

**Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Стерн Кристина Ильинична

**РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ
СИБУТРАМИНА В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ КОНТРОЛЕ МАССЫ ТЕЛА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
доцент Малкова Т.Л.

Пермь – 2015

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД	артериальное давление
БАВ	биологически активные вещества
БАД	биологически активные добавки к пище
ВДА	вертикальная двигательная активность
ГДА	горизонтальная двигательная активность
ГЖХ	газо-жидкостная хроматография
ГФ	Государственная фармакопея
ГХ-МС	газовая хроматография с масс-селективным детектированием
ДМС	десметилсибутрамин
ДДМС	дидесметилсибутрамин
ЕС	Европейский Союз
ЖАК	железоаммониевые квасцы
ИК	инфракрасная спектроскопия
КНР	Китайская Народная Республика
ЛС	лекарственные средства
МАО	моноаминоксидаза
МЗ	Министерство здравоохранения
МС	метилстеарат
НД	нормативный документ
НПВС	нестероидное противовоспалительное средство
ос.ч.	особой чистоты
СанПиН	санитарные правила и нормы
СДА	спонтанная двигательная активность
СМИ	средства массовой информации
ТС	Таможенный союз
ФСКН	Федеральная служба по контролю за оборотом наркотиков
х.ч.	химически чистый, маркировка чистоты реактива
ЦНС	центральная нервная система
ч.д.а.	чистый для анализа
ЯМР	ядерно-магнитный резонанс
MLM-сети	multi-level marketing (многоуровневый, сетевой маркетинг)
WADA	World anti-doping agency (Всемирное антидопинговое агентство)

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	12
1.1. Биологически активные добавки к пище. Общая характеристика.....	12
1.1.1. Классификация БАД.....	12
1.1.2. Нормативное регулирование обращения биологически активных добавок к пище в Российской Федерации.....	14
1.1.3. Нормативное регулирование обращения биологически активных добавок к пище за рубежом.....	17
1.2. Токсикологическое значение БАД.....	23
1.3. Сибутрамин и его производные, общая характеристика, способы обнаружения в БАД.....	26
Выводы по главе 1.....	35
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	36
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1. Объекты исследования.....	36
2.2. Методы исследования, приборы и реактивы.....	38
2.2.1. Химическое исследование.....	39
2.2.2. Биологическое исследование.....	39
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ПРИ КОНТРОЛЕ МАССЫ ТЕЛА.....	45
3.1. Анализ информационных данных по составу БАД растительного происхождения.....	45
3.2. Микроскопический анализ.....	47
3.3. Качественный химический анализ на основные группы биологически активных веществ.....	49
3.4. Хроматографическое исследование методом газовой хроматографии с масс-селективной детекцией.....	52
Выводы по главе 3.....	61
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОБНАРУЖЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕСМЕТИЛСИБУТРАМИНА И ДИДЕСМЕТИЛСИБУТРАМИНА МЕТОДОМ ГЖХ С ПЛАМЕННО-ИОНИЗАЦИОННОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ.....	63
4.1. Обнаружение десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА в биологически активных добавках.....	63
4.2. Разработка методики количественного определения десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА.....	64
4.3. Валидация и апробация методики количественного определения десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА.....	66
Выводы по главе 4.....	74

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА СХОДСТВА ПСИХОАКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕСМЕТИЛСИБУТРАМИНА, ДИДЕСМЕТИЛСИБУТРАМИНА И СИБУТРАМИНА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ КОМПЛЕКСНОГО ХИМИКО- БИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	75
5.1. Химическое исследование десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА методом ГХ-МС.....	76
5.2. Химическое исследование десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА методом ИК-спектроскопии.....	78
5.3. Сравнительная оценка психоактивных свойств сIBUTРАМИНА и его структурных аналогов	81
Выводы по главе 5.....	98
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	117
Приложение 1. Сравнительный анализ информации о составе биологически активных добавок к пище растительного происхождения	118
Приложение 2. Документы по внедрению результатов научных исследований	122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. С 1998 г. в Российской Федерации действует Концепция государственной политики в области здорового питания, в число основных задач которой входит расширение применения биологически активных добавок к пище [17]. В настоящее время рынок биологически активных добавок представляет собой довольно большой сегмент фарминдустрии. В России на сегодняшний день количество зарегистрированных наименований БАД достигло 9,5 тысяч [34]. Примерно половина из них – БАД, представляющие собой сложные многокомпонентные смеси преимущественно растительного происхождения. Проблемы безопасности таких продуктов по показателям токсичности и микробиологической чистоты в целом разрешены и в России, и за рубежом. Однако в литературных источниках по-прежнему нет чётких рекомендаций по качественному и количественному исследованию биологически активных добавок к пище, а по прилагаемым к ним инструкциям невозможно установить истинный компонентный состав.

Наряду с ростом распространения биологически активных добавок растёт и число недобросовестных производителей, а продажа БАД через дистрибьюторов и дистанционные каналы, составляющая значительную долю незаконного сбыта данного вида продукции, не поддаётся какому-либо контролю и лишь усугубляет ситуацию. К сожалению, при проведении стандартизации БАД и проверке качества в ходе выборочного контроля определение чужеродных токсикологически важных веществ не проводится. Контроль качества данных продуктов осуществляется по активным веществам, указанным в их составе изготовителем. Таким образом, проблема, связанная с незаконным оборотом БАД, содержащих посторонние компоненты, является особенно актуальной, учитывая масштабы реализации данной продукции.

Также участились факты обнаружения в биодобавках сильнодействующих веществ, обладающих психоактивными свойствами, что противоречит законодательству Российской Федерации. Основным производителем и

поставщиком БАД, содержащих в своем составе сильнодействующие вещества, является Китай. Как правило, данные биологически активные добавки позиционируются производителями как растительные, при этом в их составе обнаруживаются посторонние синтетические компоненты. В большей степени это относится к биодобавкам, используемым при контроле массы тела. Ранее в данных продуктах правоохрательными органами часто обнаруживался сибутрамин, в настоящее время запрещенный к использованию в составе БАД как сильнодействующее вещество, включенное в соответствующий список, утвержденный Постановлением Правительства РФ № 964.

На сегодняшний день в биологически активные добавки незаконно вносятся активные деметилированные метаболиты сибутрамина, синтезированные в виде субстанций. Являясь производными сибутрамина, десметилсибутрамин и дидесметилсибутрамин значительно активнее исходного соединения, их фармакологические свойства до конца не изучены, и потому данные вещества потенциально опасны для потребителя. Кроме того, правовой статус производных сибутрамина до сих пор не определен, что препятствует своевременному принятию решений в правоприменительной практике. В литературных источниках практически отсутствуют данные по исследованию производных сибутрамина в биологически активных добавках, что обуславливает актуальность разработки методик их обнаружения и количественного определения с использованием современных методов анализа.

Целью настоящей работы является разработка способов качественного и количественного определения производных сибутрамина в биологически активных добавках для лиц, контролирующих массу тела, содержащих растительные объекты. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить нормативно-методическую базу оборота биологически активных добавок в России и за рубежом;
- сравнить информационные данные по составу биологически активных добавок, зарегистрированных на территории РФ;

- провести комплексное исследование БАД растительного происхождения для лиц, контролирующих массу тела, с использованием фитохимического и инструментального хроматографического анализа;
- разработать методики обнаружения и количественного определения десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА методом ГЖХ с пламенно-ионизационной детекцией;
- установить идентификационные характеристики и провести исследование схожести психоактивного воздействия десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА с сIBUTРАМИНОМ с целью возможности их отнесения к его аналогам;
- обосновать необходимость включения десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА отдельными позициями в Список сильнодействующих веществ.

Научная новизна. Разработана оригинальная методика качественного и количественного определения десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА в биологически активных добавках к пище на основе газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием, установлены хроматографические параметры исследуемых веществ.

Установлены идентификационные характеристики и впервые проведено исследование схожести психоактивных свойств десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА с сIBUTРАМИНОМ с целью возможности их отнесения к его аналогам.

Обоснована необходимость включения десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА отдельными позициями в Список сильнодействующих веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации, утвержденный постановлением Правительства РФ от 29 декабря 2007 г. № 964.

Теоретическая и практическая значимость. Изучение нормативно-методической базы оборота биологически активных добавок в России и за рубежом, проведение сравнительного анализа информационных данных (данные

Реестра БАД, интернет-ресурсы, инструкции по применению) по составу биологически активных добавок, зарегистрированных на территории РФ, позволили обобщить полученный в ходе исследования материал в форме монографии «Биологически активные добавки в России и за рубежом: правовые основы, стандартизация, методы анализа». Материалы монографии используются в учебном процессе кафедры управления и экономики фармации ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России (акт внедрения от 26.02.15 г.).

На основании проведенных экспериментальных исследований сформировано и утверждено Ученым советом ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России информационное письмо «Исследование сибутрамина и его активных метаболитов в вещественных доказательствах» для работников территориальных Бюро судебно-медицинской экспертизы, химико-токсикологических лабораторий, экспертно-криминалистических центров по процедуре выявления в составе БАД сибутрамина, десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина, предложены методики обнаружения, количественного определения, биологические тесты. Информационное письмо направлено для утверждения в ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы». Информационное письмо и описанные в нем методики внедрены в экспертную деятельность Свердловского областного Бюро судебно-медицинской экспертизы (акт внедрения от 30.01.15 г.).

Проведены комплексные химико-биологические исследования десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина, предоставленных правоохрательными органами в различных видах вещественных доказательств. Полученные результаты подтверждены актами внедрения научных достижений в экспертную практику Управления ФСКН России по Чувашской Республике (акт внедрения от 20.02.15 г.), Управления ФСКН России по Республике Татарстан (акт внедрения от 16.02.15 г.).

Отдельные фрагменты диссертационной работы и материалы Информационного письма «Исследование сибутрамина и его активных метаболитов в вещественных доказательствах» внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии Оренбургского государственного медицинского

университета (акт внедрения от 02.02.15 г.), кафедры химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета (акт внедрения от 09.02.15 г.).

В Правовой департамент Министерства здравоохранения РФ направлено письмо о внесении изменений в Список сильнодействующих веществ, где дано обоснование необходимости включения десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА отдельными позициями в Список сильнодействующих веществ (от 21.01.15 г). После рассмотрения данные материалы были направлены Минздравом по компетенции в ФСКН России письмом от 05.02.2015 г. для принятия дальнейшего решения.

На защиту диссертации выносятся следующие положения:

- сравнительная оценка информационных данных по составу биологически активных добавок, зарегистрированных на территории РФ;
- результаты фитохимического анализа и хроматографического исследования БАД растительного происхождения для лиц, контролирующих массу тела;
- методика обнаружения и количественного определения десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА методом ГЖХ с пламенно-ионизационной детекцией;
- результаты комплексного химико-биологического исследования, оценка аналогичности химической структуры и психоактивных свойств десметилсIBUTРАМИНА, дидесметилсIBUTРАМИНА в сравнении с сIBUTРАМИНОМ с правовых позиций;
- обоснование необходимости включения десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА отдельными позициями в Список сильнодействующих веществ.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов диссертационного исследования обусловлена достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов исследования, валидацией разработанных методик, статистической обработкой данных.

Основные положения работы доложены на Ежегодных научно-практических конференциях ПГФА (Пермь, 2012, 2013), Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Здоровье семьи – здоровье нации» (Пермь, 2012), Всеукраинской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной, клинической медицины и фармации» (Луганск, 2012), Всероссийском конкурсе для студентов и молодых ученых на премию им. Проф. В.К. Сологуба «Молодой организатор здравоохранения» (Красноярск, 2012), Первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2013), Евразийском Конгрессе с международным участием «Медицина, фармация и общественное здоровье» (Екатеринбург, 2013), Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы развития науки» (Уфа, 2014), XIII научной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 75-летию СОГМА «Молодые ученые – медицине» (Владикавказ, 2014), Всероссийской научной конференции «Химия и фармакология растительных веществ» (Сыктывкар, 2014), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами» (Пермь, 2014).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Пермской государственной фармацевтической академии (номер государственной регистрации 01.9.50 007417). Фрагмент: «Исследования в области химико-токсикологического анализа по разработке и усовершенствованию методик аналитической диагностики токсичных веществ».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения соответствуют формулам специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют

областям исследования специальностей, конкретно пунктам 1, 4 паспорта «фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (главы 2, 3, 4, 5), общих выводов, списка литературы, приложения. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста. Включает 20 таблиц, 48 рисунков и 18 страниц приложения, включающего таблицу «Сравнительный анализ информации о составе БАД растительного происхождения» и материалы внедрения. Список использованной литературы содержит 133 наименования, из них 85 источников зарубежной литературы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ: 15 статей, из которых 3 – в изданиях, рекомендованных ВАК, и 1 монография.

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах исследования: планировании и проведении научных экспериментов, проведении анализа отечественных и зарубежных литературных источников по теме диссертации, проведении и статистической обработке результатов исследования, формировании выводов и заключений. Автором самостоятельно проведены исследования в качестве оператора аналитического оборудования (газо-жидкостный хроматограф с масс-селективным детектором, газо-жидкостный хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, оптический микроскоп).

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Биологически активные добавки к пище. Общая характеристика

Биологически активные добавки к пище – композиции натуральных или идентичных натуральным биологически активных веществ, предназначенных для непосредственного приема с пищей или введения в состав пищевых продуктов с целью обогащения рациона отдельными пищевыми или биологически активными веществами и их комплексами. Это продукты, содержащие пищевые и (или) биологически активные вещества (их концентраты) природного происхождения или идентичные им вещества искусственного происхождения, а также пребиотические компоненты и пробиотические микроорганизмы, предназначенные для употребления с пищей с целью оптимизации рациона человека и не являющиеся единственным источником пищи или диетического питания [7, 13, 16, 24, 33].

1.1.1. Классификация БАД

Несмотря на достаточно длительное существование на рынке России биологически активных добавок, единая общепринятая классификация для этой группы не разработана. Различные литературные источники и нормативные документы используют частные классификации, отражающие отдельные стороны производства и оборота БАД.

Институтом питания РАМН разработана классификация БАД, согласно которой все добавки делятся на три группы: нутрицевтики, парафармацевтики и эубиотики [2, 13, 33].

В соответствии с требованиями ТС и СанПин [7, 12], разработана **классификация по источникам получения и основным компонентам** (рис. 1).

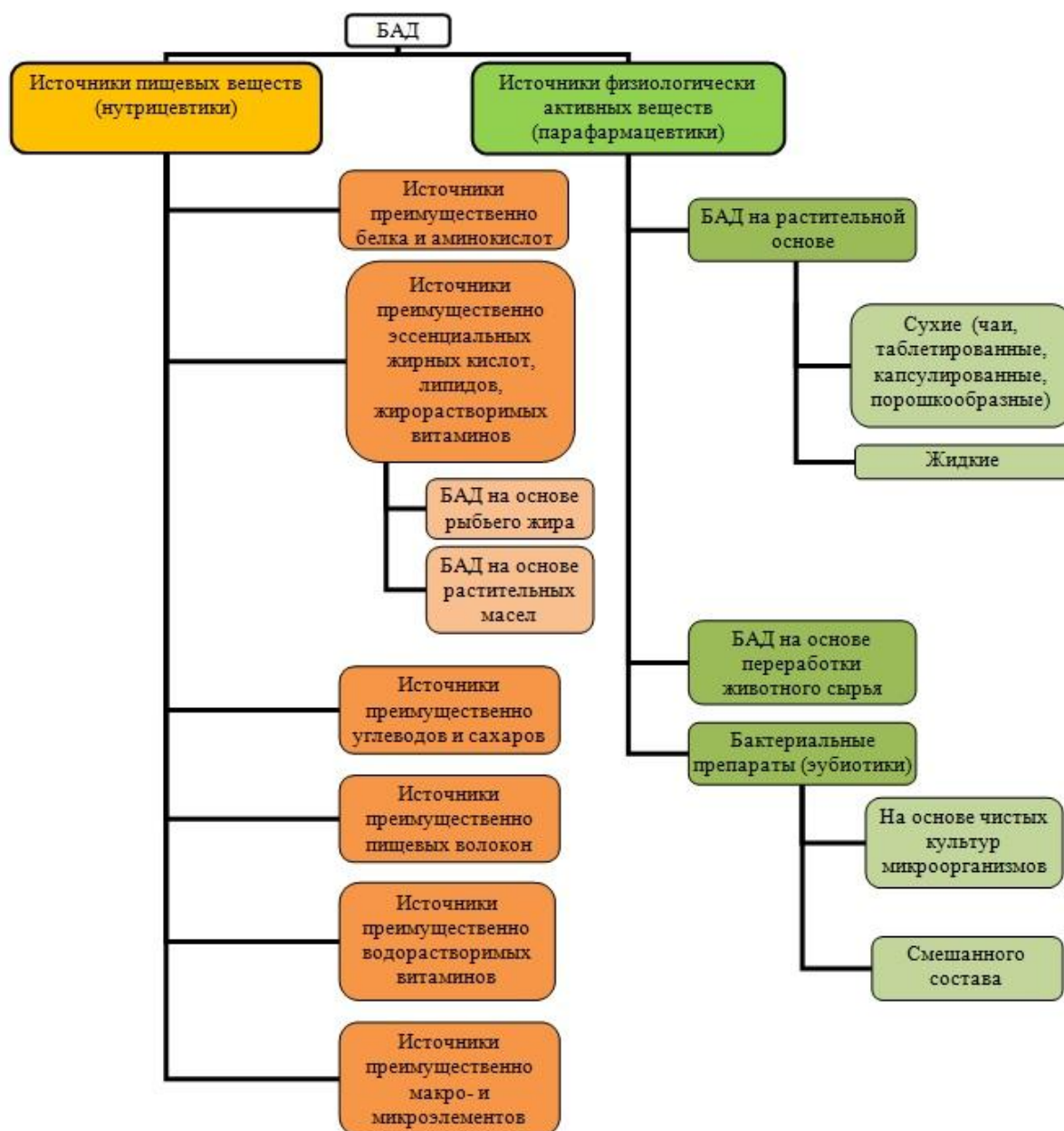


Рисунок 1. Классификация БАД по источникам получения и основным компонентам

В федеральном реестре дана **классификация по функциональному (преимущественному) действию** [44], представленная на рисунке 2.

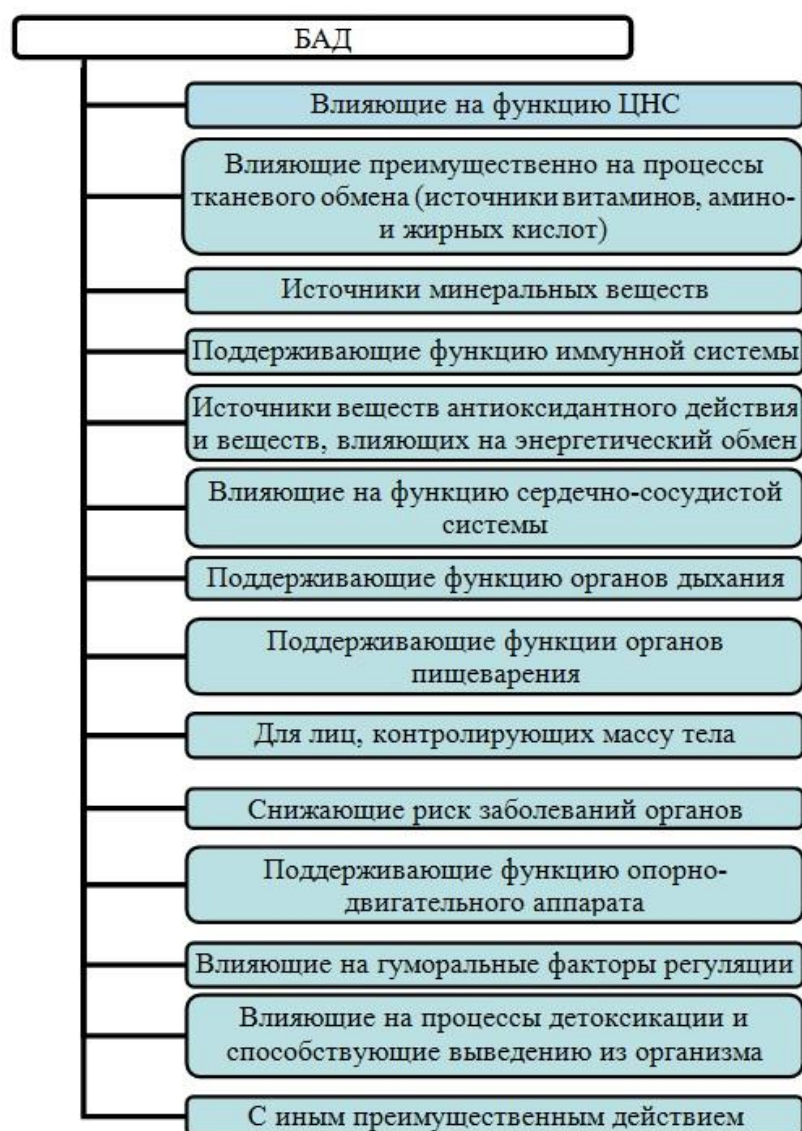


Рисунок 2. Классификация БАД по функциональному действию

Существуют классификации БАД по другим критериям: формам выпуска и особенностям технологии, контингенту, стране производства и региональным, количественным особенностям упаковки, ценовому диапазону и т.д.

1.1.2. Нормативное регулирование обращения биологически активных добавок к пище в Российской Федерации

Основные нормативно-методические документы, регулирующие оборот и производство БАД в РФ, представлены на рисунке 3.

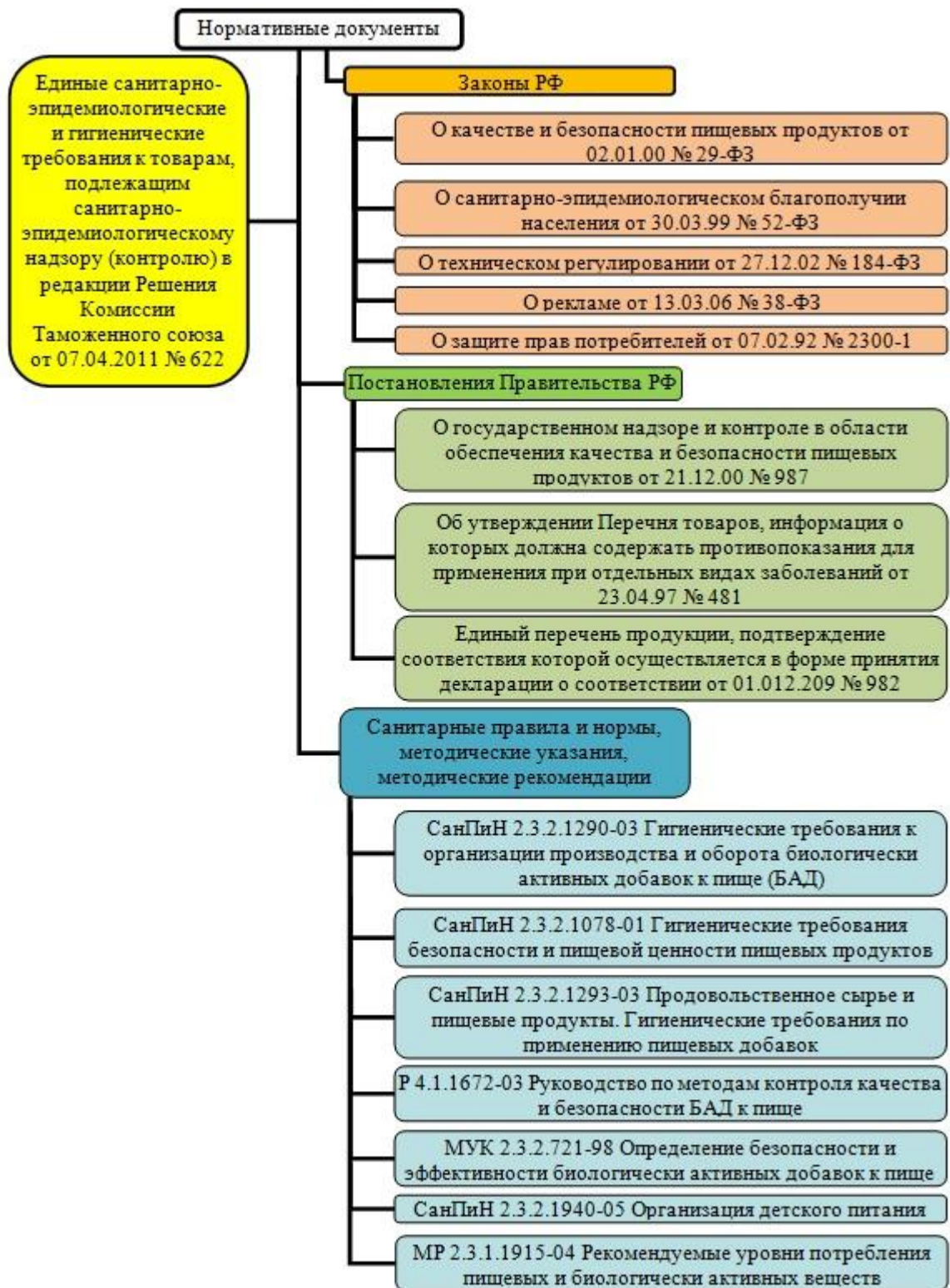


Рисунок 3. Нормативно-методическая база БАД

Соответственно, введение в оборот БАД, в том числе путём распространения их рекламы, с 15 февраля 2010 года возможно только в том случае, если такие БАД прошли процедуру обязательного подтверждения

соответствия. Согласно пункту 6 статьи 7 Федерального закона «О рекламе», не допускается реклама товаров, подлежащих обязательной сертификации или иному обязательному подтверждению соответствия требованиям технических регламентов, в случае отсутствия такой сертификации или подтверждения такого соответствия [19].

Реклама БАД не должна создавать впечатление о том, что они являются ЛС и (или) обладают лечебными свойствами; содержать ссылки на конкретные случаи излечения людей, улучшения их состояния в результате применения таких добавок; содержать выражение благодарности физическими лицами в связи с применением таких добавок; побуждать к отказу от здорового питания; создавать впечатление о преимуществах таких добавок путем ссылки на факт проведения исследований, обязательных для государственной регистрации таких добавок, а также использовать результаты иных исследований в форме прямой рекомендации к применению таких добавок [19].

В ряде НД оговорены требования к упаковке и маркировке БАД [7, 12, 13, 15, 18, 22, 24, 29].

Розничная торговля БАД осуществляется через аптечные учреждения, специализированные магазины по продаже диетических продуктов, продовольственные магазины (специальные отделы, секции, киоски) [13].

К сожалению, документ, который регулировал бы сферу БАД в целом, пока не разработан. Все технические регламенты Таможенного союза лишь частично касаются биодобавок, являющихся особой категорией пищевой продукции, отличающейся от таких категорий как «пищевая добавка» и «специализированная пищевая продукция, в том числе диетического лечебного и диетического профилактического питания».

1.1.3. Нормативное регулирование обращения биологически активных добавок к пище за рубежом

В 1962 г. ВОЗ и Международной организацией по продовольствию и агрокультуре был принят Пищевой кодекс, регулирующий большинство аспектов питания, в том числе вопросы, касающиеся производства и оборота БАД.

На рисунке 4 представлены основные документы, регулирующие качество БАД в странах запада и РФ.

В США регулирование БАД возложено на Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA). В 1990 г. Конгресс США принял Акт о маркировке продуктов питания (рис. 4), согласно которому БАД должны были иметь маркировку с указанием ингредиентов, которая ранее не была обязательной. Таким образом, Акт позволял при одобрении FDA определять продукты, оказывающие влияние на здоровье (на основании наличия или отсутствия в них соответствующих питательных веществ), что должно было быть подтверждено «существенным научным соглашением» [47, 76].

15.10.94 г. Конгрессом США был принят акт «О внесении изменений в федеральный акт о пищевых продуктах, лекарственных препаратах и косметических средствах с целью установления стандартов по отношению к пищевым добавкам» (рис. 4). Данный нормативный документ определяет понятие БАД, как продукта (за исключением табачных изделий), предназначенного для восполнения диеты, содержащего один или несколько из перечисленных ингредиентов: витамины, минеральные вещества, растительные компоненты, аминокислоты, а также концентраты, метаболиты, отдельные компоненты и экстракты описанных выше ингредиентов. Согласно данному акту, БАД предназначен для внутреннего употребления в форме таблетки, капсулы, жидкости, порошка, мягкой капсулы, а если не в такой форме, то не в виде обычной пищи и не предназначенный для использования в качестве единственного продукта при одном приеме пищи или при диетическом питании и

обозначенный на этикетке как «биологически активная добавка к пище» [38, 46, 104].

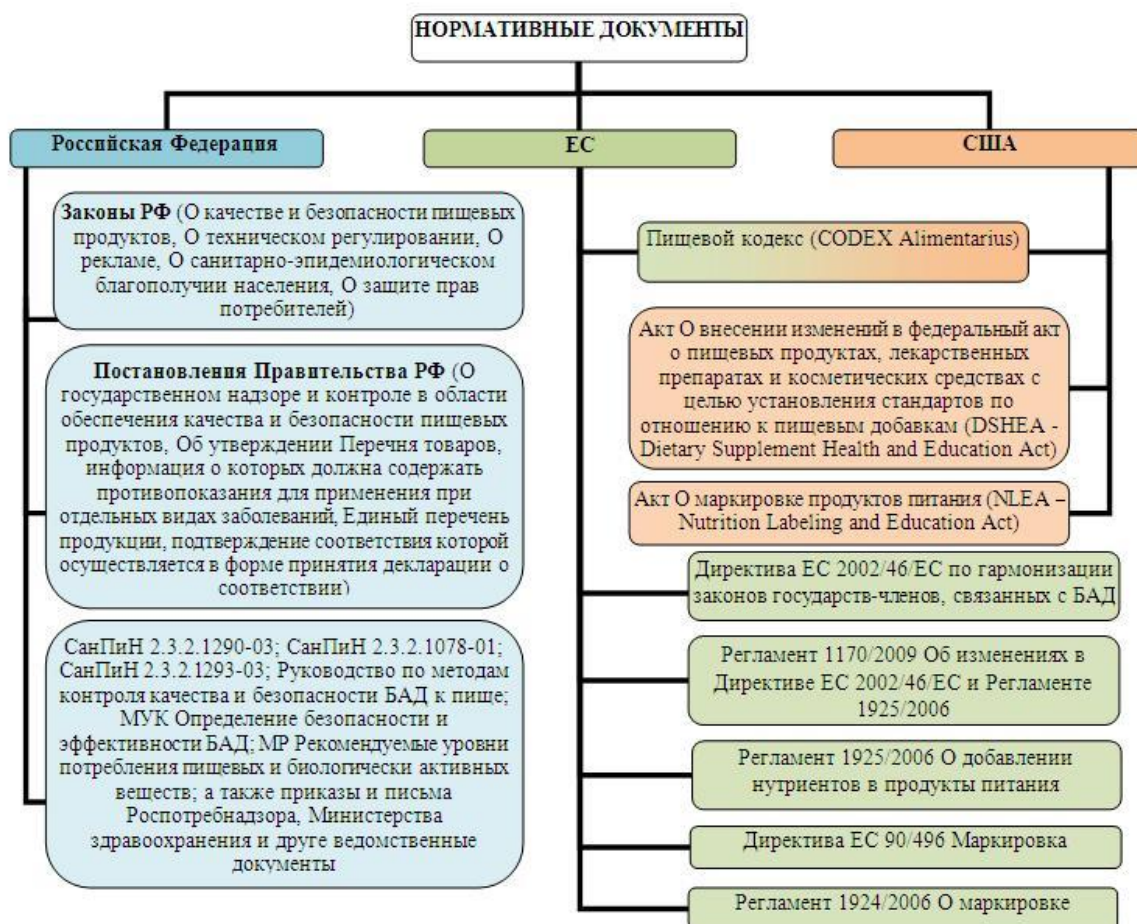


Рисунок 4. Нормативно-методическое регулирование оборота БАД в России и за рубежом

Информация на этикетках БАД в США контролируется специальной Комиссией (табл. 1). На этикетках допускается ограниченная информация о целях применения БАД, название и количество каждого ингредиента или общего количества ингредиентов в смеси, указание части растения, из которой был получен данный компонент (для БАД растительного происхождения). Кроме того, производитель обязан снабдить этикетку четкой и разборчивой надписью, гласящей, что продукт не предназначен для лечения, профилактики, диагностики, продукт является БАД. Ответственность за решение о количестве нутриента в

составе БАД и о его дозировании лежит только на производителе и не требует одобрения FDA. Особое отношение сформировалось к продукции, включающей в себя «новые» ингредиенты, т.е. не применявшиеся до октября 1994 г. На основе ингредиентов, присутствовавших в БАД до этой даты, разрешено производить любую новую продукцию. В случае с новыми ингредиентами производитель должен за 75 дней до появления добавки на рынке уведомить FDA [31, 76].

Таблица 1 – Государственное регулирование БАД в США

Структура	Функции	Ссылка
Управление по особым пищевым продуктам (Office of Special Nutritional)	Сбор и анализ информации о БАД.	47
Комиссия по этикеткам БАД (Commission on Dietary Supplement Labels)	Проверка сведений на этикетках и разработка рекомендаций по их оформлению.	76
Управление по БАД (Office of Dietary Supplements)	• Осуществление экспертных оценок и координации БАД. • Углубленное исследование потенциальных возможностей использования БАД в системе здравоохранения в США, поддержку научных исследований БАД и их роли в укреплении здоровья и предупреждении хронических заболеваний и других отклонений в состоянии здоровья. • Инициация программ по совершенствованию аналитической методологии и созданию стандартов по диетическим добавкам на основании доклинических исследований и клинических испытаний. • Организация конференций. • Подготовка специалистов. • Создание собственных web-сайта и газеты. • Составление баз данных (International Bibliographic Information on Dietary Supplements, Dietary Supplement Ingredient Database, Dietary Supplement Label Database, Computer Access to Research on Dietary Supplements) и т.д.	31, 77, 114, 115
Научно-исследовательские центры	Клиническая фармакология лекарственных растений, оценка эффективности БАД.	31

Согласно законодательству США, продажа БАД производится в аптеках, специальных магазинах и отделах супермаркетов [47, 76].

