

*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

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата фармацевтических наук**

Москва – 2021

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научные руководители:**

кандидат фармацевтических наук,  
доцент

**Родионова Галина Михайловна**

доктор химических наук,  
профессор

**Эллер Константин Исаакович**

**Официальные оппоненты:**

**Белоусов Михаил Валерьевич**, доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой

**Сенченко Сергей Петрович**, доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Института фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств, начальник отдела

**Ведущая организация:** Акционерное общество «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ»

Защита состоится в «19» мая 2021 г. в 13.00 часов на заседании Диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации: <https://sechenov.ru>

Автореферат разослан: «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

**Учёный секретарь**

диссертационного совета ДСУ 208.002.01  
доктор фармацевтических наук, профессор



**Дёмина Наталья Борисовна**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **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.

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.

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

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.

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).

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 метаболомного и протеомного анализа 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**

Объекты исследования – 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 детектированием (ВЭЖХ-ДМД) и капиллярного электрофореза (КЭ).

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 таможене 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. Используемое 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», которые внесены в реестр от 24.07.2020 Государственной системы санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации. 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).

### **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**

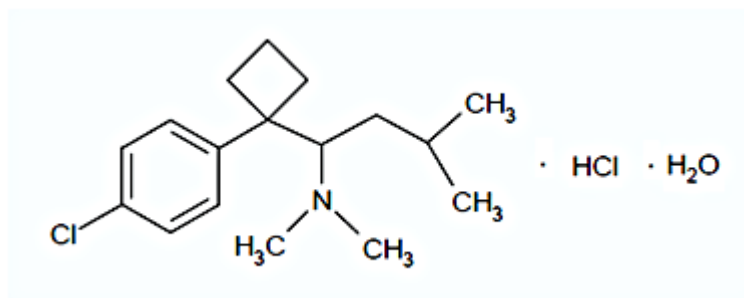
Диссертационная работа изложена на 121 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, общих выводов, списка литературы из 128 источников (60 из которых – зарубежные), списка используемых сокращений и приложений.

Диссертация иллюстрирована 60 рисунками и включает 35 таблиц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В качестве объектов исследования использовали 5 лекарственных средств анорексигенного действия, содержащих Сибутрамин (рисунок 1), а также биологически активные добавки к пище в количестве 22 единиц.



*Рисунок 1– Структурная формула сибутрамина гидрохлорида*

На сегодняшний день фармакопейная статья на субстанцию Сибутрамина гидрохлорида представлена только в Фармакопее США (USP 36, 2013).

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

Вещество представляет собой кристаллический порошок от белого до кремового цвета, растворимую в воде соль третичного азотистого основания,  $pK_a$  которой составляет 9,77.

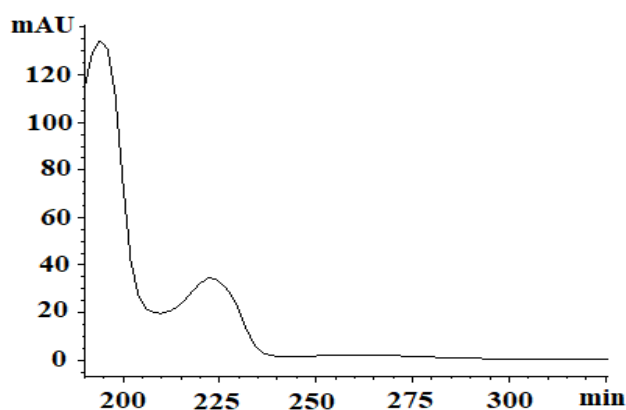
В качестве стандартных образцов использовали индивидуальные вещества стандарты «Sigma Aldrich», «Tocris». В качестве экстрагентов – метанол и рабочий электролит – фосфатный буфер 50 ммоль рН=7,0±0,1. Определение сибутрамина осуществляли с помощью методов ВЭЖХ-ДМД, ВЭЖХ-МС (тройной квадрупольный масс-спектрометрический детектор “TSQ Endura”) на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100 и Ultimate 3000 соответственно, КЭ – на системе капиллярного электрофореза Agilent 7100, а также применяя ТСХ.

Валидацию разработанных методик количественного определения методами ВЭЖХ-ДМД и КЭ проводили согласно ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIV.

