

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2015

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Малкова Тамара Леонидовна доктор фармацевтических наук, доцент, ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Калёкин Роман Анатольевич доктор фармацевтических наук, ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России, старший научный сотрудник отдела специальных лабораторных исследований

Гармонов Сергей Юрьевич доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества

Ведущая организация: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 26 мая 2015 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.01 при ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» **Минздрава России** по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2. Тел./факс (342) 233-55-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России по адресу: 614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46.

Текст диссертации размещен на сайте ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России <http://www.pfa.ru> 11 марта 2015 г. Дата размещения объявления о защите диссертации на сайте Министерства образования и науки Российской Федерации <http://www.mon.gov.ru> «__» _____ 2015 г.

Автореферат, отзыв научного руководителя и объявление о защите диссертации размещены на сайте ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России <http://www.pfa.ru> «__» _____ 2015 г.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.068.01



Н.В. Слепова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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. 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 правоохранительными органами часто обнаруживался сибутрамин, в настоящее время запрещённый к использованию в составе БАД как сильнодействующее вещество, включённое в соответствующий список, утверждённый 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 определён, 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 десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина методом ГЖХ с пламенно-ионизационной детекцией;
- установить идентификационные характеристики и провести исследование схожести психоактивного воздействия десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина с сибутрамином с целью возможности их отнесения к его аналогам;
- обосновать необходимость включения десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина отдельными позициями в Список сильнодействующих веществ.

Научная новизна. Разработана оригинальная методика качественного и количественного определения десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина 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, утверждённый 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 Учёным советом ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России информационное письмо «Исследование сIBUTРАМИНА 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 сIBUTРАМИНА, десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА, 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 десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА, 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 десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина 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 десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина методом ГЖХ с пламенно-ионизационной детекцией;
- результаты комплексного химико-биологического исследования, оценка аналогичности химической структуры и психоактивных свойств десметилсибутрамина, дидесметилсибутрамина в сравнении с сибутрамином с правовых позиций;
- обоснование необходимости включения десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина отдельными позициями в Список сильнодействующих веществ.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов диссертационного исследования обусловлена достаточным объёмом 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 учёных 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 учёных и специалистов, посвящённой 75-летию СОГМА «Молодые учёные – 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 формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведённого исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 4 паспорта специальности «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 статистической обработки 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).

В автореферате используются следующие сокращения: биологически активные вещества – БАВ, биологически активные добавки к пище – БАД, газо-жидкостная хроматография с пламенно-ионизационным детектированием – ГЖХ-ПИД, газовая хроматография с масс-селективным детектированием – ГХ-МС, десметилсIBUTрамин – ДМС, дидесметилсIBUTрамин – ДДМС, инфракрасная спектроскопия – ИК, Министерство здравоохранения – МЗ, спонтанная двигательная активность – СДА, Управление Федеральной службы по контролю за оборотом наркотиков – УФСКН.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Литературный обзор

В обзоре приведена общая характеристика БАД. Рассмотрено нормативное регулирование обращения БАД в России и за рубежом, приводятся сведения о токсикологическом значении и способах обнаружения в БАД сIBUTрамина и его производных – десметилсIBUTрамина и дидесметилсIBUTрамина.

Глава 2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись БАД для похудения, приобретенные в аптеках г. Перми, посредством сети Интернет и изъятые в качестве вещественных доказательств (табл. 1), а также образцы сравнения, предоставленные правоохранительными органами при назначении экспертиз (субстанции сIBUTрамина гидрохлорида, ДМС и ДДМС). Представлены методология построения биологического исследования, список используемых реактивов и растворов.

Таблица 1 – 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 РФ 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 РФ по Республике Татарстан	Неизвестно

Субстанции сибутрамина гидрохлорида, десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина были предоставлены 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 0,1М 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.

