах. – 2012. – Т. 15. – № 5. – С. 356.
40. Стерн К.И. Правовые аспекты производства биологически активных добавок для похудения, содержащих растительные компоненты / К.И. Стерн, П.С. Машенко, Т.Л. Малкова // Медицинская Экспертиза и Право. – 2014. – №1. – С. 3 – 8.
41. Стерн К. И. Разработка и валидация методики количественного определения десметилсIBUTРАМИНА методом ГЖХ с пламенно-ионизационным детектированием / К. И. Стерн, Т. Л. Малкова // Электронный журнал «Современные проблемы науки и образования». – 2014. – № 6. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/120-15483>.
42. Стерн К. И. Разработка способов определения производных сибутрамина в биологически активных добавках, используемых при контроле массы тела: дис. ...канд. фарм. наук: 14.04.02/Стерн Кристина Ильинична. – М., 2015. – 135 с.
43. Суханова А.М. Аналитические методы определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов. Использование методик определения сибутрамина в БАД к пище анорексигенного действия / А.М. Суханова, И.Б. Перова, В.И. Гегечкори [и др.] // Вестник «Южно-казахстанской медицинской академии». – 2019. – Т. 87. – №3. – С. 80–82.
44. Суханова А.М. Анорексигенный препарат сибутрамин. Возможная фальсификация БАД к пище / А.М. Суханова, В.И. Гегечкори, Г.М. Родионова // Медицинское образование и вузовская наука. – 2018. – №3 – 4. – С. 157–159.
45. Суханова А.М. Использование сибутрамина в лекарственных препаратах и БАД к пище анорексигенного действия (обзор) / А.М. Суханова, И.Б. Перова, Г.М. Родионова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8. – №1. – С. 97 – 101.
46. Суханова А.М. Лекарственные средства анорексигенного действия. Сибутрамин в многокомпонентных лекарственных препаратах и возможные способы фальсификации БАД к пище / А.М. Суханова, Родионова Г.М., Белова М.В. // Естественные и технические науки. – 2019. – Т. 128 – №2. – С. 20-26.
47. Суханова А.М. Методы выявления недекларируемого добавления сибутрамина к биологически активным добавкам к пище / А.М. Суханова, Г.М. Родионова, К.И. Эллер

- [и др.] // Материалы III научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности». – 2019. – С. 20–22.
48. Суханова А.М. Определение лекарственного вещества сибутрамина физико-химическими методами в составе многокомпонентных биологически активных добавок к пище / А.М. Суханова, Н.И. Пономарёва, И.Б. Перова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т.54. – №11. – С. 57-61.
49. Суханова А.М. Определение сибутрамина в биологически активных добавках к пище методом капиллярного электрофореза / А.М. Суханова, Г.М. Родионова, К.И. Эллер [и др.] // Материалы VII международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации». – 2020. – Т. 91. – №4. – С. 160–161.
50. Суханова А.М. Разработка и валидация методики количественного определения сибутрамина в биологически активных добавках к пище методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А.М. Суханова, И.Б. Перова, А.С. Кошечкина [и др.] // Вопросы питания. – 2020. – Т.89. – №6. – С. 123-129.
51. Суханова А.М. Разработка и валидация методики количественного определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов методом КЭ / А.М. Суханова, И.Б. Перова, К.И. Эллер [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т.9. – №4. – С. 141-145.
52. Суханова А.М. Разработка и валидация методики определения сибутрамина в лекарственных препаратах / А.М. Суханова, И.Б. Перова, К.И. Эллер [и др.] // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2020. – Т.30. – №4. – С. 28-33.
53. Тимофеева М.Ю. Проблемы регулирования биологически активных добавок на пути реализации «ответственного самолечения» (клинико-правовой аспект) / М.Ю. Тимофеева, Ю.С. Тимофеев, С.Д. Нечаева // Медицинское право: теория и практика. – 2018. – Т. 8. – №2 – С. 135 – 141.
54. ТР ТС 029/2012 Технический регламент Таможенного союза «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» (с изменениями на 18 сентября 2014 года).
55. ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" (с изменениями на 8 августа 2019 года).
56. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией: учеб. пособие для самост. подгот. студентов, обучающихся по специальности «Фармация» / под общ. ред. А.П. Арзамасцева– М.: ГЭОТАР–Медиа, 2010. – 240 с.

57. Федеральный закон от 02.01.2000 №29-ФЗ (ред. от 27.12.2019) «О качестве и безопасности пищевых продуктов» // Собрание законодательства РФ. – 10.01.2000. – №2. – ст.150.
58. Федеральный закон от 13.03.2006 №38-ФЗ (ред. от 02.08.2019) «О рекламе» // Собрание законодательства РФ. – 20.03.2006. – №12. – ст.1232.
59. Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/folder/210/document/13218>.
60. Федеральная таможенная служба [Электронный ресурс] // http://mot.customs.ru/search?q=%D1%81%D0%B8%D0%B1%D1%83%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD&date_since=&date_until.
61. Хроматография в тонких слоях / под ред. Шталя Э. – М.: Мир, 1965. – 508 с.
62. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Бёккер – М.: Техносфера, 2009. – 472 с.
63. Шабров Р.В. Закон против фальсификации лекарственных средств и биологически активных добавок / Р.В. Шабров, Н.Ю. Луц, А.Д. Шадрин // Ремедиум. – 2015. – С. 8–13.
64. Шиманская С.В. Понятие и сущность биологически активных добавок как объектов правоотношений / С.В. Шиманская // Право и государство: теория и практика. – 2019. – Т. 172. – №4. – С. 16–19.
65. Шишкова В.Н. Сибутрамин в лечении ожирения / В.Н. Шишкова, А.Б. Хадзегова, Е.Н. Ющук // Ожирение и метаболизм. – 2010. – №2. – С. 16–20.
66. Шупенина Е.Ю. Опыт применения сибутрамина у пациентов с ожирением и контролируемой артериальной гипертензией / Е.Ю. Шупенина, Е.Н. Ющук, Ю.А. Васюк [и др.] // Ожирение и метаболизм. – 2019. – Т. 16 – №2. – С. 42–48.
67. Эллер К.И. Тенденция развития аналитических методов определения качества и подлинности пищевых продуктов / К.И. Эллер, И.Б. Перова // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89. – №4. – С. 255–261.
68. Юринская А.А. Ожирение, патогенез сердечно-сосудистых осложнений при ожирении / А.А. Юринская // Бюллетень Северного Государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 41. – №2. – С. 123-125.
69. Akamatsu S. Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry / S. Akamatsu, T. Mitsuhashi // Drug Test. Anal. - 2014. – Vol. 6. – №5. – P. 426–433.
70. Ahmad U. Antihyperlipidemic efficacy of aqueous extract of *Stevia rebaudiana Bertoni* in albino rats / U. Ahmad, R.S. Ahmad, M. Arshad [et al.] // Lipids Health Dis. – 2018. – Vol. 17. – №1. – P. 175.

