

УДК 615.074

<https://www.doi.org/410.34907/JPQAI.2020.86.90.004>

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИБУТРАМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

**А.М. Суханова**, ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Минздрава России; лаборант-исследователь лаборатории метаболомного и протеомного анализа ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», г. Москва, [annatsukhanova@gmail.com](mailto:annatsukhanova@gmail.com)

**И.Б. Перова**, канд. фарм. наук, старший научный сотрудник лаборатории метаболомного и протеомного анализа ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», г. Москва

**К.И. Эллер**, доктор хим. наук, зав. лабораторией метаболомного и протеомного анализа ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», г. Москва

**Г.М. Родионова**, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Минздрава России, г. Москва

Данная работа посвящена разработке и валидации методики определения сибутрамина в лекарственных препаратах для осуществления их контроля качества с целью дальнейшей разработки нормативной документации на территории Российской Федерации. Подобраны экстрагент, хроматографические условия разделения для оптимального определения сибутрамина в лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора (УФ). Доказаны специфичность, линейность, правильность методики; относительная ошибка единичного определения не превышает 1,5% (0,70%), коэффициент вариации (RSD) меньше 1% (0,93%), проведена внутрилабораторная прецизионность, относительная ошибка которой = 0,16%. Определен предел обнаружения на уровне 0,004 мг/мл; предел количественного определения – 0,01 мг/мл.

Методика является правильной, систематическая ошибка отсутствует, следовательно, методика пригодна для дальнейшего использования и включения в нормативную документацию.

**Ключевые слова:** сибутрамин, лекарственные препараты, ВЭЖХ-УФ, валидация, контроль качества, нормативная документация

Разработка и валидация методик определения активных фармацевтических субстанций (АФС) в составе лекарственных препаратов является актуальной и необходимой для развития и поддержания фармацевтической системы качества.

В настоящее время ожирение – довольно распространенное заболевание среди населения. Число пациентов с ожирением в России в 2019 году по сравнению с 2018-м

увеличилось на 15,8% (зарегистрированные случаи в 2018 году – 446 663, в 2019-м – 517 357), что указывает на повышение заболеваемости с каждым годом [1].

Сибутрамин – высокоэффективный лекарственный препарат для лечения ожирения. В РФ проведены исследования с целью доказательства безопасности и фармакологической эффективности этого лекарственного средства. По результатам шестимесячной программы «Весна» 44% пациентов избавились от диагноза «ожирение», также установлено уменьшение уровня глюкозы, липопротеинов низкой плотности, холестерина и повышение уровня липопротеинов высокой плотности, отмечено уменьшение артериального давления [2,3]. В исследовании «ПримаВера» подтверждено положительное влияние сибутрамина на динамику изменения массы тела пациентов (51% участников избавились от диагноза «ожирение») и отсутствие серьезных побочных эффектов и рисков, связанных с приемом лекарственного препарата [4].

Сибутрамин является ингибитором обратного захвата норэпинефрина и серотонина. Фармакологический эффект осуществляется вследствие образования метаболитов (M1 – десметилсибутрамин и M2 – дидесметилсибутрамин), период полувыведения которых составляет 14 ч и 16 ч соответственно, сибутрамина – 1,1 ч [5,6].

Согласно ИЮПАК, сибутрамина гидрохлорида моногидрат – циклобутанметанамин, 1-(4-хлорфенил)-N, N-диметил-α-(2-метилпропил)-, гидрохлорид, моногидрат, (±)-; (±)-1-(п-хлорфенил)-α-изобутил-N, N-диметилциклобутанметиламина гидрохлорид моногидрат (рис. 1). Представляет собой малорастворимый в воде порошок от белого до кремового цвета [7].