В странах Европейского Сообщества имеется свой перечень законодательных актов (рис. 4).

Директива 2002/46/ЕС – это основной документ, целью которого является гармонизация законодательства, устранение барьеров в торговле, обеспечение безопасности и правильной маркировки продуктов для того, чтобы покупатель мог сделать правильный информированный выбор. Нормы Директивы 2002/46/ЕС касаются, прежде всего, витаминов и минеральных веществ. Согласно данному документу, диетические добавки – это концентрированные источники нутриентов (витаминов, минералов) и/или других веществ (аминокислоты, эссенциальные жирные кислоты, клетчатка и различные травяные и растительные экстракты) с нутрициональным/питательным или физиологическим эффектом, используемые для дополнения обычной диеты [111, 113, 130]. Директива 2002/46/ЕС предусматривает установление максимальных и минимальных уровней витаминов и минералов в диетических добавках, терминологию, правила по маркировке и рекламе. Также она включает закрытый список витаминов и минеральных веществ, разрешенных к использованию при производстве БАД. Регламент № 1170/2009 внес изменения в данный список. Так же были заменены списки по добавлению нутриентов в продукты питания – «Обогащенные, продукты питания». Торговля в ЕС продуктами, содержащими витамины и минералы, не перечисленными в Приложении Директивы 2002/46/ЕС, запрещена с августа 2005. Таким образом, в странах ЕС БАД имеют статус свободно продаваемых товаров, т.е. их продажа разрешается на тех же основаниях, что и других потребительских товаров, и, если они не зарегистрированы в соответствии с законодательством в качестве ЛС, приравниваются к продуктам питания [111].

Для того чтобы различать понятия пищевых продуктов (в том числе БАД) и ЛС, Совет Европы, через частичное соглашение в социальной сфере и в области здравоохранения, создал модель гомеостаза. В соответствии с данной моделью должны быть использованы два основных критерия: предполагаемое использование

продукта и природа его влияния на один или более параметров. Пищевые продукты, как таковые, не подлежат предварительной маркетинговой процедуре, но они должны регулироваться соответствующим законодательством. Эта процедура состоит из авторизации БАД, определения пределов обнаружения контаминантов, соответствия общим требованиям гигиены и предмаркетингового разрешения на использование информации на этикетках. Если продукт используется для питания или укрепления здоровья, и в дозах, меньших, чем ЛС, он может поступать в продажу в соответствии с пищевым законодательством только если является безопасным (компоненты входят в позитивный список), качество продукта гарантируется и он производится согласно GMP, отсутствуют маркировки, характерные для ЛС [71, 130].

Особое внимание, как в странах ЕС, так и в США, уделяется маркировке БАД, в связи с чем выделены особые категории (рис. 5). Фундаментальный принцип любых маркировок состоит в том, что они должны быть научно обоснованы, однозначны и понятны для потребителя [58, 66, 100, 109, 110, 113, 123].

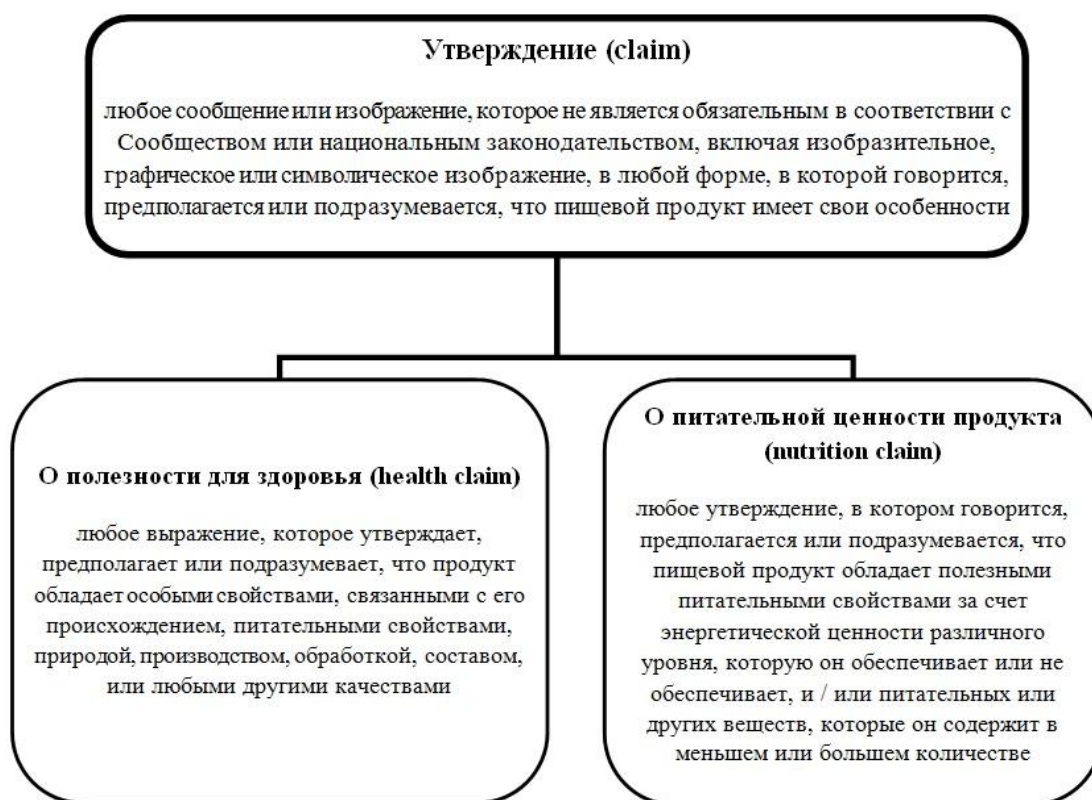


Рисунок 5. Категории маркировки БАД

Согласно директиве 2002/46/СЕ, маркировка, презентации и реклама не должны приписывать биологически активным добавкам к пище способности предотвращения, лечения или профилактики заболеваний человека или ссылаться на такие свойства, таким образом, различая БАД и ЛС [71, 111].

В ряде стран ЕС, помимо общих, разработаны собственные нормативные документы по регулированию и стандартизации БАД. Так, в Англии оборот БАД подпадает под действие так называемого «UK Medicines Act», который предусматривает необходимость получения специальной лицензии для производства, экспорта и продажи БАД.

В Германии качество БАД регламентируют «Положение о деятельности аптек» и «Предписание о декларации пищевой ценности». Таким образом, продукт, предназначенный для приёма внутрь, может быть или только лекарством, или продуктом питания. Положение о деятельности аптек предусматривает, что в ней вместе с ЛС могут продаваться продукты, являющиеся дополнениями к питанию. В рекламе БАД на территории Германии допустимы такие сочетания слов, как «дополняет питание», «для здорового питания», «для покрытия суточной нормы», «полезно для здоровья» и т.п. На упаковке БАД и в рекламе о них недопустимы рекомендации типа: «защищает от...», «уменьшает содержание холестерина в крови», «предназначается для нормализации кровяного давления» и т.п.

В Австрии для характеристики БАД существует такое определение, как «Verzehrproducte» (среднее между пищевыми продуктами и лекарственными средствами). Продажа их осуществляется после соответствующей сертификации.

В Швеции создана Национальная Администрация по пищевым продуктам, занимающаяся вопросами регулирования БАД [100].

В Румынии дополнительно действуют документы, представленные в таблице 2 [71].

Правовые акты, определяющие порядок оборота БАД, разработаны также в Бельгии, Нидерландах и Греции, где под БАД понимают только витамины и

минеральные вещества и относят их к продуктам питания, которые подлежат строгому контролю в отношении разовых и суточных доз [47].

Таблица 2 – Нормативные акты по регулированию БАД в Румынии

Название документа	Область регулирования
Совместный приказ Министерства сельского хозяйства, Президента Национальной санитарной ветеринарии и безопасности пищевых продуктов и Министерства здравоохранения № 1228/2005/63/244/2006	Технические нормы для маркетинга предварительно дозированных пищевых добавок животного и растительного происхождения и / или их смеси с витаминами, минералами и другими питательными веществами.
Приказ Министерства здравоохранения № 1069/2007	Нормы для пищевых добавок (применяет положения Директивы 2002/46/ЕС).
Решение Национального совета по телевидению и радио № 187/2006	Регулирование содержания аудиовизуальных программ.

Подходы к проверке качества и безопасности БАД в США и странах ЕС на первый взгляд кажутся более либеральными по сравнению с Россией, однако в данном случае для выпуска нового продукта производители рискуют большими средствами, что гарантирует высокую ответственность за качество БАД. В то же время вопрос о разграничении понятий ЛС и БАД остается открытым как в России, так и за рубежом. Обеспечить безопасность БАД при их обороте на рынке невозможно без надежных методов контроля содержания в них активно действующих веществ и подтверждения подлинности заявляемых в составе продукции ингредиентов, а также определения посторонних компонентов. Это главные критерии качества и эффективности БАД.

1.2. Токсикологическое значение БАД

Согласно Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), биологически активные вещества, компоненты пищи и продукты, являющиеся их источниками, используемые при изготовлении биологически активных добавок к пище:

- должны обеспечивать эффективность БАД и не оказывать вредного воздействия на здоровье человека;
- не должны содержать психотропные, наркотические, ядовитые, сильнодействующие вещества, определенные действующим законодательством государств-членов Таможенного союза и допинговые вещества, определенные действующим списком WADA.

Однако убедительных научных доказательств эффективности и безопасности большинства БАД и используемых для их получения растений нет. Исследуется лишь их специфическая фармакологическая активность и острая токсичность, изучение побочных реакций не проводится, тогда как используются данные препараты на протяжении длительного периода, большей частью бесконтрольно.

В соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача, организации, осуществляющие ввоз, производство и оборот БАД, обязаны предоставлять при регистрации препаратов сведения об отсутствии в них наркотических средств, психотропных, сильнодействующих и ядовитых веществ [25].

По данным производителя, БАД растительного происхождения, как правило, являются источником фенольных соединений (флавоноиды, антраценпроизводные, дубильные вещества), терпенов (горькие гликозиды, эфирные масла), полисахаридов. Несмотря на то, что все растения, входящие в состав парафармацевтика, должны быть разрешены к применению в пищевой промышленности или в качестве компонента лекарственных чаев и сборов в соответствии с требованиями МЗ РФ [10], всё чаще на рынке БАД встречаются продукты, содержащие сапонины и алкалоиды.

Токсичность растительных биодобавок может быть результатом влияния многих факторов:

- 1. Неверное обозначение видов растительного сырья, применяемого в данной продукции.** Существует множество задокументированных случаев подмены растительного сырья. Так, в 90-х годах в Бельгии, США, странах

Азии у больных, употребляющих сборы для снижения веса, основанные на китайских травах *Stephania tetranadra* и *Magnolia officinalis*, были отмечены тяжелые заболевания почек и несколько случаев уротелиальной карциномы. Последующий анализ показал, что из-за схожести китайских наименований растений произошла замена *Stephania tetranadra* на *Aristolochia fangchi*, содержащую аристолохиевую кислоту, обладающую нефротоксическим и канцерогенным действием [63, 78, 79, 89, 129]. FDA также были опубликованы случаи употребления БАД, содержащих, согласно ингредиентному составу, «plantain» и вызвавших у пациентов атриовентрикулярную блокаду. В результате исследования данных продуктов были обнаружены сердечные гликозиды *Digitalis lanata* [64, 69].

2. **Использование запрещенных растений и их частей, содержащих сильнодействующие, наркотические или ядовитые вещества.** Описаны случаи обнаружения в БАДах растений, содержащих пирролизидиновые алкалоиды (кава-кава, дубровник пурпурный, чистотел, белокопытник и т.д.), оказывающие гепатотоксическое, тератогенное, мутагенное и канцерогенное действия, и поражающие сердечно-сосудистую, легочную и центральную нервную системы [11, 36, 60, 68, 78, 84, 90, 92, 124].
3. **Загрязнение пестицидами, тяжелыми металлами, микроорганизмами.** В литературе встречаются множество сообщений о содержании в растительном сырье китайского происхождения (которое в основном и содержат БАД) соединений мышьяка, свинца, ртути, таллия, кадмия и др. токсичных металлов, а также бактерий и пестицидов [54, 82, 85, 89, 97, 101, 112, 118, 120].
4. **Добавление синтетических веществ, не указанных в составе БАД.** Среди данных веществ могут быть как фармацевтические препараты, так и сильнодействующие вещества, в т. ч. обладающие психотропным эффектом. Так или иначе, состав, указанный производителем, не соответствует фактическому. В 2002 г. с рынка был изъят БАД «PC-SPES», содержащий в своем составе варфарин и индометацин, а также синтетические эстрогены диэтилстильбэстрол и этинилэстрадиол [63, 87, 91, 99]. В литературных

источниках существует множество сообщений об обнаружении в составе биодобавок растительного происхождения соединений, внесенных в список наркотических средств и психотропных веществ, оборот которых запрещён (Список I) (фенфлурамин и его производные), соединений, внесенных в списки сильнодействующих и ядовитых веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса РФ (сибутрамин и его аналоги, диазепам, хлордиазепоксид), стероидов (преднизон, преднизолон), НПВС (диклофенак, фенилбутазон, индометацин, парацетамол), препаратов, запрещенных к применению в России (фенацетин), изъятых из обращения (фенолфталеин (пурген)) и иных синтетических веществ (силденафил, орлистат). [23, 43, 52, 53, 65, 73, 74, 75, 91, 95, 93, 99, 106, 108, 131, 132].

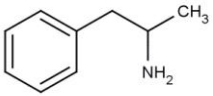
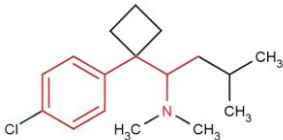
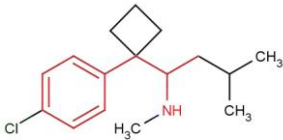
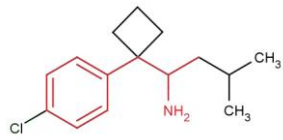
1.3. Сибутрамин и его производные, общая характеристика, способы обнаружения в БАД

В последнее время участились случаи выявления бесконтрольного применения сибутрамина и его производных в биологически активных добавках для похудения. Вопрос пресечения проникновения на территорию РФ из КНР БАД, содержащих в своем составе сильнодействующие вещества, учитывая различные правовые нормы, регламентирующие оборот добавок в России и Китае, и соседство границ наших государств, стоит достаточно остро. Сотрудниками правоохранительных органов обсуждаются варианты противодействия незаконному обороту сильнодействующих веществ и БАД и предлагаются пути решения данной задачи [37, 42].

Проблема ввоза и реализации на территории России БАД китайского производства, в состав которых входит данное вещество, рассматривалась в г. Харбине в декабре 2006 г., в результате чего была достигнута договоренность об информировании граждан Китая об ответственности, согласно российскому законодательству, за ввоз и продажу препаратов, в состав которых входят подконтрольные на нашей территории сильнодействующие и ядовитые вещества.

Также был пресечен канал поставки в Алтайский край БАД из Китая через Забайкальский край. Однако в том же году амурским наркоконтролем было изъято более 1,8 кг сильнодействующих веществ [8]. С 2008 года сибутрамин, а также его структурные аналоги, обладающие схожим психоактивным действием, включены в список сильнодействующих веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации [30]. По данным криминалистического исследования ФСКН России, с учетом дофаминовой теории формирования наркологических заболеваний, сибутрамин может вызывать привыкание и зависимость. Клинические описания действия данного вещества позволяют предположить использование его потребителями психоактивных веществ в качестве психостимулятора, в частности, действие сибутрамина напоминает действие амфетаминов и экстази [41]. Безусловно, сибутрамин и его деметилированные производные имеют структурное сходство с амфетамином, внесенным в Список наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, как видно из таблицы 3 [27]. Однако, некоторые зарубежные исследователи исключают возможность использования сибутрамина в качестве замены таких известных уличных наркотиков, как амфетамин или MDMA (экстази), ссылаясь на то, что изучение наличия у сибутрамина эффекта возникновения привыкания в сравнении с соединениями, которые повышают секрецию катехоламинов, показало низкий риск возникновения пристрастия к данному препарату [51, 53, 57].

Таблица 3 – Сравнение структурных формул сибутрамина, его производных и амфетамина

№ п/п	Название вещества	Химические названия вещества	Формула
1	Амфетамин	1-фенилпропан-2-амин	
2	Сибутрамин	1. 1-(4-хлорфенил)-N,N-диметил-альфа-(2-метилпропил) циклобутанметанамин 2. 1-(п-хлорфенил)-α-изобутил-N,N-диметилциклобутанметиламин 3. 1-[1-(4-хлорфенил) циклобутил]-N,N,3-триметилбутан-1-амин)	
3	Десметилсибутрамин	1. сибутрамин (нор-) 2. 1-(4-хлорфенил)-N-метил-альфа-(2-метилпропил) циклобутанметанамин 3. 1-[1-(4-хлорфенил) циклобутил]-N,3-диметилбутан-1-амин	
4	Дидесметилсибутрамин	1. сибутрамин (бис-нор-) 2. 1-(4-хлорфенил)-альфа-(2-метилпропил) циклобутанметанамин 3. 1-[1-(4-хлорфенил) циклобутил]-3-метилбутан-1-амин	

Механизм действия

Сибутрамин метаболизируется изоферментом CYP3A4 до деметилированных метаболитов М1 и М2 (десметилсибутрамин и дидесметилсибутрамин), которые обуславливают его терапевтический эффект и являются ингибиторами обратного захвата норадреналина, серотонина и допамина (рис. 6).

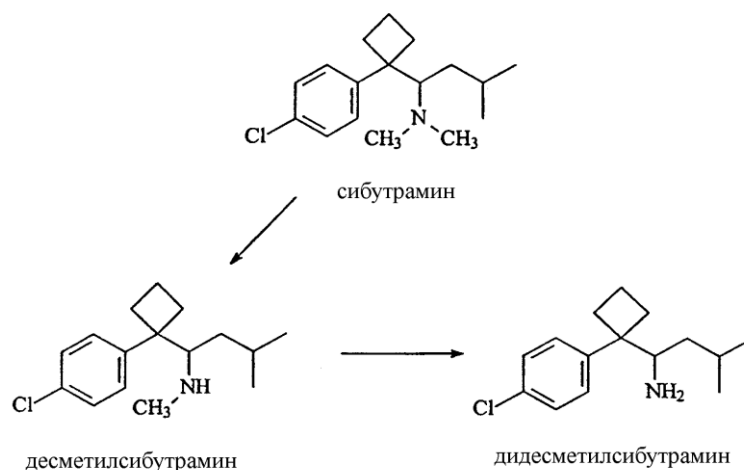


Рисунок 6. Метаболизм сибутрамина

В тканях головного мозга человека метаболиты M1 и M2 подавляют обратный захват норадреналина и серотонина в 3 раза активней, чем допамина: 73 %, 54 %, 16 %, соответственно. Сибутрамин и его метаболиты не влияют на высвобождение моноаминов, не ингибируют MAO. Они обладают низким сродством к большому количеству рецепторов нейромедиаторов, в т.ч. серотонинергических (5-HT₁, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}), адренергических (β_1 , β_2 , β_3 , α_1 , α_2), допаминовых (D₁, D₂), мускариновых, гистаминовых (H₁), бензодиазепиновых и глутаматных NMDA-рецепторов. Установлено, что десметилсибутрамин и дидесметилсибутрамин являются более эффективными (примерно в 100 раз) ингибиторами обратного захвата *in vitro* норадреналина и серотонина, чем сибутрамин [53, 62, 67, 88, 93, 94, 96, 105, 106, 107, 126, 127, 1278]. Также замечено, что R-энантиомеры деметилированных производных сибутрамина гораздо активнее S-энантиомеров [53, 80].

Анорексигенный эффект препарата обусловлен двойным механизмом, предусматривающим сокращение потребления пищи и увеличение расхода энергии [6]. При этом сибутрамин также вызывает доза-зависимое усиление подвижности крыс, происходящее параллельно с увеличением энергозатрат, что связано главным образом с допамин-зависимым усилением двигательной активности [53, 86, 127, 128]. Исследование механизма термогенного действия дидесметилсибутрамина (метаболит M2) на взрослых самках крыс Wistar показало,

что серотониновые рецепторы, альфа(1) и бета(3) адренорецепторы участвуют в индукции термогенеза M2, тогда как гипофагический эффект главным образом опосредован альфа(1)-адренорецепторами, что согласуется с повышением уровня серотонина и норадреналина посредством сильного ингибирования обратного захвата, которое впоследствии приводит к усилению рефлекторной симпатической активности бурой жировой ткани [102].

Исследования влияния сибутрамина на поведение крыс, связанное с возникновением беспокойства (тревоги), выявили как отсутствие анксиолитических эффектов сибутрамина, так и наличие данных эффектов у препарата, в том числе и после единичного введения [30, 50, 62]. В настоящее время имеются противоречивые данные о том, обладают ли сибутрамин и его деметилированные производные анксиолитическим или анксиогенным действием. Также нет никаких сведений о схожести психоактивного действия сибутрамина и его структурных аналогов десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина.

Воздействие на человека

Сибутрамин, десметилсибутрамин и дидесметилсибутрамин обладают рядом серьезных побочных эффектов, которые отражены в таблице 4 [59, 70, 72, 73, 80, 81, 83, 106, 103, 116, 119, 121, 125, 131, 133].

Клинические испытания сибутрамина гидрохлорида показали отсутствие каких-либо седативных или стимулирующих эффектов у препарата в сравнении с амитриптилином. При этом сибутрамин вызывал повышение частоты сердечных сокращений и систолического кровяного давления на 1, 2 и 6 ч после введения 60 мг [98].

Таблица 4 – Побочные действия сибутрамина, десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина

Орган, система	≥ 10 %	≥1 %, <10 %	<1 %
Центральная нервная система	Бессонница, сухость во рту.	Головная боль, головокружение, беспокойство, парестезии, изменение вкуса.	Судороги, сонливость, эмоциональная лабильность, кратковременные нарушения памяти, боль в спине, тревожность, нервозность.
Сердечно-сосудистая система		Тахикардия, сердцебиение, повышение АД, вазодилатация, гиперемия кожи с ощущением тепла.	Мерцательная аритмия.
Желудочно-кишечный тракт	Запор, потеря аппетита.	Тошнота, обострение геморроя.	Диарея, рвота, боль в животе, повышение аппетита, жажда, обратимое повышение уровней печеночных ферментов в крови.
Кожные покровы		Потливость.	Алоpecia, пурпура Шенлейна-Геноха, кожный зуд.
Система кроветворения			Тромбоцитопения.
Иммунная система			Реакции аллергической гиперчувствительности и (от умеренных высыпаний на коже, зуда и крапивницы до ангионевротического отека (отека Квинке) и анафилаксии).
Психические расстройства			Депрессия, психоз, состояния суицидально направленного мышления, суицид и мания.
Органы зрения			Затуманивание.
Мочевыделительная система			Острый интерстициальный нефрит, задержка мочи.

Таблица 4 – Продолжение

Репродуктивная система			Нарушения эякуляции, оргазма, импотенция, нарушение менструального цикла, маточные кровотечения.
Реакции на отмену			Головная боль, повышенный аппетит.
Прочие			Ринит, синусит, боль в спине, гриппоподобный синдром, периферические отеки, кровотечения, боль в спине.

Комитет по медицинским продуктам, предназначенным для человека (CHMP) пришёл к заключению, что риск при использовании препаратов, содержащих сибутрамин, превышает пользу и рекомендовал приостановить действие лицензии на их продажу на территории ЕС. Заключение CHMP основано на обзоре результатов исследования SCOUT (Sibutramine Cardiovascular OUTcomes), которое проводилось с целью оценки безопасности долгосрочного лечения сибутрамином. В исследование было включено 10744 пациентов с ожирением, либо избыточной массой тела, в возрасте 55 лет и старше, с высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний. В результате было выявлено повышение риска развития у больных серьёзных сердечно-сосудистых осложнений, таких как инсульт или инфаркт миокарда, при приёме сибутрамина по сравнению с группой пациентов, получавших плацебо [9].

Способы обнаружения сибутрамина и его производных в БАД

В литературных источниках встречается крайне мало информации по исследованию биологически активных добавок и продуктов растительного происхождения с целью обнаружения в них сибутрамина и его производных. В основном, это публикации зарубежных авторов, описывающих отдельные

аналитические методики в отношении сибутрамина, десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина.

Для скрининга данных веществ в составе БАД, а также в плазме крови описаны методики с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором и высокоэффективной тонкослойной хроматографии [73, 122].

D. Blachut и др. [53] было описано обнаружение сибутрамина, а также десметилсибутрамина в смеси соединений класса амфетаминов в биологически активных добавках растительного происхождения методом ГХ-МС. Были предложены следующие условия анализа: колонка HP-5ms, температура колонки программируемая: начальная 110 °C, поднимается со скоростью 12 °C/мин до 300 °C и удерживается 8 мин; ввод пробы с делением потока 1/30, температура инжектора 250 °C, скорость потока газа-носителя (гелий) – 0,6 мл/мин, анализ масс 40-400 m/z. В данных условиях было достигнуто приемлемое разделение хроматографических пиков веществ амфетаминового ряда и сибутрамина. В качестве идентификационной характеристики были получены масс-спектры исследуемых веществ, где наглядно была показана разница в 14 а.е.м. (отсутствие у ДМС одного метильного радикала) [53, 93].

P. Zou и др. для идентификации сибутрамина, ДМС и ДДМС в растительных биодобавках был предложен метод жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией и время-пролетной масс-спектрометрией в следующих условиях: колонка ODS-3 Inertsil, подвижная фаза – ацетонитрил : трифторуксусной кислоты 0,1 % раствор (33:67), в изократическом режиме со скоростью 0,4 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. МС/МС анализ проводили в диапазоне масс 30-300 m/z [74].

Для совместного обнаружения и количественного определения сибутрамина и ДДМС в биологически активных добавках был предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективной и ультрафиолетовой детекцией при длине волны 223 нм. При этом использовалась обращеннофазная колонка Spherisorb C8, подвижная фаза ацетонитрил :

муравьиной кислоты 0,2 % раствор : аммония ацетат, в изократическом режиме со скоростью 1 мл/мин. В результате были получены масс-спектры с характеристическими ионами, показывающими, что сибутрамин и дидесметилсибутрамин имеют сходную химическую структуру [122].

В литературе также описаны способы идентификации сибутрамина и его производных методами ИК и ЯМР-спектроскопии [53, 93], однако данные по количественному определению указанных веществ, незаконно внесенных в состав биодобавок, практически не встречаются. Поэтому актуальной является разработка соответствующих методик по выявлению производных сибутрамина в составе БАД, включающих как идентификацию, так и количественный анализ.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. БАД – широко распространенный вид продукции, которая не относится к лекарственным средствам, но позиционируется СМИ как средство для решения проблем здоровья. Данная продукция зачастую реализуется с нарушением законодательства, что обуславливает ее токсикологическое значение.

2. Имеются факты нарушения оборота БАД, связанные с несоответствием данных реестра, нормативной документации и фактического состава продукта.

3. Анализ нормативной базы оборота БАД показал, что, несмотря на большой спектр методов оценки безопасности БАД, они не включают процедуры установления факта наличия сильнодействующих веществ, поэтому актуальной является разработка соответствующих методик по выявлению сильнодействующих и психоактивных веществ в составе БАД, включающих идентификацию и количественный анализ.

4. В БАД для похудения обнаруживаются сибутрамин, внесенный в Список сильнодействующих веществ, и его производные десметилсибутрамин и дидесметилсибутрамин, что указывает на несовершенство системы контроля. Таким образом, необходимо изучить психоактивное действие десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина на предмет схожести с эффектами сибутрамина и соответствия их формулировке «...Сибутрамин, а также его структурные аналоги, обладающие схожим психоактивным действием...» Списка сильнодействующих веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на базе РИЦ «Фарматест» ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России.

2.1. Объекты исследования

1. Образцы сравнения, предоставленные правоохранительными органами при назначении экспертиз – субстанции сибутрамина гидрохлорида, десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина в виде порошков белого и светло-кремового цвета. Чистота образцов сравнения была установлена методом ГХ-МС и составила более 99,0 %. Содержание действующих веществ в субстанциях устанавливали методом неводного титрования 0,1 М хлорной кислотой в среде муравьиной кислоты и уксусного ангидрида (1:10), индикатор кристаллический фиолетовый. Чистота субстанций составила 99,60 %, 99,43 % и 99,65 % для сибутрамина гидрохлорида, десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина, соответственно.
2. Биологически активные добавки для похудения, приобретенные в аптеках г. Перми и посредством сети Интернет, а также материалы, изъятые в качестве вещественных доказательств (табл. 5; рис. 7).

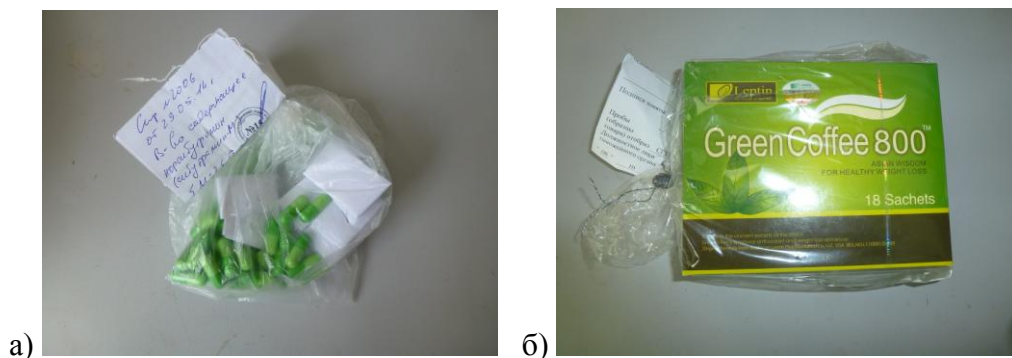


Рисунок 7. Материалы, предоставленные для исследования УФСКН России (а) и Федеральной таможенной службой (б).

Таблица 5 – Объекты исследования

№ п\п	Наименование/ описание объекта	Состав, указанный производителем	Форма выпуска	Серия / источник получения	Страна – производитель
1	«Жуйдэмэн»	Плоды боярышника кроваво-красного, цветки хризантемы китайской, трава эльшольции реснитчатой, листья периллы кустарниковой, семена кассии тора, листья зеленого чая	Капсулы № 60, 500 мг	111052801	Китай
2	«Билайт»	Лист лотоса, пория, гребенчатая мездра мускульного желудка курицы, семена китайской карликовой вишни, батат, плоды боярышника	Капсулы № 90, 400 мг	20101125	Китай
3	«Apple vinegar plant fiber slimming capsule»	Лист лотоса, пория кокосовидная, зеленое яблоко, семена японской вишни, боярышник	Капсулы № 10, 400 мг	20120630	Китай
4	«Летящая ласточка»	Листья брусники обыкновенной, кожура незрелого мандарина, пахима кокос, семена кассии тора, листья зеленого чая	Фильтр-пакеты № 20 по 3,0 г	050912	Китай
5	«Капсула обезжиривания «Жасминовый чай»	Жасмин, эстрагон, плоды бирючины блестящей	Капсулы № 10, 480 мг	20130205	Китай
6	Капсулы синего цвета	Неизвестно	Неизвестно	УФСКН России по Республике Хакасия	Неизвестно
7	«Green Coffee 800»	Кальций, пиколинат хрома, растительная смесь: стандартизованный экстракт листьев зеленого чая (антиоксиданты полифенолов, эпигаллокатехина галлата, кофеин), женьшеня корни стандартизованные	Саше № 18 по 5,0 г	SS201307	США
8	Капсулы зеленого цвета	Неизвестно	Неизвестно	УФСКН России по Республике Татарстан	Неизвестно

2.2. Методы исследования, приборы и реактивы

В работе использованы следующие инструментальные методы и поверенное оборудование:

- ГХ-МС на приборе Agilent 7890А с масс-селективным детектором Agilent 5975С.

В качестве условий анализа использовались типовые условия, применяемые в РИЦ «Фарматест» при исследовании аналогов наркотических веществ: колонка HP-5MS, ионизация осуществлялась методом электронного удара (70 eV); скорость потока газа-носителя (гелий) 1мл/мин.; ввод пробы с делением потока 1/10; температура испарителя 250°C; температура колонки программируемая: 5 мин. 70°C, затем со скоростью 10°C в мин поднималась до 310°C и выдерживалась 10 мин.

- ИК-спектрометрия на приборе Specord M80.
- ГЖХ на приборе Хроматэк-Кристалл 5000 (г. Йошкар-Ола, ЗАО СКБ «Хроматэк») с пламенно-ионизационным детектором.
- Оптическая микроскопия с использованием микроскопа «БИОМЕД-6» с окулярами 15х и объективами 4х, 10х, 40х, с цифровой фотонасадкой для микроскопа DCM-510.
- Для взвешивания образцов использовались весы марки «Sartorius GP1800G» (дискретность отсчета – 0,01 г).
- Весы лабораторные марки «КТ-2 ВЛР-200» (дискретность отсчета – 0,00001 г).

Исследование качественных характеристик объектов растительного происхождения проводили, используя приёмы микроскопического и качественного фитохимического анализа, в соответствии с методиками ГФ XI.

