<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145>
УДК 615.074

Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики количественного определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов методом КЭ

А. М. Суханова^{1,2*}, И. Б. Перова², К. И. Эллер², Г. М. Родионова¹, С. В. Чернова¹, В. Н. Кузина¹

1 – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
2 – ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Россия, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14

*Контактное лицо: Суханова Анна Михайловна. E-mail: annamsukhanova@gmail.com

ORCID: А. М. Суханова – <https://orcid.org/0000-0002-8687-8521>; И. Б. Перова – <https://orcid.org/0000-0001-5975-1376>; К. И. Эллер – <https://orcid.org/0000-0003-1046-4442>; Г. М. Родионова – <https://orcid.org/0000-0002-0536-9590>; С. В. Чернова – <https://orcid.org/0000-0002-1023-4949>; В. Н. Кузина – <https://orcid.org/0000-0002-1023-4949>.

Статья поступила: 30.09.2020. Статья принята в печать: 12.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В последнее время наблюдается тенденция роста числа пациентов с ожирением и лишним весом. На сегодняшний день наиболее эффективным лекарственным средством для лечения ожирения и снижения избыточной массы тела является сибутрамин. Лекарственный препарат является ингибитором обратного захвата серотонина и норадреналина, что приводит к уменьшению чувства голода, следовательно, к похудению.

Цель. Разработать и валидировать методику определения сибутрамина в лекарственных препаратах методом капиллярного электрофореза (КЭ) с использованием ультрафиолетового диодноматричного детектора.

Материалы и методы. С помощью метода КЭ с ультрафиолетовым диодноматричным детектором проводили количественное определение сибутрамина в лекарственных препаратах. В качестве растворителя и рабочего электролита использовали раствор фосфатного буфера 50 ммоль рН = 7,0; для разделения пиков – кварцевый капилляр 56 см, 50 мкм.

Результаты и обсуждение. Валидацию разработанной методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел обнаружения и количественного определения.

Заключение. Методика количественного определения сибутрамина в лекарственных препаратах методом КЭ с использованием ультрафиолетового диодноматричного детектора была разработана и валидирована. Данная методика соответствует всем требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики» и может быть использована для проведения контроля качества лекарственных препаратов, действующим веществом которых является сибутрамин.

Ключевые слова: сибутрамин, КЭ, лекарственные препараты, количественное определение, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. М. Суханова, И. Б. Перова, К. И. Эллер участвовали в разработке и валидации аналитической методики. Г. М. Родионова, С. В. Чернова, В. Н. Кузина отвечали за статистическую обработку. Все авторы участвовали в обсуждении и формировании результатов.

Для цитирования: Суханова А. М., Перова И. Б., Эллер К. И., Родионова Г. М., Чернова С. В., Кузина В. Н. Разработка и валидация методики количественного определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов методом КЭ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145>

Development and Validation of Sibutramine Determination in Drug Products by Capillary Electrophoresis

Anna M. Sukhanova^{1,2*}, Irina B. Perova², Konstantin I. Eller², Galina M. Rodionova¹, Svetlana V. Chernova¹, Vera N. Kuzina¹

1 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
2 – Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14, Ustinskiy proezd, Moscow, 109240, Russia

*Corresponding author: Anna M. Sukhanova. E-mail: annamsukhanova@gmail.com

ORCID: Anna M. Sukhanova – <https://orcid.org/0000-0002-8687-8521>; Irina B. Perova – <https://orcid.org/0000-0001-5975-1376>; Konstantin I. Eller – <https://orcid.org/0000-0003-1046-4442>; Galina M. Rodionova – <https://orcid.org/0000-0002-0536-9590>; Svetlana V. Chernova – <https://orcid.org/0000-0002-1023-4949>; Vera N. Kuzina – <https://orcid.org/0000-0002-1023-4949>.

Received: 30.09.2020. Revised: 12.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Recently, there has been a growing trend in the number of obese and overweight patients. To date, sibutramine is the most effective drug for treating obesity and overweight. The drug is an inhibitor of the reuptake of serotonin and norepinephrine, which leads to a decrease in hunger, and therefore, to weight loss.