На сегодняшний день на фармацевтическом рынке РФ представлены следующие ЛП, содержащие сибутрамин: «Редуксин» (капсулы: 10; 15 мг сибутрамина гидрохлорида +

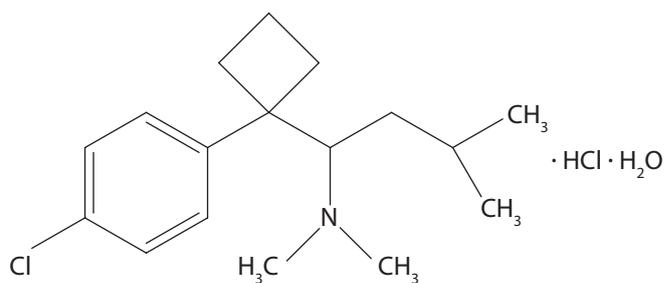


РИС. 1. Структурная формула сибутрамина

+ 158,5 мг; 153,5 мг целлюлозы микрокристаллической), «Редуксин Мет» (капсулы: 10; 15 мг сибутрамина гидрохлорида + 158,5 мг; 153,5 мг целлюлозы микрокристаллической; отдельно прилагаются таблетки метформина 850 мг), «Редуксин Форте» (таблетки: 10; 15 мг сибутрамина гидрохлорида + 850 мг метформина) (ООО «Промомед Рус», Россия); «Голдлайн» (капсулы: 10; 15 мг сибутрамина гидрохлорида), «Голдлайн Плюс» (капсулы: 10; 15 мг сибутрамина гидрохлорида + 158,5 мг; 153,5 мг целлюлозы микрокристаллической) (ООО «Изварино Фарма», Россия). Данные ЛС отпускаются строго по рецепту врача, так как сибутрамина гидрохлорид входит в Перечень сильнодействующих и ядовитых веществ и находится на предметно-количественном учете [8].

Следовательно, необходимой является разработка нормативной документации для проведения контроля качества АФС сибутрамина гидрохлорида на фоне компонентов ЛП.

**Целью** настоящего исследования является разработка и валидация методики определения сибутрамина в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-УФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования явились стандартный образец сибутрамина гидрохлорида (Tocris, Великобритания), целлюлоза микрокристаллическая (Sigma Aldrich, США), метформина гидрохлорид (Supelco, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимальный растворитель подбирали экспериментально [9,10]. В качестве экстрагента использовали метанол различной концентрации, изучали зависимость площади пика сибутрамина от концентрации растворителя, вследствие чего нами был выбран метанол безводный (J.T. Baker, Польша) в качестве растворителя.

Хроматографическое определение сибутрамина проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) с УФ-детектором. В качестве неподвижной фазы использовали хроматографическую колонку из нержавеющей стали C18 NUCLEOSIL (Macherry-Nagel, Германия) размерами 4,6 мм x 150 мм, частицы сорбента 5 мкм; температура термостата колонки – 40°C. Скорость потока – 1 мл/мин.

Были протестированы различные подвижные фазы для получения наилучших разделений в течение наиболее короткого времени с целью оптимизации аналитической процедуры. Опробованы подвижные фазы ацетонитрил-буфер (pH 3–7) при различных отношениях органических и водных компонентов (20–80%). Результаты, удовлетворяющие требованиям нормативной документации, были достигнуты при соотношении компонентов подвижной фазы смесью 0,05М формиатного буфера pH=4,0 (аммония формиат – Honeywell, Германия, муравьиная кислота – Sigma-Aldrich,

США) и ацетонитрила (PanReac AppliChem, Германия) в соотношении 40:60 (по объему).

Аналитическая длина волны была выбрана на основании полученного спектра метанола (рис. 2) – 225 нм.

Полноту извлечения сибутрамина определяли из лекарственной формы на модельных смесях субстанции сибутрамина и целлюлозы микрокристаллической в соотношении, соответствующем ЛП (10 мг (15 мг) + 158,5 мг).

Для приготовления 9 модельных смесей около 0,010 г субстанции сибутрамина гидрохлорида (точная навеска) и 0,159 г целлюлозы микрокристаллической помещали в мерные колбы объемом 10 мл, прибавляли 8 мл метанола, ставили в ультразвуковую ванну на 10 мин., объем доводили до метки, перемешивали, фильтровали через мембранный фильтр с размером 0,2 мкм (нейлон). Затем 1 мл полученного раствора помещали в колбу объемом 10 мл, добавляли 10 мл метанола, перемешивали.

Раствор стандартного образца (СО) сибутрамина гидрохлорида готовили аналогичным для модельных смесей способом (концентрация сибутрамина гидрохлорида – 0,10 мг/мл).

Методику количественного определения сибутрамина с помощью метода ВЭЖХ-УФ проводили согласно ОФС 1.1.0012.15 ГФ XIV «Валидация аналитической методики».