2.2.1. Химическое исследование

В работе использованы следующие реактивы: хлороформ (ч.д.а.), этиловый спирт 95 % (х.ч.), эфир диэтиловый (ч.д.а.), аммиака раствор концентрированный 25 % (ч.д.а.), йод кристаллический (ч.д.а.), калия йодид (х.ч.), кислота хлористоводородная концентрированная (х.ч.), кислота серная концентрированная (х.ч.), кислота азотная концентрированная (ос.ч.), кислота муравьиная (ч.д.а.), уксусный ангидрид (ч.д.а.), кислота уксусная ледяная (х.ч.), кислота хлорная 0,1 М, натрия гидроксида спиртовый раствор 10 %, пикриновой кислоты раствор 0,5 %, свинца ацетата раствор 10 %, квасцов железоаммониевых раствор 1%, хлоралгидрата раствор, калия йодовисмутата раствор (реактив Драгендорфа), кристаллический фиолетовый (ч.д.а.).

Качественный фитохимический анализ проводили на основные группы биологически активных веществ. Для проведения качественных реакций готовили водное, водно-спиртовое и сернокислое извлечение. В работе использовались общепринятые стандартные методики [4, 5, 45].

2.2.2. Биологическое исследование

Животные. Самцы белых беспородных мышей возрастом 6-7 недель, весом 20-30 грамм, содержались в виварии РИЦ «Фарматест» ГБОУ ВПО ПГФА, Пермь, Россия. До начала эксперимента животные содержались в условиях вивария ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России на стандартной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92) согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96), в клетках по 10 голов. В пределах суточного опыта – по одной мыши в клетке, постоянно подвергаясь «стрессу одиночества». Доступ к воде и пище у животных был свободным, за исключением суток экспонирования в камере регистрации спонтанной двигательной активности, когда у животных был доступ только к воде.

Животные выращены в условиях естественного суточного освещения, и во время изученного циркадного периода искусственный свет также не использовался.

При проведении всех видов исследований параллельно группам животных, которым вводится исследуемое вещество (экспериментальная группа), имелись аналогичные по численности группы контрольных животных, которым теми же способами вводили эквивалентные объемы растворителя. Животные содержались в идентичных условиях, совпадали по возрасту, полу и имели одинаковый режим и рацион питания. Животные распределялись по группам случайным образом методом рандомизации.

Методические основы построения эксперимента. Для установления однородности поведенческих эффектов сибутрамина и ДДМС проводили следующие тесты на лабораторных животных:

1. Тест спонтанной двигательной активности. Проводится с целью изучения двигательной активности животных на длительных интервалах времени после введения исследуемых веществ. Этот этап исследования включает сопоставление кривых динамики пиковых поминутных энергозатрат животных в контроле и в опытных группах (для обоих веществ) в течение одного циркадного периода – в условиях так называемого «длительного» модельного стресса. Анализ выполняется по данным регистрации СДА, проводится интервальная оценка доверительных интервалов для каждой временной точки, по её результатам строится визуализация «продольного среза эффекта» относительно оси времени.

Для изучения СДА одиночных животных использовалась установка «Активность-2» (ЕНИ ПГУ – ПГФА, Пермь, Россия). Установка представляет собой высокочувствительный 16-канальный актографический программно-аппаратный комплекс, регистрирующий в цифровом виде данные о спонтанной двигательной активности животных в течение одного суточного (циркадного) периода [1]. Условия содержания животных в установке не отличались от нормативных (согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96)), однако на

время СДА-теста животные содержались в клетках (регистрирующих камерах) в течение суток, поодиночке, имели свободный доступ к воде, но были лишены питания (были накормлены заранее) [35].

Данные, сформированные аппаратной частью, обрабатывались программными модулями комплекса, а также пакетами математической обработки данных, в частности, StatSoft Statistica 8.0, и R 3.0.1 [117]. Полученные СДА-данные позволяют выявить и описать отклонения от нормальной кривой двигательной активности (baseline) [49], синхронно полученной по данным с контрольной группы животных. Эти результаты позволили проследить суточную динамику влияния изучаемых веществ на СДА в аспектах длительности и магнитуды (абсолютного пикового значения) эффекта. Порядок проведения эксперимента включал 3 фазы: пре-экспозиция, введение, экспериментальная экспозиция. Длительность пре-экспозиции составляла 80 минут. Животные на этой фазе помещались в индивидуальные камеры регистрации двигательной активности, в указанное время велась запись индивидуальных параметров с целью зафиксировать фоновую вариабельность поведения (до экспозиции) в опытных группах относительно контрольной, исключить аномальных животных, проверить стабильность параметров системы и т.д. Последующие 10 минут – выполнение введения веществ в порядке плацебо → меньшая доза → большая доза, и помещение обратно в индивидуальные камеры. На этой фазе закладывается небольшой взаимный фазовый сдвиг результатов в пределах 5 минут. После инъекции и до конца экспериментального периода длится экспериментальная экспозиция, на протяжении которой происходит разворачивание временной картины эффекта. При этом кривые СДА опытных групп интерпретируются относительно кривой контрольной группы (baseline), поскольку запись данных происходит синхронно, что обеспечивает однородность внеэкспериментальных условий (в первую очередь, внешних ритмоводителей – время суток, длина светового дня и т.д.).

2. Тест «Открытое поле» и анализ дискретных элементов поведения для выявления нарушений когнитивных функций. Дискретные элементы поведения

фиксируются экспертом. Для получения «поперечных» относительно стрелы времени данных использовалась установка «Открытое поле» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия), представляющая собой круглую площадку диаметром 63 см с имеющимися 13 отверстиями в полу и разделенной на 19 равных частей с выделением периферической, промежуточной и центральной зоны поля. Установка «Открытое поле» предназначена для изучения поведения грызунов в новых (стрессогенных) условиях и позволяет оценить: выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов; уровень эмоционально-поведенческой реактивности животного (седацию-возбуждение); стратегию исследовательского (оборонительного) поведения; привыкание; запоминание обстановочных стимулов; симптомы неврологического дефицита; локомоторную стереотипию. Перед опытом животные проходили получасовое экспонирование в клетках по трое, и в «открытое поле» животное изымалось из этой группы. Тестируемое животное помещалось в центр площадки хвостом к экспериментатору. В течение трех минут наблюдения за животными регистрировали следующие показатели: число пересеченных квадратов по периферии, на 2/3 и центре площадки (горизонтальная двигательная активность), число вставаний на задние лапы (вертикальная двигательная активность), число заглядываний в отверстия поля (ориентировочно-исследовательская активность), количество фекальных болюсов (эмоциональный фактор), груминг [3, 61].

3. Видеотрекинг. Обработка данных видеотрекинга с целью получения континуальных характеристик поведения животных в «Открытом поле» позволяет описывать проявления тревожности/страха и сопутствующие явления. На этой фазе выполняется объективное количественное сопоставление поведения групп на основе полностью автоматизированных процедур, где участие человека во всём процессе сбора, подготовки и обработки данных практически исключено. Для детализации и объективизации результатов измерений выполнялся видеотрекинг «Открытого поля», т.е. животные в процессе выполнения теста регистрировались на видео, после чего поток видеоданных обрабатывался программной частью комплекса. Таким образом, традиционная этограмма регистрировалась

параллельно и независимо от технической надстройки. Ядро обработки данных видеотрекинга – процедуры многомерного непараметрического дисперсионного анализа, основанные на работах [55, 56]. Вычисляемые и поведенческие параметры таковы: пройденный путь, индивидуальная вариабельность скорости, верхний дециль ускорений, отношение времени подвижности/неподвижности, асимметричность выбора направлений и интегральная асимметричность, доля времени нахождения вне периферии поля, а также доля времени активности в периферии поля. Кроме того, применены характеристики временных рядов: энтропия Шеннона, показатель Хёрста и индекс фрактальности.

Не менее чем за 60 минут до тестирования животных помещали в тихое, слабо освещенное место. В этот период исключались перегруппировка животных, кормление, взятие в руки и другие активные манипуляции.

Опыты проводились между 17 и 21 часом, поскольку в отличие от дневных часов, на это время приходится нормальный пик активности, что обеспечивает более высокую разрешающую способность метода по сравнению с дневными опытами. Кроме того, в это время в лаборатории регистрировались минимальные интенсивности внеэкспериментальных факторов, требующих учёта.

В опыте с десметилсибутрамином были использованы 32 мышей (СДА). В тесте «Открытое поле» использовалось 24 животных в контрольной группе, по 6 в группах с дозой 1 мг/кг, по 9 животных в группах с дозой 10 и 100 мг/кг. Всего было использовано в тесте 72 мыши.

В исследовании дидесметилсибутрамина, в целом, было использовано 44 животных. В это число вошли 2 опытных группы – 4 животных для сибутрамина и 5 животных для ДДМС, и 2 контрольных группы из 4 и 7 животных соответственно – при изучении длительной (циркадной) динамики эффекта, оказанного на нормальную стрессовую реакцию животных (в 2 СДА-тестах), а также 2 опытных группы (для каждого вещества) и контрольная группа – по 8 животных – при проведении теста «Открытое поле».

Расчет доз исследуемых веществ для животных. Расчёт выполнен с учетом разовой дозы лекарственного препарата сибутрамина (Редуксин) для

человека среднего возраста и средней массы (70 кг) – 10 мг. Расчет дозы для мышей проводили, руководствуясь правилами о межвидовом переносе доз, представленными в таблице 6 [35]:

Таблица 6 – Межвидовой перенос доз

Объект	Масса тела (г)	Коэффициент пересчета доз (мг/кг) с животных на человека
Человек	70 000	-
Мышь	20	11,8

Эффекты ДМС и ДДМС исследовались в двух различных экспериментальных программах; при исследовании в качестве эталона сравнения был применён сибутрамина гидрохлорид в дозе 10 мг, доза ДДМС соответствовала разовой принимаемой для достижения изменённых состояний сознания. Таким образом, разовые дозы сибутрамина и десметилсибутрамина для исследования на мышах составили 1 мг/кг. Общий исследованный диапазон доз сибутрамина и ДМС включал 1 мг (однократная доза для животного), 10 и 100 мг. ДДМС был исследован только в однократно принимаемой дозе.

Увеличение дозы позволяет получить вероятные токсические и побочные эффекты.

Введение исследуемых веществ осуществляли внутрибрюшинно. Навеска вещества диспергировалась в изотоническом растворе натрия хлорида до получения однородной взвеси. Точность дозирования достигалась изменением объема вводимого раствора при его постоянной концентрации. Дозирование осуществляли по содержанию активного компонента.

Для каждого вещества были получены как «продольные», так и «поперечные» данные. В обеих группах опытов было обязательным наличие синхронного контроля групп, инъецированных плацебо (дистиллятом), и исследуемыми веществами.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ КОНТРОЛЕ МАССЫ ТЕЛА

3.1. Анализ информационных данных по составу БАД растительного происхождения

В настоящее время рынок БАД представляет собой довольно большой сегмент фарминдустрии, включающий множество каналов распространения. Так, только за два года существования Таможенного союза было зарегистрировано 9134 биологически активных добавки к пище, из них около 57 % (5188) – БАД российского производства. По прогнозам экспертов, рынок БАД будет расти в среднем на 5 % в год в ближайшие пять лет. На сегодняшний день в России зарегистрировано более 9500 наименований биологически активных добавок. Помимо аптечных организаций, ведущими каналами распространения БАД являются торговые и MLM-сети, специализированные магазины, интегрированные каналы (теле- и Интернет-магазины, Call-центры). Оборота внеаптечного сегмента рынка биологически активных добавок практически не поддаётся контролю ввиду отсутствия достоверных обобщённых данных, и, следовательно, более подвержен различного рода нарушениям. Особенно остро стоит вопрос стандартизации парафармацевтических БАД, содержащих в своем составе растительные компоненты.

Нами был проведен сравнительный анализ информации, предоставленной Интернет-порталами (сайты производителей, Интернет-магазины, рекламная информация) и официальными источниками (Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию и Федеральный реестр БАД) [32].

Было проанализировано 3 000 наименований БАД растительного происхождения. В ходе исследования сравнивали состав БАД, указанный при регистрации продукта производителем (данные Реестра продукции, прошедшей государственную регистрацию), и состав тех же БАД, представленных на официальных сайтах производителей данных продуктов и рекламных сайтах.

Полученную информацию также проверяли на наличие запрещенных растительных компонентов в соответствии со списком, утвержденным СанПиН 2.3.2.2567-09.

В результате были обнаружены нарушения (2 %), представленные на рисунке 8:

- наличие растительных объектов, запрещенных в составе БАД, наблюдалось в 76 % случаев от общего количества нарушений;
- расхождения в составе по разным источникам информации, без обнаружения растений из негативного списка, составили 24 %.

Данные анализа представлены в Приложении 1.

Таким образом, российский рынок БАД в настоящее время представляет собой довольно большой сегмент продукции, реализуемой как через фармацевтические учреждения, так и посредством интегрированных каналов, основной особенностью которого является отсутствие должного контроля качества биоактивных добавок и процедуры их реализации. Полученные данные свидетельствуют о необходимости тщательного изучения сложившейся ситуации, организации контроля фармацевтического рынка БАД, ужесточении ответственности за недобросовестную рекламу, а также разработке мер выявления фальсифицированной продукции.

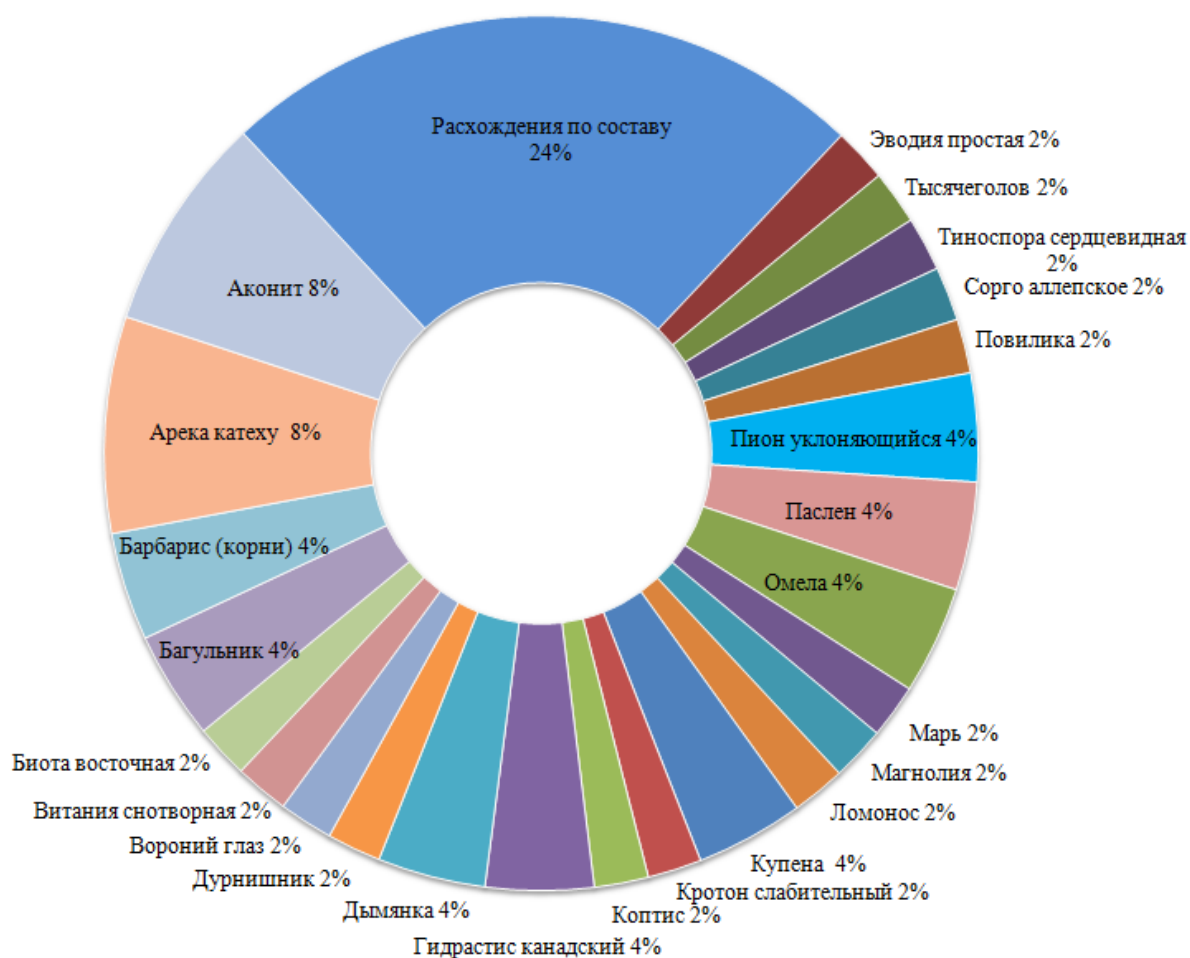


Рисунок 8. Выявленные нарушения в компонентном составе БАД растительного происхождения

3.2. Микроскопический анализ

Для приготовления микропрепаратов порошок содержимого капсул помещали в колбу, прибавляли 5 % раствор гидроксида натрия, разведенный водой (1:1), и кипятили в течение 1-2 мин., тщательно промывали водой и помещали на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата. Объект накрывали покровным стеклом, слегка подогревали до удаления пузырьков воздуха и после охлаждения рассматривали под микроскопом сначала при малом, затем при большом увеличении.

В результате анализа, в микропрепаратах объектов 1 и 2 (раздел 2.1) были обнаружены обрывки паренхимы (рис. 9). Также в микропрепарате объекта 2

видны волокна с кристаллоносной обкладкой, характерные для корней солодки (рис. 10), однако согласно составу производителя, данный продукт не содержит корни солодки. Во всех объектах наблюдали большое количество зерен крахмала, в качестве примера на рисунке 11 приведены фото микроскопии объектов 3 и 5.

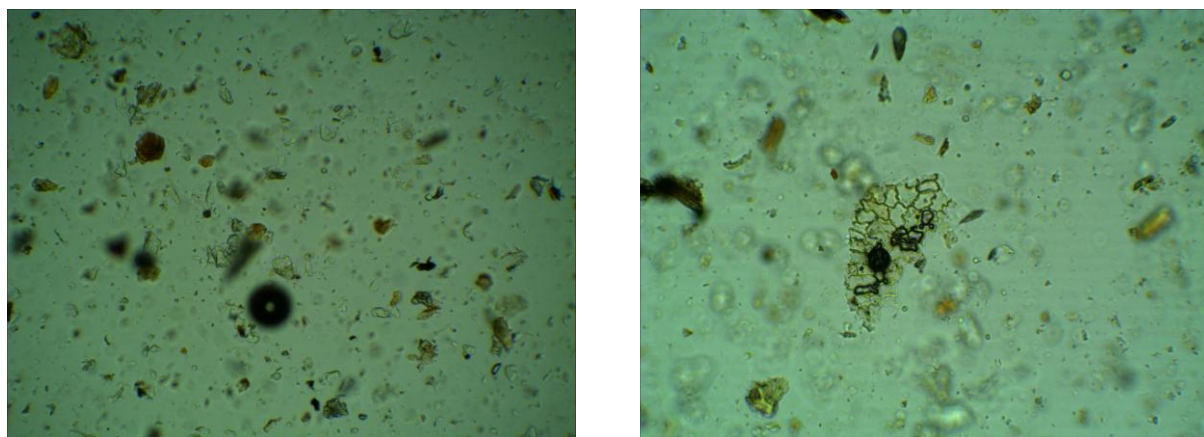


Рисунок 9. Микропрепарат содержимого капсул объектов 1, 2.

Обрывки паренхимы

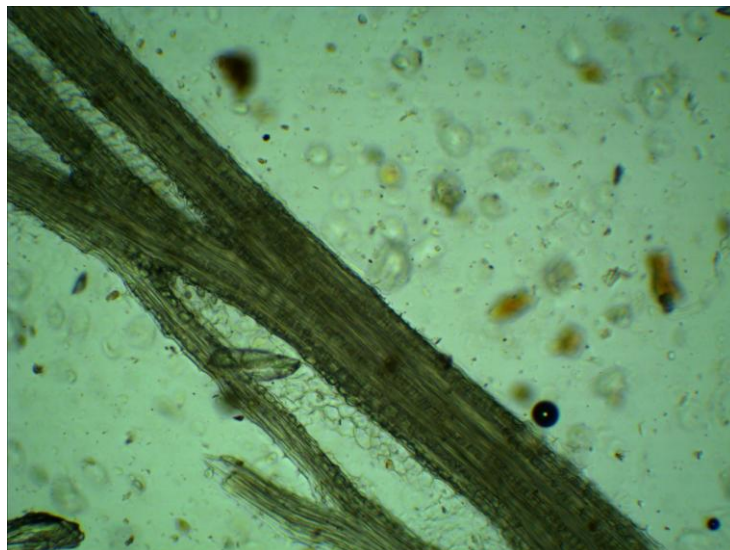


Рисунок 10. Микропрепарат содержимого капсул объекта 2. Волокна с кристаллоносной обкладкой

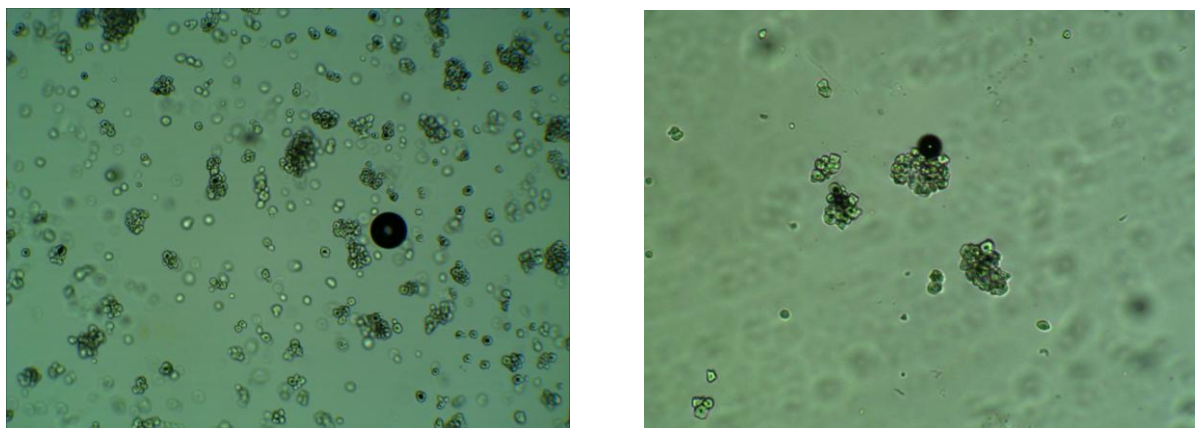


Рисунок 11. Зерна крахмала

Полученные данные свидетельствуют о несоответствии фактического состава БАД, позиционируемых как продукты, содержащие исключительно растительные компоненты, составу, указанному производителем.

3.3. Качественный химический анализ на основные группы биологически активных веществ

Качественный анализ на основные группы биологически активных веществ проводили по следующим методикам, реактивы для которых приведены в разделе 2.2.1. Результаты анализа представлены в таблице 6 [39].

Определение флавоноидов. Проба Синода: 1,0 г порошка объекта исследования залили 10 мл спирта этилового 95 %, довели до кипения на водяной бане и настаивали 24 ч. Извлечение профильтровали, упарили до 2 мл и разлили в 2 пробирки поровну. В каждую пробирку добавили 3 капли кислоты хлористоводородной концентрированной. В первую пробирку внесли 0,05 г цинковой пыли и нагревали на водяной бане до кипения. В извлечениях из объектов 1, 2, 4, 6 наблюдалась неярко розово-вишневая окраска, что позволяет говорить о наличии флавонолов.

Определение антраценпроизводных. Реакция Борнтрегера: 0,1 г порошка объекта исследования несколько минут кипятили с 2 мл натрия гидроксида 10 % спиртового раствора. Извлечение профильтровали, охладили, подкислили

кислотой хлористоводородной разведенной до слабо-кислой реакции среды и взбалтывали с 2 мл эфира этилового. Затем добавили равный объем аммиака 10 % раствора. Извлечения из объекта 3 и 4 окрасились в вишнево-красный цвет. При этом эфирный слой извлечения объекта 3 оставался окрашенным в бледно-желтый цвет.

Определение алкалоидов. Извлечение для проведения реакций на алкалоиды готовили следующим образом: 0,2 г порошка объекта исследования взбалтывали с 2 мл кислоты серной разведенной. Далее проводили качественные реакции с общеалкалоидными реактивами (Драгендорфа, Вагнера, пикриновой кислотой). Все объекты давали оранжево-коричневые осадки с реактивом Драгендорфа, бурые осадки с реактивом Вагнера. При взаимодействии с пикриновой кислотой наблюдалось образование сростков игольчатых кристаллов желтого цвета.

Мурексидная проба: к 0,1 г порошка объекта исследования прибавили 3 капли кислоты азотной концентрированной и выпарили досуха в фарфоровой чашке. Затем добавили 10 мл аммиака 25 % раствора. Объекты 3, 4 и 7 давали коричнево-красное окрашивание, что говорит о наличии кофеина.

Определение дубильных веществ. Извлечение для проведения реакций на дубильные вещества готовили следующим образом: 0,1 г порошка объекта исследования кипятили с 10 мл воды очищенной в течение нескольких минут. Далее проводили качественные реакции с раствором железоаммониевых квасцов (черно-синее окрашивание извлечения из объекта 1, и черно-зеленое – из объектов 3, 4, что говорит о преобладании в извлечении гидролизуемой и конденсированной группы дубильных веществ, соответственно) и свинца ацетата 10% раствором (извлечения из объектов 1, 3, 4 давали белый хлопьевидный осадок, растворимый в уксусной кислоте).

Таблица 7 – Результаты проведения качественных реакций с извлечениями из объектов исследования

Цветные реакции / № объекта	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Проба Синода	++	++	-	+	-	+	-	-
2. Добавление раствора ЖАК	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
3. Добавление 10% раствора ацетата свинца	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
4. Добавление реактива Драгендорфа	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5. Добавление раствора кислоты пикриновой	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6. Добавление реактива Вагнера	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7. Мурексидная проба	-	-	+++	+++	-	-	+++	-
8. Реакция Борнтрегера	-	-	+	++	-	-	-	-

В результате проведенных реакций (табл. 6) в объекте 1 установлено наличие флавоноидов (1 реакция), дубильных веществ (2, 3 реакции), алкалоидов (4-6 реакции). В объекте 2 установлено наличие флавоноидов (1 реакция) и алкалоидов (4-6 реакции). Извлечение из объекта 3 давало положительные реакции на алкалоиды (4-6 реакции), а так же на дубильные вещества (2, 3 реакции), кофеин (7 реакция) и хризофанол (реакция 8). В объекте 4 обнаружены флавоноиды (1 реакция), дубильные вещества (2 реакция), алкалоиды (реакции 4-6), кофеин (7 реакция), антраценпроизводные (8 реакция). В объекте 5 обнаружены алкалоиды (4-6 реакции). В объекте 6 обнаружены флавоноиды (1 реакция) и алкалоиды (4-6 реакции). В объекте 7 обнаружены алкалоиды (4-6 реакции) и кофеин (7 реакция). В объекте 8 обнаружены алкалоиды (4-6 реакции).

3.4. Хроматографическое исследование методом газовой хроматографии с масс-селективной детекцией

Для хроматографического исследования объектов 1-6 и 8 (раздел 2.1.) готовили извлечения с использованием спирта этилового 95 % в соотношении 1:10, взбалтывали в течение 30 мин и центрифугировали.

Поскольку элюирующей способности спирта этилового для объекта 7 было недостаточно в связи с малым содержанием действующих веществ в объекте, готовили хлороформное извлечение в щелочной среде (pH 9-10) в соотношении 1:10, нагревали на песчаной бане в течение 5 мин, охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали.

Условия для анализа описаны в разделе 2.2. При выборе условий хроматографирования особое внимание было уделено способу ввода пробы. Так, для объектов 5, 7 был подобран способ ввода пробы без деления потока в связи с малыми концентрациями веществ.

Регистрацию масс-спектров проводили по полному ионному току. Полученные масс-спектры сравнивали с библиотечными масс-спектрами. Настройка масс-спектрометрического детектора осуществляли по стандартной программе настройки Autotune.

Полученные хроматограммы анализируемых образцов № 1, № 2 и № 3 показали наличие пиков со временем удерживания 13,18 мин, 13,18 мин и 13,10 мин, масс-спектры которых соответствуют библиотечному масс-спектру дидесметилсibuтpаминa (рис. 12 – 15 (a), 23 (a)).

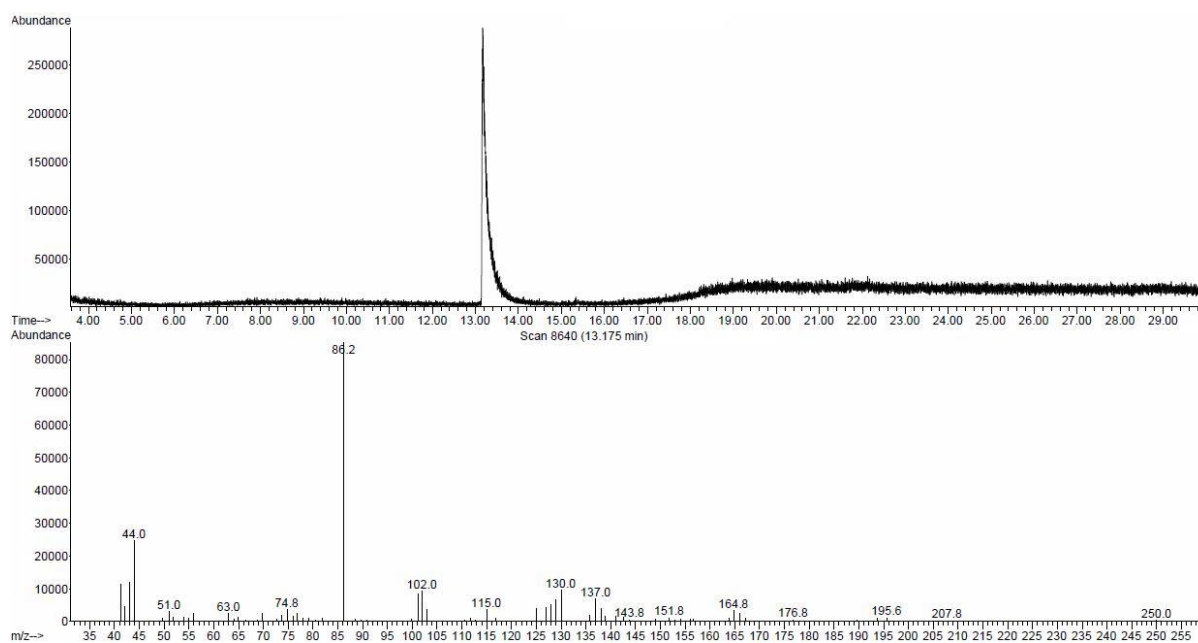


Рисунок 12. Хроматограмма извлечения из объекта 1 (вверху) и масс-спектр пика со временем удерживания 13,18 мин (внизу)

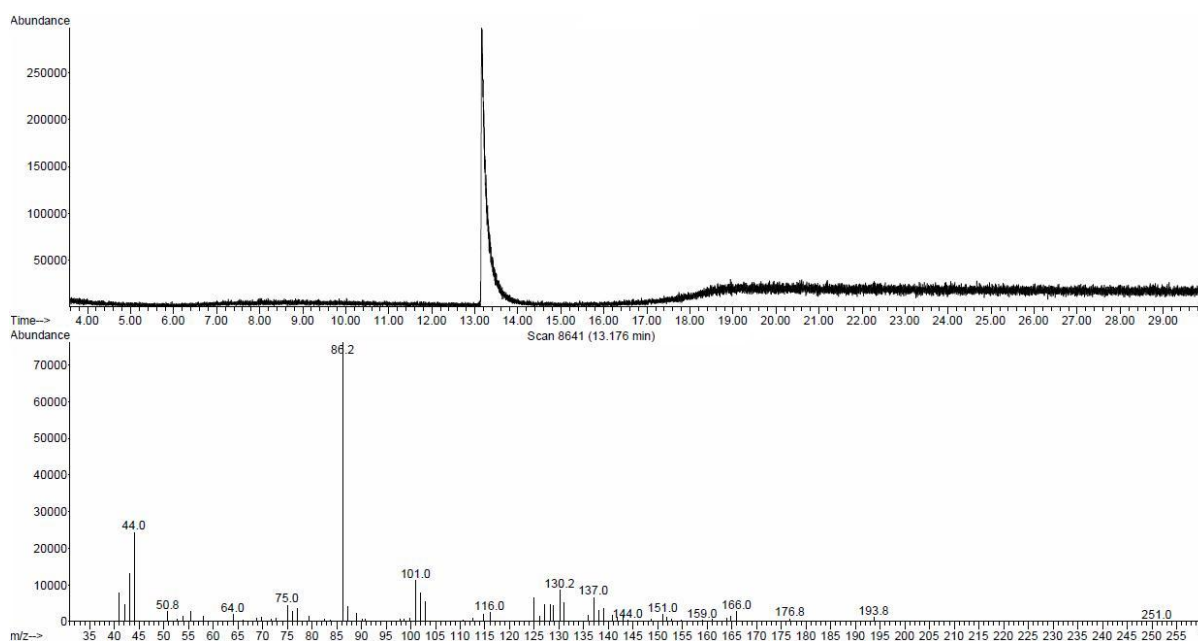


Рисунок 13. Хроматограмма извлечения из объекта 2 (вверху) и масс-спектр пика со временем удерживания 13,18 мин (внизу)

В объекте № 3 также были обнаружены пики, масс-спектры которых соответствовали библиотечным масс-спектрам хризотанола, кофеина и фенолфталеина (рис. 15 (б-г), 16 – 18).

