



РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА
УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВОСКОПЈЕ
УНИВЕРЗИТЕТСКА ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ
СТУДИИ

ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
СТУДЕНТСКИ ПРАШАЊА 2

ОИ-ГК

Број:
Датум: __.20__ година
Скопје

До
Фармацевтски факултет во Скопје
Совет на студиската програма по фармација

ПРИЈАВА

за учество на годишна конференција во IV семестар во академска 2021/2022 година

Студент	Зоран Живиќ
Број на индекс	72/др
Ментор	Проф. д-р Руменка Петковска
Студиска програма	трет циклус, докторски студии од областа медицински науки и здравство, поле фармација
Студиска подпрограма	
Поле на истражување	Храна и исхрана
Тема	Квалитет и безбедност на додатоци на исхрана за намалување на телесна тежина
Година на запишување на докторски студии	
Број на остварени кредити	
Забелешка	

Скопје, 25.10.2021 година.

Студент
З. Живиќ

Ментор
Р. Петковска

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

Студиска програма: трет циклус, докторски студии

Кандидат: Зоран Живиќ

Број на индекс: 72/др

Вработен во: Институт за применета биохемија, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје

Ментор: Проф. д-р Руменка Петковска

Студиска година: трета

ИДЕНТИФИКАЦИЈА И ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА НЕДЕКЛАРИРАНИ
КОМПОНЕНТИ ВО ДОДАТОЦИТЕ НА ИСХРАНА ЗА СЛАБЕЕЊЕ

КРАТКА СОДРЖИНА

Присуството на нелегални додатоци на исхраната за слабеење и третман на прекумерната телесна тежина на глобалниот пазар претставува јавен здравствен проблем. Фалсификувањето на овие производи со незаконски додадени и недекларирани компоненти е честа појава што се практикува од страна на производителите за да се обезбедат брзи ефекти на намалување на телесната тежина, следствено и да се зголеми нивната продажба. Со оглед на потенцијалните здравствени ризици за потрошувачите, развојот на аналитички метод за точен, брз и ефикасен скрининг и идентификација на супстанциите кои се користат за фалсификување на додатоците на исхрана од оваа категорија се наметнува како неопходност. Меѓу најчестите фармаколошки активни супстанции што се користат за фалсификување на додатоците на исхрана за слабеење се: сибутрамин, флуоксетин, фенолфталеин, кофеин и теобромин. Со цел да се направи скрининг на овие пет компоненти во комерцијално достапните додатоци на исхрана за намалување на телесната тежина на пазарот во Република Северна Македонија, беше развиен и валидиран HPLC-DAD метод за нивна идентификација и квантификација. Хроматографските услови на валидираниот метод вклучуваат изократско елуирање со фосфатен пуфер и ацетонитрил во однос 64:36 (v/v), користејќи колона LiChrospher® 60 RP-select B (125 mm × 4 mm, 5,0 μm) и диоден детектор на бранова должина од 225 nm. Идентификацијата на аналитите е заснована на ретенционото време и спектралните својства на аналитите во споредба со референтните стандарди. Методот е едноставен, брз и селективен бидејќи овозможува истовремена идентификација, како и квантификација на пет различни аналити за време од 10 минути.

Клучни зборови: додатоци на исхрана за слабеење, фалсификување, HPLC-DAD, валидација.