Глава 3. Исследование биологически активных добавок, используемых при контроле массы тела

Проведён сравнительный анализ информации по составу БАД, указанному при регистрации продукта производителем (данные Реестра продукции, прошедшей государственную регистрацию), и составу тех же БАД, представленных на официальных сайтах производителей данных продуктов, рекламе и инструкциях. Обнаружены несоответствия данных по составу анализируемых БАД (2 % от общей выборки):

– наличие растительных объектов, запрещённых в составе БАД, в соответствии со списком, утверждённым СанПиН 2.3.2.2567-09 (76 % случаев от общего количества нарушений);

– расхождения в составе по разным источникам информации (24 %).

Проведён микроскопический анализ ряда БАД растительного происхождения для лиц, контролирующих массу тела. Все объекты содержат большое количество зёрен крахмала. В некоторых объектах обнаружены обрывки паренхимы и волокна с кристаллоносной обкладкой (объект 2), характерные для корней солодки. Полученные данные свидетельствуют о несоответствии фактического состава БАД, позиционируемых как продукты, содержащие исключительно растительные компоненты, составу, указанному производителем.

В результате качественного анализа восьми БАД растительного происхождения обнаружены расхождения по основным группам БАВ, источником которых являются анализируемые БАД, согласно данных производителя, и фактическому составу. Все анализируемые БАД дают положительную реакцию с общеалкалоидными реактивами, при этом кофеин, разрешенный в составе БАД, обнаружен лишь в трех объектах исследования (объекты 3, 4, 7).

Проведено ГХ-МС-исследование восьми образцов БАД с целью обнаружения в них посторонних, в т.ч. сильнодействующих веществ. Для хроматографического исследования объектов 1-6 и 8 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 (рН 9-10) в соотношении 1:10, нагревали на песчаной бане в течение 5 мин, охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали. 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. Установлено присутствие в составе БАД сибутрамина, включённого в список сильнодействующих веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации и, соответственно, запрещённого к использованию в составе БАД (объекты 5, 6), а также его производных: ДМС (объект 8) и ДДМС (объекты 1-3, 7). В объекте 3 также обнаружен фенолфталеин. Данные вещества не указаны производителем в составе исследуемых продуктов.

Глава 4. Разработка методик обнаружения и количественного определения десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина методом ГЖХ с пламенно-ионизационной детекцией

Разработана методика обнаружения и количественного определения ДМС и ДДМС методом ГЖХ-ПИД с расчётом концентрации по методу внутреннего стандарта (метилстеарат). Хроматографирование проводили в различных температурных режимах и временных условиях, в результате чего были определены оптимальные условия:

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

В данных условиях время анализа составило 18 мин. В качестве параметра, характеризующего содержание исследуемого вещества в пробе, использовали площадь хроматографического пика.

Методика валидирована по показателям специфичность, линейность, правильность, прецизионность (на уровне intra-day и inter-day) и аналитическая область.

Для проверки специфичности предложенных условий были проанализированы экстракты из биологически активных добавок, содержащих ДМС и ДДМС и растворы сравнения исследуемых веществ в присутствии метилстеарата (рис. 1-3). В таблице 2 приведены основные параметры, позволяющие оценить качество хроматографического разделения и абсолютные времена удерживания ДМС и ДДМС в разработанных условиях. Коэффициент разрешения соседних хроматографических пиков составляет более 15, что свидетельствует о приемлемом разделении.