## **РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИБУТРАМИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ-ДМД**

Для определения количественного содержания Сибутрамина в ЛП и БАД к пище разработана методика с использованием ВЭЖХ-ДМД.

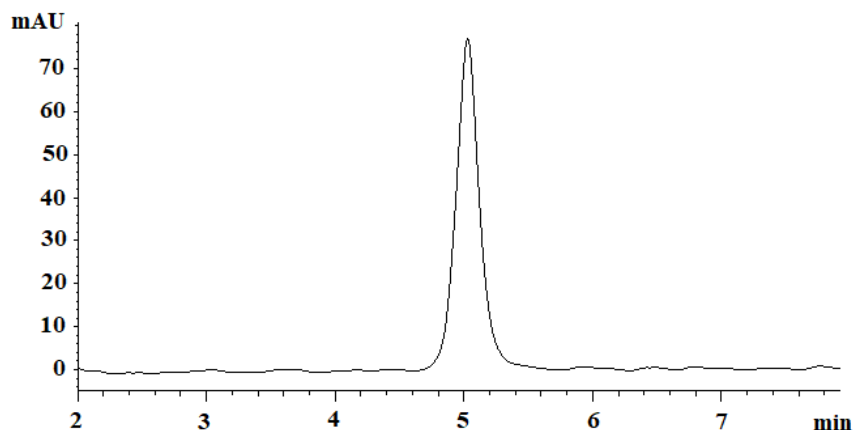
Максимум поглощения Сибутрамина в метаноле находится в области 225±2 нм, чем обусловлен выбор аналитической длины волны при проведении анализа (рисунок 2).



*Рисунок 2 –  
Спектр поглощения  
стандартного  
раствора  
Сибутрамина  
0,1 мг/мл  
(растворитель –  
метанол)*

На основе данных литературы и собственных экспериментальных исследований установлены оптимальные условия анализа: НФ – хроматографическая колонка MACHERRY-NAGEL NUCLEOSIL 5 мкм C18 150x4.6 мм; ПФ – ацетонитрил:формиатный буфер рН=4,0±0,1 60:40 (v/v);

скорость потока – 1 мл/мин;  $t^\circ$  термостата колонки – 40°C. Примерное время удерживания Сибутрамина – 5 мин (рисунок 3).



*Рисунок 3 –  
Хроматограмма  
раствора  
Сибутрамина  
0,1 мг/мл;  
ПФ – ацетонитрил:  
формиатный буфер  
pH=4,0±0,1 60:40 (v/v)*

Проведена валидация методики количественного определения Сибутрамина по результатам анализа модельных смесей лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел обнаружения, предел количественного определения.

Специфичность методики доказана на основании сопоставления полученных хроматограмм стандартного раствора Сибутрамина, модельной смеси с концентрацией Сибутрамина 0,1 мг/мл и используемого растворителя – метанола, а также лекарственного препарата «Редуксин Форте», содержащего Метформин. Компоненты модельной смеси и Метформин не мешают определению Сибутрамина благодаря хорошему разделению пиков определяемого и сопутствующих веществ между собой.

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. Коэффициент корреляции  $R^2$  – 0,9992.

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

Извлечение Сибутрамина из модельных смесей метанолом в условиях эксперимента проходит в количестве 98,96% - 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  $t_{\text{расч}}$  (2,14) меньше табличного  $t_{\text{табл}}$  (2,26), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует.

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

Предел обнаружения (LOD) Сибутрамина составил 0,004 мг/мл. Предел количественного определения (LOQ) – 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 (согласно получению модельной смеси №5).

Среднее значение содержания Сибутрамина при проведении 10 измерений – 100,39%, стандартное отклонение – 0,50%. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Внутрилабораторная прецизионность».

Для проведения валидации методики определения Сибутрамина в БАД к пище методом ВЭЖХ-ДМД были приготовлены модельные смеси БАД к пище. 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 доказательства специфичности методики ВЭЖХ-ДМД получали хроматограммы растворителя (метанол), биологически активной добавки к пище, раствора стандарта Сибутрамина, модельной смеси №7 (рисунок 4). Сопутствующие компоненты не влияют на определение Сибутрамина в БАД к пище в условиях данной методики.

