

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕСМЕТИЛСИБУТРАМИНА МЕТОДОМ ГЖХ С ПЛАМЕННО-ИОНИЗАЦИОННЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Стерн К.И.¹, Малкова Т.Л.¹

¹ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: perm@pfa.ru

Статья посвящена проблеме неконтролируемого употребления сильнодействующих веществ (сIBUTРАМИНА и его структурных аналогов, метаболитов десметилсIBUTРАМИНА и дидесметилсIBUTРАМИНА) в биологически активных добавках к пище. В научной литературе отсутствует какая-либо информация по контролю БАД на наличие сильнодействующих веществ, в то время как в практике судебно-химических исследований имеются факты обнаружения данных веществ в данных продуктах. В связи с этим возникла необходимость усовершенствования процедуры обнаружения сильнодействующих веществ методами качественного и количественного анализа. Разработана методика определения десметилсIBUTРАМИНА методом газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Аналитическая область методики составила 10 – 1000 мкг/мл. Методика валидирована по показателям линейность, правильность, прецизионность и обладает хорошей воспроизводимостью. Данная методика может использоваться в соответствующих аналитических лабораториях.

Ключевые слова: валидация, психоактивные вещества, десметилсIBUTРАМИН, количественный анализ, газо-жидкостная хроматография.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF DESMETHYLSIBUTRAMINE QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD BY GLC-FID

Stern K.I.¹, Malkova T.L.¹

¹Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: perm@pfa.ru

The article deals with the problem of uncontrolled using of strong effective substances (sibutramine and its structural analogs, metabolites desmethylsibutramine and didesmethylsibutramine) in dietary supplements. There is no information about control of dietary supplements for the presence of strong effective substances in the scientific literature, while in the practice of forensic chemical research there are facts of these substances detection in these products. Therefore it was a necessary to improve procedures of detection of strong effective substances by qualitative and quantitative methods. The method of GLC-FID desmethylsibutramine determination is developed. Analytical range was 10 – 1000 µg/ml. The method is validated in terms of calibration curve, the accuracy, precision, and has a good reproducibility. This method can be used in the respective analytical laboratories.

Keywords: validation, psychoactive substances, desmethylsibutramine, quantitative analysis, gas liquid chromatography.

Проблема злоупотребления психоактивными веществами в России из года в год становится все более актуальной. В последнее время участились случаи обнаружения сIBUTРАМИНА и его активных метаболитов (M1 и M2) в биологически активных добавках для похудения (БАД). Федеральная Служба РФ по контролю за оборотом наркотиков в Методических рекомендациях по криминалистическому исследованию сIBUTРАМИНА от 2006 г. сообщала, что, с учетом дофаминовой теории формирования наркологических заболеваний, сIBUTРАМИН может вызывать привыкание и зависимость, а клинические описания его действия позволяют предположить использование его потребителями

психоактивных веществ в качестве психостимулятора [4]. 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 [3].

Сибутрамин метаболизируется изоферментом CYP3A4 до деметилированных метаболитов М1 и М2 (моно- и дидесметилсибутрамин), которые обуславливают его терапевтический эффект и являются структурными аналогами сибутрамина [6, 7, 8]. Установлено, что десметилсибутрамин (ДМС) и дидесметилсибутрамин (ДДМС) примерно в 100 раз активнее исходного соединения [5, 8].

Согласно действующему законодательству РФ, сильнодействующие вещества и их аналоги запрещены к использованию в составе БАД [2]. Ввиду сложившейся ситуации вопрос об усовершенствовании процедуры обнаружения посторонних токсикологически важных веществ, не заявленных в составе БАД, стоит достаточно остро. Однако на сегодняшний день в литературных источниках отсутствует какая-либо информация по процедуре контроля БАД на наличие сильнодействующих веществ, в то время как в практике судебно-химических исследований имеются факты обнаружения данных веществ в биологически активных добавках к пище.

Цель исследования

Разработка методики количественного определения активного метаболита сибутрамина, ДМС, методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ).