71. Aragwal U.P. Analysis of Cellulose and Lignocellulose Materials by Raman Spectroscopy: A Review of the Current Status // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – №9. – P. 1659.
72. Askarpour M. Efficacy of l-carnitine supplementation for management of blood lipids: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials / M. Askarpour, A. Hadi, M. Miraghajani // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* – 2019. – Vol. 29. – №11. – P. 1151–1167.
73. Atole D.M. Ultraviolet spectroscopy and its pharmaceutical applications- A brief review / D.M. Atole, H. Rajput // *Asian J. Pharm. Clin. Res.* – 2018. – Vol. 11. – №2. – P. 59.
74. Blundell J. Serotonin and Dietary Fat Intake: Effects of Dexfenfluramine / J. Blundell, C. Lawton // *Metabolism*. – 1995. – Vol. 44. – №2. – P. 33-37.
75. Chen C. Elemental analysis, chemical composition, cellulose crystallinity, and FT-IR spectra of *Toona sinensis* wood / C. Chen, J. Luo, W. Qin [et al] // *Monatsh. Chem.* – 2014. – Vol. 145. – №1. – P. 175–185.
76. DiNicolantonio J. J. Effects of spirulina on weight loss and blood lipids: a review / J. J. DiNicolantonio, A. G. Bhat, J. O'Keefe // *Open Heart*. – 2020. – Vol. 7. – №1. – e001003.
77. DrugBank [Электронный ресурс] // <https://go.drugbank.com/drugs/DB01105>.
78. Fentress D. New anti-obesity drug comes to market / D. Fentress // *Diabetes Forecast*. – 1998. – Vol.51. – №6. – P. 33 – 34.
79. Geist J. Focusing In On Adderall. – Food & Drug Law, Professor Neal Fortin, 2007. – 22 pp.
80. Gilard V. Quality control of herbal medicines assessed by NMR / V. Gilard, S. Balayssac, M. Malet-Martino [et al.] // *Current Pharmaceutical Analysis*. – 2010. – Vol. 6. – №4. – P. 873 – 876.
81. GlaxoSmithKline launches alli® (orlistat 60 mg). - GlaxoSmithKline, 2009. [Электронный ресурс]. // Режим доступа: <https://www.gsk.com/en-gb/media/press-releases/glaxosmithkline-launches-alli-orlistat-60-mg/>.
82. Grundy S.M. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute. American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition / S.M. Grundy, H.B. Jr. Brewer, J.I. Cleeman [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – №3. – P. 433 – 438.
83. Hammadi R. A fully validated HPLC-UV method for quantitative and qualitative determination of six adulterant drugs in natural slimming dietary supplements / R. Hammadi, M. Amer. Almardini // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. - 2014. – Vol. 29. – №1 – P. 171 – 174.

84. Hancu G. Enantiometric separation of sibutramine by capillary zone electrophoresis / G. Hancu, A. Hilochie, A.-R. Vlad [et al.] // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2016. – Vol. 27. – №6. - P. 1116 – 1120.
85. Hayamizu K. Effects of garcinia cambogia (Hydroxycitric Acid) on visceral fat accumulation: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial / K. Hayamizu, Y. Ishii, I. Kaneko [et al.] // *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* – 2003. – Vol. 64. – №8. – P. 551–567.
86. Hayun. Determination of sibutramine adulterated in herbal slimming products using TLC densitometric method / Hayun, B.P. Maggadani, N. Amalina // *Indones. J. Pharm.* – 2016. – Vol. 27 – №1. – P. 15 – 21.
87. Hemdan A. HPLC – UV chromatographic methods for detection and quantification of undeclared withdrawn synthetic medications in counterfeit herbal medicines with confirmation by HPLC – PDA and mass spectrometry / A. Hemdan, S.M. Tawakol // *Chromatographia.* – 2018. – №5. – P. 777-783.
88. Inchley J.C. Growing up unequal: gender and socioeconomic differences in young people's health and well-being: Health Behaviour in School-aged Children (HBSC) study: international report from the 2013/2014 survey / J.C. Inchley, D.B. Currie, T. Young [et al.] // *Health Policy for Children and Adolescents.* – Denmark: WHO Regional Office for Europe. – 2016. – №7. – 276 p.
89. Jones A.R. FDA vs. Ephedra: Dietary Supplement Regulation Under DSHEA, 2002. – 28 p.
90. Kamardi T. Development of analytical method for identification of sibutramine hydrochloride in traditional medicine using solid phase extraction: High – performance liquid chromatography / T. Kamardi, I. Fidrianny, A. Musadad // *Asian J. Pharm. Clin. Res.* – 2016. – Vol. 9. – №6 – P. 201 – 209.
91. Kilicarlan G. UV spectrophotometric, derivative spectrophotometric and RP-HPLC-DAD determination of sibutramine / G. Kilicarlan, E. Imamoglu, A. Kucuk [et al.] // *Rev. Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 29. – №3 – 4. — P. 169 – 196.
92. Kitagawa F. Capillary and Microchip Electrophoresis / F. Kitagawa // *Anal. Sci.* – 2020. – Vol. 36. – №8. – P. 899 – 900.
93. Kumar P. Implication of mutagenesis and precursor supplementation towards the enhancement of lipstatin (an antiobesity agent) biosynthesis through submerged fermentation using *Streptomyces toxytricini* / P. Kumar, K.K. Dubey // *3 Biotech* 8. – 2018. – Vol. 8. – №1 – P. 29.
94. Lean M.E. Sibutramine – a review of clinical efficacy / M.E. Lean // *International journal of obesity and related metabolic disorders.* – 1997. – Vol. 21. – №1. – P. 30-36.