На хроматограмме объекта № 4 обнаружен пик со временем удерживания 13,34 мин, соответствующий кофеину (рис. 17, 19).

На хроматограммах извлечений из объектов №№ 5, 6 наблюдали пики с временами удерживания 13,64 мин и 13,23 мин соответственно (рис. 20, 21). Масс-спектры данных веществ соответствуют библиотечному масс-спектру сибутрамина (рис. 22)

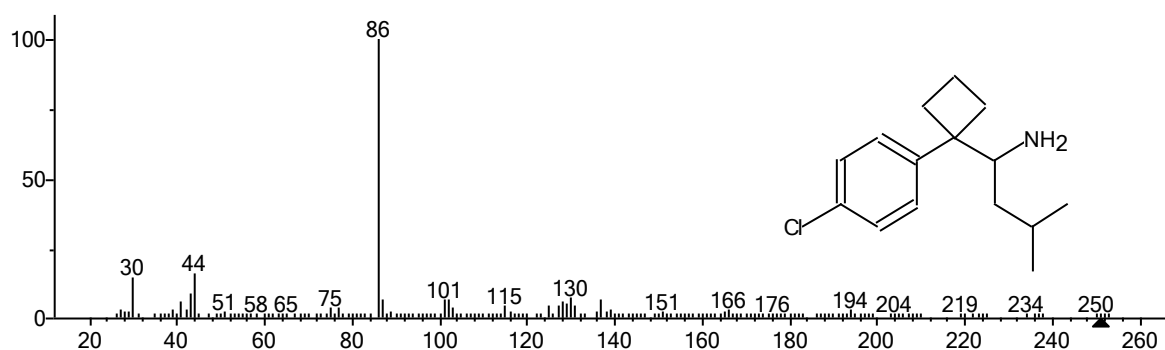


Рисунок 14. Библиотечный масс-спектр дидесметилсибутрамина

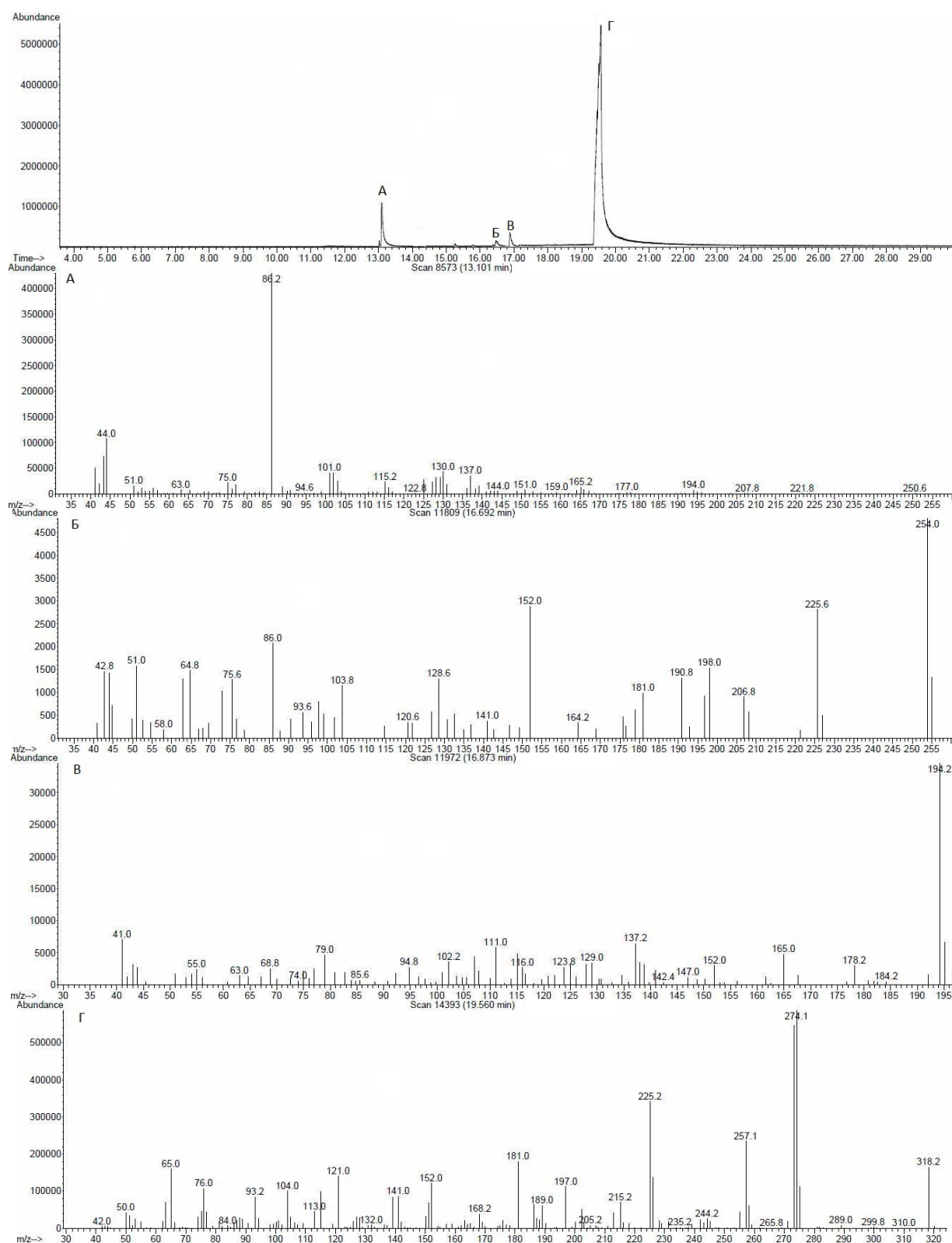


Рисунок 15. Хроматограмма извлечения из объекта 3 (вверху) и масс-спектры пиков со временем удерживания 13,10 мин (а), 16,69 мин (б), 16,87 мин (в) и 19,56 мин (г)

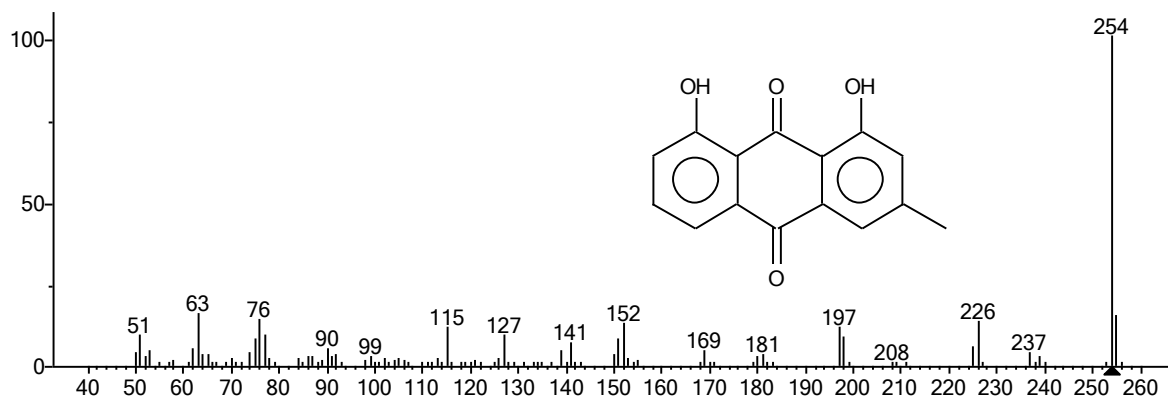


Рисунок 16. Библиотечный масс-спектр хризифанол

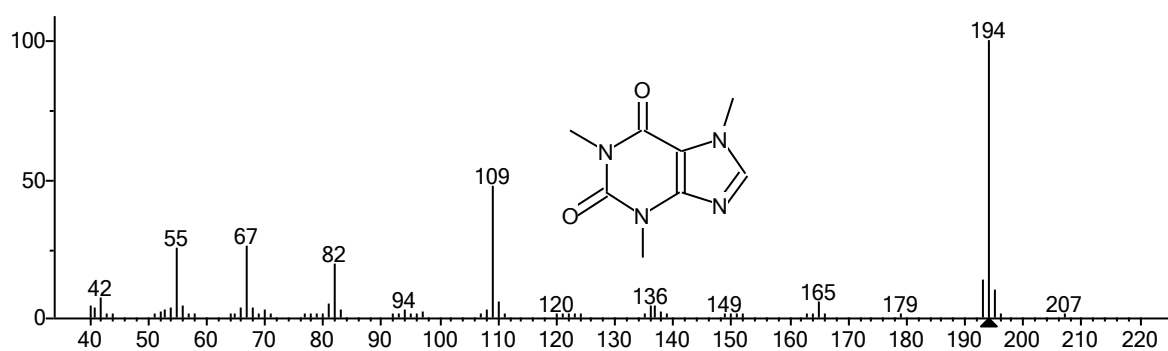


Рисунок 17. Библиотечный масс-спектр кофеина

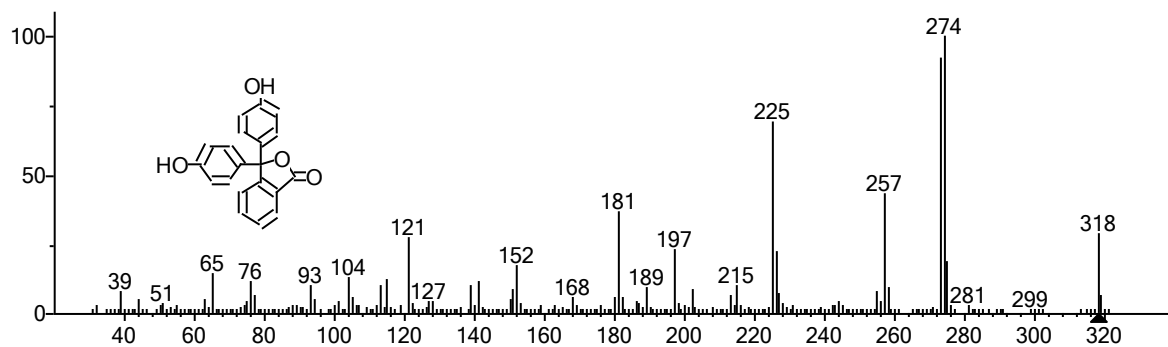


Рисунок 18. Библиотечный масс-спектр фенолфталеина

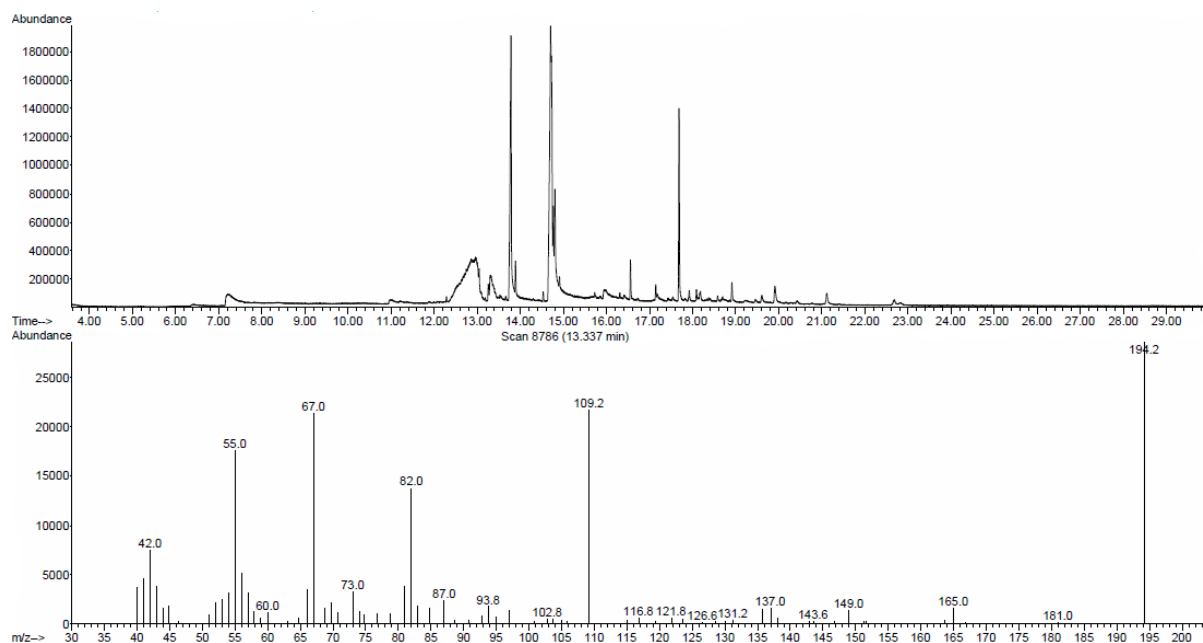


Рисунок 19. Хроматограмма извлечения из объекта 4 (вверху) и масс-спектр пика со временем удерживания 13,34 мин (внизу)

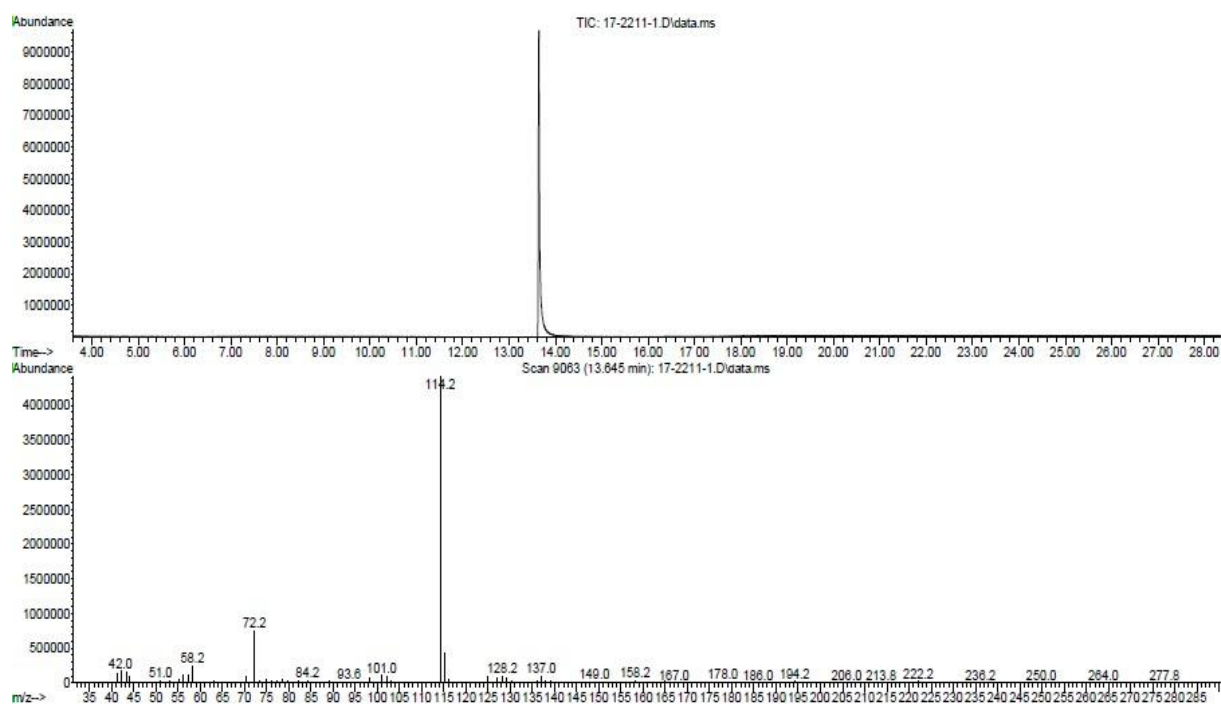


Рисунок 20. Хроматограмма извлечения из объекта 5 (вверху) и масс-спектр пика со временем удерживания 13,65 мин (внизу)

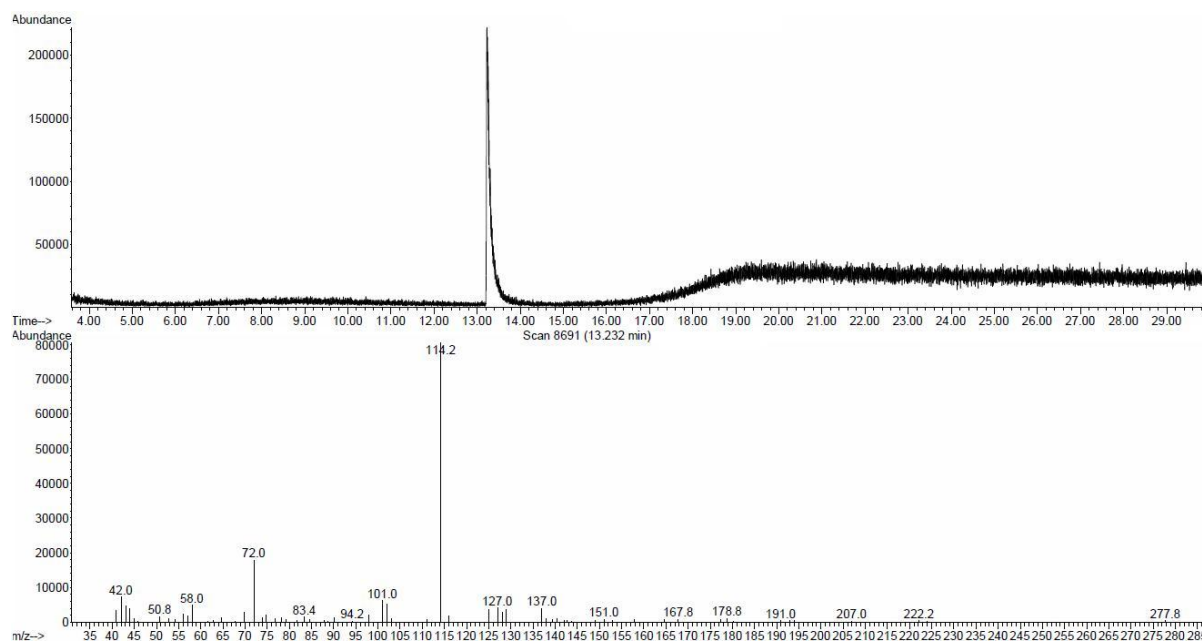


Рисунок 21. Хроматограмма извлечения из объекта 6 (вверху) и масс-спектр пика со временем удерживания 13,23 мин (внизу)

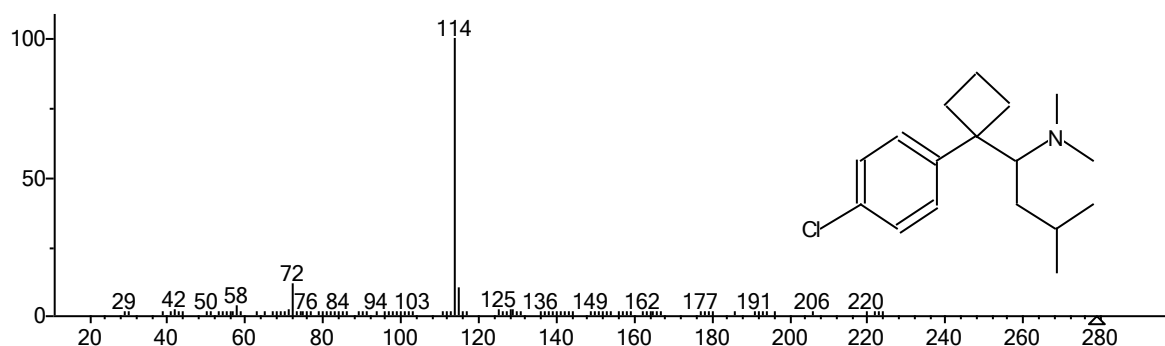


Рисунок 22. Библиотечный масс-спектр сибутрамина

В объекте исследования № 7 обнаружены пики, масс-спектры которых соответствовали библиотечным масс-спектрам дидесметилсибутрамина и кофеина (рис. 23, 14, 17).

На хроматограмме объекта 8 обнаружен пик с временем удерживания 13,18 мин. Масс-спектр данного пика соответствует библиотечному масс-спектру десметилсибутрамина (рис. 24, 25).

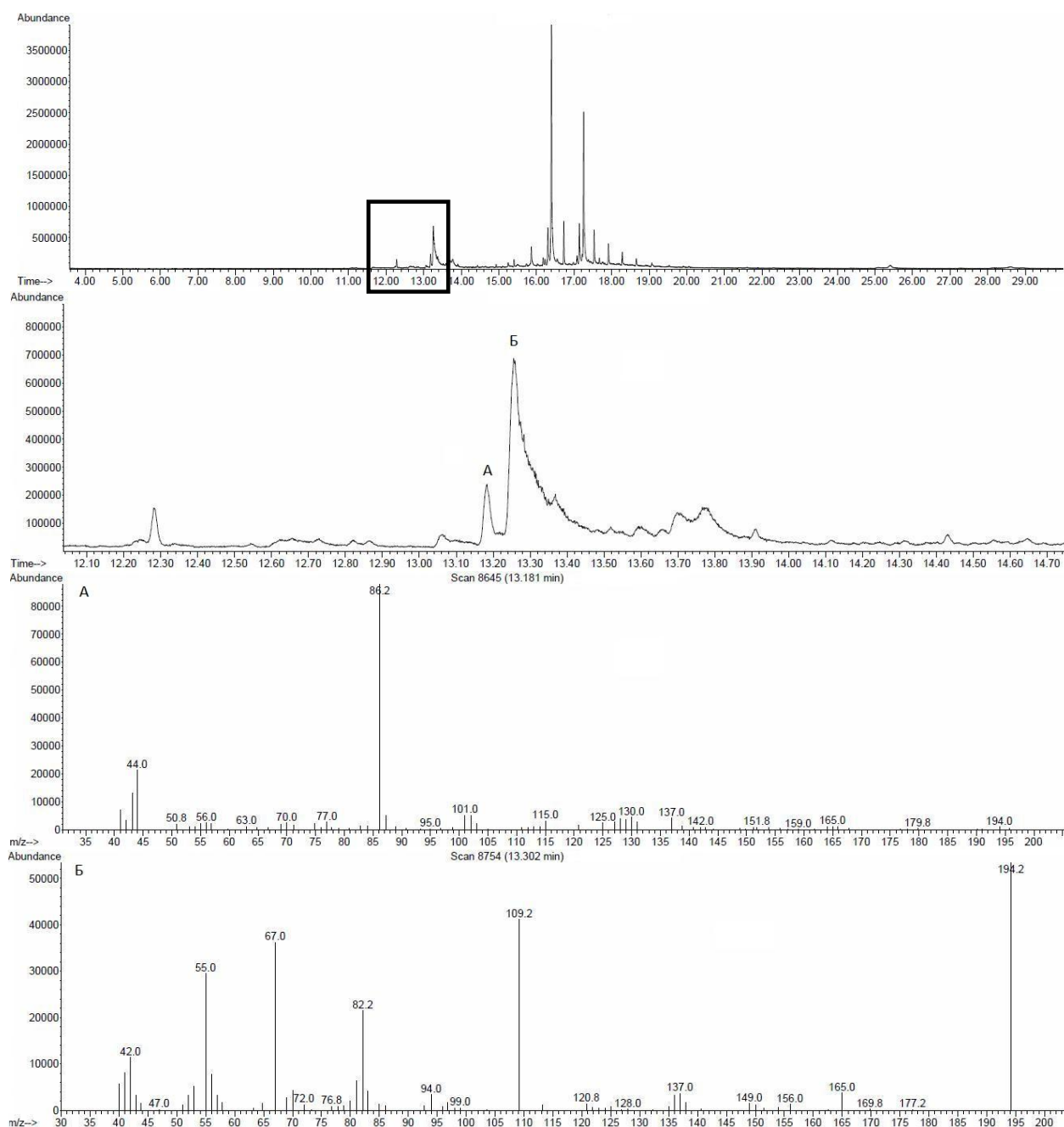


Рисунок 23. Сверху вниз: хроматограмма извлечения из объекта 7, приближенная хроматограмма пиков а и б, масс-спектры пиков со временем удерживания 13,18 мин (а), 13,30 мин (б)

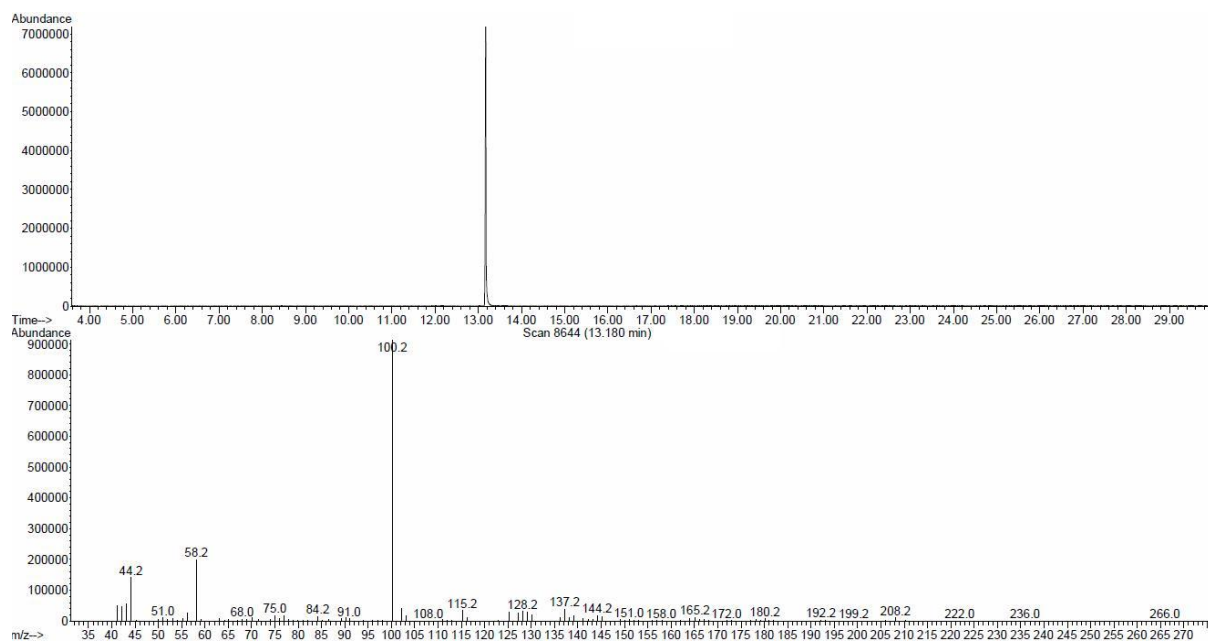


Рисунок 24. Хроматограмма извлечения из объекта 8 (вверху) и масс-спектр пика со временем удерживания 13,18 мин (внизу)

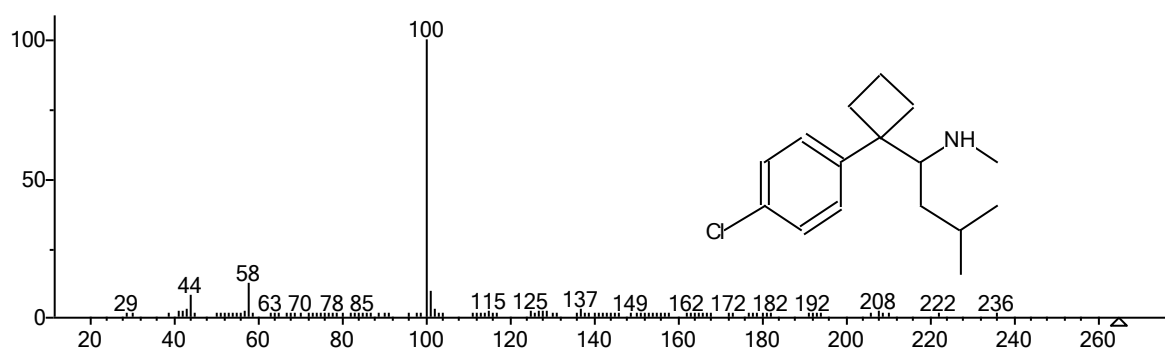


Рисунок 25. Библиотечный масс-спектр десметилсибутрамина

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Проведен сравнительный анализ информации по составу БАД, предоставленной Интернет-порталами и официальными источниками. Изучен состав 3 000 наименований БАД растительного происхождения. Общая доля нарушений и расхождений по составу составила 2 %. Из них: наличие растительных объектов, запрещенных в составе БАД, в соответствии со списком, утвержденным СанПиН 2.3.2.2567-09, наблюдалось в 76 % случаев. Расхождения в составе по разным источникам информации, без обнаружения растений из негативного списка, составили 24 %.

2. Проведен микроскопический анализ ряда БАД растительного происхождения для лиц, контролирующих массу тела. Было выявлено, что все объекты содержат большое количество зерен крахмала. Также в некоторых объектах были обнаружены обрывки паренхимы и волокна с кристаллоносной обкладкой, характерные для корней солодки. Полученные данные свидетельствуют о несоответствии фактического состава БАД, позиционируемых как продукты, содержащие исключительно растительные компоненты, составу, указанному производителем.

3. Проведен качественный анализ восьми БАД растительного происхождения для лиц, контролирующих массу тела, представленных на экспертизу правоохранительными органами и приобретенных в аптечных сетях г. Перми, а также посредством Интернет. Обнаружены расхождения по основным группам БАВ, источником которых являются анализируемые БАД, согласно данных производителя, и фактическим составом. Кроме того, все анализируемые биологически активные добавки давали положительную реакцию с общеалкалоидными реактивами, при этом кофеин, разрешенный к использованию в составе БАД, обнаружен лишь в трех объектах исследования.

4. Методом ГХ-МС проведен анализ восьми биологически активных добавок с целью обнаружения в них посторонних, в т.ч. сильнодействующих веществ. В двух исследуемых объектах обнаружен сибутрамин, включенный в

список сильнодействующих веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации, и, следовательно, запрещенный к использованию в составе БАД. В пяти объектах обнаружены производные сибутрамина: десметилсибутрамин и дидесметилсибутрами, не указанные производителем в составе исследуемых биологически активных добавок.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОБНАРУЖЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕСМЕТИЛСИБУТРАМИНА И ДИДЕСМЕТИЛСИБУТРАМИНА МЕТОДОМ ГЖХ С ПЛАМЕННО-ИОНИЗАЦИОННОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

В данной главе представлены материалы химического исследования по разработке методик обнаружения и количественного определения ДМС и ДДМС методом газо-жидкостной хроматографии. Для проведения газо-жидкостной хроматографии использовали газовый хроматограф Хроматэк-Кристалл 5000 (г. Йошкар-Ола, ЗАО СКБ «Хроматэк») с пламенно-ионизационным детектором.

4.1. Обнаружение десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА в биологически активных добавках

Для определения оптимальных условий хроматографирования готовили рабочие стандартные растворы ДМС и ДДМС в спирте этиловом 95 % с концентрацией 1 мг/мл. Хроматографирование проводили в температурных режимах, начиная с минимальных:

- температура термостата колонки начальная – 120 °С, скорость нагрева до температуры 150 °С – 20 °С/мин, температура детектора – 200 °С, температура испарителя – 150 °С;
- температура термостата колонки начальная – 150 °С, скорость нагрева до температуры 200 °С – 10 °С/мин, температура детектора – 230 °С, температура испарителя – 200 °С.

В данных программированных временных и температурных условиях, а также при их дальнейшем варьировании при хроматографировании значительно увеличивалось время анализа и выхода пиков исследуемых веществ (до 15 мин), площадь и высота пиков были незначительны, не достигалось эффективного разделения пиков и они не были симметричны. Поэтому для получения оптимальных результатов далее повышали температуру анализа: температура

термостата колонки начальная – 170 °С, скорость нагрева до температуры 220 °С – 20 °С/мин, температура детектора – 250 °С, температура испарителя – 230 °С.

Таким образом, при проведении эксперимента нами были предложены следующие условия хроматографирования:

- колонка НР-5 длиной 30 м,
- скорость потока газа-носителя (азот) – 2,4 мл/мин,
- температура термостата колонки начальная – 170 °С,
- скорость нагрева до температуры 220 °С – 20 °С/мин,
- температура детектора – 250 °С,
- температура испарителя – 230 °С,
- ввод пробы с делением потока 1/3,
- объем вводимой пробы – 1 мкл.

В данных условиях время анализа составило 18 мин. Абсолютное время удерживания десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина составило 7,07 и 7,02 мин соответственно.

4.2. Разработка методики количественного определения десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина

Для количественного определения данных веществ нами предложен метод ГЖХ с расчетом концентрации по методу внутреннего стандарта, поскольку он не требует воспроизводимого ввода пробы по величине, отличается малой зависимостью результатов измерений от нестабильности работы хроматографа и детектора, т.к. эти факторы в равной мере влияют на определяемое и стандартное соединение. Далее, к достоинствам метода относится то, что здесь требуется разделять только анализируемые компоненты и стандарт. Ошибки в измерении параметров пика и калибровочного коэффициента (исключая стандарт) сказываются только на определении содержания соединения, для которого была допущена ошибка.

В качестве внутреннего стандарта нами был выбран метилстеарат. Преимуществами использования метилстеарата являются:

- хроматографические свойства, близкие к определяемому веществу (хорошо разрешенный пик, расположенный на хроматограмме рядом с пиком определяемого компонента, что дает возможность точного измерения параметра пика, уменьшает влияние изменения чувствительности детектора из-за колебаний рабочих условий (расход газа-носителя, температура колонки и т.д.));
- летучесть, близкая определяемым компонентам, – для уменьшения ошибок, вызванных фракционированием пробы при вводе;
- хорошая растворимость в анализируемой смеси и инертность к другим компонентам пробы для обеспечения точного значения массы внутреннего стандарта;
- стабильность полученных результатов;
- доступность для закупки на территории РФ.

В качестве параметра, характеризующего содержание исследуемого вещества в пробе, использовали площадь хроматографического пика.

При этом были определены относительные времена удерживания: для ДМС 0,65 мин, для ДДМС 0,64 мин.