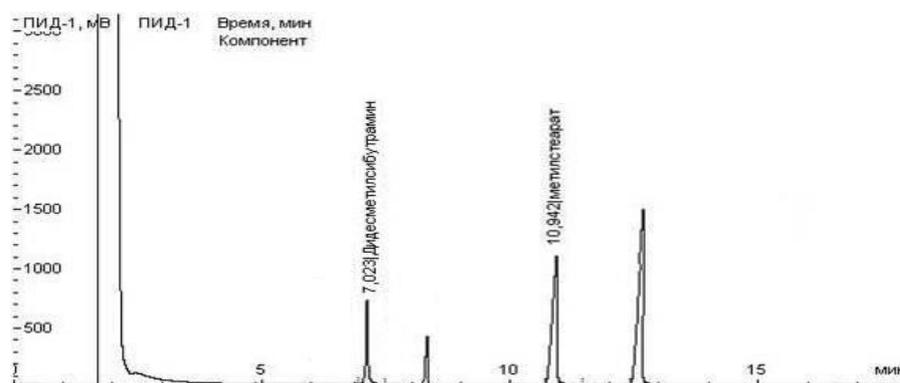


Рис. 1. Хроматограмма экстракта объекта 3

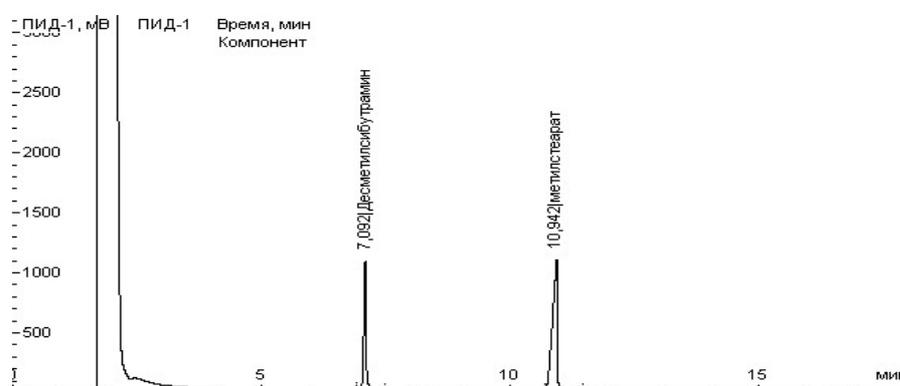


Рис. 2. Хроматограмма раствора сравнения ДМС в присутствии метилстеарата

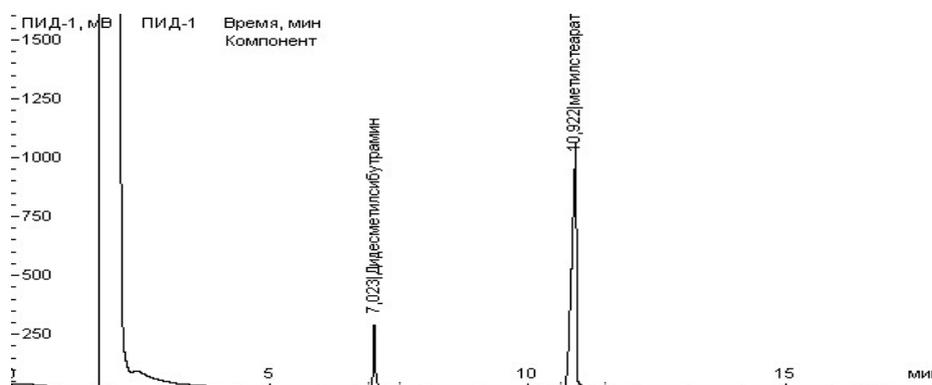


Рис. 3. Хроматограмма раствора сравнения ДДМС в присутствии метилстеарата

Таблица 2 – Хроматографические параметры исследуемых веществ

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

Для оценки линейности методики рабочие спиртовые растворы исследуемых веществ в концентрациях 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл и 10 мкг/мл хроматографировали в разработанных условиях. Линейная зависимость между концентрацией растворов и отношением площадей хроматографических пиков исследуемых веществ и внутреннего стандарта наблюдается во всем интервале выбранных концентраций ($R^2_{\text{ДМС}} = 0,9968$; $R^2_{\text{ДДМС}} = 0,9997$). Для оценки правильности и прецизионности методики проводили анализ 3 рабочие спиртовых растворов ДМС и ДДМС с концентрациями 10 мкг/мл, 200 мкг/мл, и 1000 мкг/мл в течение первого и второго дня. Полученные значения RSD и ϵ свидетельствуют о достаточной степени соответствия между истинным значением определяемого вещества и его значением, рассчитанным по данной методике (табл. 3, 4).