95. Lee Y-J. Chiral discrimination of sibutramine enantiomers by capillary electrophoresis and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy / Y-J. Lee, S. Choi, J. Lee [et al.] // *Arch. Pharmacol. Res.* – 2012. – №35. – P. 671 – 681.
96. Luthra U. Mutagenesis of the lipstatin producer *Streptomyces toxytricini* ATCC 19813 / U. Luthra, R.C. Dubey // *Nature and science.* – 2013. – Vol. 11. – №7 – P. 73 – 76.
97. Malematja R.O. Potential hypoglycaemic and antiobesity effects of *Senna italica* leaf acetone extract / R. O. Malematja, V. P. Bagla, I. Njanje [et al.] // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* – 2018. Special issue. – 10 P.
98. Maluf D.F. Validation of an analytical method for determination of sibutramine hydrochloride monohydrate in capsules by Uv-Vis spectrophotometry. / D.F. Maluf, P.V. Farago, S.M.W. Barreira [et al.] // *Lat. Am. J. Pharm.* - 2007. – Vol. 26. – №6. –P. 909 – 912.
99. Mathon C. Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPLC-UV densitometry. *Food Additives and Contaminants* / C. Mathon, A. Ankli, E. Reich [et al.] // *Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment.* – 2014. – Vol. 31. – №1. – P. 15 – 20.
100. Mechcatie E. Abbott Pulls Weight-Loss Drug Sibutramine From Market / E. Mechcatie // *Skin & Allergy News.* – 2010. – Vol. 41. – №11.
101. Monakhova Y.B. Standardless ¹H NMR determination of pharmacologically active substances in dietary supplements and medicines that have been illegally traded over the Internet / Y.B. Monakhova, T. Kuballa, S. Löbell-Behrends [et al.] // *Drug Testing and Analysis.* – 2013. – Vol. 5. – №6. – P. 400 – 411.
102. Nateghi S. An epidemic amphetamine problem: commentary on treatment of amphetamine abuse/use disorder / S. Nateghi, H. Effatpanah // *DARU Journal of pharmaceutical sciences.* – 2019. – Vol. 28. – №1 – P. 417 – 418.
103. Obesity update 2017. – OECD, 2017. – 18 p.
104. Pagotto U. Pharmacological therapy of obesity / U. Pagotto, D. Vanuzzo, V. Vicennati [et al.] // *Giornale Italiano di Cardiology.* – 2008. – Vol. 9. – №1. – P. 83 – 93.
105. Petkova-Gueorguieva E. Detection of sibutramine in herbal food supplements by UHPLC/HRMS and UHPLC/MS-MS / E. Petkova-Gueorguieva, K. Ivanov, S. Gueorguiev [et al.] // *Biomedical Research.* – 2018. – Vol. 29. – №14. – P. 3006 – 3009.
106. Rasmussen N. America's First Amphetamine Epidemic 1929–1971 / N. Rasmussen // *Am. J. Publ. Health.* - 2008. – Vol. 98. – №6. – P. 974–985.
107. Reeuwijk N. Active pharmaceutical ingredients detected in herbal food supplements for weight loss sampled on the Dutch market / N. Reeuwijk, B. Venhuis, D. de Kaste [et al.] // *Food*

- Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment. – 2014. – Vol. 31. – №11. – P. 1783 – 1793.
108. Reith M. Molecular Mechanisms of Amphetamines / M. Reith, M. Gnegy // Handbook of experimental pharmacology. – 2020. – Vol. 258. – №1 – P. 265 – 297.
109. Rocha T. Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs: A Review / T. Rocha, J.S. Amaral, M.P.P.O. Beatriz [et al.] // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. – 2016. – №15. – P. 43 – 62.
110. Rothenberg D. O' N. A Review on the Weight-Loss Effects of Oxidized Tea Polyphenols / D. O' N. Rothenberg, C. Zhou, L. Zhang // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – №5. – P. 1176.
111. Sankar R. Fundamental Chromatographic Parameters / R. Sankar // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. – 2020. – Vol. 55. – №2. – P. 46 – 50.
112. Silva N.C. Near Infrared Spectroscopy Detection and Quantification of Herbal Medicines Adulterated with Sibutramine / N.C. Silva, R.S. Honorato, P.M. Pimentel [et al.] // Journal of Forensic Sciences. – 2015. – Vol. 60. – №5 – P. 1199-1205.
113. Stăcescu S. A historical overview upon the use of amphetamine derivatives in the treatment of obesity / Ş. Stăcescu, G. Hancu, D. Podar [et al.] // Journal of Pharmaceutical Care. – 2019. – Vol. 7. – №3. – P. 75 – 82.
114. Ştefănescu B. E. Phenolic Compounds from Five Ericaceae Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits / B. E. Ştefănescu, K. Szabo, A. Mocan // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – №11. – P. 2046.
115. Stohs S. J. A Review of the Human Clinical Studies Involving Citrus aurantium (Bitter Orange) Extract and its Primary Protoalkaloid p-Synephrine / S. J. Stohs, H. G. Preuss, M. Shara // Int. J. Med. Sci. – 2012. – Vol. 9. – №7. – P. 527–538.
116. Strano-Rossi S. Detection of sibutramine administration: a gas chromatography/mass spectrometry study of the main urinary metabolites / S. Strano-Rossi, C. Colamonici, F. Botrè // Rapid Communications in Mass Spectrometry. - 2007. – Vol. 21. – №2. – P. 79 – 88.
117. Strano-Rossi S. Parallel analysis of stimulants in saliva and urine by gas chromatography/mass spectrometry: Perspectives for “in competition” anti-doping analysis / S. Strano-Rossi, C. Colamonici, F. Botre // Anal. Chim. Acta. – 2008. – Vol. 606 – №2. – P. 217 – 222.
118. Sukhanova A.M. Determination of sibutramine in drugs and anorexigenic dietary supplements of plant origin / A.M. Sukhanova, I.B. Perova, D.I. Zhilyaev // Reviews on clinical pharmacology and drug therapy. – 2020. – Vol. 17. – №3. – C. 66.
119. The United States Pharmacopeia 36. Dietary supplements. The National Formulary 31. USA. Vol. 1. 2013.
120. The United States Pharmacopeia 36. The National Formulary 31. – Vol. 1,2. – 2013.