Материал и методы исследования

Субстанцию ДМС получали из содержимого капсул «Жуйдэмэн» (500 мг, № 60), содержащих данное вещество, при комнатной температуре следующим образом: содержимое капсул высыпали в чистую стеклянную склянку, залили спиртом этиловым 95% (1:10), встряхивали в течение 15 минут, затем надосадочную жидкость сливали в чистую стеклянную склянку. Оставшийся осадок вновь заливали спиртом этиловым 95% и операции повторяли. Надосадочные жидкости объединяли и выпаривали без нагревания до сухого остатка. Получившийся сухой остаток брался из расчета, что его состав соответствует экстракту содержимого одной капсулы. После перекристаллизации экстракт был проанализирован на газовом хроматографе Agilent 7890А с масс-спектрометром Agilent 5975С, в результате чего была идентифицирована и подтверждена его химическая структура: масс-спектр пика со временем удерживания 13,18 мин соответствовал библиотечному масс-спектру ДМС (рис. 1).

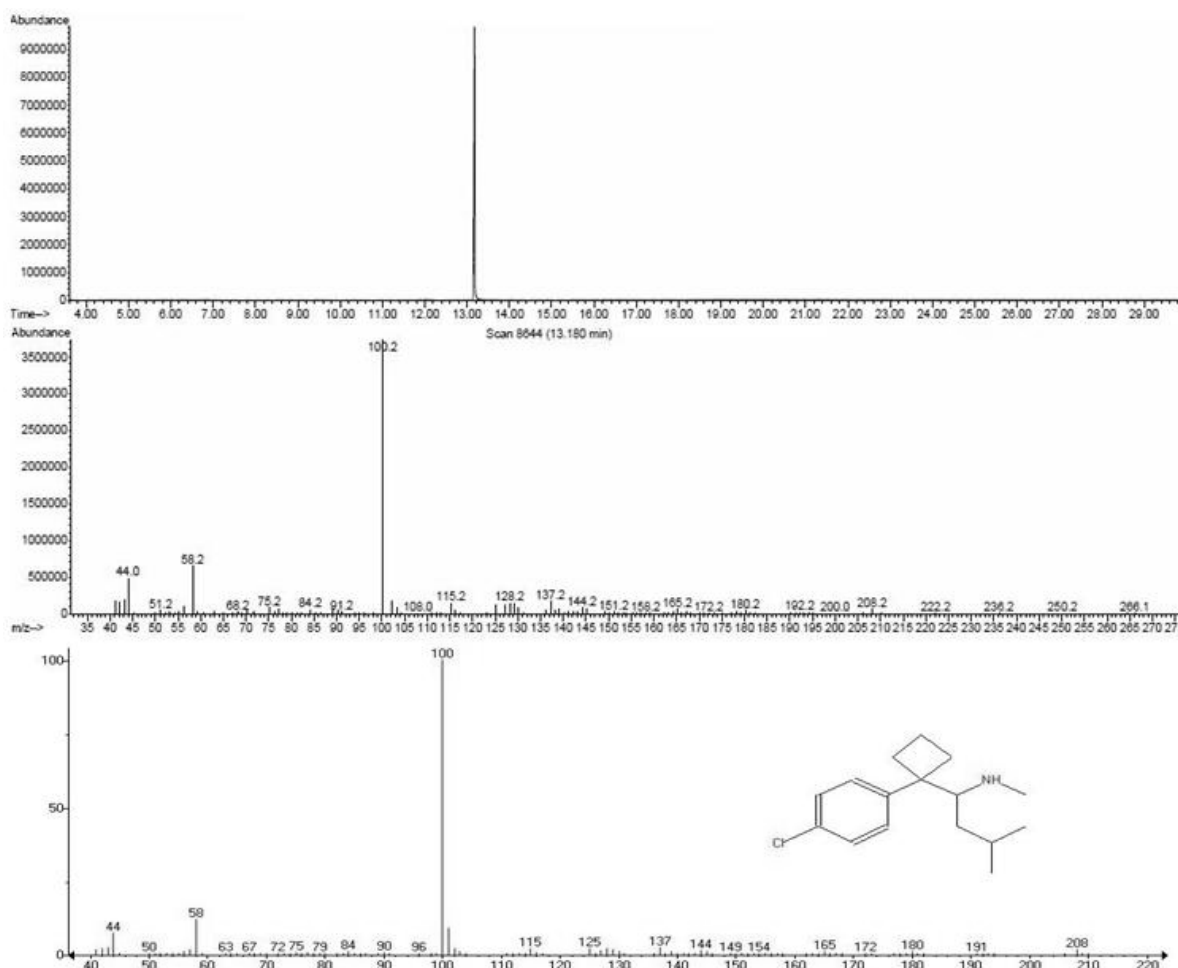


Рисунок 1. Хроматограмма перекристаллизованного экстракта (верхняя часть рисунка), масс-спектр пика с временем удерживания 13,18 мин (средняя часть рисунка) и библиотечный масс-спектр десметилсубутрамина (нижняя часть рисунка).