1. ВОВЕД

Дебелината претставува патолошка состојба која се јавува како резултат на акумулација на маснотии во телото и се смета за значаен ризик фактор за развој на различни сериозни заболувања. За справување со дебелината се применува широк спектар на додатоци на исхраната чија основна цел е намалување на телесната тежина. Нивното дејство генерално ги опфаќа следниве механизми: контрола на апетитот, стимулирање на термогенезата и метаболизмот на липидите, инхибирање на активноста на панкреасната липаза, спречување на адипогенезата и промоција на липолиза [1]. Третманот на здебеленоста со додатоци на исхраната наменети за намалување на телесната тежина во оптималните пропишани дози треба да биде безбеден и ефикасен. Меѓутоа, научните податоци за клиничката ефикасност и појавата на можни несакани ефекти поврзани со примената на овие производи се ограничени [2]. Дополнително, за да се постигнат брзи ефекти на слабеење, што има крајна цел зголемување на продажбата, честопати додатоците на исхраната се адултерираат со нелегално додавање на фармацевтски супстанции како што се наркотици, стимуланси, антидепресиви, анорексици, лаксативи и диуретици или нивни аналози [3]. Адултерирањето претставува мешање на непожелни или супстанции со нестандарден квалитет со оригиналните активни супстанции за комерцијални цели. Овој процес значајно го намалува квалитетот на производот, може да ја намали неговата ефикасност и во некои случаи може да предизвика животозагрозувачки последици [4]. Иако, генерално за додатоците на исхрана, пред сè за хербалните производи постои општо верување дека не се поврзани со ризик по здравјето и многу често се означуваат како природни, следствено безбедни и ефикасни средства за надминување на дебелината, нивната продажба, особено преку интернет, не е под строга контрола и честопати законската регулатива не наложува тестирање на квалитетот и безбедноста пред да доспеат на пазарот [5]. Во оваа смисла, познати се случаи на појава на несакани ефекти (главоболки, палпитации, градна болка, гадење, нарушување на сонот, замор, хипертензија) како резултат на додавање на лекови како што се флуоксетин или сибутрамин во хербални додатоци на исхраната за слабеење [6, 7]. Повеќекратните здравствени ризици поврзани со присуство на недеklarирани компоненти во додатоците на исхраната за слабеење од една страна, и глобализацијата и проширувањето на пазарите од друга страна, неминовно ја наметнуваат потребата од прецизни и ефективни испитувања на додатоците на исхрана за слабеење, како и структурна идентификација на непознати адултерации/аналози. Имајќи го предвид наведеното, целта на овој труд се состои во идентификација и определување на пет супстанции евентуално присутни како недеklarирани компоненти во додатоците на исхраната за слабеење, што моментално се наоѓаат на пазарот во Република Северна Македонија.

2. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

2.1. Материјали

Како материјал за работа во овој труд беа користени комерцијално достапни додатоци на исхраната за слабеење набавени од пазарот на територијата на Република Северна Македонија. За идентификација на испитуваните аналити беа користени стандардни супстанции набавени од Sigma Aldrich, USA со чистота > 98,0% (w/w). За подготовка на мобилната фаза беше користен ацетонитрил со HPLC чистота (Carlo Erba- SDS, France). За подготовка на фосфатниот пуфер во состав на мобилната фаза беше користен натриум дихидроген фосфат монохидрат (Алкалоид, Р.С. Македонија) и

орто-фосфорна киселина (Merck, Germany). За сите анализи беше користена ултра-прочистена вода со квалитет за HPLC анализа.

2.2. Хроматографски услови

Методот беше развиен на Agilent 1200 течен хроматограф (Agilent Technologies, USA) со примена на колона LiChrospher® 60 RP-select B (125 mm × 4 mm, 5,0 µm) на температура од 40 °C (Табела 1).

Мобилната фаза беше составена од смеса на фосфатен пуфер (0,05 mol/L натриум дихидроген фосфат), прилагоден на pH 2,5 со орто-фосфорна киселина и ацетонитрил во однос 64:36% (v/v). За елуирање на анализите беше применет изократски метод со проток на мобилната фаза од 1 mL/min. Волуменот на инјектирање изнесуваше 10 µL. Детекцијата беше направена на бранова должина од 225 nm.

Табела 1. Хроматографски услови.

Мобилна фаза	фосфатен пуфер (pH 2,5) и ацетонитрил во однос 64:36% (v/v)
Колона	LiChrospher® 60 RP-select B (125 mm × 4 mm, 5,0 µm)
Волумен на инјектирање	10 µL
Температура на колона	40 °C
Брзина на проток	1 mL/min
Бранова должина	225 nm
Време на елуирање	10 min

2.3. Подготовка на примероци и стандардни раствори

Стандардните раствори беа подготвени во концентрација од 0,2 mg/mL користејќи ја мобилната фаза како растворувач. Примероците беа подготвени согласно фармакопејските упатства (Ph. Eur 9), при што определена маса од производот (10 просечни маси) беа одмерени во волуметриски сад од 100 mL и поставени на ултразвучна мешалка. Потоа, аликвот од 50 mL беше пренесен во одмерен сад од 100 mL и дополнет со мобилна фаза. Сите раствори пред инјектирање беа филтрирани со филтер RC 0,45 µm (ALWSCI Group, China). Квантитативното определување беше изведено на три примероци.