121. Tucker J. Unapproved Pharmaceutical Ingredients Included in Dietary Supplements Associated with US Food and Drug Administration Warnings / J. Tucker, T. Fischer // JAMA Network Open. – 2018. – Vol. 6. – №1. – P. 1-11.
122. Um S.S. Treatment of adolescents with morbid obesity with bariatric procedures and anti-obesity pharmacological agents / S.S. Um, W. Slusser, D.A. Deugarte // Open access Surgery. – 2011. – №4. – P. 57 – 63.
123. Vaysse J. Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY ¹H-NMR / J. Vaysse, S. Balayssac, V. Gilard [et al.] // Food Addit. Contam. – 2010. – Vol. 27. – №7. – P. 903 – 916.
124. Wang Y. Simultaneous determination of five illegal drugs in weight control foods with solid phase extraction-high performance liquid chromatography / Y. Wang, W.-T. Zhang, S.-T. Li [et al.] // Journal of Sichuan University (Medical Science Edition). - 2010. – Vol. 41. – №5. – P. 873 – 876.
125. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. – World health organization, 2018. – P. 18 – 20.
126. Zeng Y. Analysis of 40 weight loss compounds adulterated in health supplements by liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry / Y. Zeng, Y. Xu, C.-L. Kee [et al.] // Drug Testing and Analysis. – 2016. – Vol. 8. – №3 – 4 – P. 351 – 356.
127. Zhang S. Molecular matchmaking between the popular weight-loss herb *Hoodia gordonii* and GPR119, a potential drug target for metabolic disorder / S. Zhang, Y. Ma, J. Li [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2014. – Vol. 111. – №49. – P. 14571–14576.
128. Zhong Y. Simultaneous determination of eight adulterants in weight management supplements and herbs by HPLC-DAD and LC-MS/MS / Y. Zhong, C. Sun, J. Xiong [et al.] // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. – 2017. – Vol. 40. – №12. – P. 640 – 648.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Методика определения сибутрамина
в биологически активных добавках
к пище и специализированной
пищевой продукции**

Методические указания
МУК 4.1.3603—20

Издание официальное

Москва • 2020

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)

Литвинова Т.М.

« 30 » 2020 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Сухановой Анны Михайловны
(фамилия, имя, отчество)

в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии
им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им. А.П. Нелюбина
(наименование кафедры)

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)
Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные
положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации
Сухановой Анны Михайловны
(фамилия, имя, отчество)

на тему «Разработка методик определения сибутрамина в составе
многокомпонентных лекарственных препаратов и БАД к пище анорексигенного
действия»
(название диссертации)

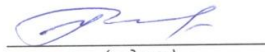
внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии
им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им. А.П. Нелюбина
(наименование кафедры)

при изучении дисциплины фармацевтическая экология,
(наименование дисциплин)

читаемых студентам по направлению подготовки (специальности)
33.05.01 Фармация

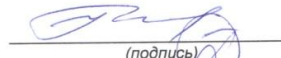
(шифр и наименование направления подготовки (специальности))

Директор Института
Института Фармации
А.П. Нелюбина
д.ф.н., профессор


(подпись)

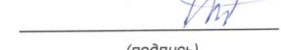
Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой
Фармацевтической и
токсикологической
химии им. А.П. Арзамасцева


(подпись)

Раменская Г.В.

Начальник Учебного управления
к.м.н.


(подпись)

Юдина Л.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ

В редакционную коллегию
«Химико-фармацевтического журнала»

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ПИТАНИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ И
БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ**
(ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14
Тел. +7(495) 698-53-60; факс: +7(495) 698-53-79
ОКПО 01897222 ОГРН 1027739311907
ИНН 7705004254 КПП 770501001
E-mail: mailbox@ion.ru Сайт: www.ion.ru

19.10.2020 № *400-ст. 14/2020*

На № _____ от _____

Уважаемая редакционная коллегия!

В ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» разрабатываются методические подходы определения сибутрамина в биологически активных добавках к пище, специализированной пищевой продукции, в частности, с целью выявления недекларируемого добавления сибутрамина. В целях соблюдения этических норм, а также конфиденциальной информации, разглашение наименований БАД к пище не разрешается.