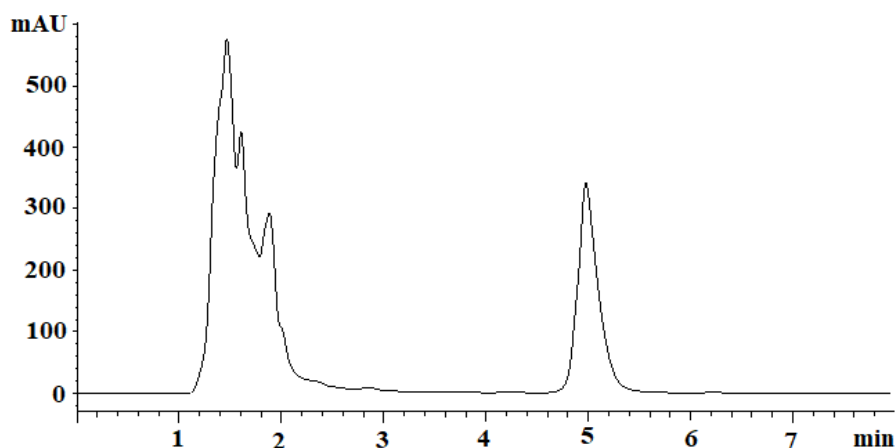


Рисунок 4 –  
ВЭЖХ-хроматограмма  
модельной смеси №7;  
ПФ - ацетонитрил:  
формиатный буфер  
 $pH=4,0\pm 0,1$  60:40 (v/v)

Линейность методики доказана результатами анализа 9 модельных смесей. Коэффициент корреляции  $R^2 - 0,9993$ .

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

Извлечение Сибутрамина из модельных смесей метанолом 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  $t_{расч}$  (1,62) меньше табличного  $t_{табл}$  (2,26), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует.

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

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

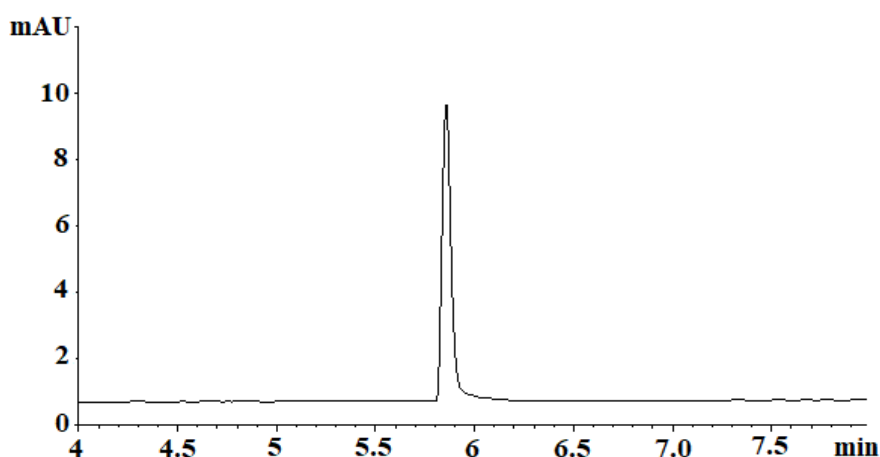
Внутрилабораторную прецизионность устанавливали по результатам определения Сибутрамина в образцах: 2 раствора, приготовленных разными химиками-аналитиками с добавлением БАД к пище (согласно приготовлению модельной смеси №5).

Среднее значение содержания Сибутрамина при проведении 10 измерений составило 100,13%, стандартное отклонение – 0,19%. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Внутрилабораторная прецизионность».

### РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИБУТРАМИНА МЕТОДОМ КЭ

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. 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.

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 – 5,9 мин (рисунок 5).



*Рисунок 5 –  
Электрофореграмма  
раствора  
Сибутрамина  
0,1 мг/мл;  
Рабочий электролит -  
фосфатный буфер  
рН=7,0±0,1*

Проведена валидация методики по результатам анализа модельных смесей лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище по

параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел обнаружения, предел количественного определения.