2.4. Валидација на метод

Валидацијата на методот е спроведена по претходно усвоен план за валидација, согласно упатствата на интернационалните водичи, а вклучува определување на специфичност, линеарност, точност, прецизност и робустност. Со цел да се потврди специфичноста кај производите во кои се детектирани недеklarирани компоненти, дополнително се изведени параметарите специфичност, точност и прецизност за секоја формулација поединечно, со кои се отстрануваат евентуално можните интерференции со плацебото.

Параметарот линеарност беше евалуиран со користење на калибрациони дијаграми со осум точки. Параметарот прецизност беше определен преку коефициентите на варијација изразени како релативна стандардна девијација (RSD), при што критериум за прифаќање на резултатите за прецизност е вредноста за RSD% да не биде повисока од 2%. Точноста беше изведена во три концентрациски нивоа од 50%, 100% и 150%, и определена како процент од приносот добиен при анализирање на пробите со додадени познати количества на стандардни супстанции. Критериум за

прифаќање на резултатите за точност е средната вредност од приносот да биде во опсег од 98-102%, а вредноста за $RSD \leq 2\%$. Робустноста беше изведена со промена на хроматографските услови во однос на протокот ($\pm 0,1 \text{ mL/min}$), температурата на колоната ($\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$), pH вредноста на пуферот ($\pm 0,1 \text{ pH}$ единица), соодносот на мобилни фази ($\pm 2\%$) и концентрацијата на соли ($\pm 0,01 \text{ mol/L}$). Критериуми на прифаќање во однос на робустноста се задоволување на параметрите што ја дефинираат соодветноста на системот (ретенционо време, број на теоретски подови < 3000 и симетрија на пик $< 2,0$).

3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. Резултати од валидација на метод

Податоците за линеарност за определување на испитуваните пет супстанции со примена на развиениот метод се прикажани во Табела 2.

Табела 2. Линеарност на метод.

Линеарност	Теобромин	Кофеин	Фенолфталеин	Флуоксетин	Сибутрамин
Концентрациски опсег (mg/mL)	0,002-0,3	0,002-0,3	0,002-0,3	0,002-0,3	0,002-0,3
Коефициент на корелација (R^2)	0,9991	1	0,9999	0,9999	0,9997

Линеарноста беше определена во концентрациски опсег од 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 и 0,3 mg/mL за сите испитувани супстанции, со помош на калибрационен дијаграм и евалуација на коефициентот на корелација. Коефициентот на корелација (R^2) за сите калибрациони дијаграми изнесуваше доследно $\geq 0,999$. Равенките на линеарната регресија беа добиени со користење на методот на најмали квадрати. Податоците за линеарност беа валидирани со примена на ANOVA, при што беше утврдено незначајно отстапување од линеарноста и значајна линеарна регресија.