Директор ФГБУН «ФИЦ питания
и биотехнологии», член-корр. РАН



Д.Б. Никитюк

Исполнитель: К.И. Эллер, т. 8-495-698-54-07

08137

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

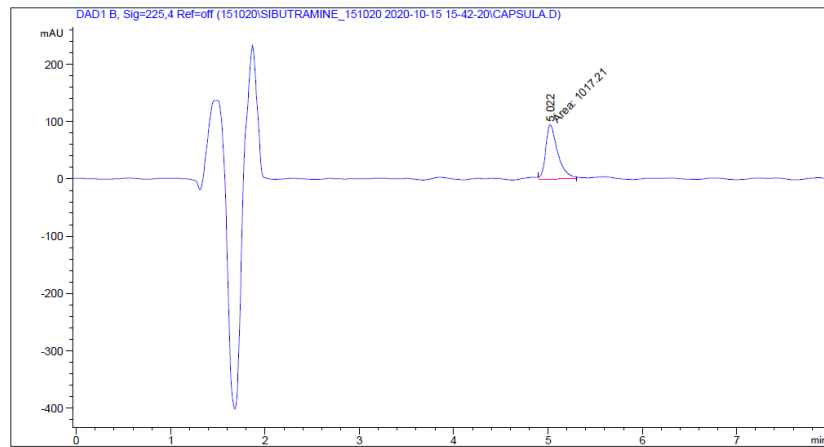


Рисунок 45 – Хроматограмма ЛП «Редуксин» 10 мг
Условия – раздел 3.2

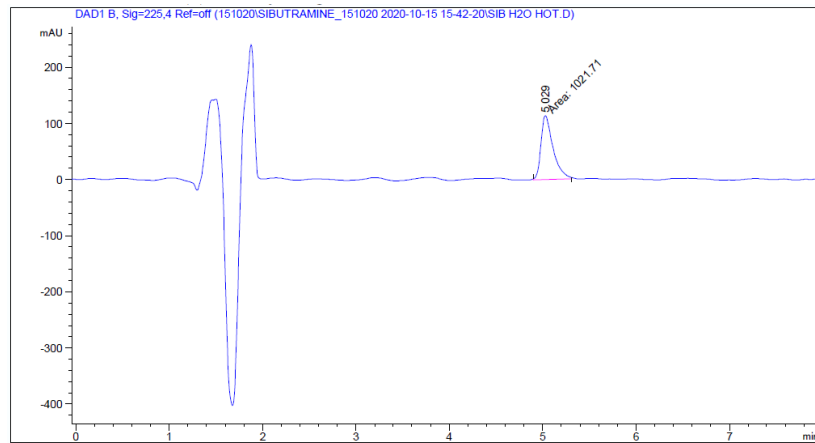


Рисунок 46 – Хроматограмма ЛП «Голдлайн» 15 мг
Условия – раздел 3.2

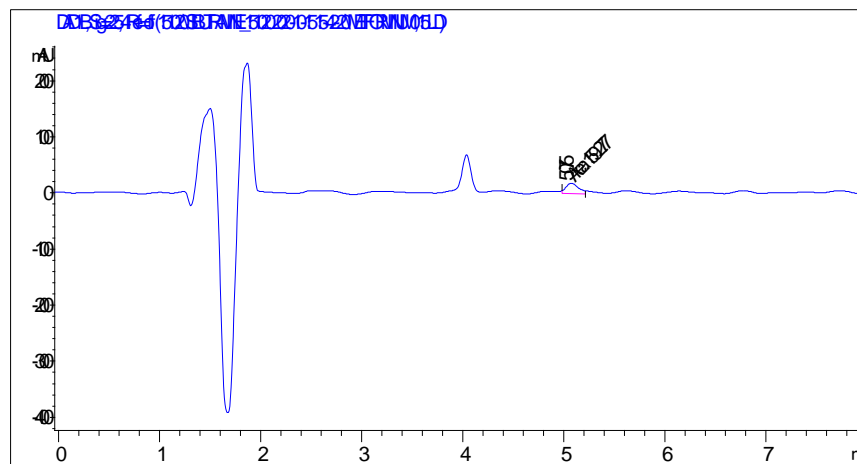


Рисунок 47 – Хроматограмма БАД №3