Таблица 3 – Оценка правильности и прецизионности (ДМС)

Intra-day					
С _{факт} , мкг/мл	С _{изм} , мкг/мл	С _{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					
С _{факт} , мкг/мл	С _{изм} , мкг/мл	С _{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 4 – 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				

Аналитическая область методики установлена в диапазоне 10 – 1000 МКГ/МЛ.

По разработанной методике были проанализированы 5 образцов БАД (табл. 5). Для статистической обработки экспериментальных данных проводили три параллельных измерения. Расчёт содержания X_i (мг) ДМС и ДДМС в исследуемой смеси проводили по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \times K \times m_{ст} \times P}{S_{ст} \times m_{п}} \times 1000, \text{мг}; \quad (1)$$

где S_i – площадь пика определяемого компонента;

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

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

$m_{п}$ – 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.

Таблица 5 – 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

Глава 5. Оценка сходства психоактивного действия десметилсIBUTРАМИНА, дидесметилсIBUTРАМИНА и сIBUTРАМИНА по результатам комплексного химико-биологического исследования

Получены параметры идентификации ДМС и ДДМС методами ИК-спектрометрии (рис. 4) и ГХ-МС в условиях: колонка НР-5MS, скорость потока газа-носителя (гелий) 1мл/мин; ввод пробы с делением потока 1/10; температура испарителя 250 °С; температура колонки программируемая: 5 мин 70 °С, повышается со скоростью 10 °С/мин до 310 °С и выдерживается 10 мин. В качестве параметров идентификации в методе ГХ-МС использовали время удерживания и масс-спектры веществ (рис. 5, 6, табл. 6).

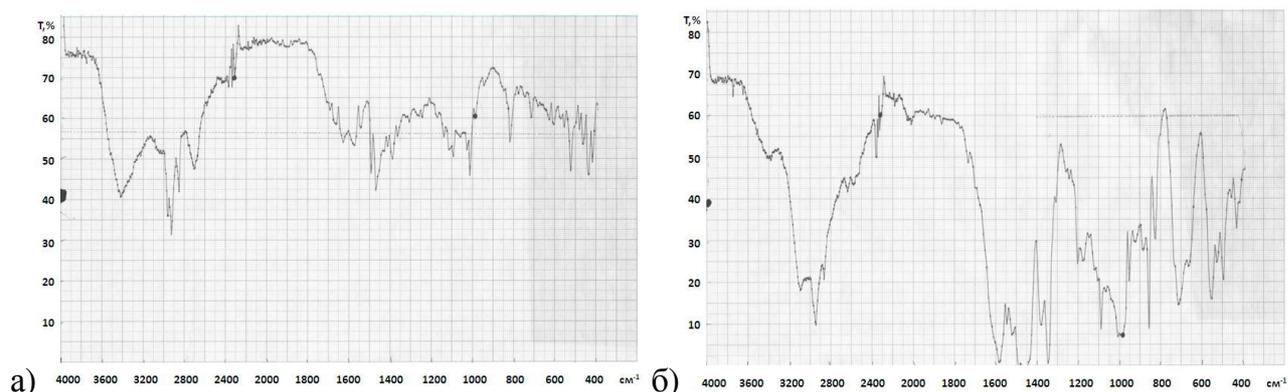


Рис. 4. ИК-спектры ДМС (а) и ДДМС (б) в таблетке КВг

Таблица 6 – Параметры идентификации веществ методом ГХ-МС

Соединение	Параметры идентификации	
	t_R (мин)	Характеристические ионы (в порядке уменьшения интенсивности, %)
ДесметилсIBUTРАМИН	13,18	100.20 (100), 58.20 (22), 44 (15), 43.20 (6), 41.20 (6), 42.20 (5), 264 (1)
ДидесметилсIBUTРАМИН	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)