Aim. To develop and validate a methodology for the determination of sibutramine in drugs by capillary electrophoresis (CE) using an ultraviolet diode array detector.

Materials and methods. Quantitative determination of sibutramine in drugs was carried out using the CE method with an ultraviolet diode array detector. A solution of phosphate buffer 50 mmol pH = 7.0 was used as a solvent and working electrolyte; to separate the peaks – quartz capillary 56 cm, 50 μm.

© Суханова А. М., Перова И. Б., Эллер К. И., Родионова Г. М., Чернова С. В., Кузина В. Н., 2020

© Sukhanova A. M., Perova I. B., Eller K. I., Rodionova G. M., Chernova S. V., Kuzina V. N., 2020

Results and discussion. The developed method was validated according to the following parameters: specificity, linearity, correctness, precision, limit of detection and limit of quantification.

Conclusion. A method for the quantitative determination of sibutramine in drugs by the CE method using an ultraviolet diode array detector has been developed and validated. This method meets all the requirements of General Pharmacopoeia Monograph 1.1.0012.15 «Validation of the analytical method» and can be used to control the quality of drugs, the active pharmaceutical substance of which is sibutramine.

Keywords: sibutramine, EC, drugs, quantification, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Anna M. Sukhanova, Irina B. Perova, Konstantin I. Eller participated in the development and validation of the analytical method. Galina M. Rodionova, Svetlana V. Chernova, Vera N. Kuzina were responsible for statistical processing. All authors participated in the discussion and forming of the results.

For citation: Sukhanova A. M., Perova I. B., Eller K. I., Rodionova G. M., Chernova S. V., Kuzina V. N. Development and validation of sibutramine determination in drug products by capillary electrophoresis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145>

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время наблюдается тенденция роста числа пациентов с ожирением и лишним весом [1]. На сегодняшний день наиболее эффективным лекарственным средством для лечения ожирения и снижения избыточной массы тела является сибутрамин.

Согласно ИЮПАК активная фармацевтическая субстанция сибутрамин гидрохлорид моногидрат – (±)-диметил-1-[1-(4-хлорфенил)циклобутил]-N,N,3-триметилбутил-1-амин (рисунок 1).

Рисунок 1. Структурная формула сибутрамина

Figure 1. The structural formula of sibutramine

Сибутрамин – ингибитор обратного захвата серотонина и норадреналина, что приводит к уменьшению чувства голода, следовательно, к похудению [2, 3]. Фармакологические эффекты достигаются вследствие образования активных метаболитов под действием изофермента CYP3A4 цитохрома P450 [2, 4, 5].

На основании проведенного анализа литературных источников по определению сибутрамина методом КЭ для определения сибутрамина используются буферные растворы солей с различными значениями pH, в качестве растворителя – рабочий электролит [6–8]. Наиболее оптимальный рабочий электролит подбирался экспериментально – раствор фосфатного буфера со значением pH = 7,0.

На сегодняшний день в РФ данные по определению сибутрамина методом капиллярного электрофореза отсутствуют.

В настоящем исследовании показана разработка и валидация методики определения сибутрамина в лекарственных препаратах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Определение сибутрамина в лекарственных препаратах проводили на системе капиллярного электрофореза Agilent 7100, оснащенной ультрафиолетовым детектором на диодной матрице. Обработка была проведена с помощью программы OpenLAB CDS ChemStation.

Реактивы и растворы

Для проведения исследования были использованы: натрия дигидрофосфат NaH₂PO₄ (х.ч., «Химмед»), вода Milli-Q; 1 М NaOH (Agilent), 0,1 М NaOH (Agilent), метанол (supergradient grade, J.T. Baker). Для приготовления растворов рабочих образцов применяли стандартные образцы: сибутрамина гидрохлорида (Tocris, Великобритания, содержание 100,0 %, годен до 01.2021 г.), целлюлоза микрокристаллическая (Sigma Aldrich, США, содержание 99,9 %, годен до 12.2021 г.), метформина гидрохлорид (USP reference standard).

Исходные и рабочие растворы стандартов растворяли в электролите – растворе фосфатного буфера pH = 7,0.

Пробоподготовка

Приготовление водного раствора фосфатного буфера 50 ммоль pH = 7,0 (NaH₂PO₄; NaOH).