Условия – раздел 3.2

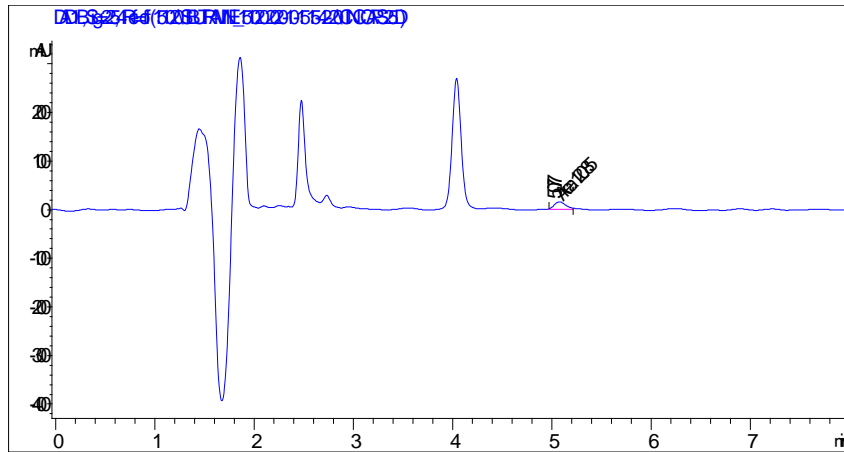


Рисунок 48 – Хроматограмма БАД №9
Условия – раздел 3.2

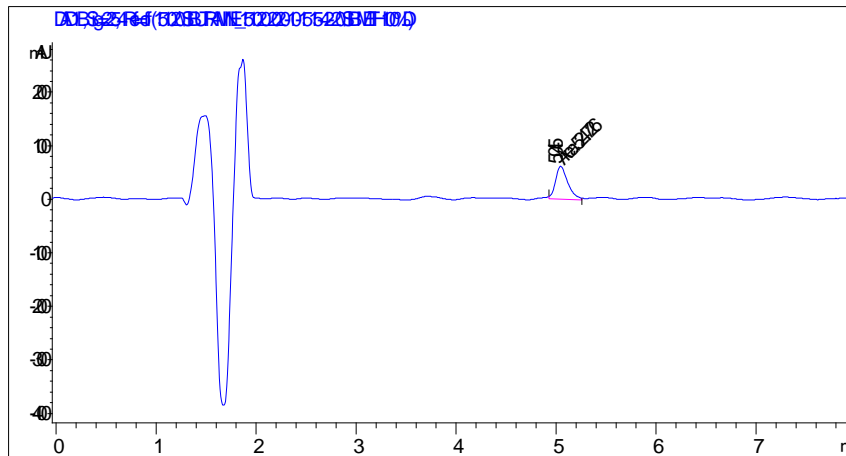


Рисунок 49 – Хроматограмма БАД №17
Условия – раздел 3.2

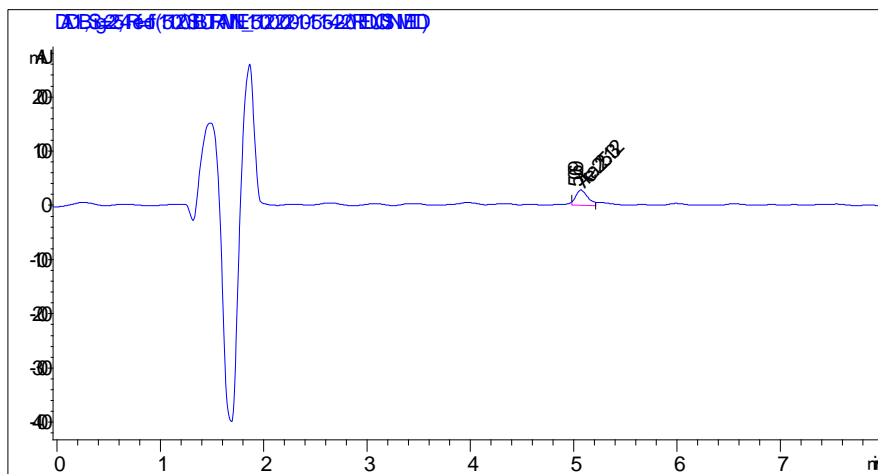


Рисунок 50 – Хроматограмма БАД №18
Условия – раздел 3.2

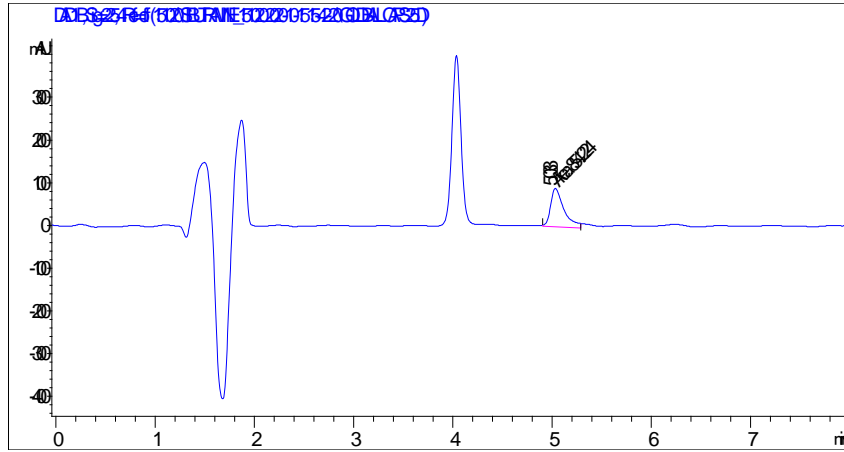


Рисунок 51 – Хроматограмма БАД №19
Условия – раздел 3.2

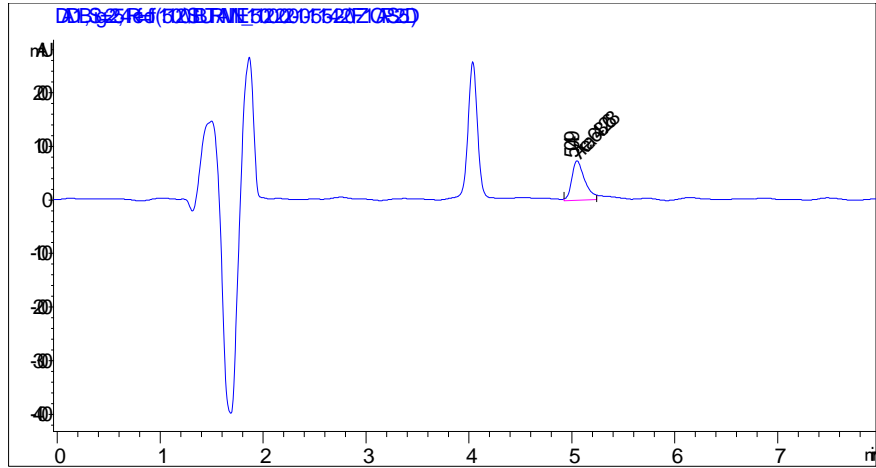