Методика количественного определения моно- и дидесметилсибутрамина в вещественных доказательствах

К точной навеске (0,05 г) исследуемого вещества добавляли 1 мл раствора метилстеарата в спирте этиловом 95 % в концентрации 1 мг/мл. Исследование проводили на газовом хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000 с пламенно-ионизационным детектором. Хроматографическое разделение осуществлялось на капиллярной кварцевой колонке с метилсилоксановой стационарной фазой HP-5 длиной 30 м в следующих условиях: скорость потока газа-носителя (азот) – 2,4 мл/мин, температура термостата колонки начальная – 170 °С, скорость нагрева до температуры 220 °С – 20 °С/мин, температура детектора – 250 °С, температура

испарителя – 230 °С, ввод пробы с делением потока 1/3, объем вводимой пробы – 1 мкл.

Для статистической обработки экспериментальных данных проводили не менее трех параллельных измерений.

Расчет концентрации C_i (масс. %) или содержания X_i (мг) моно- и дидесметилсибутрамина в исследуемой смеси проводили соответственно по формулам:

$$C_i = \frac{S_i \times K \times m_{\text{ст}}}{S_{\text{ст}} \times m_{\text{п}}} \times 100, \text{масс. \%}; \quad (1)$$

или

$$X_i = \frac{S_i \times K \times m_{\text{ст}} \times P}{S_{\text{ст}} \times m_{\text{п}}} \times 1000, \text{мг}; \quad (2)$$

где S_i – площадь пика определяемого компонента;

$S_{\text{ст}}$ – площадь пика внутреннего стандарта;

$m_{\text{ст}}$ – масса добавленного внутреннего стандарта, г;

$m_{\text{п}}$ – масса пробы анализируемой смеси, к которой добавлено определенное количество внутреннего стандарта, г;

K – относительный массовый коэффициент (равный 1,65 для десметилсибутрамина и 1,67 для дидесметилсибутрамина);

P – средняя масса объекта, г.

4.3. Валидация и апробация методики количественного определения десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина

Валидацию разработанной методики осуществляли по показателям специфичность, линейность, правильность, прецизионность (на уровне intra-day и inter-day) и аналитическая область [40].

Для проверки специфичности предложенных условий были проанализированы экстракты из биологически активных добавок, содержащих ДМС и ДДМС (рис. 26-28).

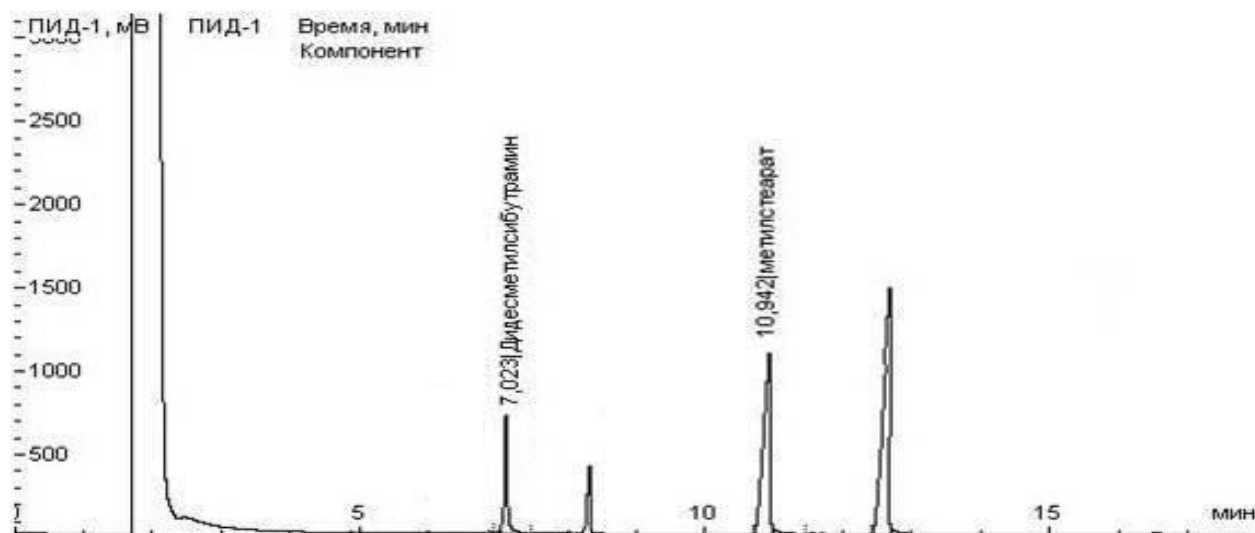


Рисунок 26. Хроматограмма экстракта объекта 3

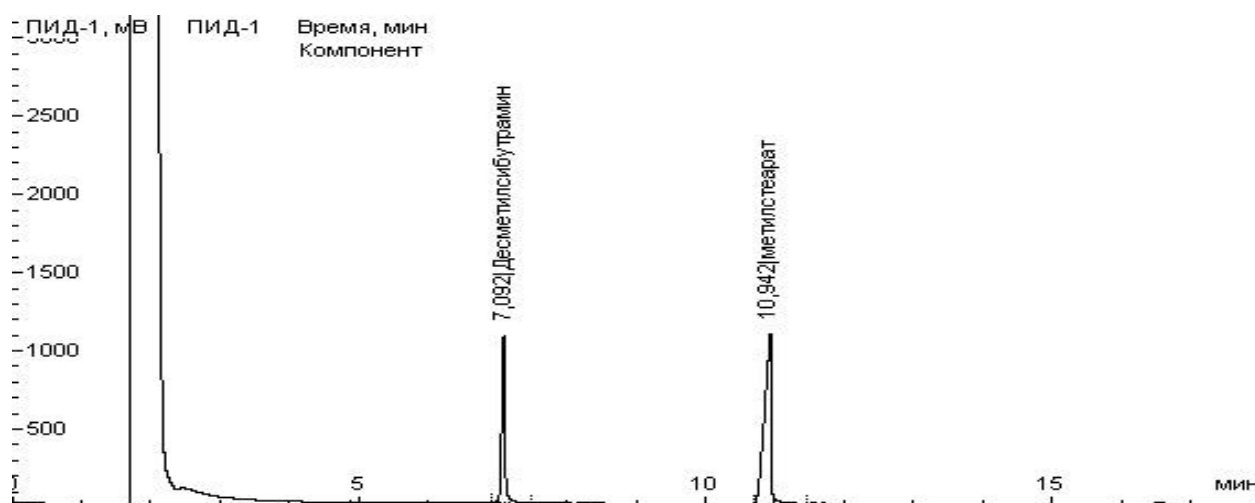


Рисунок 27. Хроматограмма раствора сравнения ДМС в присутствии метилстеарата

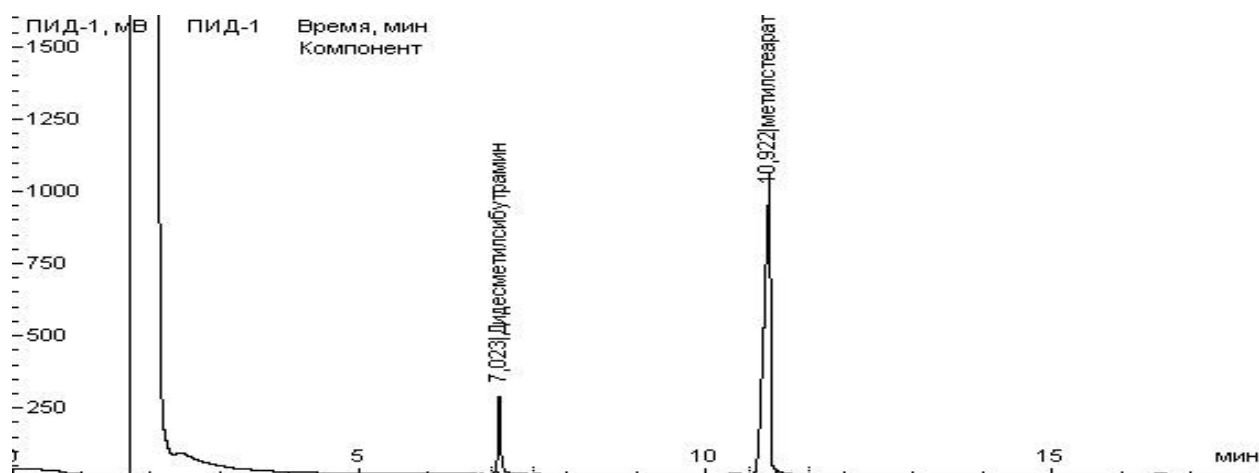


Рисунок 28. Хроматограмма раствора сравнения ДДМС в присутствии метилстеарата

В таблице 8 приведены основные параметры, позволяющие оценить качество хроматографического разделения.

Таблица 8 – Хроматографические параметры исследуемых веществ

Соединение	Абсолютное время удерживания, мин (n=6)	Эффективность хроматографической колонки, теоретические тарелки/м	Коэффициент асимметрии
Десметилсибутрамин	7,07 ± 0,005	4000	1,05
Дидесметилсибутрамин	7,02 ± 0,004	4000	1,08

Коэффициент разрешения соседних хроматографических пиков составил более 15, что свидетельствует о приемлемом разделении.

Для оценки линейности методики готовили растворы исследуемых веществ в спирте этиловом 96 % в концентрациях 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл и 10 мкг/мл в присутствии внутреннего стандарта (1000 мкг/мл) (табл. 9, 10).

Растворы хроматографировали в разработанных условиях, измеряли площади хроматографических пиков и строили калибровочный график (n = 6). Линейная зависимость между концентрацией растворов и площадью

хроматографического пика наблюдается во всем интервале выбранных концентраций (рис. 29, 30).

Таблица 9 – Значения концентраций калибровочных растворов и отношений площадей пиков ДМС к площадям пиков метилстеарата

С _{ДМС} , мкг/мл	С _{МС} , мкг/мл	S _{ДМС}		S _{МС}		S _{ДМС} / S _{МС}	
		S _i	S _{ср}	S _i	S _{ср}	S _i	S _{ср}
10	1000	49,919	46,512	8319,833	7752,000	0,0060	0,0060
		45,663		7610,500		0,0060	
		43,954		7325,667		0,0060	
50	1000	193,912	200,776	6002,845	6078,020	0,0323	0,0330
		211,794		6310,256		0,0336	
		196,621		5920,958		0,0332	
100	1000	303,652	405,149	5855,909	7692,778	0,0519	0,0526
		489,749		9227,440		0,0531	
		422,047		7994,986		0,0528	
200	1000	677,061	678,460	5732,946	5754,650	0,1181	0,1179
		681,875		5808,131		0,1174	
		676,443		5722,872		0,1182	
500	1000	1550,308	1870,566	5834,157	6914,314	0,2660	0,2703
		2129,204		7808,231		0,2730	
		1932,187		7100,553		0,2720	
1000	1000	3814,719	3619,324	6320,993	5998,512	0,6035	0,6034
		3286,095		5446,867		0,6033	
		3757,157		6227,676		0,6033	

Таблица 10 – Значения концентраций калибровочных растворов и отношений площадей пиков ДДМС к площадям пиков метилстеарата

С _{ДМС} , мкг/мл	С _{МС} , мкг/мл	S _{ДМС}		S _{МС}		S _{ДМС} / S _{МС}	
		S _i	S _{ср}	S _i	S _{ср}	S _i	S _{ср}
10	1000	36,739	37,492	6164,193	6241,329	0,0060	0,0060
		37,685		6260,028		0,0060	
		38,051		6299,766		0,0060	
50	1000	188,987	194,814	7267,826	7398,034	0,0260	0,0263
		199,525		7553,952		0,0264	
		195,929		7372,325		0,0266	
100	1000	393,287	401,877	7491,696	7628,843	0,0525	0,0527
		419,373		7925,280		0,0529	
		392,971		7469,552		0,0526	
200	1000	765,136	774,923	6342,836	6398,433	0,1206	0,1211
		788,079		6499,081		0,1213	
		771,555		6353,381		0,1214	
500	1000	1970,894	2031,255	6589,705	6725,456	0,2991	0,3020
		2016,438		6658,274		0,3029	
		2106,433		6928,390		0,3040	
1000	1000	4324,346	4080,197	7219,516	6808,955	0,5990	0,5993
		3907,883		6522,161		0,5992	
		4008,361		6685,187		0,5996	

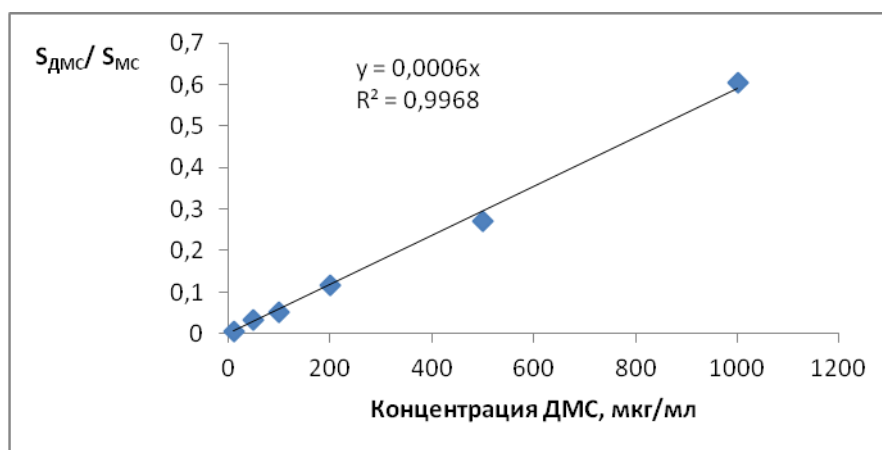


Рисунок 29. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ДМС к площади пика метилстеарата от концентрации ДМС в растворе

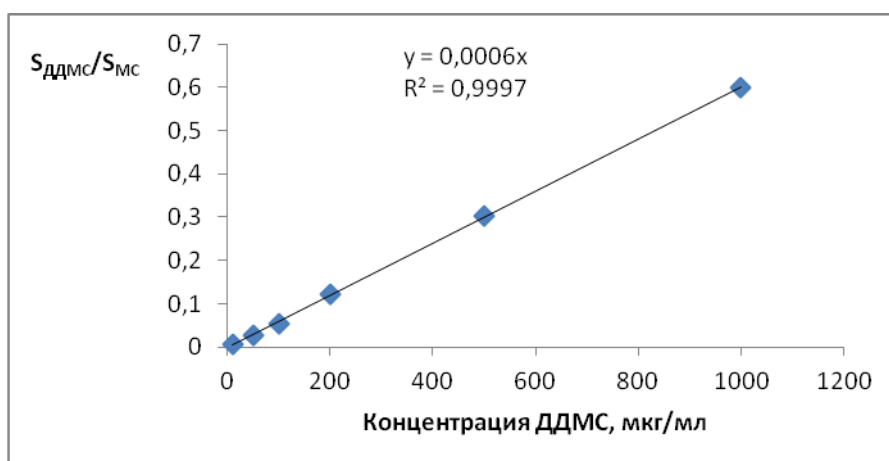


Рисунок 30. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ДДМС к площади пика метилстеарата от концентрации ДДМС в растворе

Квадрат линейного коэффициента корреляции (R^2) характеризует степень соответствия между регрессионной моделью и исходными данными. В данном случае 99,68% и 99,97% изменений зависимой переменной описывается регрессионным уравнением для ДМС и ДДМС, соответственно, что свидетельствует о наличии прямой линейной зависимости между площадью пиков данных веществ и их концентрацией в растворе.

Для оценки правильности и прецизионности методики проводили анализ 3 калибровочных спиртовых растворов ДМС и ДДМС с концентрациями 10 мкг/мл, 200 мкг/мл, и 1000 мкг/мл в течение первого дня (intra-day) и второго дня (inter-

day). Каждый раствор хроматографировали в трех повторностях. Для полученных значений концентрации веществ рассчитывали величину стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %) и отклонение от заданной величины (ε , %). Данные представлены в таблицах 11 и 12.

Таблица 11 – Оценка правильности и прецизионности (ДМС)

Intra-day					
C _{факт} , мкг/мл	C _{изм} , мкг/мл	C _{ср} (n=3)	SD (n=3)	RSD, % (n=3)	ε, %
10	10,03	10,04	0,01	0,12	0,40
	10,03				
	10,05				
200	196,85	197,08	0,24	0,12	1,46
	197,33				
	197,07				
1000	1005,83	1005,61	0,19	0,02	0,56
	1005,50				
	1005,50				
Inter-day					
C _{факт} , мкг/мл	C _{изм} , мкг/мл	C _{ср} (n=3)	SD (n=3)	RSD, % (n=3)	ε, %
10	9,87	9,91	0,05	0,52	0,90
	9,90				
	9,97				
200	195,33	195,61	0,56	0,29	2,19
	195,25				
	196,25				
1000	1007,83	1007,81	0,28	0,03	0,78
	1007,52				
	1008,08				

Таблица 12 – Оценка правильности и прецизионности (ДДМС)

Intra-day					
C _{факт} , мкг/мл	C _{изм} , мкг/мл	C _{ср} (n=3)	SD (n=3)	RSD, % (n=3)	ε, %
10	9,93	10,01	0,07	0,70	0,10
	10,03				
	10,06				
200	201,05	201,85	0,71	0,35	0,93
	202,10				
	202,40				
1000	998,30	998,75	0,95	0,10	0,13
	998,62				
	999,32				
Inter-day					
C _{факт} , мкг/мл	C _{изм} , мкг/мл	C _{ср} (n=3)	SD (n=3)	RSD, % (n=3)	ε, %
10	9,91	9,99	0,07	0,70	0,10
	10,01				
	10,05				
200	199,45	199,68	0,35	0,18	0,16
	199,50				
	200,08				
1000	1000,48	1000,71	0,32	0,03	0,07
	1000,57				
	1001,08				

Полученные значения RSD и ε свидетельствуют о достаточной степени соответствия между истинным значением определяемого вещества и его значением, рассчитанным по данной методике.

Аналитическая область методики на основании результатов оценки линейности, правильности и прецизионности составила 10 – 1000 мкг/мл.

Разработанную методику апробировали на 5 объектах исследования (п.2.1). Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты апробации методики количественного определения ДМС и ДДМС в БАД методом ГЖХ

№ объекта	1	2	3	7	8
Обнаруженное вещество	ДДМС	ДДМС	ДДМС	ДДМС	ДМС
Содержание, мг	0,46	0,55	1,37	0,23	8,40

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Разработана методика обнаружения ДМС и ДДМС методом газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационной детекцией, определены условия хроматографирования:

- колонка НР-5MS длиной 30 м,
- скорость потока газа-носителя (азот) – 2,4 мл/мин,
- температура термостата колонки начальная – 170 °С,
- скорость нагрева до температуры 220 °С – 20 °С/мин,
- температура детектора – 250 °С,
- температура испарителя – 230 °С,
- ввод пробы с делением потока 1/3,
- объем вводимой пробы – 1 мкл.

2. Установлены хроматографические параметры исследуемых веществ в предложенных условиях: абсолютное время удерживания ДМС и ДДМС соответственно составило 7,07 и 7,02 мин. Относительные времена удерживания для ДМС и ДДМС по метилстеарату – 0,65 и 0,64 мин соответственно.

3. Разработана методика количественного определения моно- и дидесметилсIBUTРАМИНА методом газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационной детекцией с использованием в качестве внутреннего стандарта метилстеарата. Достигнуто эффективное разделение исследуемых веществ и внутреннего стандарта.

4. Аналитическая область методики установлена в диапазоне 10 – 1000 мкг/мл. Методика обладает необходимой специфичностью (коэффициент разделения соседних хроматографических пиков более 15), линейностью ($R_{\text{ДМС}} = 0,9968$; $R_{\text{ДДМС}} = 0,9997$), правильностью и прецизионностью, что позволяет говорить о ее хороших валидационных характеристиках.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА СХОДСТВА ПСИХОАКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕСМЕТИЛСИБУТРАМИНА, ДИДЕСМЕТИЛСИБУТРАМИНА И СИБУТРАМИНА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ КОМПЛЕКСНОГО ХИМИКО- БИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Поскольку помимо сибутрамина, являющегося, согласно российскому законодательству, сильнодействующим веществом, в биологически активных добавках для похудения все чаще выявляются десметилсибутрамин и дидесметилсибутрамин, необходимо определить правовой статус данных веществ.

Сибутрамин включен в «Список сильнодействующих веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации», утвержденного постановлением Правительства РФ № 964 от 29.12.2007 г. в формулировке **«Сибутрамин, а также его структурные аналоги, обладающие схожим психоактивным действием»**.

Для того чтобы идентифицировать вещество как аналог, то есть определить сходство с химической структурой подконтрольного вещества, а также его аналогичное психоактивное действие на организм, необходимо провести комплексное исследование, состоящее из двух этапов:

1. химическое исследование, в ходе которого проводится идентификация исследуемого вещества и устанавливается сходство химической структуры исследуемого вещества с химической структурой контролируемого вещества;
2. биологическое исследование, в ходе которого устанавливается сходство психоактивных свойств исследуемого вещества и контролируемого вещества.

Химическое исследование проводится инструментальными методами, которые позволяют наиболее точно определить химическую структуру исследуемых веществ (ГХ-МС, ИК-спектроскопия и др.).

В ходе биологического исследования изучается влияние конкретного вещества на поведенческую и психическую активность лабораторных животных с

использованием теста спонтанной двигательной активности одиночных животных на промежутках времени не менее суток после введения вещества, теста «Открытое поле» с видеотрекингом (раздел 2.2.2).

5.1. Химическое исследование десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина методом ГХ-МС

Для идентификации исследуемых веществ и установления их структурного сходства с сибутрамином нами был выбран метод ГХ-МС. Основными преимуществами объединения методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии являются эффективное разделение веществ в пробе в сочетании с высокочувствительным детектором и возможность определения без использования стандартных образцов. Это позволяет получать результаты, удовлетворяющие требованиям надежности, доказательности и достоверности анализа. Данный метод позволяет осуществить наглядное сравнение структурных формул исследуемых веществ.

Исследование методом ГХ-МС проводили следующим образом: растворы анализируемых веществ в спирте этиловом 95 % хроматографировали при стандартных условиях, описанных в главе 2. В качестве параметров идентификации использовали время удерживания и масс-спектры веществ (табл. 14).

Масс-спектры пиков с временем удерживания 13,18 мин и 13,10 мин соответствуют библиотечным масс-спектрам десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина (рис. 31 – 36).

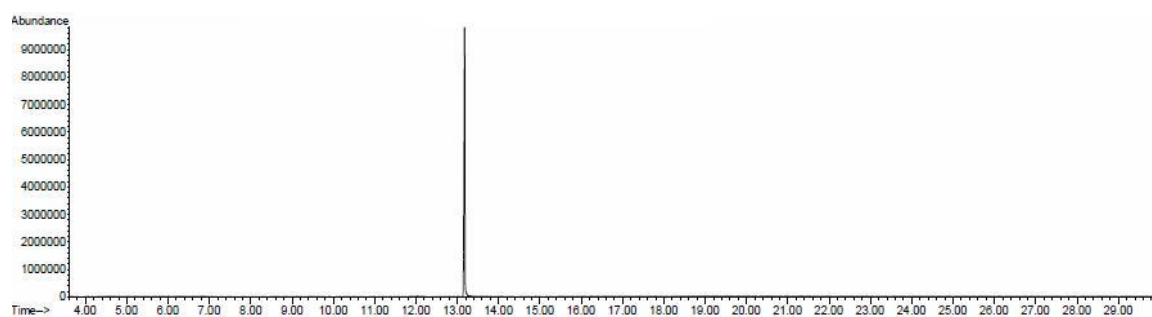


Рисунок 31. Хроматограмма раствора десметилсибутрамина (ГХ)

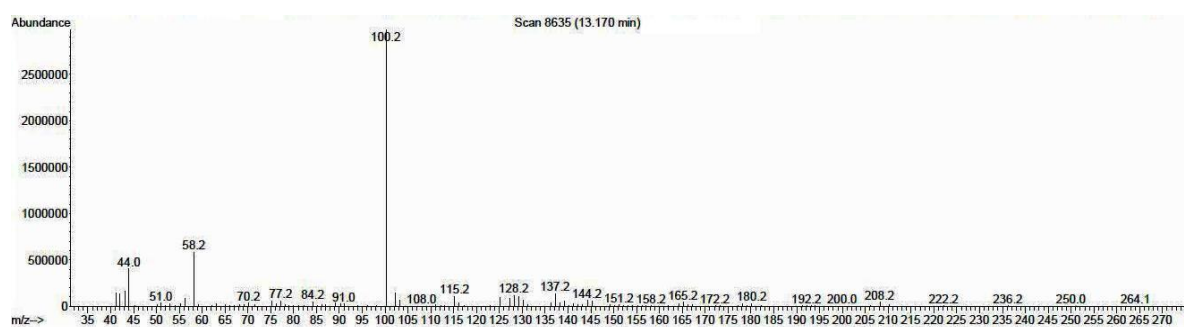


Рисунок 32. Масс-спектр десметилсибутрамина

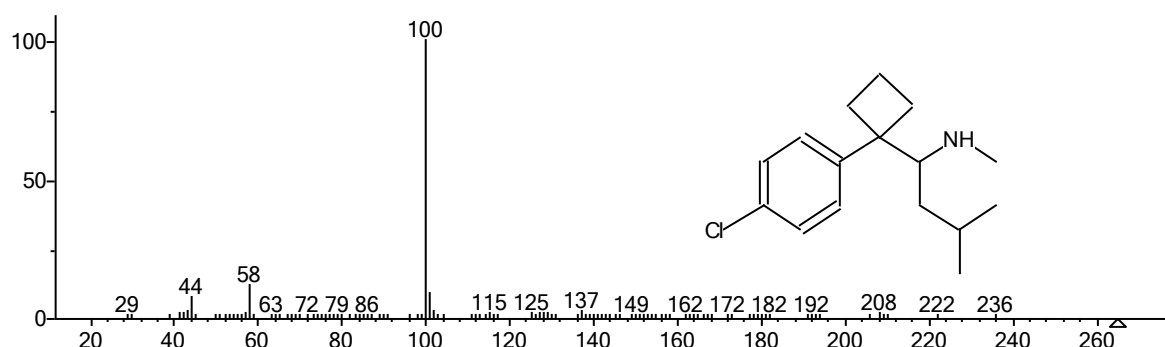


Рисунок 33. Библиотечный масс-спектр десметилсибутрамина
и его структурная формула

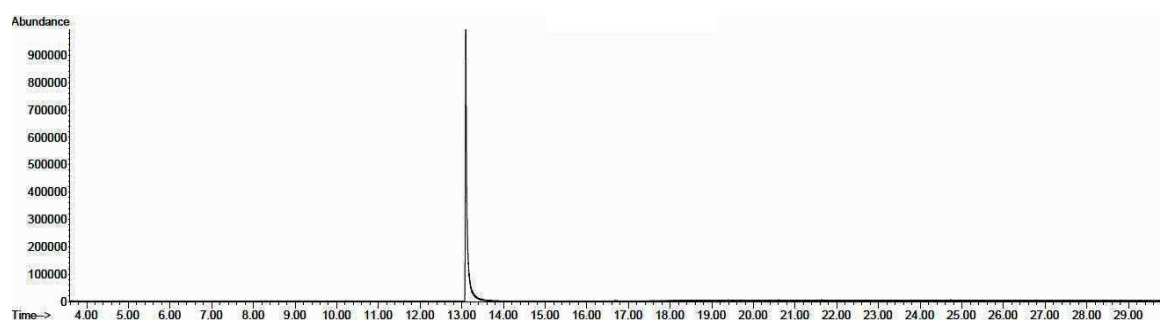


Рисунок 34. Хроматограмма раствора дидесметилсибутрамина (ГХ)

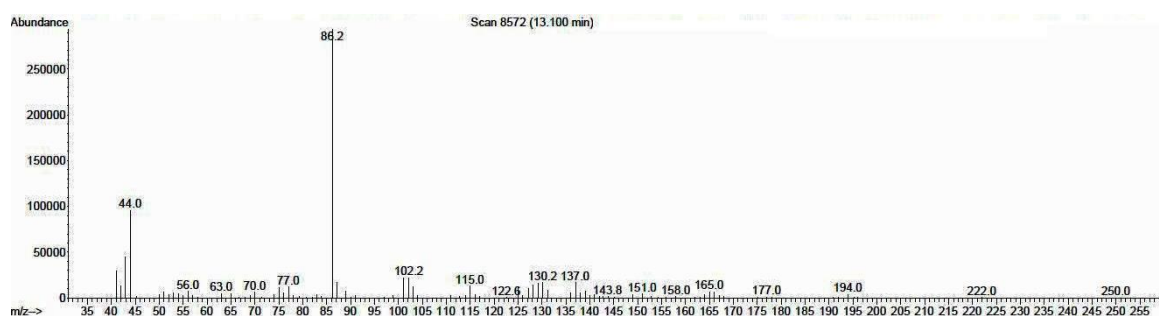


Рисунок 35. Масс-спектр дидесметилсибутрамина

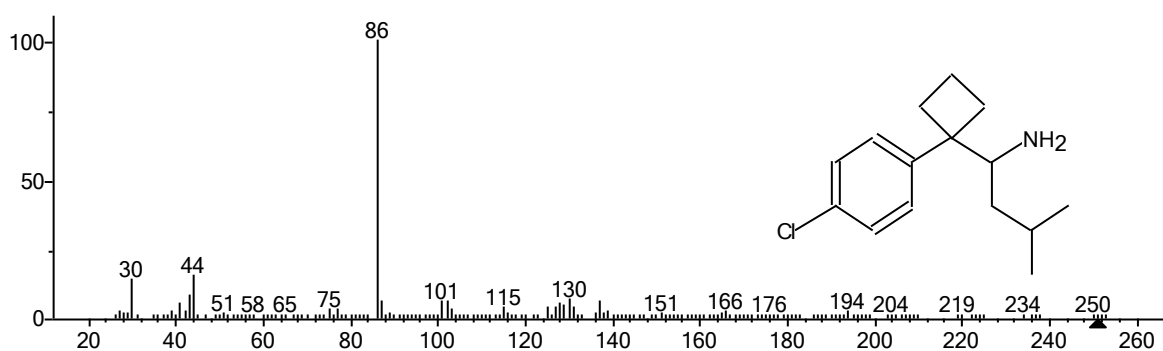
Рисунок 36. Библиотечный масс-спектр дидесметилсибутрамина
и его структурная формула

Таблица 14 – Параметры идентификации веществ методом ГХ-МС

Соединение	Параметры идентификации	
	t_R (мин)	Характеристические ионы (в порядке уменьшения интенсивности, %)
Десметилсибутрамин	13,18	100.20 (100), 58.20 (22), 44 (15), 43.20 (6), 41.20 (6), 42.20 (5), 264 (1)
Дидесметилсибутрамин	13,10	86.20 (100), 44.20 (18), 43.20 (9), 130.20 (5), 87.20 (5), 41.20 (5), 101.20 (5), 102.20 (5), 137.20 (5), 250 (1)

5.2. Химическое исследование десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина методом ИК-спектроскопии

Для подтверждения структуры веществ навеску порошка перетирали с бромидом калия (1:150) и формировали таблетку $d = 3$ мм.

ИК-спектры снимали в диапазоне $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ на приборе Specord M80.

Полосы поглощения в области 3300 см^{-1} (область 1) характерны для NH- и NH_2 - группы.

Полосы поглощения в области 1600 см^{-1} (область 2) характерны для ароматического кольца и системы двойных связей ($-\text{C}=\text{C}-$).

Все найденные группы имеются в молекулах десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА (рис. 37, 38).



Рисунок 37. ИК-спектр десметилсIBUTРАМИНА в таблетке KBr

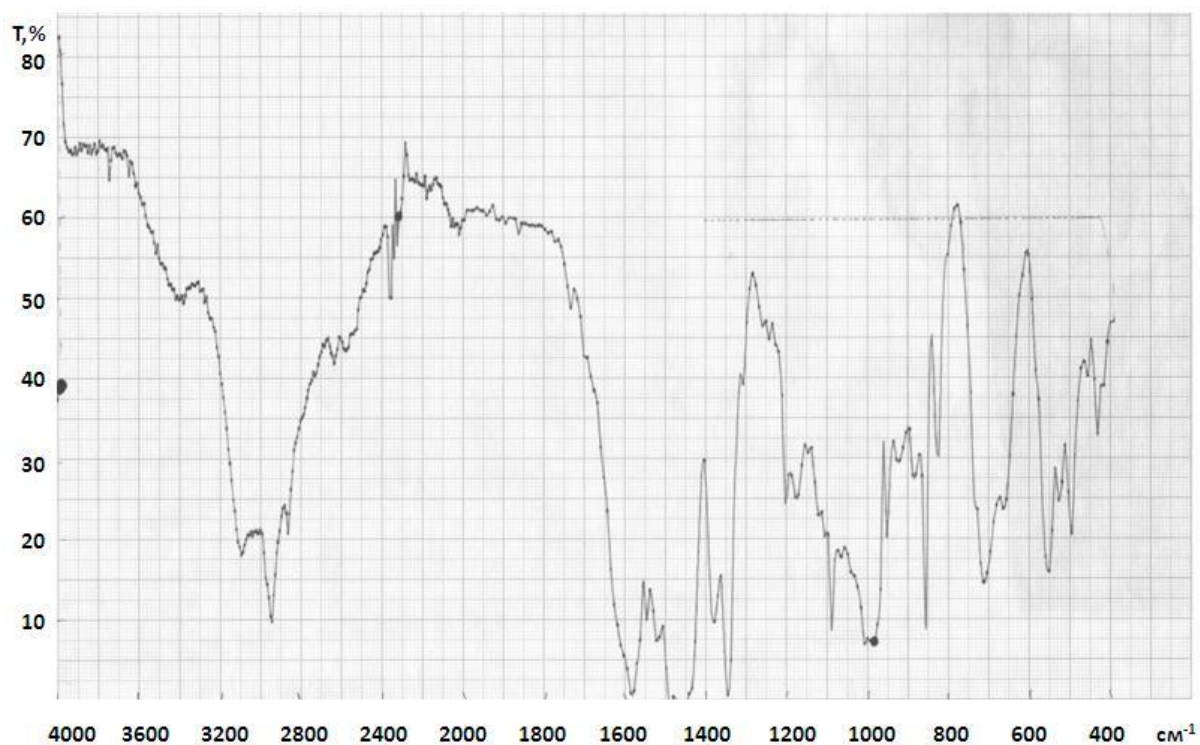


Рисунок 38. ИК-спектр дидесметилсIBUTРАМИНА в таблетке KBr

Для сравнения на рисунке 39 приведен ИК-спектр сIBУТРАМИНА.