*Специфичность* определяли на основании полученных хроматограмм растворителя, стандартного образца, плацебо (целлюлоза

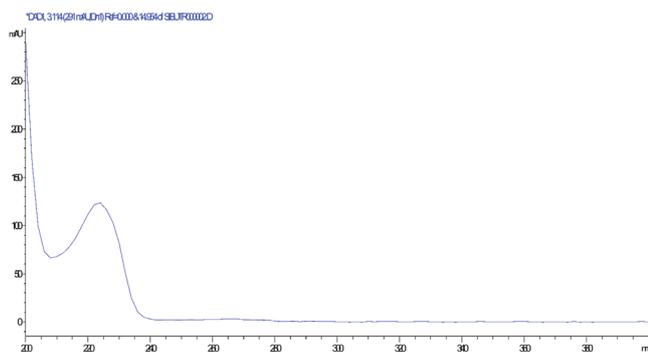


РИС. 2. Спектр сибутрамина

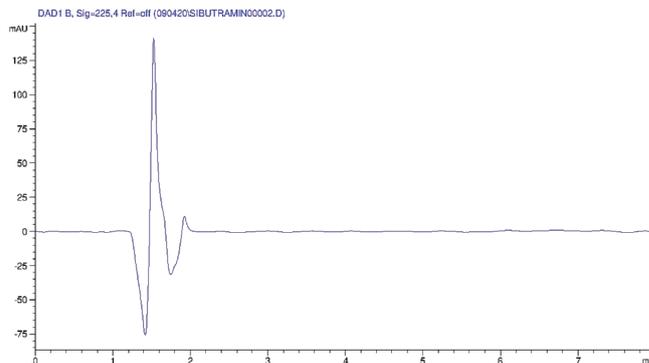
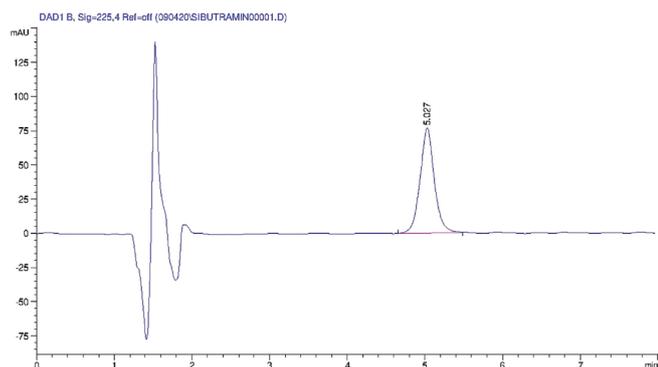
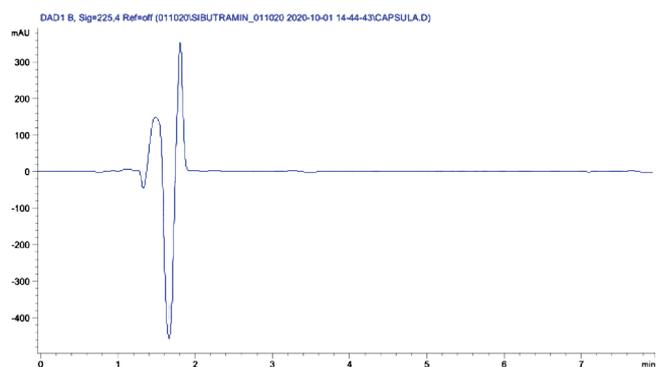