Рисунок 52 – Хроматограмма БАД №20
Условия – раздел 3.2

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

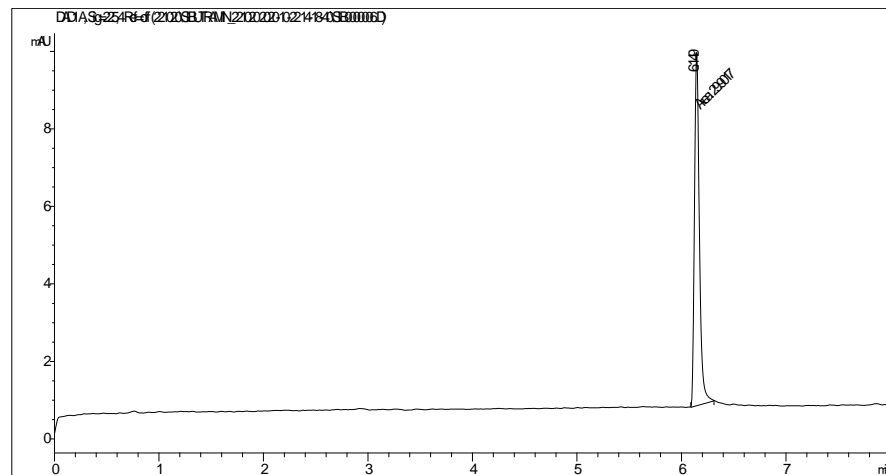


Рисунок 53 – Электрофореграмма препарата «Редуксин» 10 мг
Условия – раздел 4.2

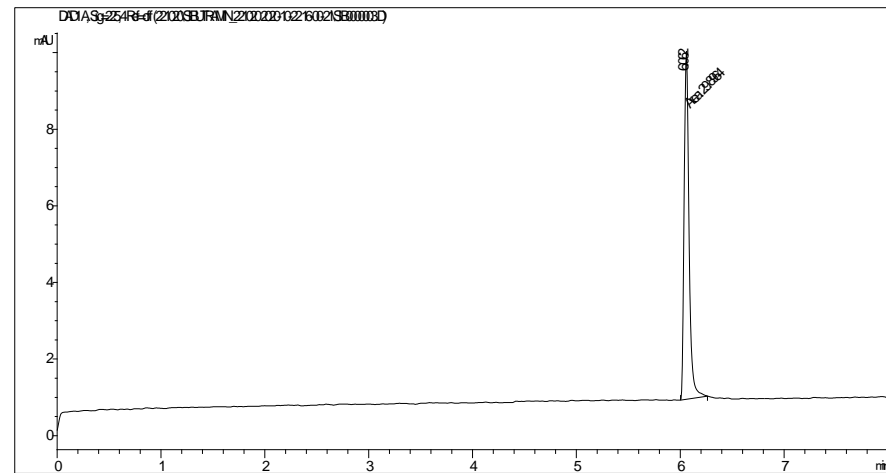


Рисунок 54 – Электрофореграмма ЛП «Голдлайн» 15 мг
Условия – раздел 4.2

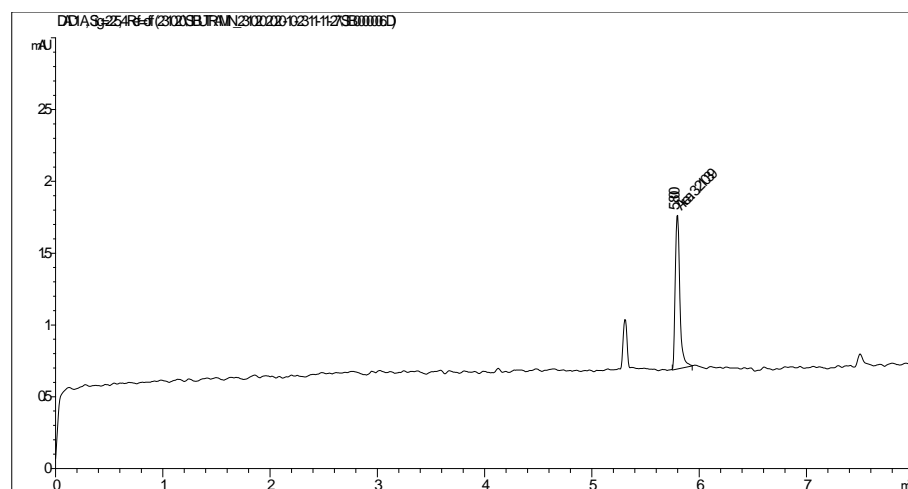


Рисунок 55 – Электрофореграмма БАД №3
Условия – раздел 4.2

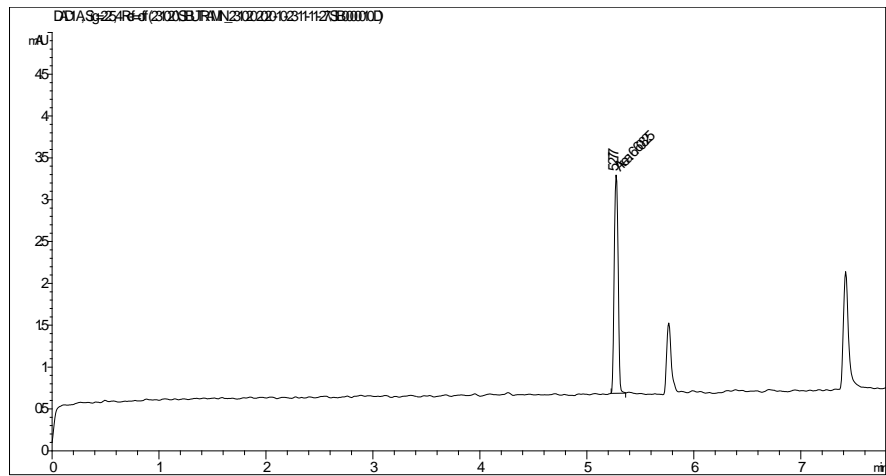