Доказательство специфичности методики проводили путем сравнения электрофореграмм: растворителя – рабочего электролита, раствора стандарта Сибутрамина, целлюлозы микрокристаллической, Метформина, модельной смеси (Сибутрамин и МКЦ), модельной смеси (Сибутрамин и Метформин). Растворитель и другие компоненты не мешают определению Сибутрамина в составе лекарственных препаратов.

Линейность 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 10 мг/капс.). Коэффициент корреляции  $R^2 - 0,9989$ .

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

Извлечение Сибутрамина из модельных смесей рабочим электролитом в условиях эксперимента проходит в количестве 99,24% – 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.

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



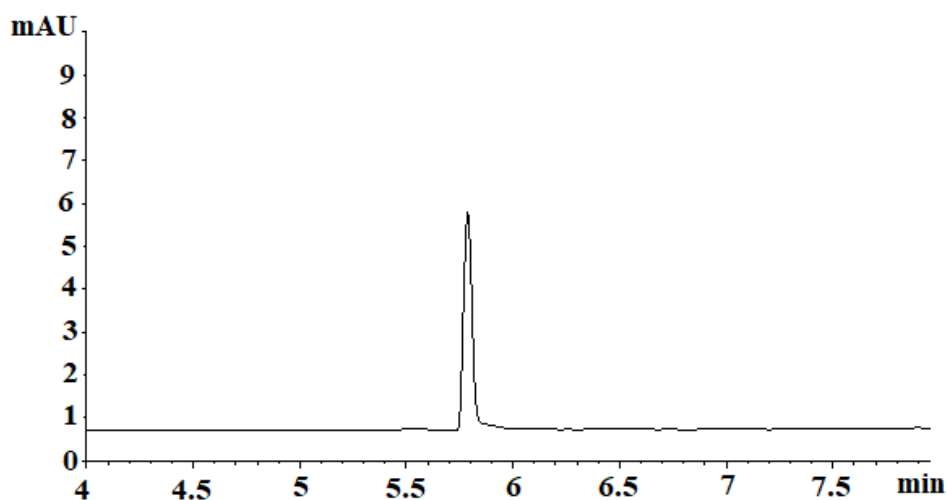
(согласно получению модельной смеси №5), приготовленных двумя разными химиками-аналитиками.

Показатель среднего значения Сибутрамина при проведении 10 измерений – 99,96%, стандартное отклонение – 0,25%. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Внутрилабораторная прецизионность».

Была проведена валидация разработанной методики на модельных смесях БАД 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 была выбрана БАД к пище №4 (по аналогии с методикой ВЭЖХ-МДМ) для приготовления модельных смесей.

Специфичность разработанной методики подтверждали сопоставлением полученных электрофореграмм: растворителя (рабочего электролита), раствора стандарта Сибутрамина, биологически активной добавки к пище, модельной смеси (Сибутрамин и БАД к пище) (рисунок 6).



*Рисунок 6 –  
Электрофореграмма  
модельной смеси  
(Сибутрамин и БАД  
к пище №4);  
Рабочий электролит -  
фосфатный буфер  
pH=7,0±0,1*

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

Линейность методики была подтверждена результатами анализа 9 модельных смесей. Коэффициент корреляции  $R^2 = 0,9993$ .

Правильность методики доказана определением степени извлечения Сибутрамина, добавленного в модельные смеси. Извлечение Сибутрамина из модельных смесей рабочим электролитом в условиях эксперимента проходит в количестве 98,40% – 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  $t_{расч}$  (1,34) меньше табличного  $t_{табл}$  (2,26), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует.

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.

Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам определения Сибутрамина в образцах: 2 стандартных растворах, приготовленных разными химиками-аналитиками с добавлением Сибутрамина в БАД к пище (согласно получению модельной смеси №5).

Показатель среднего значения содержания Сибутрамина при проведении 10 измерений – 99,97%, стандартное отклонение – 0,27%. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по критерию «Внутрилабораторная прецизионность».

## **ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РАЗРАБОТАННЫХ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИБУТРАМИНА**

### **В ЛП и БАД К ПИЩЕ**

Разработанные методики были апробированы на лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище.