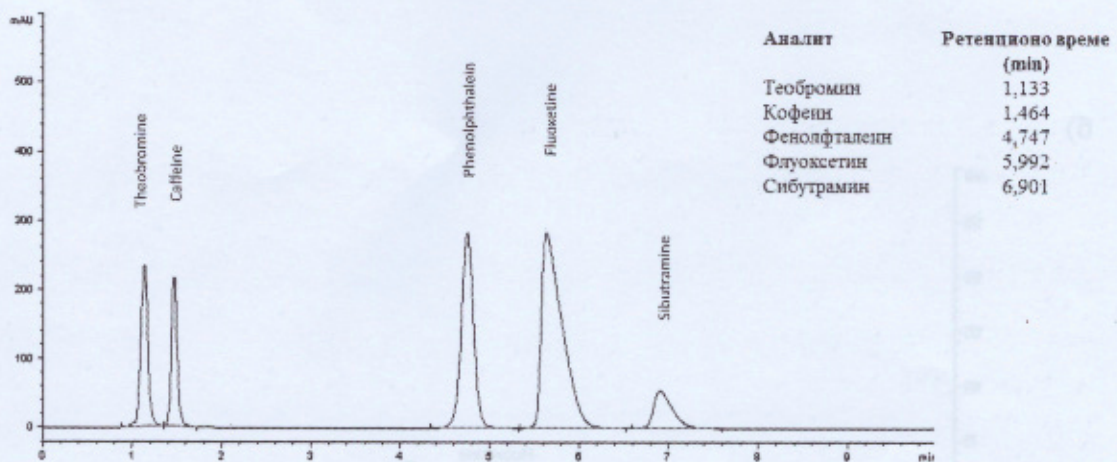
Точноста на методот беше определена преку приносот добиен со додавање на познати количества на стандардни супстанции (сибутрамин, флуоксетин, фенолфталеин, кофеин и теобромин) што соодветствуваат на 50, 100 и 150% од концентрацијата на работниот стандард. Точноста беше пресметана како процент на секоја од анализираните пет супстанции во согласност со приносот добиен од оваа анализа. Испитувањето на прецизноста покажа дека методот е прецизен, бидејќи добиените резултати беа во согласност со критериумите на прифатливост. Ниската вредност за $RSD\%$ добиена за сите примероци во кои се додадени познати количества на стандардни раствори, покажува дека методот се карактеризира со добра прецизност и повторливост. Податоците за точност и прецизност на методот се прикажани во Табела 3.

Табела 3. Точност и прецизност на метод.

Параметри	Точност			Прецизност RSD %
	Принос + RSD (%)			
Концентрација/ Концентрациско ниво	0,1 mg/mL (50%)	0,2 mg/mL (100%)	0,3 mg/mL (150%)	
Сибутрамин	99,37 + 0,33	98,14 + 0,99	99,03 + 0,57	1,2
Флуоксетин	99,12 + 0,62	99,03 + 0,47	99,53 + 0,42	1,03
Кофеин	100,11 + 0,12	100,26 + 0,27	99,88 + 0,19	0,56
Теобромин	99,60 + 0,45	99,73 + 0,57	99,48 + 0,96	0,92
Фенолфталеин	99,24 + 0,37	99,84 + 0,77	98,17 + 1,66	0,64

Специфичноста на методот беше определена преку споредба на хроматограмите од поединечните стандарди, анализа на смесата од стандардните раствори на испитуваните супстанции и вообичаено користените ексципиенси. Со оглед на тоа што во овој труд за анализа беа избрани додатоци на исхраната што се достапни на националниот пазар, како ексципиенс беше користен производ за кој е потврдено дека не содржи ниту една од испитуваните пет супстанции. На овој начин беше покажано дека методот се карактеризира со доволна специфичност во однос на анализите, што се потврдува со отсуство на интерферирачки пикови со потекло од ексципиенсите.

Во добиените хроматограмите не се забележани интерферирачки пикови со потекло од ексципиенсите во примероците. Факторот на резолуција за пиковите на испитуваните пет супстанции беше поголем од два во однос на останатите разделени пикови, без интерференции во опсег на ретенционото време на анализите (Слика 1).



Слика 1. Хроматограм добиен од стандардни раствори на теобромин, кофеин, фенолфталеин, флуоксетин и сибутрамин.