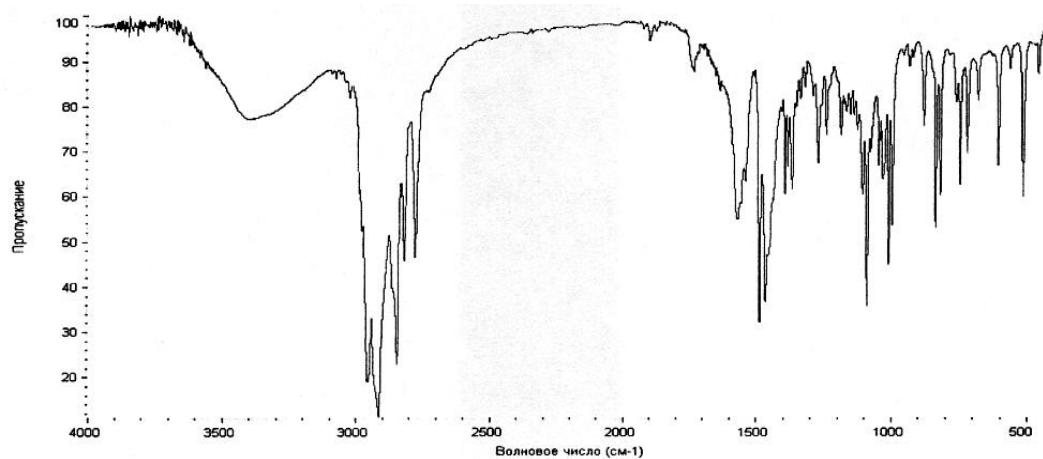


Рисунок 39. ИК-спектр сIBУТРАМИНА

Таким образом, вещества десметилсIBУТРАМИН и дидесметилсIBУТРАМИН имеют сходную химическую структуру с сильнодействующим веществом сIBУТРАМИН, и, следовательно, являются его структурными аналогами (рис. 40).

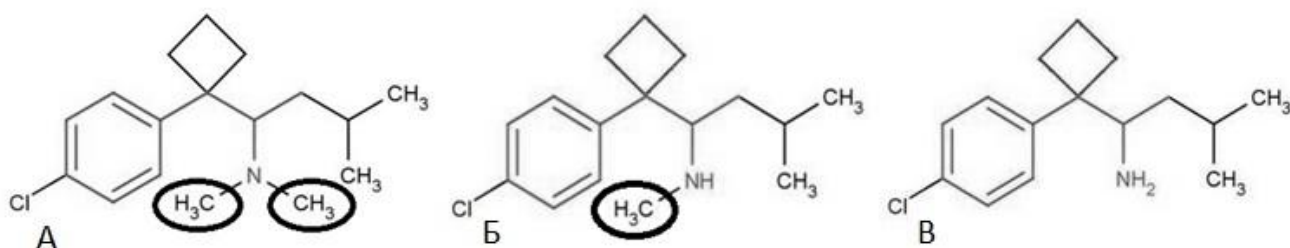


Рисунок 40. Сравнение структурных формул веществ сибутрамина (а), десметилсибутрамина (б) и дидесметилсибутрамина (в). Отличие структур выделено овалами.

5.3. Сравнительная оценка психоактивных свойств сибутрамина и его структурных аналогов

Следующим этапом изучали психоактивные свойства десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина в сравнении с сибутрамином. Биологическое исследование проводили с применением тестов, описанных в разделе 2.2.2.

Результаты СДА-тестирования

Контрольные условия. С 0-й по ~ 80-ю минуту опыта протекал контрольный период, основной задачей которого является контроль состояния животных до введения исследуемого вещества. Во время указанного периода динамика опытных и контрольных групп существенно не различалась. На 80-90й минуте животным опытных групп было выполнено внутрибрюшинное введение соответствующих доз исследуемых веществ (экспозиция), контрольные животные получили соответствующее стрессовое воздействие при эквивалентном контрольном введении физраствора.

Первые нормальные максимумы в группах контроля имеют центры около ~280 минуты с начала каждого из опытов – активность животных возрастает после острого стрессового ответа на изъятие и укол (рис. 41). Далее – в контроле наблюдались длительные относительно равномерные спады энергозатрат на двигательную активность, с крупномасштабным экстремумом (минимумом) с

центром около ~700-ой минуты опытов (для сибутрамина и ДМС) и 800-й – 900-й минуты опытов (для сибутрамина и ДДМС).

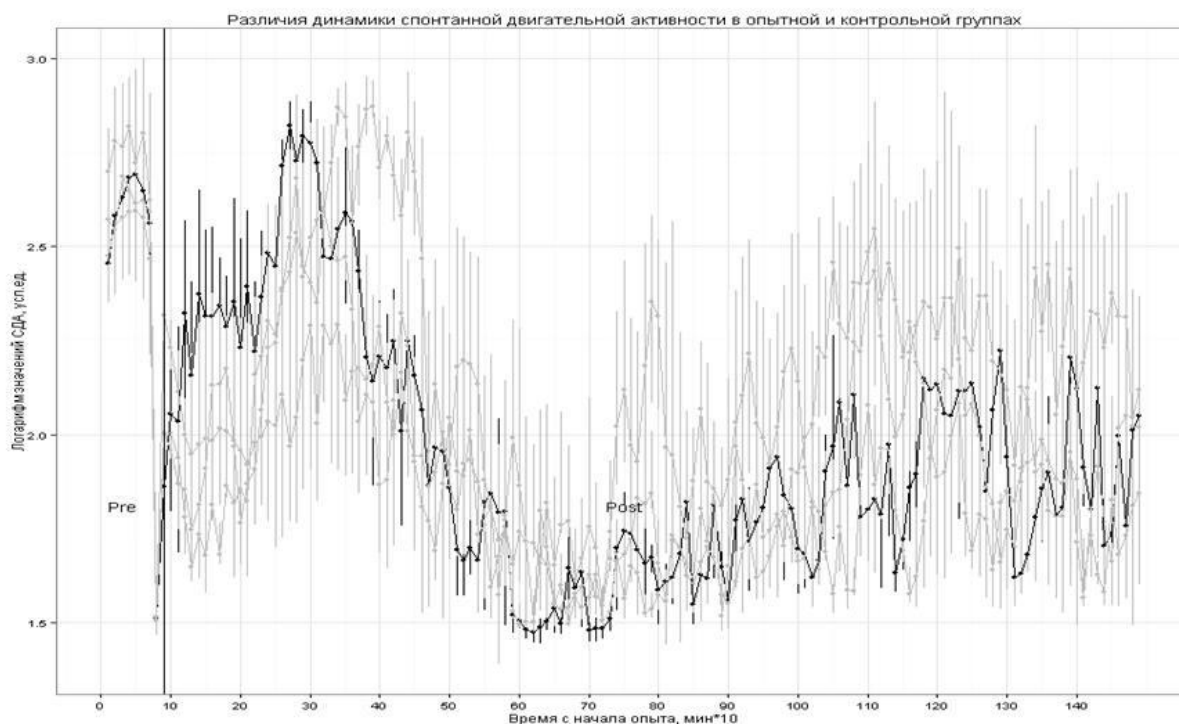


Рисунок 41. Характерная форма динамики СДА в контрольной группе на протяжении суток опыта

Характеристики эффекта. В СДА-тесте были исследованы по 3 дозы ДМС и сибутрамина, а также однократная доза ДДМС, для которых было выполнено сравнение динамики энергозатрат на двигательную активность экспонированных животных с аналогичной динамикой контрольных групп, и сравнение отклонений от контроля между собой.

В опыте «СДА-ДМС» латентный период в действии сибутрамина и ДМС при всех исследованных дозах составляет не более ~30 минут, при высоких дозах не выявляется. Непосредственно после введения, на 0-20 минуте, для высоких доз (100 мг/кг) ДМС и сибутрамина наблюдались проявления атаксии и стереотипии, и периодически возникающие сильные судороги, сопровождающиеся двигательным возбуждением высокой интенсивности, вплоть до биений животных о стенки и пол клеток. Эти эффекты более выражены и длительны у

животных, экспонированных ДМС. При высоких дозах эта фаза эффекта не может быть охарактеризована, как латентная, и будет обозначена, как фаза острого ответа. Для сибутрамина латентная фаза (и фаза острого ответа – при дозе 100 мг) длятся не более 30 минут, для ДМС – до ~150 минут при дозе 100 мг/кг (табл. 15, 16).

Следующей фазой эффекта для обоих веществ во всех исследованных дозах является глубокая **седация** – снижение уровня СДА относительно контроля. Снижение СДА на этой фазе более длительное и выраженное у сибутрамина (табл. 15, 16). Отметим, что для ДМС характер этой фазы соответствует сдвигу нормального пика активности влево (т.е. происходит его откладывание – при дозах 1 и 10 мг/кг), тогда как для сибутрамина это верно лишь для дозы 10 мг/кг, при дозе 1 мг/кг сдвиг не наблюдается, картина соответствует простому подавлению активности с обратной зависимостью от времени.

Следующей фазой обоих эффектов является относительная **активация**, вызванная при дозах 1 и 10 мг/кг ДМС и 10 мг/кг сибутрамина сдвигом нормального пика активности. Основные различия между эффектами веществ в этом диапазоне доз связаны с моментом наступления фазы, определяемым сдвигом влево для ДМС на длительность латентной фазы и периода острого ответа. При дозах в 100 мг/кг различия эффектов весьма существенны: на время нормального периода покоя затраты энергии на СДА группой, экспонированной сибутраминам 100 мг/кг, близки к контрольным, тогда как животные, экспонированные ДМС в той же дозе, непрерывно (!) – при обобщении на уровне десятков минут – выбрасывают значительную часть доступной для мышечного движения энергии на немотивированную, инадаптивную двигательную активность, что приводит к гибели одной из особей в эксперименте около 300-й минуты с начала опыта – после пиковых по сравнению с остальными животными затрат на двигательную активность. В целом, циркадный ритм для всех особей группы, экспонированной ДМС 100 мг/кг, оказывается полностью разрушенным.

После периода **нормального покоя** становится доступным для изучения период **отложенных эффектов**. Так, для сибутрамина в дозе 1 мг/кг они

оказываются невыявляемыми, для 10 и 100 мг/кг можно констатировать длительную и выраженную компенсационную активность животных. У животных, экспонированных ДМС, компенсационные эффекты не выявлены. В целом, после периода нормального покоя, наблюдается неравномерный возврат к динамике, приближающейся к контрольной. Поведение экспонированных животных в первые десятки минут после введения включает аномальные элементы: наблюдаются проявления атаксии, стереотипные движения.

Максимальные значения магнитуд отклонений от контроля во время периода седации при всех исследованных дозах наблюдались в моменты времени, сведённые в таблицы 15, 16.

Таблица 15 – Некоторые параметры модификаций, вызванных ДМС

Доза	Латентный период + фаза острого ответа	Отрицательные оценки смещения СДА (длительность интервала непрерывного подавления СДА)	Максимальные магнитуды эффекта (время с начала опыта)
1	~20 + 0 мин	~120 мин	~ 260, ~300, (550) мин
10	~20 + 10 мин	~160 мин	~ 260, (510) мин
100	~ 10 + 20 мин	~220 мин	(~140), ~310, (510, 710) мин

() – значения в скобках указывают на моменты положительных экстремумов отклонений СДА от контроля, значения без скобок – на моменты отрицательных экстремумов.

Таблица 16 – Некоторые параметры модификаций, вызванных сибутрамином

Доза	Латентный период + фаза острого ответа	Отрицательные оценки смещения СДА (длительность интервала непрерывного подавления СДА)	Максимальная магнитуда эффекта (время с начала опыта)
1	~20 + 120 мин	~150 мин	~ 140, ~190 мин.
10	~20 + 130 мин	~220 мин	~ 140, ~270 (~440) мин
100	~10 + 140 мин	~400 мин	~ 270 (~1110) мин

() – значения в скобках указывают на моменты положительных экстремумов отклонений СДА от контроля, значения без скобок – на моменты отрицательных экстремумов.

Таким образом, в результате воздействия ДМС и сибутрамина происходит доза-зависимая модификация двигательной активности животных; доминирующая фаза модификации для обоих веществ – седативная, выявляемая через ~20-30 минут после введения вещества – для сибутрамина, и лишь через 120-140 минут после введения – для ДМС.

В целом, кривые энергозатрат на двигательную активность отражают специфику состояния животных: стрессовый ответ реализуется аномально, переходя после латентного периода и периода острых ответов к длительной и выраженной седации, и далее, с течением времени, к постепенному, неравномерному выходу к базовой линии нормального циркадного цикла активности. После периода нормального покоя (с ~800 по ~1500 минуту опыта) наблюдается отложенное повышение СДА после экспонирования сибутрамина, и не выявляется – после экспонирования ДМС. По мере развития эффекта исследуемого вещества существенно искажаются нормальные реализации циркадного цикла в стрессовых условиях, наблюдавшиеся у контрольных животных.

Магнитуды отклонений являются значительными (табл. 15, 16); можно констатировать, что длительность острой фазы эффектов в рассмотренном диапазоне доз составляет не менее 2 часов, причём для доз в 100 мг/кг эффекты выходят за рамки изучаемого суточного периода.

Таким образом, в течение наблюдаемого периода – 100% циркадного цикла, после введения вещества в опытных группах поведение животных длительное время является изменённым, в целом образуя специфические картины динамики спонтанной двигательной активности. На рисунках 42-47 представлены обобщённые кривые активности групп животных, иллюстрирующие специфику эффекта в течение опыта.

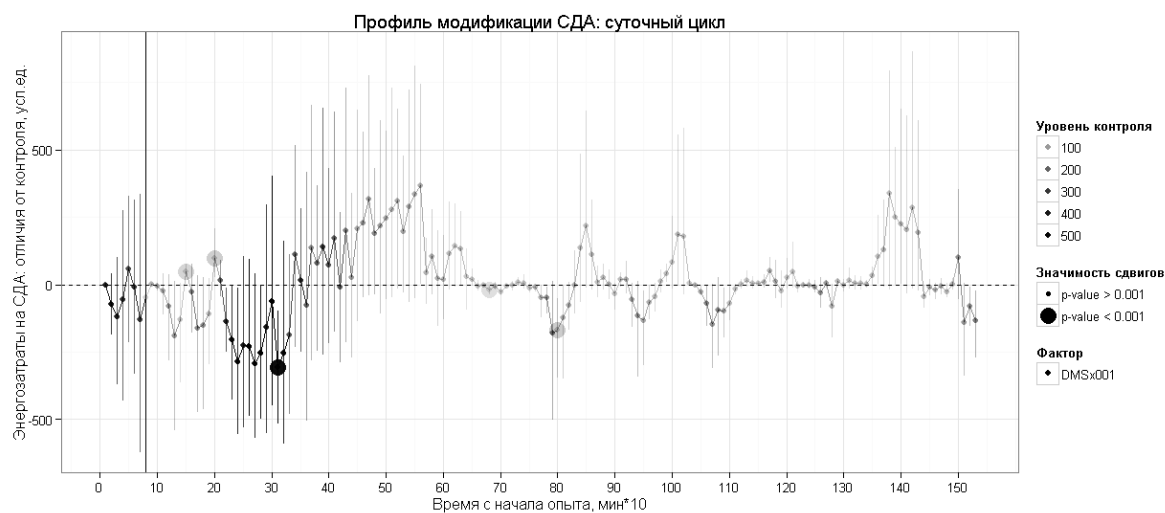


Рисунок 42. Общий план: динамика СДА при дозе 1 мг/кг ДМС в экспериментальных группах

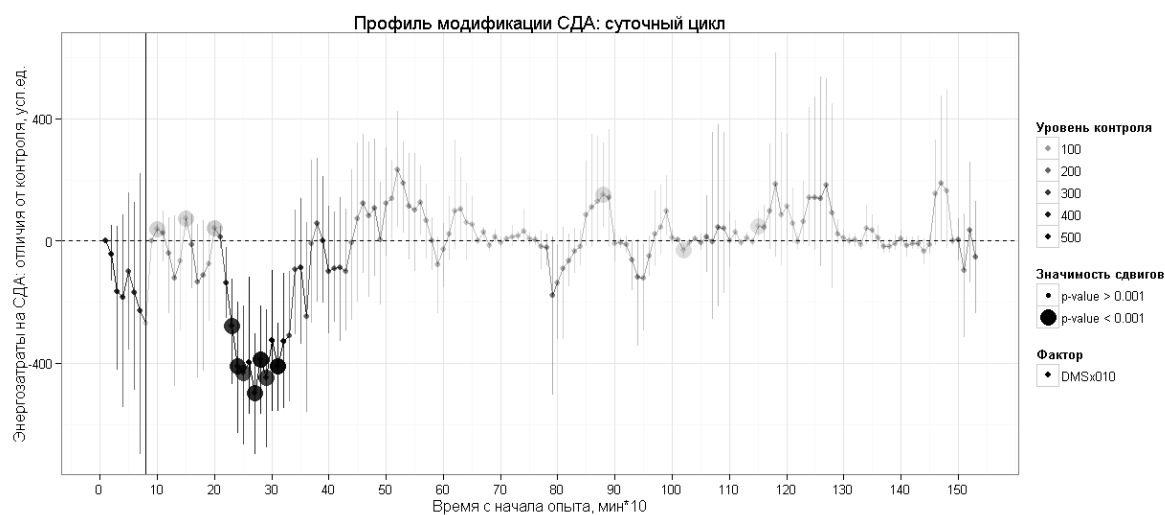


Рисунок 43. Общий план: динамика СДА при дозе 10 мг/кг ДМС в экспериментальных группах



Рисунок 44. Общий план: динамика СДА при дозе 100 мг/кг ДМС в экспериментальных группах

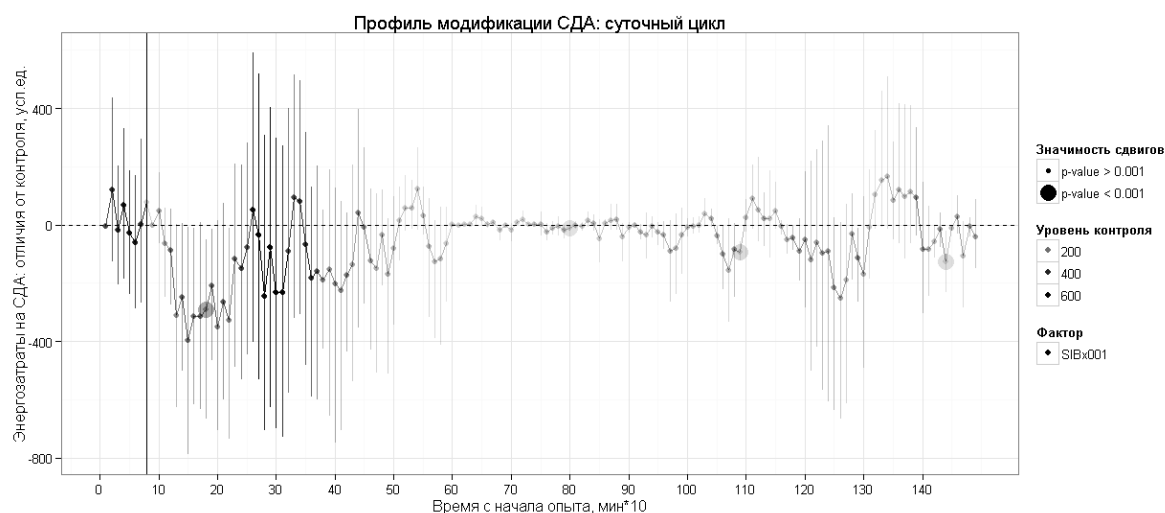


Рисунок 45. Общий план: динамика СДА при дозе 1 мг/кг сибутрамина в экспериментальных группах

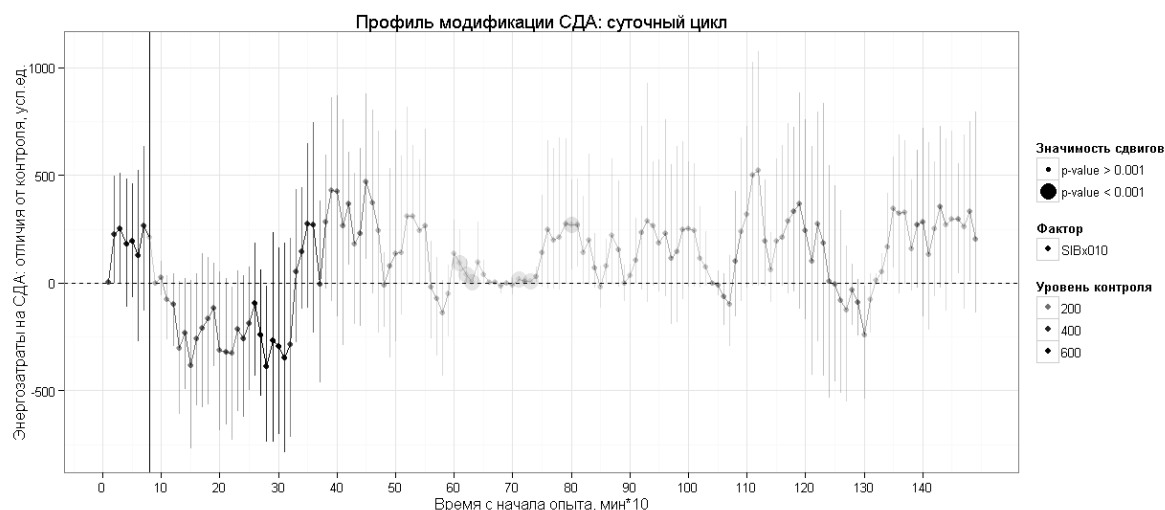


Рисунок 46. Общий план: динамика СДА при дозе 10 мг/кг сибутрамина в экспериментальных группах

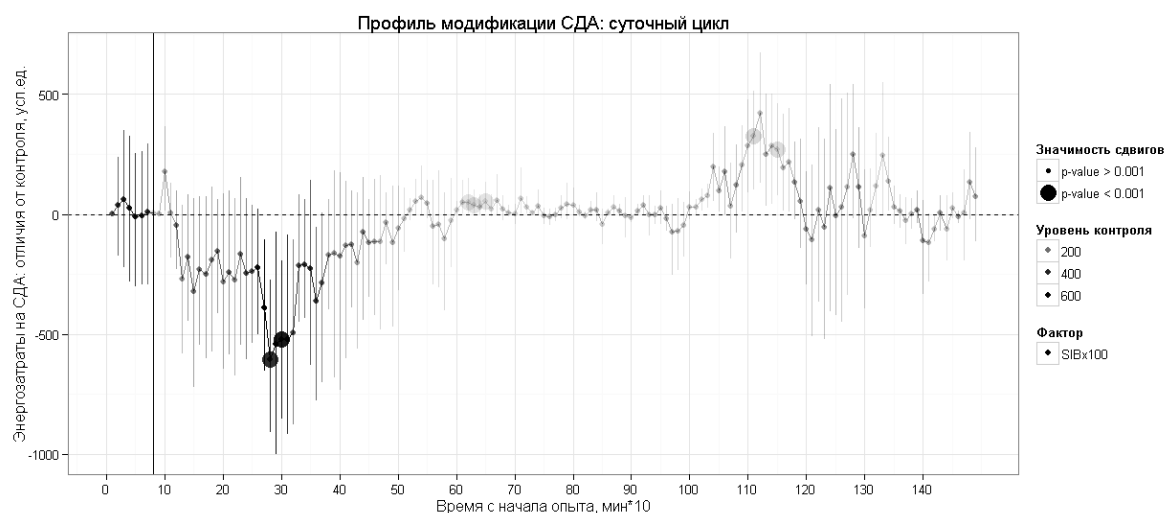


Рис. 47. Общий план: динамика СДА при дозе 100 мг/кг сибутрамина в экспериментальных группах

Таким образом, при описании эффекта вещества в тесте «СДА-ДМС» на одиночных животных, можно заключить, что ДМС и сибутрамин обладают специфической психической активностью, вызывающей на длительное время изменения состояния сознания животных, а также констатировать ограниченное сходство эффектов исследуемых веществ, определяемое пофазным соответствием, доминирующей фазой, и некоторыми токсическими проявлениями

(атаксия, стереотипия, редко – судорожная активность); различия эффектов связаны со временем наступления, длительностью и выраженностью фаз эффектов, а также отложенными модификациями динамики спонтанной двигательной активности.

В опыте «СДА-ДДМС» различие в средних групп очень выражено. Это происходит вследствие индуцированной длительной стабилизации двигательной активности на высоком уровне под воздействием ДДМС. Иллюстрация специфики динамики энергозатрат в и опытной группе в опыте «СДА-ДДМС» представлена на рисунке 48 (точками обозначены оценки средних, усами – верхний и нижний 95% доверительные интервалы).

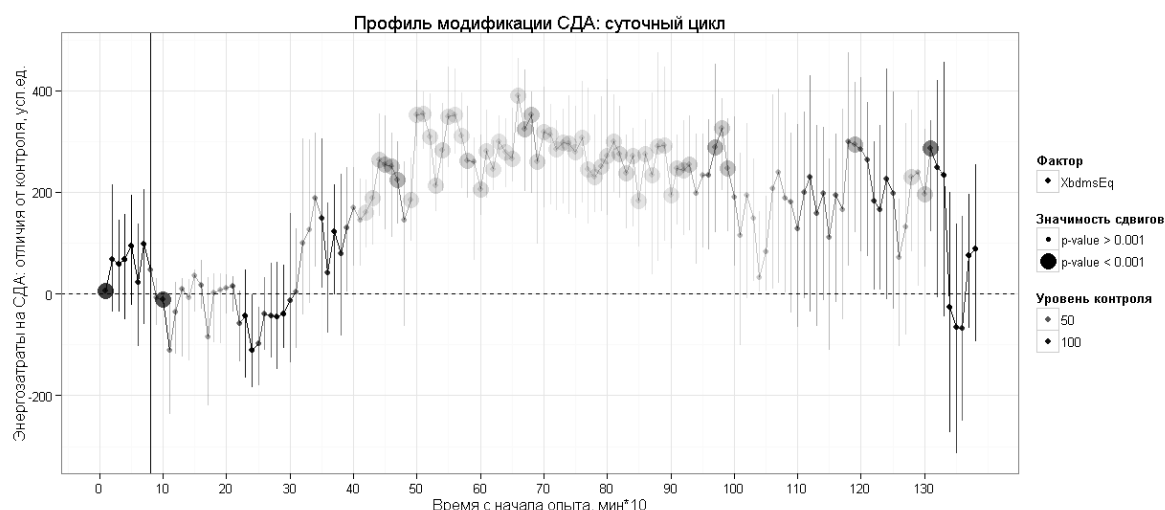


Рисунок 48. Общий план: динамика СДА при однократной дозе ДДМС в экспериментальных группах

Из анализа рисунка 48 можно сделать следующие заключения. Существенных отличий динамики энергозатрат животных на стрессовый ответ под воздействием сибутрамина в указанной дозе не выявляется. Особенности ДДМС являются: а) длительность эффекта не менее суток; б) магнитуды отклонений являются значительными; в) возможна периодизация эффекта (табл. 17).

Таблица 17 – Некоторые параметры модификаций, вызванных ДДМС

Доза	Латентный период + фаза острого ответа	Положительные оценки смещения СДА (длительность интервала непрерывного потенцирования СДА)	Максимальная магнитуда эффекта (время с начала опыта)
Однократная	~130 + 20 мин	~ 510 мин	~ 110, ~ 660 мин

С момента экспозиции по ~300 минуте опыта динамика магнитуд энергозатрат в опыте соответствовала контрольной, однако латентным периодом в действии вещества этот период считаться не может: группа компактнее контрольной, причём к концу периода компактность нарастает.

В следующую фазу (с ~ 300 по ~ 500 минуте) наблюдался относительный рост энергозатрат в экспонированной ДДМС группе. Наблюдаются длительные и выраженные специфические модификации нормального стрессового ответа, имеющие основным содержанием увеличение уровня СДА через 3-4 часа после экспонирования, с формированием длительного плато эффекта – не менее 10 часов (с ~500 по ~ 800 минуте). У экспонированных сибутрамином животных длительность и выраженность модификаций СДА существенно ниже.

С ~800 минуты по конец опыта отмечались постепенный спад эффекта, рост разброса в группе, тенденция возвращения к реализации нормального циркадного цикла.

Максимальные значения магнитуд отклонений от контроля достигались около 110 и 660 минуты с начала опыта (табл. 17).

Таким образом, кривые энергозатрат на двигательную активность отражают специфику состояния животных: стрессовый ответ реализуется аномально, переходя после введения длительной индуцированной активации, причём нормальный крупномасштабный минимум активности (между 800 и 900 минутой обоих опытов) оказывается пропущен. По мере развития эффекта исследуемого вещества существенно искажается нормальная реализация циркадного цикла в стрессовых условиях, наблюдавшаяся у контрольных животных [48].

По результатам теста «СДА-ДДМС» можно констатировать отсутствие сходства эффектов исследуемых веществ. Различия эффектов связаны с фазовой структурой сравниваемых эффектов: временем наступления, длительностью и выраженностью фаз эффектов, а также отложенными модификациями динамики спонтанной двигательной активности. Наблюдаются лишь некоторые сходные токсические проявления: атаксия разной степени выраженности, судорожная активность

Результаты анализа этограммы «Открытого поля»

Изменение поведенческой активности животных наглядно иллюстрируют результаты теста «открытое поле», включающего в себя запись и анализ этограммы, описывающей счёты, элементы поведения, иначе говоря, поведенческие события, эффективно определяемые экспертом. Анализ континуальных характеристик выполняется на фазе обработки данных видеотрекинга. Тест проводили с 30 по 40 минуту после экспозиции. Время инкубации 30 мин было выбрано исходя из данных СДА-теста.

Данные этограммы подвергались многомерному дисперсионному анализу, при этом, в анализ вошли только переменные, по которым в опыте наблюдалась существенная вариабельность. Этому требованию соответствовали параметры ГДА на периферии, на 2/3 и в центре площадки, клайминг, малый груминг и обследование отверстий.

Проверка гомогенности многомерных дисперсий позволяет констатировать отсутствие глобальных (и, соответственно, частных) различий в масштабах распределений как между контролем и опытными группами, так и между собственно опытными группами (p -значение для глобального сравнения составляет 0,762). В таблице 18 представлены сравнения для соответствующих друг другу доз сравниваемых веществ. Отметим, что значение p , определённое для глобального многомерного сдвига, равное 0,004, позволяет констатировать наличие значимых сдвигов в пространстве признаков, причём выраженность сдвига демонстрирует монотонную дозовую зависимость для обоих веществ.

После выполнения дисперсионного анализа (post hoc), поскольку были выявлены глобальные различия при p -значении, меньшем 0,05, был выполнен анализ индивидуальных откликов и введены поправки на множественные сравнения.

При исследовании методом экспертной фиксации и анализа этограмм в тесте «Открытого поля» выяснено, что сибутрамин и ДМС обладают специфической психической активностью, вызывающей на длительное время изменения состояния сознания животных; в частности, оба вещества подавляют нормальную ориентировочно-исследовательскую активность животных, в высоких дозах индуцируют двигательное возбуждение, и доза-зависимое упрощение организации стрессового поведенческого ответа. ДДМС обладает более выраженным возбуждающим действием по сравнению с сибутрамином, сходным с ним образом подавляет ориентировочно-исследовательскую активность животных в «Открытом поле», именно эти параметры определяют общую картину эффекта обоих веществ, позволяя говорить об относительной однонаправленности эффектов, выявляемых в этом тесте. Таким образом, в рамках группы параметров, учитываемых при анализе экспертно регистрируемой этограммы, ДДМС демонстрирует ограниченное сходство с сибутрамином.