Готовили растворы ДМС в этиловом 96 % спирте в концентрациях 1 мг/мл, 500 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл и 10 мкг/мл. В качестве внутреннего стандарта использовали раствор метилстеарата в 96 % этиловом спирте в концентрации 1 мг/мл.

Исследование проводили на газовом хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000 с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях: колонка НР-5MS, скорость потока газа-носителя (азот) 2,3 мл/мин, температура термостата колонки начальная 170 °С, конечная – 220 °С, температура детектора 250 °С, температура испарителя 230 °С, ввод пробы с делением потока 1/3, объем вводимой пробы 1 мкл, время хроматографирования 18 мин.

Результаты исследования и их обсуждение

Количественное определение ДМС осуществляли методом ГЖХ с расчетом концентрации по методу внутреннего стандарта, в качестве которого был выбран метилстеарат, преимуществами использования которого являются его хроматографические

свойства, близкие к определяемому веществу, стабильность полученных результатов, и доступность для закупки на территории РФ.

Время удерживания ДМС и метилстеарата в заданных условиях хроматографирования составило 7,07 мин и 10,93 мин соответственно (рис. 2).

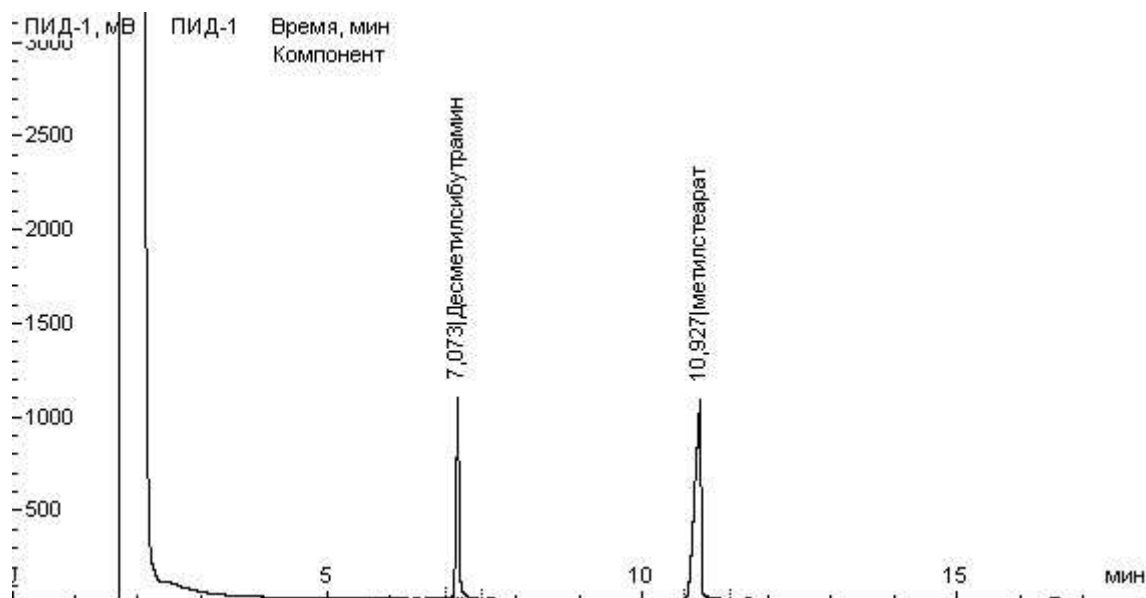


Рисунок 2. Хроматограмма раствора ДМС с внутренним стандартом (метилстеарат) в концентрации 1000 мкг/мл.

Валидацию разработанной методики осуществляли по показателям: линейность, правильность, прецизионность (на уровне *intra-day* и *inter-day*), аналитическая область [1].

Линейность

Для определения линейности проводили анализ 6 калибровочных спиртовых растворов ДМС с концентрациями от 10 мкг/мл до 1000 мкг/мл в присутствии внутреннего стандарта (1000 мкг/мл) (табл. 1).