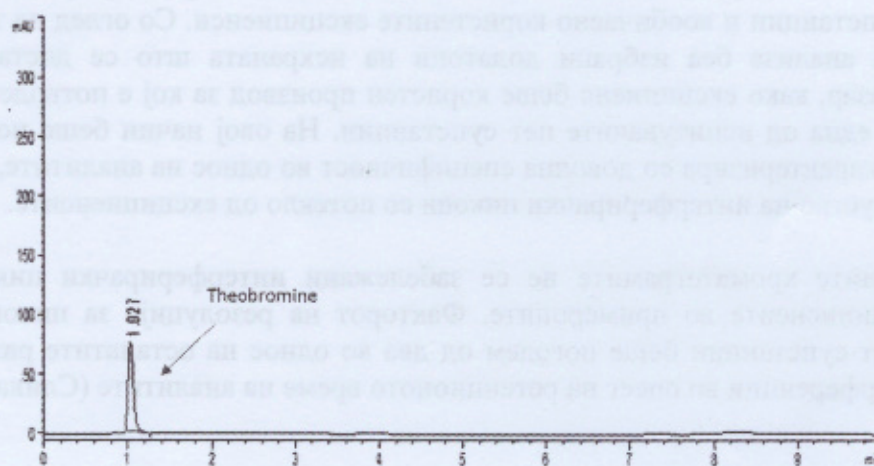
Робустноста на методот беше определена преку внимателно варирање на параметрите на методот, и тоа, проток на мобилната фаза ($\pm 0,1$ mL/min), температурата на колоната (± 5 °C), pH вредноста на пуферот ($\pm 0,1$ pH единица), соодносот на мобилни фази ($\pm 2\%$) и концентрацијата на соли ($\pm 0,01$ mol/L). Во тек на анализите

користејќи ги наведените променливи услови беше евалуирано ретенционото време, факторот на симетрија и бројот на теоретски подови на секоја од испитуваните пет супстанции, при што не беа забележани значајни промени во разделувањето, а критериумите на прифатливост беа задоволени.

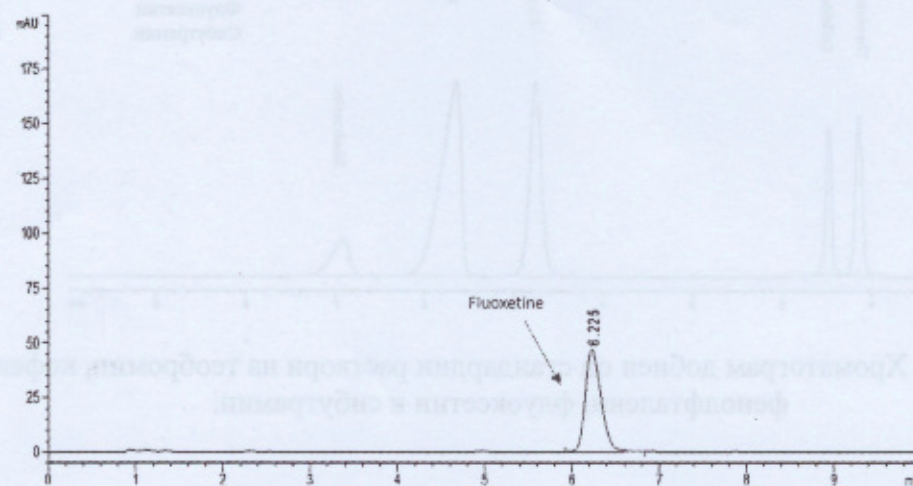
3.2. Резултати од скрининг анализа

Со примена на воспоставениот HPLC-DAD метод беше овозможена истовремена идентификација на пет компоненти (сIBUTРАМИН, флуоксетин, фенолфталеин, кофеин и теобромин), потенцијално присутни како адултерации во додатоките на исхрана за слабење за време пократко од 10 минути. За да може да се детектираат овие супстанции со различна поларност и физичко-хемиски карактеристики, составот на мобилната фаза беше соодветно адаптиран.

а)



б)



Слика 2. Хроматограм добиен со анализа на адултериран додаток на исхрана за слабење со а) теобромин и б) флуоксетин.

И покрај тврдењата на производителите на некои од анализираните додатоци на исхрана за слабеење дека ги содржат само активните компоненти што се декларирани на амбалажата на производот, резултатите од анализата покажаа присуство и на други супстанции во нивниот состав. Како адултерации во испитуваните додатоци на исхраната за слабеење беа идентификувани теобромин и флуоксетин. Имено, од вкупно анализирани 19 додатоци на исхраната за слабеење, во еден беше идентификуван теобромин, а кај 2 производи беше потврдено недеklarирано присуство на флуоксетин (Слика 2а и б, соодветно). Присуство на кофеин, фенолфталеин и сибутрамин не беше детектирано во ниту еден од анализираните производи. Идентификацијата на испитуваните пет супстанции беше направена со споредба на ретенционото време и спектралните својства на аналитите и оние на референтните стандарди.