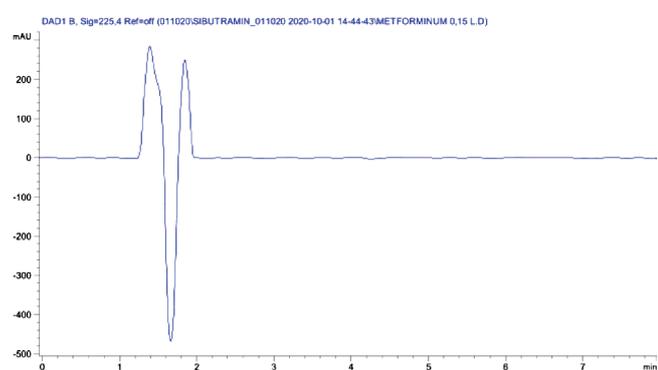
РИС. 3. Хроматограмма растворителя



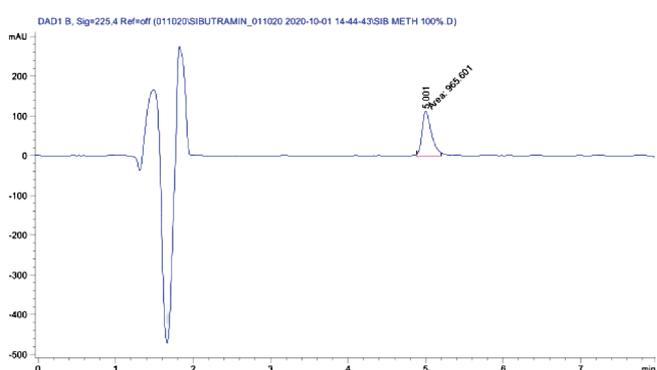
**РИС. 4.** Хроматограмма стандартного образца сибутрамина гидрохлорида



**РИС. 5.** Хроматограмма целлюлозы микрокристаллической



**РИС. 6.** Хроматограмма метформина гидрохлорида



**РИС. 7.** Хроматограмма модельной смеси

микрокристаллическая, метформин), модельных смесей (рис. 3–7).

Время удерживания сибутрамина – 5 мин. Вспомогательные вещества не мешают определению АФС, методика удовлетворяет показателю специфичности аналитической методики.

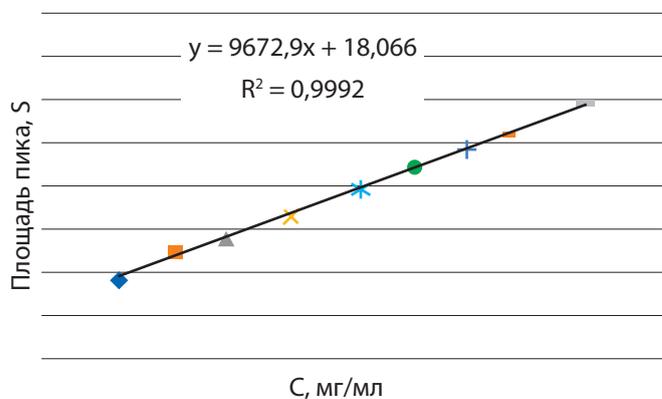
Линейность была определена на 9 модельных смесях (содержание сибутрамина гидрохлорида от 80 до 120%) (рис. 8).

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

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

Из табл. 1 следует, что извлечение сибутрамина из модельных смесей в условиях эксперимента проходит полностью, относи-

тельная ошибка единичного определения не превышает 1,5% (0,70%). Доверительный интервал  $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$  (100,22%  $\pm$  0,70%) включает 100%, расчетное значение критерия Стьюдента  $t_{расч}$  (2,14) меньше табличного  $t_{табл}$  (2,36), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует.



**РИС. 8.** График линейной зависимости площади пика ( $S$ ) от концентрации ( $C$ ) раствора сибутрамина

Таблица 1

**РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИБУТРАМИНА В МОДЕЛЬНЫХ СМЕСЯХ**

№	Взято, мг/мл (C <sub>1</sub> )	Найдено, мг/мл (C <sub>2</sub> )	Абсолютная ошибка, мг/мл (d = C <sub>2</sub> - C <sub>1</sub> )	Относительная ошибка, % (Y = d × 100/C <sub>1</sub> )	Найдено, %	Метрологические характеристики (P = 95%, n = 9)
1	0,0800	0,0796	-0,0004	-0,50	99,50	n = 9 $\bar{X} = 100,22$ S = 0,93 $S\bar{X} = 0,31$ $\Delta\bar{X} = 0,70$ $\bar{\epsilon} = 0,70\%$ $t_{расч} = 2,14$ $t_{табл} = 2,36$ RSD = 0,93%
2	0,0847	0,0851	0,0004	0,47	100,47	
3	0,0900	0,0893	-0,0007	-0,78	99,22	
4	0,0949	0,0947	-0,0002	-0,21	99,79	
5	0,0999	0,1010	0,0011	1,10	101,10	
6	0,1052	0,1061	0,0009	0,86	100,86	
7	0,1101	0,1105	0,0004	0,36	100,36	
8	0,1151	0,1139	-0,0012	-1,04	98,96	
9	0,1200	0,1221	0,0021	1,75	101,75	

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

При исследовании двух растворов, приготовленных аналогично модельным смесям (масса целлюлозы микрокристаллической – 0,159 г) разными химиками-аналитиками, определяли *внутрилабораторную прецизионность*. Навеска стандартного образца сибутрамина у первого химика составила 10,0 мг, у второго – 10,1 мг. Каждый раствор хроматографировали 5 раз по три повторности.