Таблица 1

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	

* $S_{\text{ДМС}}$ – концентрация десметилсIBUTРАМИНА в растворе, $S_{\text{МС}}$ – концентрация метилстеарата в растворе,

$S_{\text{ДМС}}$ – площадь пика ДМС, $S_{\text{МС}}$ – площадь пика метилстеарата.

По полученным значениям строили график линейной зависимости. Были рассчитаны коэффициенты регрессионной прямой $y = 0,0006x$ методом наименьших квадратов, где y – среднее значение отношения площади пика ДМС к площади пика метилстеарата, рассчитанное по трем хроматограммам, x – концентрация ДМС, мкг/мл ($S_{\text{факт}}$). (рис. 3).

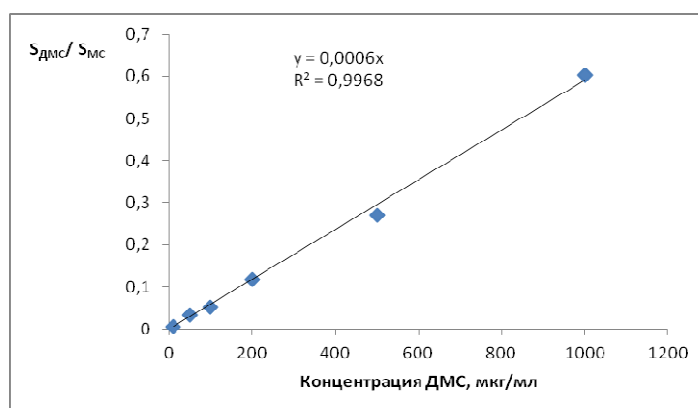


Рисунок 3. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ДМС к площади пика метилстеарата от концентрации ДМС в растворе

Квадрат линейного коэффициента корреляции (R^2) характеризует степень соответствия между регрессионной моделью и исходными данными. В данном случае 99,68% изменений зависимой переменной описывается регрессионным уравнением. Коэффициент

корреляции $R = 0,9984$, что свидетельствует о наличии прямой линейной зависимости между площадью пика ДМС и его концентрацией в растворе.

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности методики проводили анализ 3 калибровочных спиртовых растворов ДМС 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 ДМС рассчитывали величину стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %) и отклонение от заданной величины (ϵ , %). Данные представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Оценка правильности и прецизионности (*intra-day*)

$C_{\text{факт}}$, мкг/мл	$C_{\text{изм}}$, мкг/мл	$C_{\text{ср}}$ (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				

* $C_{\text{факт}}$ – фактическая концентрация ДМС в растворе, $C_{\text{изм}}$ – концентрация ДМС в растворе, рассчитанная по методике.

Таблица 3

Оценка правильности и прецизионности (*inter-day*)

$C_{\text{факт}}$, мкг/мл	$C_{\text{изм}}$, мкг/мл	$C_{\text{ср}}$ (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				

* $C_{\text{факт}}$ – фактическая концентрация ДМС в растворе, $C_{\text{изм}}$ – концентрация ДМС в растворе, рассчитанная по методике.

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

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

Заключение

Разработана методика количественного определения десметилсIBUTРАМИНА методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационной детекцией, обладающая необходимой линейностью, правильностью и прецизионностью, что позволяет говорить о хороших валидационных характеристиках данной методики.

Список литературы

1. Валидация методов контроля качества // Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. Быковского С. Н. и др. – М. : Перо, 2014. – Разд. 3.3. – С. 80-116.
2. 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 (дата обращения: 24.07.14).
3. 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 [Электронный ресурс]: постановление Правительства Российской Федерации от 29 декабря 2007 года № 964 // Информационно-правовой портал Гарант. – Режим доступа : <http://base.garant.ru/12158202/>. – Загл. с экрана (дата обращения: 21.10.14).

4. Сыромятников, С. В. Криминалистическое исследование препаратов, содержащих сибутрамин / С. В. Сыромятников, И. И. Сарычев, Е. А. Гайдукова // Судебная экспертиза. – 2008. - № 4. – С. 61-67.
5. 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.
6. 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.
7. Identification of N-desmethylsibutramine as a new ingredient in Chinese herbal dietary supplements / Blachut D. et al. // Problems of Forensic Sciences. – 2007. – LXX. – P. 225-235.
8. 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. – 2008. - № 46. – P. 707-711.

Рецензенты:

Вихарева Е.В., д.фарм.н., доцент, заведующий кафедрой аналитической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь;

Ярыгина Т.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии факультета очного обучения ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.