Таблица 18 – Влияние сибутрамина, ДМС и ДДМС на поведенческую активность животных

Сибутрамин 1 мг/кг // контроль

№	РоВ	diff	lwr	upr	p-level
1	периферическая ГДА	-15,045	0,903	-15,045	0,903
2	ГДА на 2/3 площадки	-1,182	0,929	-1,182	0,929
3	ГДА в центре площадки	1,409	0,362	1,409	0,362
4	Клайминг	-6,182	0,017	-6,182	0,017
5	Малый груминг	0,045	0,988	0,045	0,988
6	Обследование отверстий	-6,136	0,293	-6,136	0,293

Сибутрамин 10 мг/кг // контроль

№	РоВ	diff	lwr	upr	p-level
1	периферическая ГДА	1,080	0,990	1,080	0,990
2	ГДА на 2/3 площадки	-6,682	0,068	-6,682	0,068
3	ГДА в центре площадки	-0,466	0,854	-0,466	0,854
4	Клайминг	-5,557	0,008	-5,557	0,008
5	Малый груминг	-0,080	0,988	-0,080	0,988
6	Обследование отверстий	-9,636	0,008	-9,636	0,008

Сибутрамин 100 мг/кг // контроль

№	РоВ	diff	lwr	upr	p-level
1	периферическая ГДА	52,955	0,018	52,955	0,018
2	ГДА на 2/3 площадки	-9,348	0,015	-9,348	0,015
3	ГДА в центре площадки	-1,591	0,185	-1,591	0,185
4	Клайминг	-7,182	0,003	-7,182	0,003
5	Малый груминг	-0,121	0,988	-0,121	0,988
6	Обследование отверстий	-14,803	0,000	-14,803	>0,001

ДМС 1 мг/кг // контроль

№	РоВ	diff	lwr	upr	p-level
1	периферическая ГДА	-2,545	0,990	-2,545	0,990
2	ГДА на 2/3 площадки	-1,182	0,929	-1,182	0,929
3	ГДА в центре площадки	-0,341	0,854	-0,341	0,854
4	Клайминг	-6,682	0,014	-6,682	0,014
5	Малый груминг	-0,455	0,634	-0,455	0,634
6	Обследование отверстий	-1,886	0,818	-1,886	0,818

ДМС 10 мг/кг // контроль

№	РоВ	diff	lwr	upr	p-level
1	периферическая ГДА	8,455	0,941	8,455	0,941
2	ГДА на 2/3 площадки	-3,682	0,509	-3,682	0,509
3	ГДА в центре площадки	-0,424	0,854	-0,424	0,854
4	Клайминг	-5,015	0,017	-5,015	0,017
5	Малый груминг	-0,121	0,988	-0,121	0,988
6	Обследование отверстий	-1,803	0,818	-1,803	0,818

ДМС 100 мг/кг // контроль

№	РоВ	diff	lwr	upr	p-level
1	периферическая ГДА	52,621	0,018	52,621	0,018
2	ГДА на 2/3 площадки	-7,348	0,068	-7,348	0,068
3	ГДА в центре площадки	-1,591	0,185	-1,591	0,185
4	Клайминг	-7,182	0,003	-7,182	0,003
5	Малый груминг	0,712	0,102	0,712	0,102
6	Обследование отверстий	-9,136	0,026	-9,136	0,026

Таблица 18 – продолжение

ДМС однократная доза // контроль

№	PoB	diff	lwr	upr	p-level
1	периферическая ГДА	54,750	20,904	88,596	0,002
2	ГДА на 2/3 площадки	8,375	-4,342	21,092	0,244
3	ГДА в центре площадки	0,750	-2,789	4,289	0,856
4	Клайминг	-1,875	-7,178	3,428	0,652
5	Малый груминг	-0,125	-1,126	0,876	0,947
6	Обследование отверстий	-7,500	-12,54	-2,459	0,003

здесь PoB – параметры поведения, Diff – оценка сдвига, Lwr – нижняя граница доверительного интервала, Upr – верхняя оценка доверительного интервала, p-level – вероятность ошибочного отклонения нулевой гипотезы.

Результаты анализа данных видеотрекинга «Открытого поля»

По результатам обработки данных видеотрекинга предварительно были определены основные поведенческие искажения: у групп животных, экспонированных дозой 1 мг/кг сибутрамина, отличия касаются в основном пройденного пути, и верхнего дециля ускорений; для дозы 100 мг/кг ДМС – пройденного пути и доли времени неподвижности. Доза сибутрамина в 10 мг/кг по дискриминирующему параметру соответствует 1 мг/кг ДМС (показатель Хёрста), доза сибутрамина в 100 мг/кг – по дискриминирующему параметру соответствует 10 мг/кг ДМС (пройденный путь и присутствие вне периферии), разовая доза ДДМС модифицирует (увеличивает) значение пройденного пути. Анализ состоит из двух частей: тестирования гомогенности дисперсий и тестирования многомерных сдвигов (табл. 19, 20).

Данные видеотрекинга «Открытого поля» ДМС (табл. 19) показали: поскольку значение p для гомогенности дисперсий велико (0,409), мы должны принять нулевую гипотезу, и констатировать отсутствие глобальных различий между группами в масштабах распределений. Из таблицы попарных сравнений ясно, что разброс поведенческих реакций под воздействием обоих веществ существенно не отличается при соответствующих дозах.

Таблица 19 – Результаты дисперсионного анализа ДМС

Тест гомогенности дисперсий

	Df	SumSq	MeanSq	F	p-value
Groups	6	0,5604	0,093401	0,9977	0,409
Residuals	61	5,7103	0,093611		

Попарные сравнения масштабов распределений: p-value

	контроль	ДМС_001	ДМС_010	ДМС_100
контроль				
ДМС_001	0,365			
ДМС_010	0,701			
ДМС_100	0,463			
Сиб_001	0,969	0,361		
Сиб_010	0,203		0,096	
Сиб_100	0,673			0,064

Тест сдвига

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	p-value
Groups	6	3,4808	0,58014	1,489	0,0553
Residuals	53	20,6494	0,38961	0,85575	
Total	59	24,1302	1		

Попарные сравнения сдвигов: p-value

	контроль	ДМС_001	ДМС_010	ДМС_100
контроль	0			
ДМС_001	0,5994			
ДМС_010	0,1577			
ДМС_100	0,3455			
Сиб_001	0,2526	0,9465		
Сиб_010	0,1633		0,0263	
Сиб_100	0,034			0,7436

здесь Df – количество степеней свободы, SumsOfSqs – сумма квадратов отклонений, MeanSqs – средний квадрат отклонений, F – значение F-критерия, Residuals – ошибка, p-value – значение p.

Отметим, что значение p, определённое для многомерного сдвига (после исключения выбросов) равное 0,0553, принадлежит интервалу $0,05 < p < 0,1$, что позволяет констатировать глобальные различия лишь с соответствующей надёжностью. Частные отличия фиксируются для дозы 100 мг/кг ДМС – смещение относительно контроля, и при дозе в 10 мг/кг – определён многомерный сдвиг в пространстве параметров между исследуемыми веществами.

Данные видеотрекинга «Открытого поля» ДДМС (табл. 20) показали: поскольку значение p мало (0,042), мы можем отклонить нулевую гипотезу и констатировать, что обнаружены глобальные различия между группами в масштабах распределений, иначе говоря, возможны различные искажения

поведенческого стрессового ответа в зависимости от индивидуальных особенностей. Из таблицы попарных сравнений ясно, что разброс поведенческих реакций под воздействием сибутрамина значимо больше нормального разброса, (при $p=0,028$), тогда как разброс реакций при воздействии извлечения ДДМС близок к контрольному.

Таблица 20 – Результаты дисперсионного анализа ДДМС

Тест гомогенности дисперсий

	Df	SumSq	MeanSq	F	p-value
Groups	2	0,65734	0,32867	4,0383	0,042
Residuals	21	1,70916	0,08139		

Попарные сравнения масштабов распределений: p-value

	контроль	ДДМС_однократная доза
контроль		
ДДМС_однократная доза	0,655607	
Сиб_однократная доза	0,027951	0,056319

Тест сдвига

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	p-value
Groups	2	3,8682	1,9341	3,1588	0,0052
Residuals	21	12,8580	0,6123		
Total	23	16,7262			

Попарные сравнения сдвигов: p-value

	контроль	ДДМС_однократная доза
контроль		
ДДМС_однократная доза	9,00E-04	
Сиб_однократная доза	0,022	<9,00E-04

здесь Df – количество степеней свободы, SumsOfSqs – сумма квадратов отклонений, MeanSqs – средний квадрат отклонений, F – значение F-критерия, Residuals – ошибка, p-value – значение p.

Значение p, определённое для многомерного сдвига, равное 0,0052, также позволяет уверенно утверждать, что можно выделить как минимум один значимый сдвиг в пространстве признаков.

Таким образом, при исследовании методом видеотрекинга в тесте «Открытого поля» выяснено, что при экспонировании сибутрамином и ДМС лишь при высоких дозах ДМС формируются характерные и статистически значимые нарушения в структуре поведения при стрессовом ответе, которые

позволяют подтвердить наличие психической активности и у вещества десметилсIBUTРАМИН, но не позволяют констатировать сходства поведенческих эффектов сIBUTРАМИНА и ДМС по группе параметров, включающих характеристики подвижности, асимметричности, фрактальности, и некоторые другие, определяемые в тесте видеотрекинга «Открытого поля».

ДДМС формирует ряд нарушений в структуре поведения при стрессовом ответе у животных, что позволяет подтвердить наличие психической активности у ДДМС. Так, при проведении тестов у животных, экспонированных ДДМС, наблюдалось двигательное возбуждение, метание и резкие развороты, указывающие на мотивационные нарушения; проваливание в отверстия, указывающее на нарушение координации; практически полное отсутствие интереса к отверстиям в поверхности «поля», характеризующие индуцированные когнитивные нарушения. Эффект ДДМС не обладает существенным сходством с эффектами, вызываемыми сIBUTРАМИНОМ, с точки зрения группы параметров, учитываемых в тесте видеотрекинга «Открытого поля».

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Проведено химическое исследование десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина. Подтверждена химическая структура данных веществ методами ГХ-МС и ИК-спектрометрии. Установлены хроматографические параметры идентификации десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина в предложенных условиях: время удерживания 13,18 и 13,10 мин соответственно, основные характеристические ионы масс-спектра десметилсибутрамина 100.20, 58.20, 44, 43.20, 41.20, 42.20, **264**; дидесметилсибутрамина – 86.20, 44.20, 43.20, 130.20, 87.20, 41.20, 101.20, 102.20, 137.20, **250**. Результаты химического исследования показали, что вещества десметилсибутрамин и дидесметилсибутрамин, действительно имеют сходную химическую структуру с сильнодействующим веществом сибутрамин и, следовательно, являются его структурными аналогами.

2. Проведено биологическое исследование десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина с использованием тестов спонтанной двигательной активности и «Открытого поля» с видеотрекингом. Результаты биологического исследования десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина в сравнении с сибутрамином показали, что данные вещества, являясь структурными аналогами сильнодействующего вещества сибутрамин, обладают психоактивным действием, не схожим с действием сибутрамина.

3. Полученные результаты комплексного химико-биологического исследования, а также отсутствие в настоящее время нормативной базы по установлению взаимного сходства психоактивного воздействия веществ, позволили обосновать необходимость рассмотрения вопроса о внесении дополнительно к имеющейся в списке сильнодействующих веществ позиции в формулировке «Сибутрамин, а также его структурные аналоги, обладающие схожим психоактивным действием» двух новых позиций: «Десметилсибутрамин» (1-(4-хлорфенил)-N-метил-альфа-(2-метилпропил) циклобутанметанамин) и «Дидесметилсибутрамин» (1-(4-хлорфенил)-альфа-(2-метилпропил)

циклобутанметанамин), в связи с чем было направлено письмо в Правовой департамент Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Изучена нормативно-методическая база оборота биологически активных добавок в России и за рубежом, что позволило сделать вывод о необходимости в дополнение к имеющимся методам оценки безопасности БАД разработать соответствующие методики по выявлению сильнодействующих и психоактивных веществ в составе биологически активных добавок.

2. Выполнен сравнительный анализ информационных данных по составу зарегистрированных на территории РФ БАД, предоставленных Интернет-порталами и официальными источниками. Изучен состав 3 000 наименований БАД растительного происхождения. Полученные результаты свидетельствуют о наличии расхождений в составе БАД, заявленном при регистрации продуктов и указанном на рекламных Интернет-сайтах, а также Интернет-сайтах производителей.

3. Проведено фитохимическое и хроматографическое исследование восьми биологически активных добавок растительного происхождения для лиц, контролирующих массу тела. По результатам исследования обнаружены расхождения между фактическим составом БАД и данными производителя по основным группам БАВ, источником которых являются анализируемые БАД, согласно данных производителя. Кроме того, в большинстве исследуемых объектов обнаружены посторонние компоненты синтетического происхождения в т.ч. сибутрамин, включенный в Список сильнодействующих веществ и законодательно запрещенный к использованию в составе БАД, а также его производные десметилсибутрамин и дидесметилсибутрамин. Данные вещества не указаны при регистрации производителем в составе исследуемых биологически активных добавок.

4. Разработана методика обнаружения и количественного определения десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина методом ГЖХ с пламенно-ионизационной детекцией с использованием в качестве внутреннего стандарта метилстеарата. Подобран температурный режим хроматографирования (скорость

потока – 2,4 мл/мин, температура начальная – 170 °С, повышение – 20 °С/мин; температура конечная – 220 °С; температура испарителя – 230 °С; температура детектора – 250 °С). Достигнуто эффективное разделение, определены хроматографические характеристики веществ. Методика обладает необходимой специфичностью, линейностью, правильностью и прецизионностью, что позволяет говорить о ее хороших валидационных характеристиках.

5. Установлены идентификационные характеристики и впервые проведено исследование схожести психоактивного воздействия десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА с сибутрамином с целью возможности их отнесения к его аналогам. Результаты химико-биологического исследования показали, что десметилсIBUTРАМИН и дидесметилсIBUTРАМИН, являющиеся структурными аналогами сильнодействующего вещества сибутрамин, не обладают схожим с ним психоактивным действием.

6. Обоснована необходимость включения дополнительно к имеющейся в списке сильнодействующих веществ позиции в формулировке «Сибутрамин, а также его структурные аналоги, обладающие схожим психоактивным действием» двух новых позиций: «десметилсIBUTРАМИН» (1-(4-хлорфенил)-N-метил-альфа-(2-метилпропил)циклобутанметанамин) и «дидесметилсIBUTРАМИН» (1-(4-хлорфенил)-альфа-(2-метилпропил)циклобутанметанамин). Направлено соответствующее письмо в Правовой департамент Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев, А. И. Оценка возможностей применения вейвлет-анализа для исследования двигательной активности мелких лабораторных животных / А. И. Андреев // Перспективы науки. – 2011. – № 7, 22. – С. 165-182.
2. Биологически активные добавки к пище в питании человека / В. П. Тутельян, Б. П. Суханов, А. Н. Австриевских, В. М. Поздняковский. – Томск : НТЛ, 2002.
3. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – М. : Высшая школа, 1991. – С. 119-122.
4. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Б. А. Краснов, Т. П. Березовская, Н. В. Алексеюк [и др.]. – Томск : Изд-во ТГУ, 1987. – 184 с.
5. Государственная Фармакопея СССР / М-во Здравоохранения Рос. Федерации. – 11-е изд., репринт. – М., 1998. – 398 с.
6. 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.
7. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) : [Электронный ресурс] // Евразийская экономическая комиссия. – Режим доступа : http://www.tsouz.ru/KTS/KTS17/Pages/P2_299.aspx. – Загл. с экрана.
8. Зунтукова, Г. А. Незаконный оборот наркотических и психотропных веществ в Китае и России / Г. А. Зунтукова // Сравнительное правоведение в России, Монголии, Китае и Японии-II: материалы международной научной конференции студентов и аспирантов (16 апреля 2010 г.) – Улан-Удэ : Издательство Бурятского госуниверситета, 2010. – С. 206-208.

9. Колбин, А. С. Обзор сообщений по неблагоприятным побочным реакциям с июня 2009 г. по июнь 2010 г. / А. С. Колбин, Д. Ю. Белоусов // Качественная клиническая практика. – 2010. – № 1. – С. 87-97.
10. Методические указания о порядке доклинического и клинического изучения препаратов природного происхождения и гомеопатических лекарственных средств. – М., 1994. – 64 с.
11. Некоторые особенности токсикологического изучения лекарственных препаратов из растений / Л. В. Крепкова, В. В. Бортникова, Е. В. Арзамасцев, Т. А. Сокольская // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2009. – № 5. – С. 51-53.
12. О введении в действие санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.3.2.1078-01 : Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 14 ноября 2001 г. № 36 // Справочно-правовая система «Консультант-Плюс» [Электронный ресурс] : Режим доступа : http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_123769/. – Загл. с экрана.
13. О введении в действие санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.3.2.1290-03 : Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 17.04.2003 № 50 // Справочно-правовая система «Консультант-Плюс» [Электронный ресурс] : Режим доступа : http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_42302/. – Загл. с экрана.
14. О государственной регистрации биологически активных добавок к пище : Приказ Роспотребнадзора от 26.02.2006 № 36 // Справочно-правовая система «Консультант-Плюс» [Электронный ресурс] : Режим доступа : http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_59609/. – Загл. с экрана.
15. О защите прав потребителей : Закон Российской Федерации от 7 февраля 1992 года № 2300-1 // Справочно-правовая система «Консультант-Плюс» [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://www.consultant.ru/popular/consumerism/>. – Загл. с экрана.
16. О качестве и безопасности пищевых продуктов : Федеральный закон № 29-ФЗ от 2 января 2000 года № 29 // Информационно-правовой портал Гарант

- [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/12117866/>. – Загл. с экрана.
17. О концепции государственной политики в области здорового питания населения Российской Федерации на период до 2005 года : Постановление Правительства Российской Федерации от 10 августа 1998 г. N 917 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/4174952/>. – Загл. с экрана.
 18. О противопоказаниях для применения товаров при отдельных видах заболеваний : Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 27 августа 1997 г. № 19 // Справочно-правовая система «Консультант-Плюс» [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=LAW;n=69766>. – Загл. с экрана.
 19. О рекламе : Федеральный закон № 38-ФЗ от 13 марта 2006 года № 38 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/12145525/>. – Загл. с экрана.
 20. О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения : Федеральный закон № 52-ФЗ от 30 марта 1999 года № 52 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/12115118/>. – Загл. с экрана.
 21. О техническом регулировании : Федеральный закон № 184-ФЗ от 27 декабря 2002 года № 184 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : http://base.garant.ru/12129354/1/#block_100. – Загл. с экрана.
 22. Об информации на этикетке биологически активных добавок к пище : Письмо Роспотребнадзора от 22 декабря 2005 г. № 0100/11727-05-32 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/12144644/>. – Загл. с экрана.
 23. Об обнаружении сибутрамина в БАД «Капсулы для похудения «Жуйдэмэн» : Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей

- и благополучия человека от 19 сентября 2006 г. № 0100/10032-06-23 // Справочно-правовая система «Консультант-Плюс» [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=EXP;n=375855>. – Загл. с экрана.
24. Об усилении надзора за оборотом биологически активных добавок к пище : Письмо Роспотребнадзора от 7 июня 2006 года № 0100/6272-06-32 // Справочно-правовая система «Консультант-Плюс» [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=LAW;n=61241>. – Загл. с экрана.
25. Об усилении надзора за производством и оборотом БАД : Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 6 марта 2007 г. № 8 // Справочно-правовая система «Консультант-Плюс» [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=LAW;n=67557>. – Загл. с экрана.
26. Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации, и единого перечня продукции, подтверждение соответствия которой осуществляется в форме принятия декларации о соответствии : постановление Правительства Российской Федерации от 1 декабря 2009 года № 982 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/12171546/>. – Загл. с экрана.
27. Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации : постановление Правительства Российской Федерации от 30 июня 1998 года № 681 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/12112176/>. – Загл. с экрана.
28. Об утверждении перечня продукции, подлежащей декларированию соответствия, порядка принятия декларации о соответствии и ее регистрации

- : постановление Правительства Российской Федерации от 7 июля 1999 года № 766 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/12116208/>. – Загл. с экрана.
29. Об утверждении перечня товаров, информация о которых должна содержать противопоказания для применения при отдельных видах заболеваний : постановление Правительства РФ от 23 апреля 1997 года № 481 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/10200857/>. – Загл. с экрана.
30. Об утверждении списков сильнодействующих и ядовитых веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Рос. Федерации, а также крупного размера сильнодействующих веществ для целей статьи 234 Уголовного кодекса Рос. Федерации : постановление Правительства Российской Федерации от 29 декабря 2007 года № 964 // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/12158202/>. – Загл. с экрана.
31. Орехов, А. Н. Проблема оценки эффективности биологически активных добавок к пище / А. Н. Орехов // Клинические исследования лекарственных средств в России. – 2004. – № ¾. – С. 30-35.
32. Особенности фармацевтического рынка биологически активных добавок / К. И. Стерн, Т. Л. Малкова, М. Н. Гурьянова, Е. И. Килиманова // Новая аптека. Эффективное управление для руководителя. – 2013. – № 12. – С. 45-47.
33. Пищевые продукты и пищевые добавки. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище : Методические указания от 15 октября 1998 года МУК 2.3.2.721-98. // Информационно-правовой портал Гарант [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://base.garant.ru/4175758/>. – Загл. с экрана.
34. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (выданные Федеральной службой, включая Управления). Дата актуализации базы данных — 25.01.2015 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав

- потребителей и благополучия человека : официальный сайт [Электронный ресурс] : Режим доступа: <http://fr.crc.ru/gosregfr/>. – Загл. с экрана.
35. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А. Н. Миронова. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.
 36. Самылина, И. А. Лекарственные растения, обладающие гепатотоксическим действием / И. А. Самылина, В. М. Булаев, Е. В. Ших // Фармация. – 2011. – № 4. – С. 49-51.
 37. Свистильников, А. Б. Противодействие незаконному обороту сильнодействующих веществ и биологически активных добавок: проблемы и пути решения / А. Б. Свистильников, С. М. Руднев // Проблемы правоохранительной деятельности. – 2013. – № 1. – С. 52-57.
 38. Состояние и перспективы развития законодательной базы оборота биологически активных добавок к пище в некоторых странах мира / Б. П. Суханов, А. В. Васильев, К. И. Эллер, М. Г. Керимова // Вопросы питания. – 2005. – Т. 74, № 6. – С. 37-40
 39. Стерн, К. И. Правовые аспекты производства биологически активных добавок для похудения, содержащих растительные компоненты / К. И. Стерн, П. С. Мащенко, Т. Л. Малкова // Медицинская Экспертиза и Право. – 2014. – № 1. – С. 3-8.
 40. 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>. – Загл. с экрана.
 41. Сыромятников, С. В. Криминалистическое исследование препаратов, содержащих сибутрамин / С. В. Сыромятников, И. И. Сарычев, Е. А. Гайдукова // Судебная экспертиза. – 2008. – № 4. – С. 61-67.
 42. Туровская, К. А. Административно-правовое регулирование общественных отношений в сфере обращения биологически активных добавок : автореф.

- дис... канд. юридических наук : 12.00.14 / К. А. Туровская. – Хабаровск, 2012. – 22 с.
43. Тюменский наркоконтроль уличил БАД «Жуйдемен» // Вопросы социального обеспечения. – 2006. – № 15. – С. 25.
 44. **Федеральный реестр биологически активных добавок к пище / под ред. Т. Л.Пилат. –М. : Когелет, 2000. – 327 с.**
 45. Химический анализ лекарственных растений [Текст] / под ред. Н. И. Гринкевич. – М. : Высшая школа, 1983. – 176 с.
 46. Хотимченко, Ю. С. Биологически активные добавки к пище: законодательная база и применение в медицине / Ю. С. Хотимченко // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2006. – № 3. – С. 19-22.
 47. Широкова, И. Проблемы и перспективы Российского рынка БАД / И. Широкова // Ремедиум. – 2012. – № 4. – С. 20-26.
 48. Экспериментальное исследование особенностей психической активности сибутрамина и дидесметилсибутрамина на лабораторных животных / К. И. Стерн и др. // Наркология. – 2014. – № 6 (150). – С. 41-49.
 49. Abe, H. Functional diversities of two activity components of circadian rhythm in genetical splitting mice (CS strain) / H. Abe, S. Honma, K. Honma // Journal of Comparative Physiology A. – 1999. – vol.184, № 3. – P. 243-251.
 50. Absence of sibutramine effect on spontaneous anxiety in rats / S. S. Frassetto et al. // Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. – 2010. – vol. 54, № 4. — P. 375-380.
 51. Abuse liability assessment of sibutramine, a novel weight control agent / L. M. Schuh et al. // Psychopharmacology. – 2000. – 147. – P. 339-346.
 52. Adulteration of over-the-counter slimming products with pharmaceutical analogues – an emerging threat / Y. P. Yuen et al. // Hong Kong Medical Journal. – 2007. – Vol. 13, № 3. – P. 216-220.
 53. Analysing the composition of Chinese “herbal” slimming aids / D. Blachut, A. Siwinska-Ziolkowska, A. Kobylecka, Z. Czarnocki // Problems of Forensic Sciences. – 2006. – LXVI. – P. 199-211.

54. Analysis of dietary supplements for arsenic, cadmium, mercury, and lead using inductively coupled plasma mass spectrometry / S. P. Dolan , D. A. Nortrup , P. M. Bolger, S. G. Capar // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – Vol. 51, № 5. – P. 1307–1312.
55. Anderson, M.J. Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions / M.J. Anderson // *Biometrics*. – 2006. – vol. 62, № 1. – P. 245–253.
56. Anderson, M.J. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity / M.J. Anderson, K.E. Ellingsen, B.H. McArdle. // *Ecology Letters*. – 2006. – vol. 9, № 6. – P. 683–693.
57. Arfken, C. L., Postmarketing surveillance of abuse liability of sibutramine / C. L. Arfken, C. R. Schuster, C. E. Johanson // *Drug and Alcohol Dependence*. – 2003. – № 69. – P. 169–173.
58. Asp, N.-G. Health claims in the labeling and marketing of food products: The Swedish food sector's Code of Practice in European perspective / N.-G. Asp, S. Bryngelsson // *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. – 2007. – № 51. – P. 107-126.
59. Benkley, K. Sibutramine and panic attacks / K. Benkley, Knowles S. R. // *American Journal of Psychiatry*. – 2002. – № 159. – P. 1793-1794.
60. Bonkovsky, H. L. Hepatotoxicity associated with supplements containing Chinese greentea (*Camellia sinensis*) / H. L. Bonkovsky // *Annals of Internal Medicine*. – 2006. – Vol. 144. – P. 68-71.
61. Bogushewski, P. Emotional changes related to age in rats – a behavioral analysis / P. Bogushewski, J. Zagrodska // *Behavioural Brain Research*. – 2002. – vol. 133 № 1. – P. 323-332.
62. Brain serotonin transporter occupancy by oral sibutramine dosed to steady state: a pet study using ¹¹C-DASB in healthy humans / P. S. Talbot et al.// *Neuropsychopharmacology*. – 2009. – P. 1-11.
63. Breemen, R. B. Ensuring the safety of botanical dietary supplements / R. B. van Breemen, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2008. – Vol. 87, № 2. – P. 509-513.

64. Breemen, R. B. The role of quality assurance and standardisation in the safety of botanical dietary supplements / R. B. van Breemen, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth // *Chemical Research Toxicology*. – 2007. – Vol. 20, № 4. – P. 577-582.
65. Brooks, P. M. Chinese herbal arthritis cure and agranulocytosis / P. M. Brooks, R. M. Lowenthal // *The Medical Journal of Australia*. – 1977. – № 2. – P. 860.
66. Bryngelsson, S. Health claims according to Article 13 of the EC Regulation: suggested priorities with reference to the Swedish Code on health claims and emphasis on relevance / S. Bryngelsson, N.-G. Asp // *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. – 2007. – № 51. – P. 127-136.
67. BTS 54525, A Monoamine uptake inhibitor exhibiting potent actions in models predictive of potential antidepressant activity / W. R. Buckett et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 1987. – № 90. – P. 94.
68. Clonatre, D. L. Kava-kava: examining new reports of toxicity / D. L. Clonatre // *Toxicology Letters*. – 2004. – Vol. 150. – P. 86-96.
69. Contamination of botanical dietary supplements by *Digitalis lanata* / N. R. Slifman et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 1998. – Vol. 339, № 12. – P. 806-811.
70. Cordeiro, Q. Sibutramine-induced mania episode in a bipolar patient / Q. Cordeiro, H. Vallada // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2002. – № 5. – P. 283-284.
71. Crişan, O. Health claims in food supplement advertising / O. Crişan // *Farmacia*. – 2012. – Vol. 60, № 1. – P. 138-142.
72. Deitel, M. Sibutramine warning: hypertension and cardiac arrhythmias reported [editorial] / M. Deitel // *Obesity Surgery*. – 2002. – № 12. – P. 422.
73. Detection and quantification of synthetic drugs in herbal slimming formula / S. Kanan et al. // *European Journal of Scientific Research*. – 2009. – Vol. 34, № 3. – P. 348-357.
74. Detection of sibutramine, its two metabolites and one analogue in a herbal product for weight loss by liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and

- time-of-flight mass spectrometry / P. Zou et al. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2007. – № 21. – P. 614-618.
75. Determination of N-desmethyl- and N-bisdesmethyl metabolites of Sibutramine in doping control analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. Trevis, G. Sigmund, A. K. Schiffer, W. Schanzer // *European Journal of Mass Spectrometry*. – 2006. – № 12. – P. 129-136.
 76. Dickinson, A. The regulation of dietary supplements / A. Dickinson // *Drug Store News*. – 2008. – March/April. – P. 21-26
 77. Dietary supplement ingredient database (DSID): Preliminary USDA studies on the composition of adult multivitamin/mineral supplements / J. M. Roseland et al. // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2008. – № 21. – P. 69-77.
 78. Dietz, B. Botanical dietary supplements gone bad / B. Dietz, J. L. Bolton // *Chemical Research Toxicology*. – 2007. – Vol. 20, № 4. – P. 586-590.
 79. DNA adduct formation and mutation induction by aristolochic acid in rat kidney and liver / N. Mei et al. // *Mutation Research*. – 2006. – № 602. – P. 83-91.
 80. Enantioselective behavioral effects of sibutramine metabolites / S. D. Glick et al. // *European Journal of Pharmacology*. – 2000. – № 397. – P. 93-102.
 81. Ernst, E. Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review / E. Ernst // *Journal of Internal Medicine*. – 2002. – № 252. – P. 107-113.
 82. Espinoza, E. O. Arsenic and mercury in traditional Chinese herbal balls / E. O. Espinoza, M. J. Mann, B. Bleasdel // *New England Journal of Medicine*. – 1995. – № 333. – P. 803-804.
 83. Florentin, M. Sibutramine-associated adverse effects: a practical guide for its safe use / M. Florentin, E. N. Liberopoulos, M. S. Elisaf // *Obesity Reviews*. – 2008. – № 9. – P. 378-387.
 84. Frazier, T. N. Hepatotoxic herbs: will injury mechanisms guide treatment strategies / T. N. Frazier, K. J. Krueger // *Current gastroenterology reports*. – 2009. – Vol. 11. – P. 317-324.

85. García-Rico, L. Content and daily intake of copper, zinc, lead, cadmium, and mercury from dietary supplements in Mexico / L. García-Rico, J. Leyva-Perez, M. E. Jara-Marini // *Food and Chemical Toxicology*. – 2007. – Volю 45, № 9. – P. 1599–1605.
86. Golozoubova, V. Locomotion is the major determinant of sibutramine-induced increase in energy expenditure / V. Golozoubova, F. Strauss, K. Malmlof // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2006. – Vol. 83, № 4. — P. 517–527.
87. Guns, E. S. Mass spectral analysis of PC-SPES confirms the presence of diethylstilbestrol / E. S. Guns, S. L. Goldenberg, P. N. Brown // *Canadian Journal of Urology*. – 2002. – № 9. – P. 1684–1688.
88. [³H]paroxetine binding in rat frontal cortex strongly correlates with [³H]5-HT uptake: effect of administration of various antidepressant treatments / S.C. Cheetham et al. // *Neuropharmacology*. – 1993. – № 32. – P. 737–743.
89. Halsted, C. H. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? / C. H. Halsted // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2003. – № 77. – P. 1001–1007.
90. Hepatitis induced by Kava (*Piper methysticum* abelin) / F. Stickel et al. // *Journal of Hepatology*. – 2003. – № 39. – P. 62–67.
91. Herbal composition PC-SPES for management of prostate cancer: identification of active principles / M. Sovak et al. // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2002. – № 94. – P. 1275–1281.
92. Herbal does not mean innocuous: Ten cases of severe hepatotoxicity associated with dietary supplements from Herbalife products / A. M. Schoepfer et al. // *Journal of Hepatology*. – 2007. – № 47. – P. 521–526.
93. Identification of N-desmethylsibutramine as a new ingredient in Chinese herbal dietary supplements / D. Blachut et al. // *Problems of Forensic Sciences*. – 2007. – LXX. – P. 225–235.
94. Investigation of the mechanisms underlying the hypophagic effects of the 5-HT and noradrenaline reuptake inhibitor sibutramine in the rat / H. C. Jackson et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 1997. – № 121. – P. 1613–1618.