4. ДИСКУСИЈА

Во согласност со литературните сознанија, значаен е бројот на објавени хроматографски методи кои можат да се применат за идентификација и определување на недеklarирани компоненти во додатоците на исхраната за слабеење, но најчесто се соодветни за нивна поединечна анализа [2, 6] или пак за истовремена идентификација на две супстанции, на пр. сибутрамин и фенолфталеин [8]. Објавени се и неколку HPLC-DAD методи што овозможуваат истовремена анализа на поголем број супстанции, но сите аналити потекнуваат од иста група (бензодиазепини) [9] или е неопходно градиентно елуирање [10]. Развојот на аналитички метод што ќе овозможи брза и едноставна истовремена идентификација и определување на поголем број супстанции различни по своите својства, што често се користат за фалсификување на додатоците на исхрана за слабеење е значајна придобивка како од клинички и токсиколошки аспект, така и од регулаторен. Според нашите сознанија овој труд е иницијален обид во нашата земја за развој и валидација на соодветен аналитички метод што е применлив за рутинска анализа со оглед на тоа што HPLC е добро воспоставена техника од една страна, а од друга страна опишаниот метод се карактеризира со висока моќ за разделување и следствено може да се примени за анализа на сложени смеси на супстанции. Ова е од особена важност за анализа на хербалните додатоци на исхрана за слабеење, кои покрај тоа што содржат поголем број на природни активни конституенти, може да содржат и недеklarирани синтетски компоненти [11]. Воспоставениот метод во ова истражување беше успешно применет за истовремена идентификација и квантификација на сибутрамин, флуоксетин, фенолфталеин, кофеин и теобромин во додатоци на исхрана за слабеење достапни на пазарот во Република Северна Македонија. Според добиените резултати, методот е линеарен во концентрациски опсег од 0,002 до 0,3 mg/mL за сите испитувани супстанции, што е во согласност со коефициентите на корелација, кои во сите случаи имаат вредност $R^2 \geq 0,999$. Податоците од изведените експерименти за точност и прецизност ($RSD \leq 2\%$) ја потврдуваат применливоста на методот. Специфичноста на методот беше потврдена со отсуство на ендогени интерферирачки пикови во близина на ретенционото време на пиковите на испитуваните пет супстанции. Во близина на ретенционите времиња на нивните пикови, хроматографската анализа на плацебо примерокот не покажа присуство на интерферирачки пик. Дополнително, овој метод е временски и економски исплатлив и може да се користи во рутинска пракса за детекција на испитуваните пет супстанции во додатоци на исхраната за слабеење. Значењето на предложениот метод од аспект на можноста истовремено да се анализираат пет можни адултерации е уште поголемо ако се земе предвид дека супстанциите потекнуваат од различни фармаколошки групи. Имено, сибутрамин спаѓа во групата на анорексици, флуоксетин

е антидепресив, фенолфталеин е диуретик, додека пак ксантинските деривати кофеин и теобромин се стимуланси на ЦНС. Имајќи ја предвид наведената класификација, лесно може да се заклучи дека овие супстанции имаат различни физичко-хемиски својства и различна поларност, што претставува огромен предизвик во развојот на метод кој ќе овозможи нивна истовремена детекција.