Определение содержания Сибутрамина проводили согласно формуле:

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

где:

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

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

$S_{\text{стд}}$  – площадь пика стандарта Сибутрамина;

$V$  – объем раствора пробы, мл;

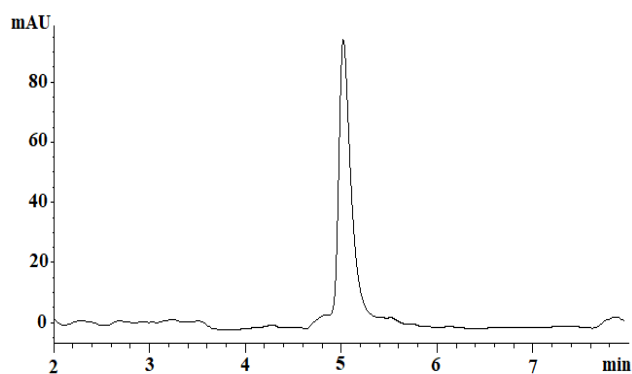
$C$  – концентрация раствора стандарта Сибутрамина, мг/мл;

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

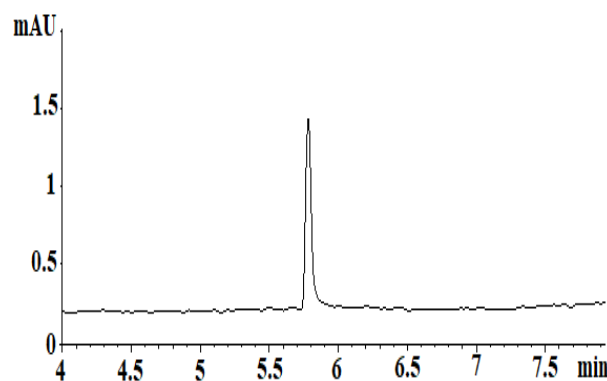
$N$  – коэффициент разбавления пробы;

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

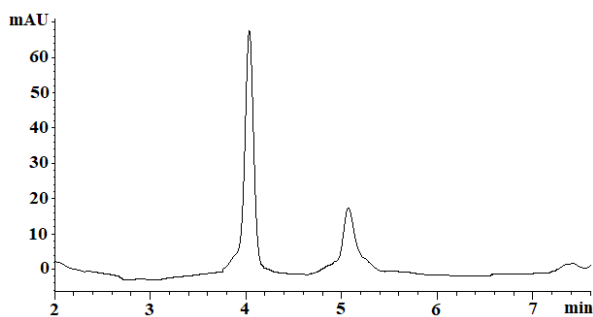
Установлено, что содержание Сибутрамина в лекарственных препаратах методами ВЭЖХ-ДМД и КЭ составляет  $99,8\% \pm 10\% - 100,4\% \pm 10\%$ ;  $99,6\% \pm 10\% - 100,4\% \pm 10\%$  от заявленного соответственно. В результате анализа 22 БАД к пище, в 6 из них выявлено наличие недекларируемого Сибутрамина в количестве  $0,3 \pm 10\% - 21,0 \pm 10\%$  мг/капс. и  $0,28 \pm 10\% - 21,0 \pm 10\%$  мг/капс., что является основанием отнести их к фальсифицированной продукции. Представлены хроматограммы и электрофореграммы одного из ЛП и фальсифицированного БАД к пище №3 (рисунок 7, 1– 4).



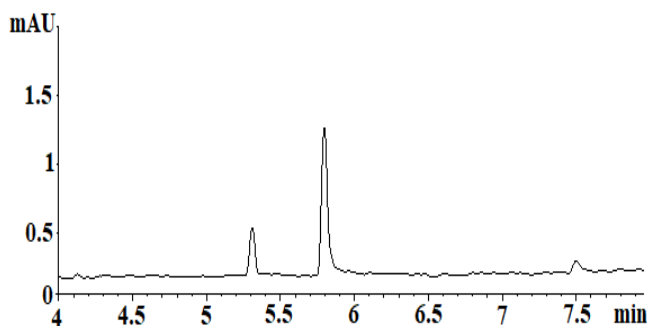
(1)



(2)



(3)



(4)

Рисунок 7 – 1,3 – Хроматограммы ЛП «Редуксин 10 мг» и БАД к пище №3;

2,4 – Электрофореграммы ЛП «Редуксин 10 мг» и БАД к пище №3

## МЕТОДИКИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО И ПОДТВЕРЖДАЮЩЕГО МЕТОДОВ АНАЛИЗА СИБУТРАМИНА В БАД К ПИЩЕ

В качестве предварительного метода определения наличия Сибутрамина в БАД к пище предложен метод ТСХ; для подтверждения – ВЭЖХ-МС.