95. Jung, J. Anotectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss / J. Jung, M. Hermanns-Clausen, W. Weinmann // *Forensic Science International*. – 2006. – № 161. – P. 221-222.
96. Jung-Woo, Bae Effects of Clopidogrel on the Pharmacokinetics of Sibutramine and Its Active Metabolites / Jung-Woo Bae, Choon-Gon Jang, Seok-Young Lee // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2011. – Vol. 51, № 12. – P. 1704-1711.
97. Kang-Yum, E. Chinese patent medicine as a potential source of mercury poisoning / E. Kang-Yum, S. H. Oransky // *Veterinary and HUMAN Toxicology*. – 1992. – № 34. – P. 235.
98. King, D.J. Clinical pharmacology of sibutramine hydrochloride (BTS 54524), a new antidepressant, in healthy volunteers / D.J. King, N. Devaney // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 1988. – Vol. 26, № 5. — P. 607–611.
99. Ko, R. Letter to the editor: PC-SPES. / R. Ko, R. D. Wilson, S. Loscutoff // *Urology*. – 2003. – № 61. – P. 1292.
100. Laser Reuterswärd, A. The new EC Regulation on nutrition and health claims on foods / A. Laser Reuterswärd // *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. – 2007. – Vol. 51, № 3. – P. 100-106.
101. Lead poisoning from ingestion of Chinese herbal medicine / H. Chan et al. // *Clinical Toxicology*. – 1977. – № 10. – P. 237.
102. Liu, Y.L. Mechanism of the thermogenic effect of Metabolite 2 (BTS 54 505), a major pharmacologically active metabolite of the novel anti-obesity drug, sibutramine / Y.L. Liu, D.J. Heal, M.J Stock // *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*. – 2002. – Vol. 26, № 9.– P. 1245-1253.
103. Luque, C.A. The discovery and status of sibutramine as an anti-obesity drug / C. A. Luque, J. A. Rey European // *Journal of Pharmacology*. – 2002. – № 440. – P. 119-128.
104. McDonald, D. D. Dietary supplement information and intention to continue and recommend supplements / D. D. McDonald, N. R. Nicholson // *International Journal of Nursing Studies*. – 2006. – № 43. – P. 51–57

105. McNeely, W. Sibutramine. A review of its contribution to the management of obesity / W. McNeely, K. L. Goa // *Drugs*. – 1998. – № 56. – P. 1093-1124.
106. Müller, D. Chinese slimming capsules containing sibutramine sold over the internet / D. Müller, W. Weinmann, M. Hermanns-Clausen // *Deutsches Ärzteblatt International*. – 2009. – Vol. 106, № 13. – P. 218–222.
107. Nisoly, E. An assessment of the safety and efficacy of sibutramine, an anti-obesity drug with a novel mechanism of action / E. Nisoly, M.O. Carruba // *Obesity Reviews*. – 2000. – № 1. – P. 127-139.
108. Offerhause, L. “Herbal” medicines and rheumatoid arthritis / L. Offerhause, M. N. G. Duke, H. M. Smits // *British Medical Journal*. – 1979. – 2. – P. 668.
109. On nutrition and health claims on foods : Regulation of the European Parliament and Council of 20 December 2006 1924/2006 [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://www.efsa.europa.eu/en/events/documents/corporate100601-p03.pdf>. – Загл. с экрана.
110. On nutrition labeling for foodstuffs : Council Directive of 24 September 1990 90/496/EEC // *Official Journal*. – 1990. – L 276. – P. 40-44 [Электронный ресурс] : Режим доступа : http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/nutritionlabel/discussion_paper_rev_tech_issues.pdf. – Загл. с экрана.
111. On the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements : Directive of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 2002/46/EC [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://www.consultpharma.ru/index.php/en/documents/fs/568-directive-2002-46-ec>. – Загл. с экрана.
112. Organochlorine Pesticides and Metals in Select Botanical Dietary Supplements / D. B. Huggett et al. // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2001. – Vol. 66, № 2. – P. 150-155.
113. Palou, A. General aspects on the assessment of functional foods in the European Union / A. Palou, F. Serra, C. Pico // *European Journal of Clinical Nutrition*. – 2003. – Vol. 57, № 1. – P. 12-17.

114. Progress in developing analytical and label-based dietary supplement databases at the NIH Office of Dietary Supplements / J. T. Dwyer et al. // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2008. – № 21. – P. 83-93
115. Progress in development of an integrated dietary supplement ingredient database at the NIH Office of Dietary Supplements / J. T. Dwyer et al. // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2006. – № 19. – P. 108-114.
116. QT interval prolongation associated with sibutramine treatment / M. Harrison-Woolrych et al. // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2006. – № 61. – P. 464-469.
117. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Электронный ресурс] // R Core Team. 2013. – Режим доступа : <http://www.R-project.org/>. – Загл. с экрана.
118. Raman, P. Evaluation of metal and microbial contamination in botanical supplements / P. Raman, L. C. Patino, M. G. Nair // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – Vol. 52, № 26. – P. 7822–7827.
119. Sayin, T. Sibutramine: possible cause of a reversible cardiomyopathy / T. Sayin, M. Güldal // *International Journal of Cardiology*. – 2005. – № 99. – P. 481-482.
120. Schaumburg, H.H. Alopecia and sensory polyneuropathy from thallium in a Chinese herbal medication / H.H. Schaumburg, A. Berger // *Journal of the American Medical Association*. – 1992. – № 340. – P. 3430.
121. Sibutramine-associated QT interval prolongation and cardiac arrest / D. Ernest, A. Gershenson, C. E. Corallo, R. Nagappan // *Annals of Pharmacotherapy*. – 2008. – № 42. – P. 1514-1517.
122. Simultaneous determination of sibutramine and N-di-desmethylsibutramine in dietary supplements for weight control by HPLC–ESI-MS / Ziqiang Huang et al. // *Journal of Chromatographic Science*. – Vol. 46. – P. 707-711.
123. Status of nutrition and health claims in Europe / H. Verhagena et al. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 501. – № 1. – P. 6-15
124. Stickel, F. Herbal hepatotoxicity / F. Stickel, E. Patsenker, D. Schuppan // *Journal of Hepatology*. – 2005. – № 43. – P. 901-910.

125. Taflinski, T. Sibutramine-associated psychotic episode / T. Taflinski, J. Chojnacka // *American Journal of Psychiatry*. – 2000. – № 157. – P. 2057-2058.
126. The contribution of metabolites to the rapid and potent down-regulation of rat cortical beta-adrenoceptors by the putative antidepressant sibutramine hydrochloride / G.P. Luscombe, R.H. Hopcroft, P.C. Thomas, W.R. Buckett // *Neuropharmacology*. – 1989. – № 28. – P. 129-134.
127. Thermogenic effects of sibutramine and its metabolites / Connoley I. P. et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 1999. – № 126. P. 1487–1495.
128. Thermogenic effects of sibutramine in humans / D. L. Hansen, et al. // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 1998. – № 68. – P. 1180–1186.
129. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*) / J. L. Nortier et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2000. – № 342. – P. 1686 –1692.
130. Use of botanicals in food supplements / P. Coppens et al. // *Annals of Nutrition and Metabolism*. – 50. – 2006. – P. 538-554.
131. Vidal, C. Identification of a sibutramine-metabolite in patient urine after intake of a “pure herbal” Chinese slimming product / C. Vidal, S. Quandt // *Therapeutic drug monitoring*. – 2006. – № 28. – P. 690-692.
132. Wang, J. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS / J. Wang, B. Chen, S. Yao // *Food Additives & Contaminants: Part A*. – 2008. – Vol. 25, № 7. – P. 822-830.
133. Woollorton, E. Obesity drug sibutramine (Meridia): hypertension and cardiac arrhythmias / E. Woollorton // *Canadian Medical Association Journal*. – 2002. – 166. – P. 1307-1308.

ПРИЛОЖЕНИЯ

**Приложение 1. Сравнительный анализ информации о составе
биологически активных добавок к пище растительного происхождения**

№ п/п	Наименование продукта	Количество компонентов согласно Реестру БАД	Количество компонентов согласно интернет- источнику	Различия по количеству наименований растений в составе	Количество запрещенных растений в составе
1.	Формула Пяти Элементов 1014 (пилюли, 9 г)	8	10	2	1
2.	Составерон (капсулы, 0,6 г)	11	7	11	0
3.	Фитосбор «Алфит-19» утренний, дневной (брикеты по 2 г)	5	5	1	0
4.	Фитосбор «Алфит-26» утренний, вечерний (брикеты по 2 г)	5	8	5	1
5.	Формула Пяти Элементов 833 (пилюли, 6 г)	8	13	8	2
6.	Формула Пяти Элементов 1312 (пилюли, 9 г)	10	12	6	1
7.	Формула Пяти Элементов 241 (пилюли, 6 г)	10	11	5	1
8.	Формула Пяти Элементов 424 (пилюли, 60 г)	8	12	5	2
9.	Формула Пяти Элементов 845 (пилюли, 0,18 г)	10	12	3	0
10.	Формула Пяти Элементов 421 (пилюли, 10 г)	17	26	11	1
11.	Формула Пяти Элементов 122 (пилюли, 1,5 г)	11	24	17	1
12.	Формула Пяти Элементов 141 (гранулы в пакетиках по 5 г)	11	22	12	2
13.	Стеростатин (капсулы, 730 мг)	4	5	1	0

№ п/п	Наименование продукта	Количество компонентов согласно Реестру БАД	Количество компонентов согласно интернет- источнику	Различия по количеству наименований растений в составе	Количество запрещенных растений в составе
14.	Реотон Комплекс (жидкость во флаконах по 118 и 237 мл)	16	14	3	0
15.	Фиточай «Сила российских трав №28» (фильтр- пакеты по 1,5 г)	11	20	9	0
16.	КангХин (капсулы, 330 мг)	5	4	2	0
17.	Фитосбор «Алфит-7» утренний, вечерний (брикеты по 2 г)	6	5	3	1
18.	Лакс-Макс (капсулы, 845 мг)	18	17	5	0
19.	Формула Пяти Элементов 1701 (пилюли, 0,169 г)	7	8	3	0
20.	Фудзы Лиджун (пилюли, 9 г)	5	5	2	1
21.	Формула Пяти Элементов 411 (пилюли, 0,1791 г)	7	7	2	0
22.	Формула Пяти Элементов 811 (пилюли, 0,1747 г)	10	10	2	0
23.	Формула Пяти Элементов 851 (пилюли, 0,18 г)	8	8	2	1
24.	Фитосбор «Алфит-25» утренний, вечерний (брикеты по 2 г)	6	8	2	0
25.	Фитосбор «Алфит-27» утренний, вечерний (брикеты по 2 г)	5	7	2	0
26.	Фитосбор «Алфит-13» утренний, вечерний (брикеты по 2,0 г)	5	6	7	1

№ п/п	Наименование продукта	Количество компонентов согласно Реестру БАД	Количество компонентов согласно интернет- источнику	Различия по количеству наименований растений в составе	Количество запрещенных растений в составе
27.	Фитосбор «Алфит-24» утренний, вечерний (брикеты по 2,0 г)	7	10	3	1
28.	Эвика (капсулы, 500 мг)	13	6	7	1
29.	СС-А NSP (капсулы, 400 мг)	10	10	2	1
30.	Набор трав № 2 (таблетки, 780 мг)	9	8	4	1
31.	Милона® - 8 (таблетки покрытые оболочкой или без оболочки, 0,5 г)	5	8	3	1
32.	Императорский кордицепс Ю-Нид (жидкость во флаконах по 30 мл)	6	6	6	1
33.	Чаванпраш Авалеха Специаль (паста в банках по 250 г, 500 г)	52	52	19	5
34.	Чэнцзай (пилюли, 6,0 г)	17	11	14	0
35.	Аллибиотик (капсулы, 620 мг)	5	6	1	0
36.	Гастронорм Болгартрав (таблетки, 0,5 г)	17	19	3	2
37.	Гепаклинз (капсулы, 800 мг)	6	9	5	2
38.	Суперлакс (капсулы, 550 мг)	6	9	3	1
39.	Уро Лакс (капсулы, 567,8 мг)	25	21	8	1
40.	Эликсир «Жун Шуан» (жидкость во флаконах по 10 мл)	4	4	2	0

№ п/п	Наименование продукта	Количество компонентов согласно Реестру БАД	Количество компонентов согласно интернет- источнику	Различия по количеству наименований растений в составе	Количество запрещенных растений в составе
41.	Фитосбор «Алфит-17» утренний, вечерний (брикеты по 2 г)	6	7	3	1
42.	Ритмы Здоровья- Вечер (капсулы, 0,45 г)	15	16	2	1
43.	Ликви-Файв® (флаконы по 15 мл)	26	30	12	2
44.	Гудзон капс. (капсулы, 1032 мг)	14	22	9	1
45.	Босвения Плюс (капсулы, 515 мг)	14	14	2	1
46.	Дилаксо (капсулы, 726,0 мг)	8	17	17	0
47.	Колез (капсулы, 730,0 мг)	8	4	8	0

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Документы по внедрению результатов научных исследований

«Утверждаю»
Начальник ГБУЗ СО
«Бюро судебно-медицинской экспертизы»
Д.Л. Кондрашов
«30» декабря 2015 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

В информационном письме «Исследование сибутрамина и его активных метаболитов в вещественных доказательствах», разработанном сотрудниками кафедры токсикологической химии Пермской государственной фармацевтической академии Стерн К.И., Малковой Т.Л., Андреевым А.И., представлены методики идентификации, количественного определения и биологического исследования активных метаболитов сибутрамина – десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина в вещественных доказательствах. Для качественного подтверждения исследуемых веществ авторами информационного письма предложен метод газовой хроматографии с масс-селективной детекцией. Разработаны методики количественного определения на основе газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационной детекцией. Проведено биологическое исследование с целью оценки схожести психоактивного воздействия сибутрамина и его активных метаболитов – десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина.

Апробация и внедрение методик, изложенных в Информационном письме (ГХ/МС и ГЖХ/ДИП), проведены в судебно-химическом отделении ГБУЗ СО «Бюро судебно-медицинской экспертизы».

Методики отличаются высокой чувствительностью, дают хорошо воспроизводимые результаты, статистически достоверны.

Заключение: предложенные методики признаны пригодными для судебно-химического исследования вещественных доказательств на наличие сибутрамина и его активных метаболитов десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина.

Заведующая судебно-химическим отделением
ГБУЗ СО «Бюро судебно-медицинской
экспертизы»



Т.В. Макаренко

Доцент кафедры судебной медицины
ГБОУ ВПО УГМУ МЗ РФ, к.м.н.,
врач-судебно-медицинский эксперт
ГБУЗ СО «БСМЭ»,
член врачебно-экспертной комиссии
(по контролю качества экспертиз)



О.Б. Долгова

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель начальника Управления-
Начальник СО Управления ФСКН
России по Чувашской Республике
полковник полиции

В.В. Бабаев



АКТ ВНЕДРЕНИЯ
материалов научных исследований в практику

Настоящим актом подтверждаем, что по запросам СО УФСКН России по Чувашской Республике на базе ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России проводились комплексные химические и фармакологические исследования вещества дидесметилсIBUTРАМИН по установлению сходства химической структуры и психоактивного воздействия со свойствами сильнодействующего вещества сибутрамин.

Результаты данных исследований активно используются в работе СО УФСКН России по Чувашской Республике в рамках расследования уголовных дел и судопроизводстве.

Старший следователь СО Управления
подполковник полиции

Р.В. Сапожников



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПО КОНТРОЛЮ ЗА ОБОРОТОМ НАРКОТИКОВ
(ФСКН РОССИИ)

УПРАВЛЕНИЕ ПО РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

420088, г. Казань, ул. Ак. Губкина, 50. Тел. (843) 274-30-30. Факс (843) 272-29-11. E-mail: ufskn.rt@tatar.ru

от 16.02.15 № акт-1070
на № _____ от _____

614070, г.Пермь-70, а/я 2600

Руководителю РИЦ «Фарматест»
ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России
Т.Л. Малковой
(для Стерн К.И.)

Направляю Вам акт внедрения материалов научных исследований в работу Управления ФСКН России по Республике Татарстан.

Приложение: акт внедрения материалов научных исследований в практику в 3 экземплярах.

Заместитель начальника Управления
- начальник следственной службы
подполковник полиции

С.Г. Каменов

Исп. Асхадуллин Р.Р.
Тел. 8(843)274-30-89

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель начальника Управления
ФСКН России по Республике Татарстан-
начальник следственной службы
подполковник полиции

С.Г. Каменов

«16» *сентября* 2015г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ
материалов научных исследований в практику

По запросу Управления ФСКН России по Республике Татарстан на базе ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России зав. каф. токсикологической химии, доц., д.ф.н. Малковой Т.Л., асс. каф. токсикологической химии Стерн К.И., м.н.с. научного отдела Андреевым А.И. проводилось комплексное химическое и фармакологическое исследование вещества десметилсIBUTРАМИН по вопросу отнесения его к аналогу сильнодействующего вещества сIBУТРАМИН.

Результаты данного исследования, активно используются в работе Управления ФСКН России по Республике Татарстан в рамках расследования уголовных дел и судопроизводстве.

Заместитель начальника
следственной службы Управления-
начальник 1 отдела
майор полиции


М.Р. Зиганшин

«Утверждаю»

Проректор по учебной работе ГБОУ ВПО

ОрГМУ Минздрава России, профессор

 И.В. Мирошниченко« 02 » февраля 2015 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ научных достижений в учебный процесс

Материалы диссертационной работы Стерн Кристины Ильиничны, представленные в Информационном письме «Исследование сибутрамина и его активных метаболитов в вещественных доказательствах» (авторы: ассистент кафедры токсикологической химии Стерн К.И., заведующий кафедрой токсикологической химии Малкова Т.Л., м.н.с. научного отдела Андреев А.И., ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России), внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии Оренбургского государственного медицинского университета при изучении дисциплины «Токсикологическая химия».

Предложенные в информационном письме методики позволяют проводить определение сибутрамина и его активных метаболитов десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина в вещественных доказательствах, в том числе в биологически активных добавках, представляющих собой смеси этих веществ с растительными компонентами. Для обнаружения и количественного определения исследуемых веществ предложены методы газовой хроматографии с различными способами детектирования (ПИД, масс-селективный детектор), использующиеся в химико-токсикологическом анализе. Для установления психоактивного воздействия исследуемых веществ использованы биологические тесты (СДА, «Открытое поле» с видеотрекингом).

Заключение: предложенные автором материалы диссертационной работы используются в учебном процессе и внеучебной работе студентов, обучающихся по специальности «Фармация».

Заведующий кафедрой биологической химии
Оренбургского государственного
медицинского университета,
доктор медицинских наук, профессор

 — А.А. Никоноров

« 02 » февраля 2015 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ

Минздрава России,

академик РАН, лауреат Государственной

премии РФ, дважды лауреат премии

Правительства РФ, заслуженный деятель

науки РФ, профессор

Г.Н. Котельников

«09» 02 2011 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационной работы Стерн Кристины Ильиничны
«Разработка способов определения производных сибутрамина в биологически
активных добавках, используемых при контроле массы тела» на соискание
ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 -
«фармацевтическая химия, фармакогнозия» на кафедре химии
фармацевтического факультета ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии фармацевтического факультета: зав. кафедрой, профессора, д.б.н. И.Ф. Шаталаева, доцента, к.х.н. С.Х. Шариповой, доцента к.фарм.н. А.В. Воронина подтверждает использование материалов диссертационного исследования К.И. Стерн в учебном процессе при проведении лекционных и практических занятий со студентами, обучающимися по специальности «Фармация».

В разработанном в рамках диссертационного исследования информационном письме «Исследование сибутрамина и его активных метаболитов в вещественных доказательствах» (авторы: Стерн К.И., Малкова Т.Л., Андреев А.И.) представлены методики идентификации, количественного определения и биологического исследования активных метаболитов сибутрамина – десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина в вещественных доказательствах. Для идентификации исследуемых веществ авторами информационного письма предложен метод газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. Разработаны методики количественного определения на основе газо-жидкостной хроматографии (с пламенно-ионизационным детектором). Проведено биологическое исследование с целью подтверждения психоактивного эффекта сибутрамина и его метаболитов – десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина.

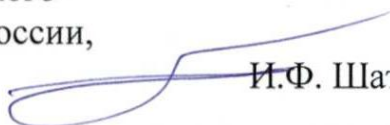
Разработанные авторами методики отличаются высокой чувствительностью, дают воспроизводимые результаты, статистически достоверны.

Представленные в Информационном письме материалы диссертационной работы Стерн К.И. дают представление о различных аспектах химико-

токсикологического анализа «лекарственных ядов», что важно при изучении дисциплины «Токсикологическая химия».

Заключение: материалы диссертационной работы Стерн Кристины Ильиничны «Разработка способов определения производных сибутрамина в биологически активных добавках, используемых при контроле массы тела» используются в учебном процессе студентов 5 курса, обучающихся по специальности «Фармация».

Заведующий кафедрой химии фармацевтического
факультета ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России,
д. биол. н., профессор



И.Ф. Шаталаев

Доцент кафедры химии фармацевтического
факультета, к. хим.н



С.Х. Шарипова

Доцент кафедры химии фармацевтического
факультета, к. фарм.н



А.В. Воронин

УТВЕРЖДАЮ

И.о. ректора ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России

профессор

И.В. Алексеева

«46» февраля 2015 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Наименование предложения или внедрения:** монография «Биологически активные добавки к пище в России и за рубежом: правовые основы, стандартизация, методы анализа».
2. **Кем и когда разработано:** на кафедре токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, 2015 г.
3. **Авторы:** ассистент кафедры токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России Стерн К.И., зав. кафедрой токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, д.ф.н. Малкова Т.Л.
4. **Где внедрено:** ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, кафедра управления и экономики фармации.
5. **Эффективность внедрения:** использование указанной монографии в учебном процессе кафедры управления и экономики фармации будет способствовать совершенствованию профессиональных компетенций обучающихся по организационным и правовым вопросам регулирования оборота биологически активных добавок к пище.

Ответственный за внедрение

зав. кафедрой управления и экономики фармации ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава
России, д.ф.н., профессор  Солонинина А.В.

Солонина А.В.

12

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России)

Юридический адрес: Россия, 614990, г. Пермь, ул. Екатерининская, д.101

Почтовый адрес: Россия, 614990, г. Пермь, ул. Полевая, д.2

Тел/факс (342) 233-55-01; 236-90-50; E-mail: perm@pfa.ru

ИНН 5902291011; КПП 590201001; ОГРН 1025900536760

19.01.2015 № 009/35
 на № _____ от _____

Директору Правового департамента
 Министерства здравоохранения РФ
 Соловьевой Светлане Борисовне

О внесении изменений в Список сильнодействующих веществ

Уважаемая Светлана Борисовна!

В связи с участвовавшими случаями выявления сибутрамина и его активных метаболитов десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина в биологически активных добавках для похудения, а также часто задаваемыми правоохранительными органами вопросами по схожести их психоактивных свойств, сотрудниками РИЦ «Фарматест» ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России Малковой Т. Л., Машенко П. С., Стерн К.И., Андреевым А. И., Булатовым И. П. были проведены комплексные химико-фармакологические исследования сибутрамина и его активных метаболитов.

В Пермской государственной фармацевтической академии накоплен достаточный опыт исследования новых синтетических соединений, изымаемых из нелегального оборота, в сравнении с веществами, официально отнесенными к наркотическим или психотропным, при этом доказывается как сходство химической структуры, так и сходство психоактивного воздействия с использованием лабораторных животных. В течение 2010-2014 г.г. исследовано более 70 новых психоактивных веществ, проведено около 4000 комплексных химико-фармакологических исследований на основании постановлений правоохранительных органов различных регионов РФ. Сотрудниками академии разработаны «Методические рекомендации по процедуре отнесения психоактивных веществ к аналогам наркотических средств и психотропных веществ», представленные для рассмотрения в ФСКН России и МЗ РФ.

Вещество сибутрамин внесено в Список сильнодействующих веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации (утвержденный постановлением Правительства РФ № 964 от 29.12.2007 г. «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) в формулировке «Сибутрамин, а также его структурные аналоги, обладающие схожим психоактивным действием».

Результаты химического исследования показали, что вещества десметилсибутрамин (ДМС) и дидесметилсибутрамин (ДДМС), действительно имеют сходную химическую структуру с сильнодействующим веществом сибутрамин и, следовательно, являются его структурными аналогами.

При исследовании циркадной ритмики спонтанной двигательной активности («СДА-тест») у животных, экспонированных сибутрамином и ДМС, выяснено, что у экспонированных ДМС животных наблюдаются длительные и выраженные специфические модификации нормального стрессового ответа, имеющие основным содержанием подавление уровня СДА через 2-4 часа после экспонирования; эффект обладает дозовой зависимостью высокой выраженности. У экспонированных сибутрамином животных, при схожести морфологии характеристических кривых, длительность и выраженность модификаций СДА существенно ниже при аналогичных дозах экспонирования. Можно констатировать ограниченное сходство эффектов исследуемых веществ, определяемое пофазным соответствием, доминирующей фазой, и некоторыми токсическими проявлениями (атаксия, стереотипия, редко - судорожная активность); различия эффектов связаны со временем наступления, длительностью и выраженностью фаз эффектов, а также отложенными модификациями динамики спонтанной двигательной активности.

При исследовании методом экспертной фиксации и анализа этограмм в тесте «Открытого поля» выяснено, что сибутрамин и ДМС обладают специфической психической активностью, вызывающей на длительное время изменения состояния сознания животных; в частности, оба

вещества подавляют нормальную ориентировочно-исследовательскую активность животных, в высоких дозах индуцируют двигательное возбуждение, и доза-зависимое упрощение организации стрессового поведенческого ответа.

При исследовании методом видеотрекинга в тесте «Открытого поля» выяснено, что при экспонировании сибутрамина и ДМС лишь при высоких дозах ДМС формируются характерные и статистически значимые нарушения в структуре поведения при стрессовом ответе, которые позволяют подтвердить наличие психической активности и у вещества десметилсибутрамин, но не позволяют констатировать сходства поведенческих эффектов сибутрамина и ДМС по группе параметров, включающих характеристики подвижности, асимметричности, фрактальности, и некоторые другие, определяемые в тесте видеотрекинга «Открытого поля».

Таким образом, вещество **десметилсибутрамин**, являющееся **структурным аналогом сильнодействующего вещества сибутрамин**, не обладает схожим психоактивным действием.

При проведении СДА-теста у животных, экспонированных сибутраминами и ДДМС, выяснено, что у экспонированных ДДМС животных наблюдаются длительные и выраженные специфические модификации нормального стрессового ответа, имеющие основным содержанием увеличение уровня СДА через 3-4 часа после экспонирования, с формированием длительного плато эффекта – не менее 10 часов. У экспонированных сибутраминами животных длительность и выраженность модификаций СДА существенно ниже. Можно констатировать отсутствие сходства эффектов исследуемых веществ. Различия эффектов связаны с фазовой структурой сравниваемых эффектов: временем наступления, длительностью и выраженностью фаз эффектов, а также отложенными модификациями динамики спонтанной двигательной активности. Наблюдаются лишь некоторые сходные токсические проявления: атаксия разной степени выраженности, судорожная активность.

При исследовании методом экспертной фиксации и анализа этограмм в тесте «Открытого поля» выяснено, что ДДМС обладает более выраженным возбуждающим действием по сравнению с сибутраминами, сходным с ним образом подавляет ориентировочно-исследовательскую активность животных в «Открытом поле», именно эти параметры определяют общую картину эффекта обоих веществ, позволяя говорить об относительной однонаправленности эффектов, выявляемых в этом тесте. Таким образом, в рамках группы параметров, учитываемых при анализе экспертно регистрируемой этограммы, ДДМС демонстрирует ограниченное сходство с сибутраминами.

При исследовании методом видеотрекинга теста «Открытого поля» выяснено, что ДДМС формирует ряд нарушений в структуре поведения при стрессовом ответе у животных, что позволяет подтвердить наличие психической активности у ДДМС. Так, при проведении тестов у животных, экспонированных ДДМС, наблюдалось двигательное возбуждение, метание и резкие развороты, указывающие на мотивационные нарушения; проваливание в отверстия, указывающее на нарушение координации; практически полное отсутствие интереса к отверстиям в поверхности «поля», характеризующие индуцированные когнитивные нарушения. Эффект ДДМС не обладает существенным сходством с эффектами, вызываемыми сибутраминами, с точки зрения группы параметров, учитываемых в тесте видеотрекинга «Открытого поля».

Таким образом, вещество **дидесметилсибутрамин**, являющееся **структурным аналогом сильнодействующего вещества сибутрамин**, не обладает схожим психоактивным действием.

На основании изложенного, а также в связи с отсутствием в настоящее время нормативной базы по установлению взаимного сходства психоактивного воздействия веществ, просим Вас рассмотреть вопрос о внесении дополнительно к имеющейся в списке сильнодействующих веществ формулировке «**Сибутрамин, а также его структурные аналоги, обладающие схожим психоактивным действием**» двух позиций: «десметилсибутрамин» (1-(4-хлорфенил)-N-метил-альфа-(2-метилпропил) циклобутанметанамин) и «дидесметилсибутрамин» (1-(4-хлорфенил)-альфа-(2-метилпропил) циклобутанметанамин).

И.о. ректора ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России

И.В. Алексеева

Исп. д.ф.н., профессор Малкова Т.Л.
(342)282-58-65, kaftox@mail.ru





**МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
(МИНЗДРАВ РОССИИ)

Рахмановский пер., д. 3/25, стр. 1, 2, 3, 4,
Москва, ГСП-4, 127994
тел.: (495) 628-44-53, факс: (495) 628-50-58

10 ФЕВ 2015 № 25-4/9-14
009/35 19.01.2015
На № _____ от _____

Мажарова Т. П.
16.02.15
(подпись)

И.о. ректора
ГБОУ ВПО ПГФА
Минздрава России

И.В. Алексеевой

ул. Полевая, д. 2,
г. Пермь, 614990

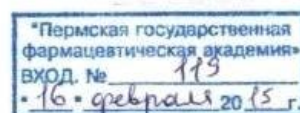
Департамент лекарственного обеспечения и регулирования обращения медицинских изделий Минздрава России в пределах своей компетенции рассмотрел Ваше письмо и сообщает, что Ваше обращение направлено по компетенции в ФСКН России письмом от 5 февраля 2015 г. № 25-4/10/2-525.

С уважением,

Заместитель
директора Департамента

О.А. Константинова

Н.М. Николаева (495) 627 24 00 (доб. 2540)



ОТ:УФСН РФ ПО РТ РСД

ТЕЛ:843 274 30 33

28 МАЙ 2014 9:29 СТР1



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПО КОНТРОЛЮ ЗА ОБОРОТОМ НАРКОТИКОВ
(ФСНН РОССИИ)

УПРАВЛЕНИЕ ПО РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

420088, г. Казань, ул. Ак. Губкина, 50. Тел. (843) 274-30-30. Факс (843) 272-29-11. E-mail: ufyn.rl@tatart.ru

от 27.05.2014 № 14/1102
на № _____ от _____

Направить факсом
факс (342) 282-58-65

Руководителю
РИЦ «Фарматест»
Т.Л. Малковой

О направлении запроса

Уважаемая Тамара Леонидовна!

Прошу Вас дать разъяснения о том, является ли сибутрамин (nog) (сибутрамин-М) структурным аналогом, а также обладает ли он схожим психоактивным действием с сильнодействующим веществом сибутрамином.

В связи с оперативной необходимостью прошу предоставить информацию до 27.05.14 по факсу (843)274-30-33 либо (843)272-94-65.

С уважением,
Начальник ЭКО Управления

Н.А. Фицева



Федеральная таможенная служба
Приволжское таможенное управление
ТАТАРСТАНСКАЯ ТАМОЖНЯ

ул. Королёвко, д. 56, г. Казань, 420094,
Телефон (843) 520-94-12, факс (843) 520-81-11
Телегайн 224313 TULPA RU
ОКПО 54448441, ОГРН 1021603150150
ИНН/КПП 1653021311/165701001

Руководителю РИЦ
«Фарматест» ГБОУ
ВПО ПФА Минздрава России
Т.Л.Малковой

13.05.2014 № 22.14/05448

На № _____ от _____

О направлении информации

Уважаемая Тамара Леонидовна!

В ходе таможенного контроля на канале международных почтовых и экспресс - курьерских отправлений, сотрудниками Татарстанской таможни выявлены международные почтовые отправления EE748811948CN и EE748811982CN с товаром «Травяной напиток Green Coffee 800». Данный товар был направлен на таможенную экспертизу в ЭКС – региональный филиал ЦЭКТУ г. Нижний Новгород.

По заключению таможенного эксперта № 1929-2013 от 21.11.2013 г. и №1930-2013 от 21.11.2013 г., в составе исследуемых объектов обнаружен структурный аналог сибутрамина – вещество нор-нор-сибутрамин. Сибутрамин, а также его структурные аналоги, обладающие схожим психоактивным действием, поименованы в Списке сильнодействующих веществ. Компетенция эксперта не позволяет в рамках проводимой экспертизы определить обладает ли исследуемые образцы психоактивными свойствами, схожими с психоактивными свойствами сибутрамина.

На основании изложенного просим Вас сообщить проводились ли, вашей организацией исследование психоактивных свойств структурного аналога сибутрамина – нор-нор-сибутрамина.

И.о. заместителя начальника
майор таможенной службы

С.Ю.Кремезной

Исп. И.И.Тазеев
2919353

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПЕРМСКАЯ
 ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА
 ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 (614990, г. Пермь, ул. Екатеринбургская, 101)

**ИССЛЕДОВАНИЕ СИВУТРАМИНА И ЕГО АКТИВНЫХ
 МЕТАБОЛИТОВ В ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ**
 (Информационное письмо)

2015

У/ДК 340.67:614.283:615.07
 ББК 58:52.81:52.84
 И 889

Авторы:

СТЕРН К.И. – ассистент кафедры токсикологической химии ГБОУ ВПО
 ПФА Минздрава России

МАЛКОВА Т.Л. – заведующий кафедрой токсикологической химии ГБОУ
 ВПО ПФА Минздрава России, доктор фармацевтических наук, доцент

АНДРЕЕВ А.И. – младший научный сотрудник научного отдела ГБОУ ВПО
 ПФА Минздрава России

**ИССЛЕДОВАНИЕ СИВУТРАМИНА И ЕГО АКТИВНЫХ
 МЕТАБОЛИТОВ В ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ**

Информационное письмо разработано для сотрудников территориальных
 бюро судебно-медицинской экспертизы, химико-токсикологических
 лабораторий, экспертно-криминалистических центров, студентов
 медицинских и фармацевтических ВУЗов и других специалистов,
 работающих в области анализа наркотических средств, токсических и
 сильнодействующих веществ.

Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ГБОУ
 ВПО ПФА Минздрава России (протокол № 7 от 29 января 2015 г.)

Рецензенты:

Т.И. Ярыгина – профессор кафедры фармацевтической химии факультета
 очного обучения ГБОУ ВПО «Пермская государственная
 фармацевтическая академия», доктор фармацевтических наук

Д.С. Лазарян – заведующий кафедрой фармацевтической и
 токсикологической химии Патиторского медико-фармацевтического
 института – филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный
 медицинский университет», доктор фармацевтических наук, профессор

© К.И. Стерн, Т.Л. Малкова, А.И. Андреев, 2015