Изборот на целните пет анализи се базира на податоците од литературата што потврдуваат дека овие супстанции често се детектирани во различни додатоци на исхраната за слабеење, без да бидат соодветно декларирани на производите [12, 13, 14, 15]. И покрај тоа што не беше детектиран сибутрамин во испитуваните производи, голем број на литературни извештаи го потврдуваат неговото користење за адултерирање на додатоците на исхрана за слабеење [7,8]. Податоците од направените истражувања покажуваат дека сибутрамин без да биде декларирани во составот на додатоците на исхрана за слабеење бил детектиран во значајно поголемо количество од поединечната препорачана доза (10-15 mg/капсула) според Европската агенција за лекови (ЕМА, European Medicine Agency) пред овој лек да биде повлечен од европскиот пазар во 2010 година [16]. Ова решение за суспензија на одобрувањето за производи што го содржат лекот сибутрамин да се пуштаат во промет, ЕМА го препорачала врз основа на извештаите за можните несакани ефекти како што се хипертензија, тахикардија или палпитации [8, 17]. За разлика од сибутрамин, во ова истражување флуоксетин беше детектиран во два производи во содржина од 20 mg/капсула, односно прашок. Присуството на недеklarиран флуоксетин во додатоците на исхрана за слабеење во определената содржина претставува сериозен ризик ако се земе предвид дека потрошувачите не се свесни за неговото нелегално присуство во производот и поврзаните несакани дејства. Флуоксетин како антидепресив се карактеризира со генерално прифатлив безбедносен профил во препорачаните терапевтски дози (20-80 mg/ден), но можни се несакани ефекти од тип на главоболка, наузеа, дијареа, сонливост или несоница, нервоза, потење, тремор, како и посериозни несакани ефекти, пр. суицидни мисли, абнормално крварење и напади [18]. Кофеин не беше детектиран во испитуваните производи, но привлекува сè поголемо внимание од аспект на неговата употреба за адултерирање на додатоците на исхрана за слабеење [5]. Препорачана дневна доза за кофеин кај возрасни луѓе, освен за бремени жени е 400 mg [19], при што дози повисоки од 600 mg може да предизвикаат значајни несакани ефекти, вклучувајќи тахикардија, тремор, несоница, нервоза, градна болка и аритмија [20, 21]. Слично како и кофеин, теобромин сè почесто се користи за адултерирање [5], а во прилог на овие сознанија во еден од испитуваните производи беше определен теобромин во содржина од 1,6 mg/капсула. Во анализираните производи, не беше детектиран лаксативот фенолфталеин, кој е повлечен од пазарот поради можните карциногени ефекти [8, 17, 22].

Додавањето на синтетски супстанции без соодветно означување на производот што вообичаено се врши заради постигнување на побрзи ефекти на слабеење, знаејќи дека корисниците на овие производи лесно се откажуваат доколку не забележат почетни ефекти на слабеење, ги изложува потрошувачите на потенцијални несакани ефекти, како и неочекувани интеракции. Имајќи го предвид зголемениот интерес за употреба на додатоци на исхраната за слабеење, се наметнува потреба од преземање на извршни мерки од страна на компетентните здравствени органи со цел детекција на можни адултерации. Во оваа смисла, потребно е да се регулира продажбата на додатоците на исхраната за слабеење и да се контролира нивниот квалитет и безбедност со примена на брзи, едноставни и специфични аналитички методи.

5. ЗАКЛУЧОК

Во овој труд беше развиен и валидиран HPLC-DAD метод за истовремена идентификација и квантификација на пет супстанции (сIBUTРАМИН, флуоксетин, фенолфталеин, кофеин и теобромин), што често се користат за фалсификување на додатоките на исхрана за слабеење, кој воедно е временски и економски исплатлив. Методот е едноставен и точен, а се карактеризира со добра линеарност, прецизност, робустност и специфичност. Мобилната фаза се подготвува брзо и лесно, а времето на анализа е релативно кратко и изнесува 10 минути. Оттука, воспоставениот метод е погоден за едноставна и брза примена во рутинските контролни лаборатории со цел детекција на фалсификување на додатоките на исхрана за слабеење со било која од испитуваните пет супстанции.