Разработана методика предварительного определения Сибутрамина в БАД к пище с помощью ТСХ. Условия анализа: НФ – хроматографические пластинки 10x20, толщина 200 мкм, силикагель 60, концентрирующая зона 2,5x20 см («Merck», США); ПФ – трехкомпонентная система растворителей состава – хлороформ:ацетон:диоксан (9:1:9,5). Детектирующие реагенты: пары йода, реактив Драгендорфа. Время анализа – 20 минут.

В данных условиях значение  $R_f$  Сибутрамина составило  $0,67 \pm 0,02$ .

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

Проведен скрининг 22 БАД к пище с применением данной методики. Схема анализа БАД к пище (№3,9,17-20) представлена на рисунке 8.

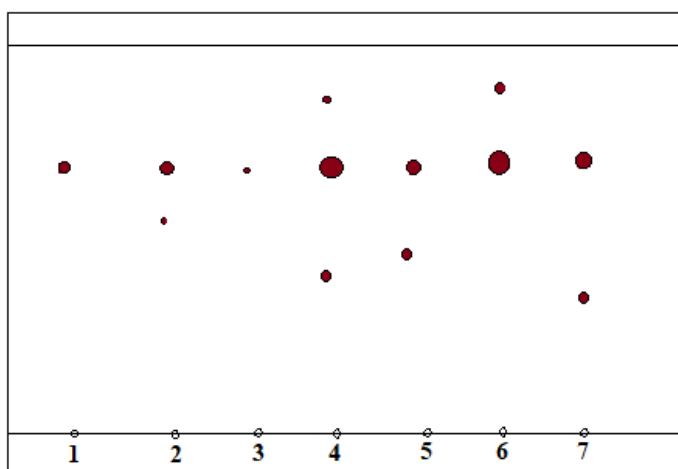


Рисунок 8 –  
Схема ТСХ – скрининга БАД к пище  
(детектирующий реагент –  
пары йода):  
1 – стандарт Сибутрамина  
с концентрацией 0,1 мг/мл;  
2 – БАД к пище №3;  
3 – БАД к пище №9;  
4 – БАД к пище №17;  
5 – БАД к пище №18;  
6 – БАД к пище №19;  
7 – БАД к пище №20

При обработке хроматографической пластинки реактивом Драгендорфа пятна приобретают ярко-оранжевую окраску; в парах йода – темно-коричневую. В результате ТСХ – скрининга 22 наименований БАД к пище недекларируемый Сибутрамин был обнаружен в 6 образцах: БАД к пище №3, 9, 17-20.

Установлено, что входящие в состав БАД к пище вещества не мешают определению Сибутрамина во всех анализируемых образцах в разработанных

параметрах ТСХ – скрининга.

В качестве подтверждающего метода доказательства Сибутрамина в биологически активных добавках к пище применяли метод ВЭЖХ-МС в условиях: НФ – хроматографическая колонка MACHERRY-NAGEL NUCLEOSIL 5 мкм C18 150x4.6 мм; ПФ – ацетонитрил: раствор формиата аммония 10 ммоль; режим элюирования – градиентное (80-100-80); скорость потока – 0,5 мл/мин; детектируемые массы – 280, 282 Да. Источник ионизации – прогреваемый электроспрей в режиме работы регистрации положительных ионов. Примерное время удерживания – 10,8 мин.

Доказана специфичность методики и определен предел обнаружения Сибутрамина в БАД к пище составляет 0,0005 мг/мл. Хроматограмма и спектр Сибутрамина в БАД к пище №9 представлены на рисунке 9 (1 – 4).