Для приготовления раствора фосфатного буфера 50 ммоль pH = 7 в стакан объемом 1000 мл отмеривают 950 мл воды Milli-Q и, тщательно перемешивая, прибавляют 6000 мг соли натрия дигидрофосфата. Содержимое переносят в мерную колбу вместе

мостью 1000 мл, раствором NaOH 1 М доводят pH до значения 7,0, доводят водой Milli-Q до метки и перемешивают.

Приготовление исходного и рабочего раствора сибутрамина

Навеску сибутрамина около 10 мг (здесь и далее: точная навеска) помещали в мерную колбу объемом 10 мл, прибавляли 8 мл рабочего электролита, перемешивали до полного растворения, доводили объем до метки раствором фосфатного буфера pH = 7,0 и перемешивали, получая исходный раствор с концентрацией 1,0 мг/мл.

1 мл исходного раствора помещали в колбу на 10 мл, доводили до метки рабочим электролитом, получая раствор стандарта сибутрамина с концентрацией 0,1 мг/мл.

Условия проведения анализа методом КЭ

Условия проведения анализа методом КЭ были подобраны в процессе эксперимента и представлены в таблице 1.

Таблица 1. Условия проведения анализа методом КЭ

Table 1. Analysis conditions for the CE methodology

Параметр Parameter	Значение Value
– рабочий электролит – working electrolyte	Фосфатный буфер 50 ммоль pH = 7,0 Phosphate buffer 50 mmol pH = 7.0
<i>Капилляр Capillary</i>	
Температура Temperature	20 °C
Напряжение Voltage	+20 кВ +20 kV
Сила тока Current strength	100 мА 100 mA
Детектирование Detection	УФ-спектрофотометрическое при $\lambda = 225$ нм UV-spectrophotometric at $\lambda = 225$ nm
<i>Характеристики методики Method characteristics</i>	
Примерное время удерживания, мин (t_R) Approximate retention time, min (t_R)	6 мин 6 min
Время анализа, мин Analysis time, min	8 мин 8 min

Подготовка капилляра к работе

Капилляр между анализами промывают растворами в следующей последовательности:

0,1 М NaOH – 10 минут;

Водой Milli-Q – 10 минут;

Рабочим электролитом – фосфатным буфером pH = 7 – 20 минут.

В случае ежедневного использования системы капиллярного электрофореза в конце анализа капилляр последовательно промывали водой Milli-Q, 0,1 М NaOH, водой Milli-Q и метанолом в течение 5 минут, затем продували воздухом и оставляли концы капилляра на ночь в пустых виалах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

При разработке методики было экспериментально установлено, что подходящим для проведения аналитической методики является кварцевый капилляр длиной 56 см, 50 мкм. При использовании данного капилляра примерное время удерживания составляет 6 минут, общее время анализа – 8 минут.

В процессе эксперимента были протестированы различные растворы электролитов. Наиболее подходящий из них – раствора фосфатного буфера 50 ммоль. Значение pH изменяли от 3,0 до 9,0. При значении pH фосфатного буфера, равного 7,0, примерное время удерживания составляет около 6 минут, достигается получение пика, удовлетворяющего требованиям НД [9].

Валидацию аналитической методики определения сибутрамина методом КЭ проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики», ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIV, руководству В. В. Береговых по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел обнаружения и количественного определения [9, 10].

Для проведения валидации необходимым является приготовление модельных смесей: 0,010 г ($0,010 \pm 0,002$ г ($\pm 20\%$)) субстанции сибутрамина и около 0,156 г плацебо помещали в мерные колбы вместимостью 10 мл, прибавляли 8 мл рабочего электролита, помещали в ультразвуковую ванну на 20 мин. Затем объем содержимого колбы доводили до метки тем же растворителем, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм (нейлон). 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки электролитом, перемешивали (таблица 2).

Для доказательства специфичности получали хроматограммы: растворителя – рабочего электролита, раствора стандарта сибутрамина, целлюлозы микрокристаллической, метформина, модельной смеси (сибутрамин и МКЦ), модельной смеси (сибутрамин и метформин) (рисунки 2–6).

Растворитель, МКЦ и метформин не мешают определению сибутрамина, чем определяется специфичность методики.