Среднее количество содержания сибутрамина для 10 измерений составляет 100,14%, стандартное отклонение – 0,16%, относительное стандартное отклонение RSD – 0,16%. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «внутрилабораторная прецизионность» (значение RSD должно быть не более 3%) для 10 параллельных измерений.

Предел обнаружения сибутрамина с использованием данной валидируемой методики составляет 0,004 мг/мл, предел количественного определения – 0,01 мг/мл.

**ВЫВОДЫ**

Разработанная методика удовлетворяет требованиям ОФС 1.1.0012.15 ГФ XIV «Валидация аналитической методики» по показателям: «специфичность», «линейность», «правильность», «сходимость» и «внутрилабораторная прецизионность».

Методика пригодна для определения сибутрамина в лекарственных препаратах и может быть внесена в нормативную документацию на лекарственные формы (капсулы, таблетки), содержащие сибутрамин, для проведения контроля качества лекарственных средств на фармацевтическом рынке.

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. *Здравоохранение в России 2019. Статистический сборник. Федеральная служба государственной статистики (Росстат).* – Москва, 2019.
2. *Ершова Е.В., Кошмилова К.А., Галиева М.О. Сибутрамин: мифы и реальность //*

- Ожирение и метаболизм. – 2014. – №4. – С. 12–17.
3. Асташкин Е.И., Глезер М.Г. Ожирение и артериальная гипертензия // Проблемы женского здоровья. – 2008. – №3 (4). – С. 23–33.
  4. Мельниченко Г.А. Романцова Т.И., Журавлева М.В. Всероссийская программа безопасного снижения веса «ПримаВера» // Итоги первого года проведения. – 2014. – №1. – С. 62–68.
  5. Регистр лекарственных средств России. URL: <https://www.rlsnet.ru/> (дата обращения: 06.08.2020).
  6. Lean M.E. Sibutramine – a review of clinical efficacy // *Int.J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1997. – Vol. 30. – №6. – P. 37–39.
  7. *The United States Pharmacopeia 36. The National Formulary 31. V. 1, 2.* 2013.
  8. Постановление правительства РФ от 29 декабря 2007 г. №964 «Об утверждении списков сильнодействующих и ядовитых веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации, а также крупного размера сильнодействующих веществ для целей статьи 234 Уголовного кодекса Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями).
  9. Zhong Y., Sun C., Xiong J., Shi Y. Simultaneous determination of eight adulterants in weight management supplements and herbs by HPLC-DAD and LC-MS/MS // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies.* – 2017. – №12. – P. 640–648.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHODOLOGY FOR DETERMINATION OF SIBUTRAMINE IN DRUGS

**A.M. Sukhanova<sup>1,2</sup>, I.B. Perova<sup>2</sup>, K.I. Eller<sup>2</sup>, G.M. Rodionova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia

*This research is devoted to the development and validation of a method for the determination of sibutramine in drugs for their quality control in order to further develop regulatory documentation in the Russian Federation. Solvent and chromatographic separation conditions were selected for the optimal determination of sibutramine in drugs by high performance liquid chromatography (HPLC) using an ultraviolet detector (UV). The specificity, linearity, correctness of the method have been proved, the relative error of a single determination does not exceed 1.5% (0.70%), the calculated value of the Student's test  $t_{calc}$  (2.14) is less than the tabular  $t_{table}$  (2.36), the coefficient of variation (RSD) does not exceed 1% (0.93%), the intralaboratory precision was carried out, the relative error of which = 0.16%. The detection limit was determined at the level of 0.004 mg/ml; the limit of quantitative determination is 0.1 mg/ml. The methodology is correct, there is no systematic error, therefore, it is suitable for further inclusion in the regulatory documents.*

**Keywords:** sibutramine, drugs, HPLC-UV, validation, quality control, regulatory documentation