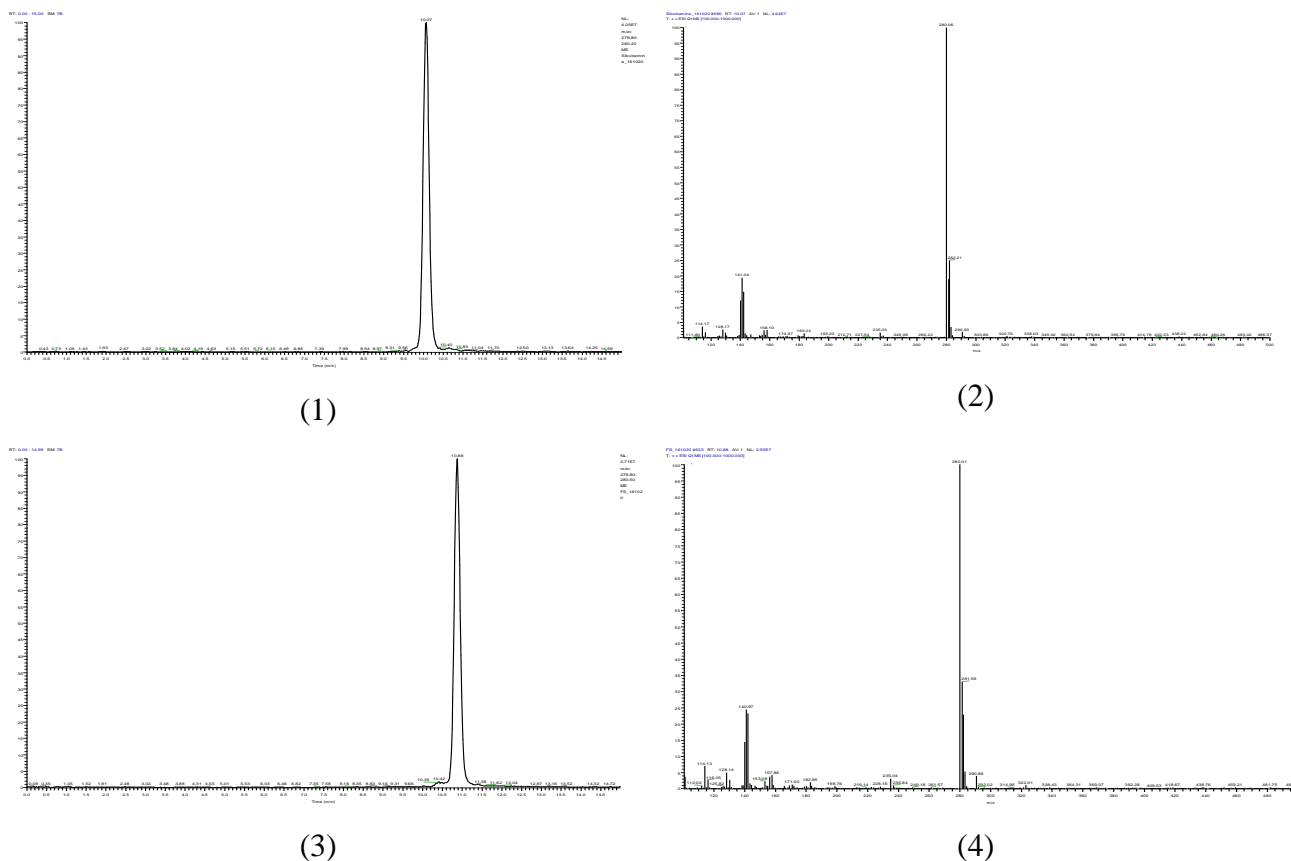


Рисунок 9: 1,2 – Хроматограмма и спектр раствора стандарта Сибутрамина 0,1 мг/мл;

3,4 – Хроматограмма и спектр раствора БАД к пище №9

В результате анализа 22 биологически активных добавок к пище было доказано наличие Сибутрамина в №3, 9, 17-20.

## 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 pH=4,0±0,1 60:40 (v/v); 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 pH=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  $99,8\% \pm 10\% - 100,4\% \pm 10\%$ ;  $99,6\% \pm 10\% - 100,4\% \pm 10\%$  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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Sukhanova A.M. Determination of sibutramine in drugs and anorexigenic dietary supplements of plant origin / **А.М. Sukhanova**, I.B. Perova, D.I. Zhilyaev // Reviews on clinical pharmacology and drug therapy. – 2019. – Vol. 17. – №3. – С. 66.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.