Линейность валидируемой методики была определена на 9 модельных смесях (таблица 2) согласно полученной калибровочной кривой (рисунок 7).

Таблица 2. Приготовление модельных смесей

Table 2. Preparation of model mixtures

№ модельной смеси № of model mixture	Необходимо внести сибутрамина, г Necessary to add sibutramine, g	V колбы, мл V flask, ml	Кратность разведения Dilution ratio
1	0,0080	10	10
2	0,0085	10	10
3	0,0090	10	10
4	0,0095	10	10
5	0,0100	10	10
6	0,0105	10	10
7	0,0110	10	10
8	0,0115	10	10
9	0,0120	10	10

Рисунок 2. Хроматограмма растворителя
Figure 2. Chromatogram of the solvent

Рисунок 3. Хроматограмма раствора стандарта сибутрамина
Figure 3. Chromatogram of a sibutramine standard solution

Значение коэффициента корреляции R^2 составляет 0,9989 (более 0,9950) при $y = 9886,9x - 13,248$ [x – концентрация (мг/мл), y – площадь пика].

При оценке прецизионности и правильности проводили хроматографирование на 9 уровнях по 3 повторных анализа на каждом из них.

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

Из таблицы 3 следует, что извлечение сибутрамина из модельных смесей в условиях эксперимента проходит полностью, относительная ошибка единич-

Рисунок 4. Хроматограмма целлюлозы микрокристаллической
Figure 4. Chromatogram of microcrystalline cellulose

Рисунок 5. Хроматограмма раствора метформина
Figure 5. Chromatogram of metformin solution

Рисунок 6. Хроматограмма модельной смеси
Figure 6. Chromatogram of model mixture

ного определения не превышает 1,5 % (0,44 %). Доверительный интервал $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ ($99,89 \pm 0,44$ %) включает 100 %, расчетное значение критерия Стьюдента $t_{\text{расч.}}$ (1,73) меньше табличного $t_{\text{табл.}}$ (2,36), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует.

Для оценки прецизионности (сходимости) результатов был рассчитан коэффициент вариации (RSD), не превышающий 1 % (0,59 %).

Предел обнаружения сибутрамина был установлен на уровне 0,005 мг/мл. Предел количественного определения составил 0,0125 мг/мл.

Рисунок 7. Калибровочный график линейной зависимости площади пика (S) от концентрации (C) раствора сибутрамина

Picture 7. The calibration curve dependence of the ratio area peak (S) to the concentration (C) of sibutramine solution

Таблица 3. Результаты количественного определения сибутрамина в модельных смесях

Table 3. Results of the quantitative determination of sibutramine in model mixtures

№	Взято, мг/мл (C ₁) Taken, mg/ml (C ₁)	Найдено, мг/мл (C ₂) Found, mg/ml (C ₂)	Абсолютная ошибка, мг/мл (d = C ₂ - C ₁) An absolute mistake, mg/ml (d = C ₂ - C ₁)	Относительная ошибка, % (Y = d × 100/C ₁) Relative error, % (Y = d × 100/C ₁)	Найдено, % Found, %	Метрологические характеристики (P = 95 %, n = 9) Metrological characteristics (P = 95 %, n = 9)
1	0,0791	0,0788	-0,0003	-0,38	99,62	n = 9 $\bar{X} = 99,89$ $S = 0,59$ $S_{\bar{X}} = 0,20$ $\Delta \bar{X} = 0,44$ $\bar{\varepsilon} = 0,44 \%$ $t_{\text{расч.}} = 1,73$ $t_{\text{табл.}} = 1,73$ $t_{\text{расч.}} = 2,36$ $t_{\text{табл.}} = 2,36$ RSD = 0,59 %
2	0,0845	0,0847	0,0002	0,24	100,24	
3	0,0903	0,0898	-0,0005	-0,55	99,45	
4	0,0950	0,0945	-0,0005	-0,53	99,47	
5	0,0997	0,0994	0,0003	0,30	99,70	
6	0,1049	0,1041	0,0008	0,76	99,24	
7	0,1102	0,1107	0,0005	0,45	100,45	
8	0,1151	0,1148	-0,0003	-0,26	99,74	
9	0,1197	0,1198	0,0001	0,08	100,08	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования была разработана и валидирована методика количественного определения сибутрамина в лекарственных препаратах методом КЭ с использованием ультрафиолетового диодноматричного детектора. Разработанная методика позволяет определять сибутрамин, не разделяя вещество на энантиомеры, поскольку это не является целью настоящего исследования. Кроме того, по сравнению с ранее опубликованными методиками предлагаемая нами характеризуется высокой воспроизводимостью результатов. Диапазон линейнос-