Рисунок 56 – Электрофореграмма БАД №9
Условия – раздел 4.2

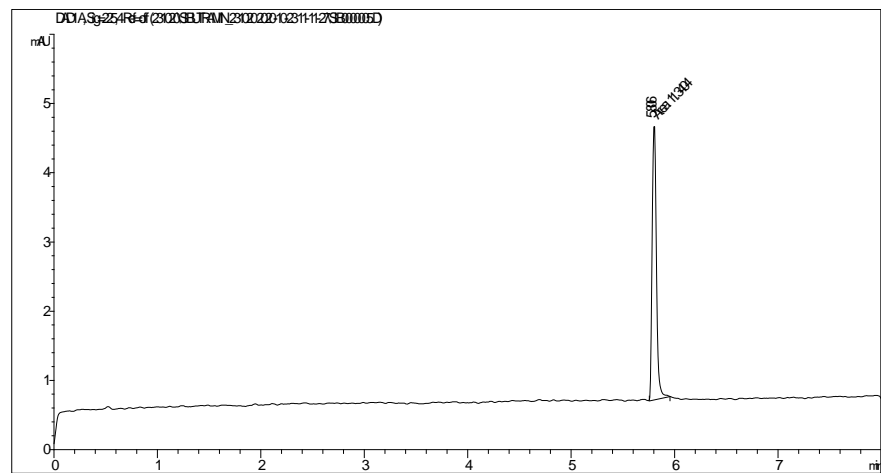


Рисунок 57 – Электрофореграмма БАД №17
Условия – раздел 4.2

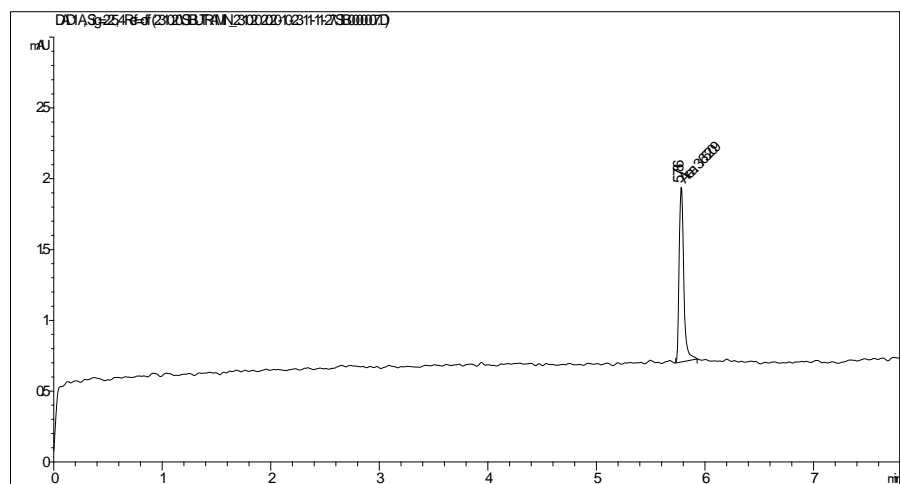


Рисунок 58 – Электрофореграмма БАД №18
Условия – раздел 4.2

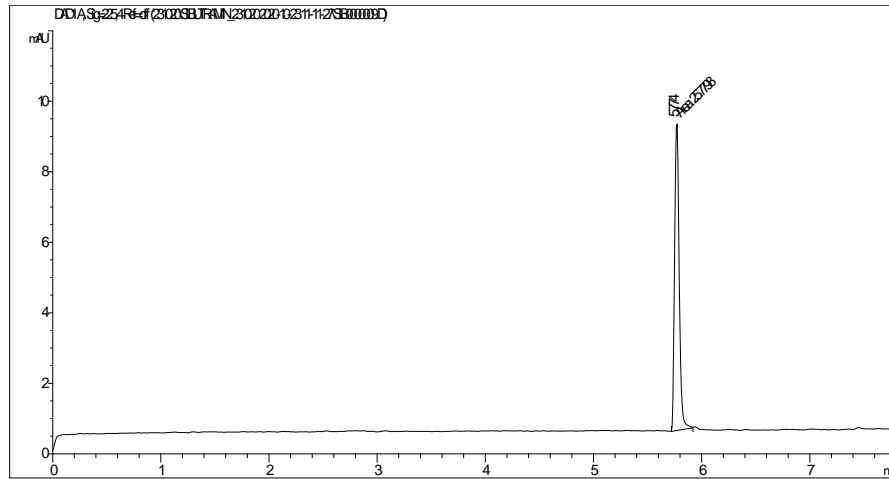


Рисунок 59 – Электрофореграмма БАД №19
Условия – раздел 4.2

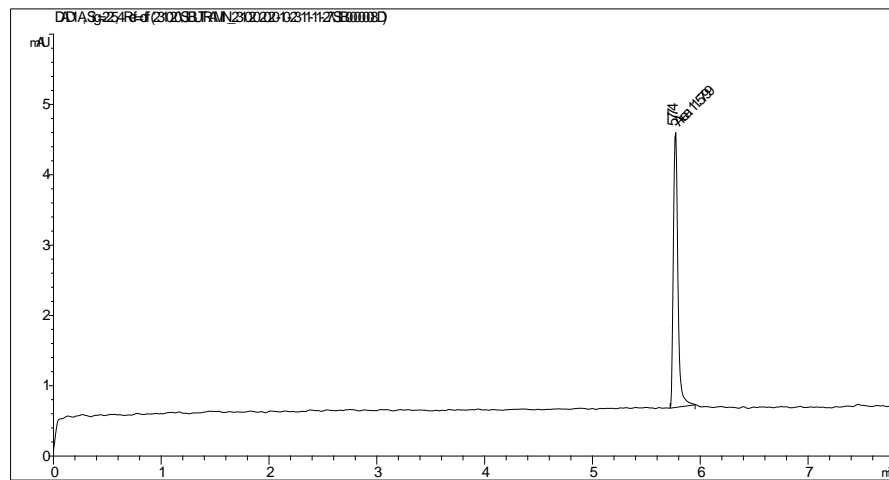


Рисунок 60 – Электрофореграмма БАД №20
Условия – раздел 4.2