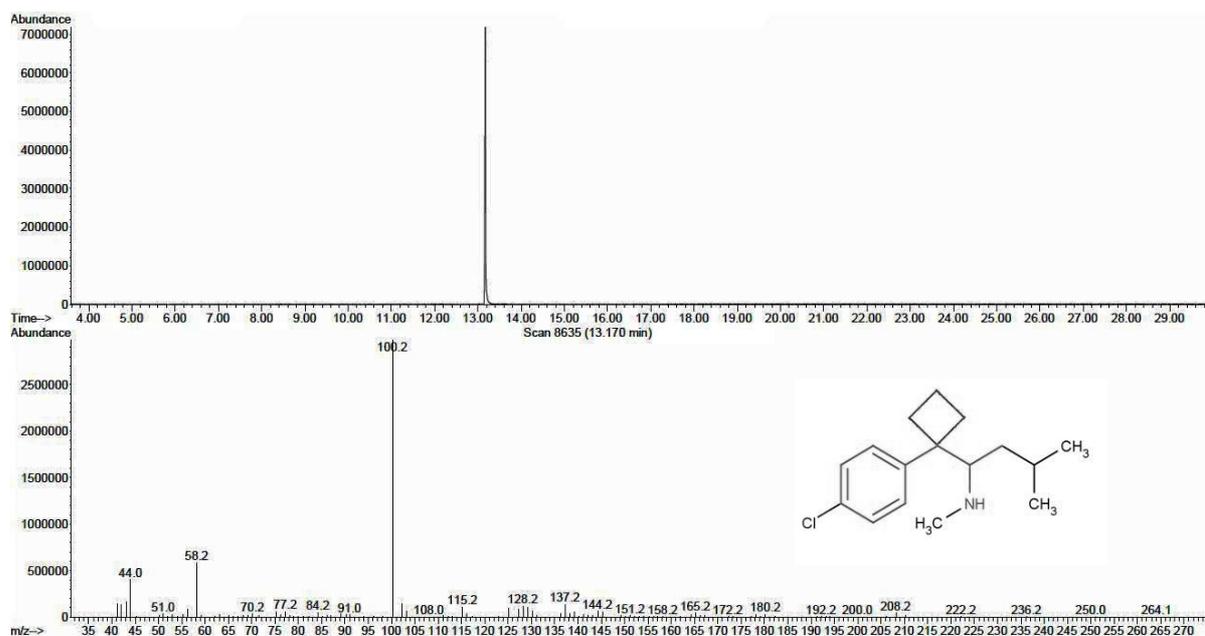


Рис. 5 – Хроматограмма раствора, масс-спектр и структурная формула ДМС

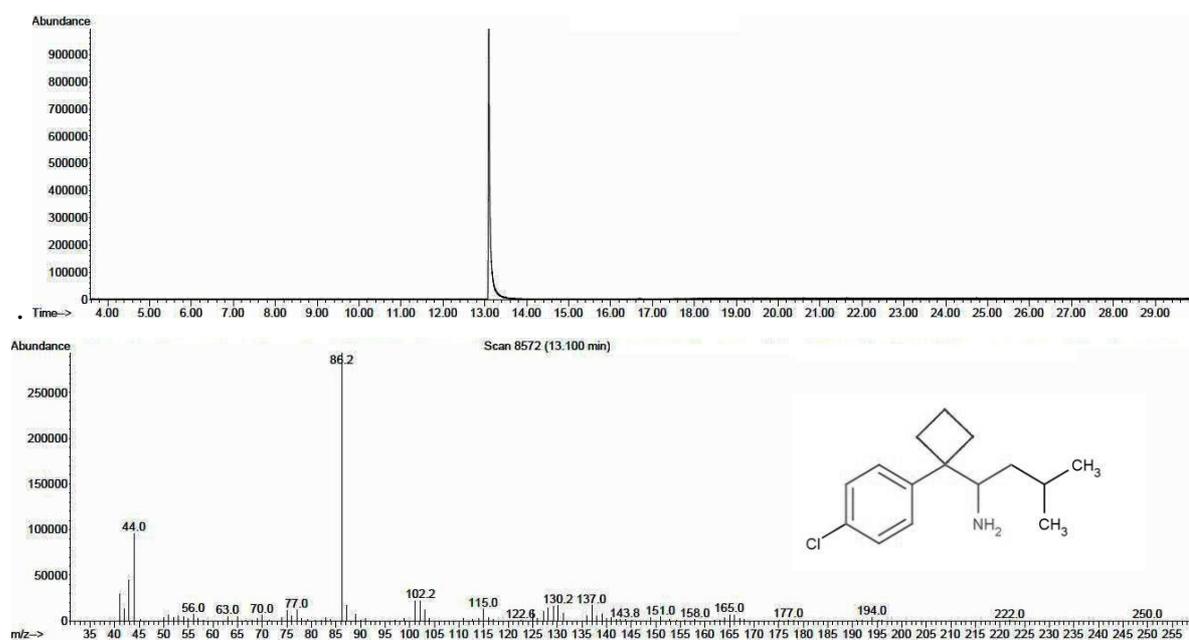


Рис. 6 – Хроматограмма раствора, масс-спектр и структурная формула ДДМС

Проведено биологическое исследование ДМС и ДДМС с использованием тестов СДА и «Открытого поля» с видеотрекингом.

При исследовании циркадной ритмики СДА 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 (табл. 7, 8). 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 проведении СДА-теста у животных, экспонированных сибутрамином 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 сибутрамином животных длительность и выраженность модификаций СДА существенно ниже (табл. 8, 9). 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.

Таблица 7 – 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 8 – Некоторые параметры модификаций, вызванных сибутрамином

Доза	Латентный период + фаза острого ответа	Отрицательные оценки смещения СДА (длительность интервала непрерывного подавления СДА)	Максимальные магнитуды 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.

Таблица 9 – 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

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: 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.

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 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». 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», характеризующее индуцированные когнитивные нарушения. Эффект ДДМС не обладает существенным сходством с эффектами,

вызываемыми сибутрамином, с точки зрения группы параметров, учитываемых в тесте видеотрекинга «Открытого поля».

Результаты биологического исследования ДМС и ДДМС в сравнении с сибутрамином показали, что данные вещества, являясь структурными аналогами сильнодействующего вещества сибутрамин, не обладают схожим с ним психоактивным действием.

На основании полученных результатов, а также в связи с отсутствием в настоящее время нормативной базы по установлению взаимного сходства психоактивного воздействия веществ, направлено письмо в Правовой департамент Министерства здравоохранения Российской Федерации для рассмотрения вопроса 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).

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 десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина с сибутрамином с целью возможности их отнесения к его аналогам. Результаты химико-биологического исследования показали, что десметилсибутрамин и дидесметилсибутрамин, 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: «десметилсибутрамин» (1-(4-хлорфенил)-N-метил-альфа-(2-метилпропил)циклобутанметанамин) и «дидесметилсибутрамин» (1-(4-хлорфенил)-альфа-(2-метилпропил)циклобутанметанамин). Направлено соответствующее письмо в Правовой департамент Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения диссертации опубликованы в работах:

1. Стерн К. И. Исследование биологически активной добавки для похудения методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором / К. И. Стерн // Украинський медичний альманах. – 2012. – Т. 15. – № 5. – С. 356.
2. Стерн К. И. Проблемы обеспечения безопасности биологически активных добавок, содержащих растительные компоненты / К. И. Стерн // Молодой организатор здравоохранения: Сб. науч. ст. студентов и молодых ученых, посвящ. Памяти проф. В. К. Сологуба / отв. ред. М. М. Петрова. – Красноярск: Версо, 2012. – С. 344-347.
3. Стерн К. И. Сравнительный статистический анализ нормативной документации БАД и информации Интернет-ресурсов / К. И. Стерн, Е. И. Килиманова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии / Научно-практический журнал. – 2012. – № 9. – Пермь. – С. 59-60.
4. Килиманова Е. И. К анализу биологически активных добавок, содержащих растительные компоненты / Е. И. Килиманова, К. И. Стерн // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии / Научно-практический журнал. – 2013. – №10. – Пермь. – С. 79-81.
5. Стерн К. И. Исследование биологически активных добавок для похудения / К. И. Стерн // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященной 85-летию профессора Е. Н. Дормидонтова. – Ярославль: ООО Издательско-полиграфический комплекс «Индиго», 2013. – С. 225.
6. Булатов И. П. Влияние сибутрамина на поведенческую и двигательную активность мышей / И. П. Булатов, А. И. Андреев, В. П. Котегов, К. И. Стерн // Медицина, фармация и общественное здоровье : Материалы. Евразийского Конгресса с международным участием / Под ред. А. С. Гаврилова. – Екатеринбург, 2013 – С. 296-301.
7. Стерн К. И. Проблема стандартизации парафармацевтиков / К. И. Стерн, Т. Л. Малкова // Первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» : Материалы конференции. – Москва, 2013. – С. 116.
8. Стерн К. И. 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.
9. **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.**
10. Стерн К. И. Характеристика компонентов БАД с позиций химико-токсикологического анализа / К. И. Стерн, Т. Л. Малкова // Актуальные вопросы развития науки: сборник статей Международной научно-практической конференции (г. Уфа, 14 февраля 2014 г.): в 6 ч. Ч. 6 / отв. ред. А. А. Сукиасян. – Уфа : РИЦ БашГУ, 2014. – С. 263-266.
 11. Стерн К. И. Сравнительная оценка подходов к обеспечению качества БАД в России и за рубежом / К. И. Стерн // Молодые ученые – медицине: Материалы XIII научной конференции молодых ученых и специалистов СОГМА с международным участием / Сев.-Осет. гос. ун-т им. К. Л. Хетагурова. – Владикавказ: ИПЦ СОГУ, 2014. – С. 276-279.
 12. Стерн К. И. Обнаружение в БАД растительного происхождения и изучение свойств сибутрамина и его структурных аналогов / К. И. Стерн, А. И. Андреев, Т. Л. Малкова // Химия и фармакология растительных веществ: Тезисы докладов Всероссийской научной конференции. – Сыктывкар: Институт химии Коми НЦ УрО РАН, 2014. – С. 190-192.
 13. **Экспериментальное исследование особенностей психической активности сибутрамина и дидесметилсибутрамина на лабораторных животных / К. И. Стерн и др. // Наркология. – 2014. – № 6 (150). – С. 41-49.**
 14. Килиманова Е. И. Сильнодействующие вещества в биологически активных добавках / Е. И. Килиманова, К. И. Стерн // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (15-17 мая 2014 года). – Пермь, ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, 2014. – С. 34-36.
 15. **Стерн К. И. Разработка и валидация методики количественного определения десметилсибутрамина 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.**
 16. Стерн К. И. Биологически активные добавки к пище в России и за рубежом: правовые основы, стандартизация, методы анализа: монография / К. И. Стерн, Т. Л. Малкова; Перм. гос. фармацев. акад. – Пермь, 2015. – 75 с.

Стерн Кристина Ильинична (Россия)

Разработка способов определения производных сибутрамина в биологически активных добавках, используемых при контроле массы тела

В работе представлены результаты исследований по разработке способов качественного и количественного определения производных сибутрамина – десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина в биологически активных добавках для лиц, контролирующих массу тела. Проведено химико-биологическое исследование десметилсибутрамина и дидесметилсибутрамина, и обоснована необходимость их включения отдельными позициями в Список сильнодействующих веществ.

Stern Kristina (Russia)

Development of detection methods of derivatives of sibutramine in dietary supplements, used at weight control

The work presents results of researches on the development of methods of qualitative and quantitative determination of derivatives of sibutramine – desmetilsibutramine and didesmetilsibutramine in dietary supplements for persons controlling body weight. The chemical and biological studies of desmetilsibutramine and didesmetilsibutramine have carried out and the necessity of its inclusion of items in the list of strong effective substances has justified.