ти методики составляет от 80 до 120 %. Данная методика соответствует всем требованиям ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики» и может быть использована для проведения контроля качества лекарственных препаратов, действующим веществом которых является сибутрамин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Здравоохранение в России. Федеральная служба государственной статистики. Доступно по: <https://rosstat.gov.ru/folder/210/document/13218>. Ссылка активна на 09.09.2020.
2. Регистр лекарственных средств России. Доступно по: <https://www.rlsnet.ru/> Ссылка активна на 10.09.2020.
3. Лерман О. В., Лукина Ю. В., Кутишенко Н. П., Марцевич С. Ю. Медикаментозное лечение ожирения: особенности врачебных назначений, информированность, приверженность и отношение больных к лекарственной терапии ожирения. *Клиницист*. 2019;13(1-2):27-33.
4. Lean M. E. Sibutramine – a review of clinical efficacy. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 1997;30(6):37-39.
5. Романцова Т. И. Сибутрамин: Эффективность и безопасность применения в рутинной клинической практике. *Ожирение и метаболизм*. 2015;3:18-24.
6. Akamatsu S. Mitsuhashi T. Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*. 2014;6(5):426-433.
7. Hancu G., Hilochie A., Vlad A. R., Cârje A., Tero-Vescan A. Enantiometric separation of sibutramine by capillary zone electrophoresis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2016;27(6):1116-1120.
8. Lee Y-J., Choi S., Lee J., Nguyen N. T., Lee K., Kang J. S., Mar W., Kim K. H. Chiral discrimination of sibutramine enantiomers by capillary electrophoresis and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Archives of Pharmacol Research*. 2012;35(4):671-681.
9. Государственная Фармакопея Российской Федерации 14 издание: официальный текст. М.: Федеральная электронная медицинская библиотека, 2018. Доступно по: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
10. Береговых В. В., ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. М.: Литтерра. 2008: 132 с.

REFERENCES

1. Healthcare in Russia. *Federal State Statistics Service*. Available at: <https://rosstat.gov.ru/folder/210/document/13218>. Accessed: 09.09.2020. (In Russ.).
2. Register of medicines of Russia. Available at: <https://www.rlsnet.ru/> Accessed: 10.09.2020. (In Russ.).
3. Lerman O. V., Lukina Yu. V., Kutishenko N. P., Martsevich S. Yu. Medical treatment of obesity: peculiarities of medical treatments, information, responsibility and relation to medical treatment of obesity of patients. *Klinitsist = The Clinician*. 2019;13(1-2):27-33. (In Russ.).
4. Lean M. E. Sibutramine – a review of clinical efficacy. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 1997;30(6):37-39.
5. Romantsova T. I. Sibutramine: efficacy and safety of prescribing in routine clinical practice. *Ozhirenie i metabolismism*. 2015;3:18-24. (In Russ.).
6. Akamatsu S. Mitsuhashi T. Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*. 2014;6(5):426-433.
7. Hancu G., Hilochie A., Vlad A. R., Cârje A., Tero-Vescan A. Enantiometric separation of sibutramine by capillary zone electrophoresis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2016;27(6):1116-1120.
8. Lee Y-J., Choi S., Lee J., Nguyen N. T., Lee K., Kang J. S., Mar W., Kim K. H. Chiral discrimination of sibutramine enantiomers by capillary electrophoresis and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Archives of Pharmacol Research*. 2012;35(4):671-681.
9. State Pharmacopoeia of the Russian Federation 14th edition: official text. Moscow: *Federal'naya elektronnyaya medicinskaya biblioteka*, 2018. Available at: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>. (In Russ.).
10. Beregovykh V. V. Validation of analytical procedures for drug manufacturers. Moscow: *Litterra*, 2008. 132 p.