6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Kazemipoor, M., Cordell, G.A., Sarker, M.R., Jasimah, C., Radzi, W.M., Hajifaraji, M., Kiat, P.E., 2015. Alternative treatments for weight loss: safety/risks and effectiveness of anti-obesity medicinal plants. *Int J Food Prop.* 18:1942-1963.
- [2] Bhatia, L., Thumar, K., Tanna, R., 2012. Determination of adulteration of anti-obesity drug in Indian herbal medicinal product: development and validation of analytical method. *Pharm Anal Qual Assur.* 3:177-182.
- [3] Rocha, T., Amaral, J.S., Oliveira, M.B.P.P., 2016. Adulteration of dietary supplements by the illegal addition of synthetic drugs: a review. *Compr Rev Food Sci Food Safety* 15:43-62.
- [4] Muschietti L., Redko F., Ulloa J., 2020. Adulterants in selected dietary supplements and their detection methods. *Drug Test Anal.* 12: 861-886.
- [5] Khazan, M., Hedayati, M., Kobarfard, F., Askari, S., Azizi, F., 2014. Identification and determination of synthetic pharmaceuticals as adulterants in eight common herbal weight loss supplements. *Iran Red Crescent Med J.* 16:e15344.
- [6] Viana, C., Zemolin, G.M., Dal Molin, T.R., Gobo, L., Ribeiro, S.M., Leal, G.C., Marcon, G.Z., de Carvalho, L.M., 2018. Detection and determination of undeclared synthetic caffeine in weight loss formulations using HPLC-DAD and UHPLC-MS/MS. *J Pharm Anal.* 8(6):366-372.
- [7] Firozian, F., Nili-Ahmadabadi, A., Moradkhani, S., Moulaei, M., Fasihi, Z., Ahmadimoghaddam, D., 2021. Adulteration of the herbal weight loss products by the illegal addition of synthetic antiobesity medications: a pilot study. *J Obes.* ID 9968730.
- [8] Ancuceanu, R., Dinu, M., Corina-Cristina, A., 2013. Weight loss food supplements: adulteration and multiple quality issues in two products of Chinese origin. *Farmacia* 61:28-44.
- [9] Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Oka, H., Kanamori, H., 2005. Simultaneous analysis of seven benzodiazepines in dietary supplements as adulterants using high performance liquid chromatography and its application to an identification system for diazepam. *J. Health Sci.* 51:278-283.
- [10] Liu, S.-Y., Woo, S.-O., Koh, H.-L., 2001. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *J Pharm Biomed Anal.* 24:983-992.
- [11] Hasan, S.A., Yasser, F.M., Rahma, N., Farah, A., 2019. Adulteration of slimming products and its detection methods. *Glob J Pharmaceu Sci.* 7(5):555723.
- [12] de Carvalho, L.M., Martini, M., Moreira, A.P., de Lima, A.P., Correia, D., Falcão, T., Garcia, S.C., de Bairros, A.V., do Nascimento, P.C., Bohrer, D., 2011. Presence of synthetic

pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. *Forensic Sci Int.* 204(1-3):6-12.

[13] Kim, J.W., Kweon, S.J., Park, S.K., Kim, J.Y., Lee, J.H., Han, K.M., et al., 2013. Isolation and identification of a sibutramine analogue adulterated in slimming dietary supplements. *Food Addit Contam Part A* 30(7):1221-1229.

[14] Hachem, R., Assemat, G., Martins, N., Balayssac, S., Gilard, V., Martino, R., et al., 2016. Proton NMR for detection, identification and quantification of adulterants in 160 herbal food supplements marketed for weight loss. *J Pharm Biomed Anal.* 124:34-47.

[15] Neves, D.B.D.J., Caldas, E.D., 2017. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. *Food Chem Toxicol.* 105:194-202.

[16] European Medicines Agency (EMA), 2010. Sibutramine. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/sibutramine>. Accessed 21 Oct 2021.

[17] Rebiere, H., Guinot, P., Civade, C., Bonnet, P.A., Nicolas, A., 2012. Detection of hazardous weight-loss substances in adulterated slimming formulations using ultra-high-pressure liquid chromatography with diode-array detection. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 29(2):161-171.

[18] US Food and Drug Administration, 2015. Detox transforms health and nutrition issues voluntary nationwide recall of dietary supplements due to the presence of undeclared drug ingredients. Available at: <https://wayback.archive-it.org/7993/20170406095839/https://www.fda.gov/Safety/Recalls/ArchiveRecalls/2015/ucm433513.htm>. Accessed 22 Oct 2021.

[19] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015. Scientific opinion on the safety of caffeine, *EFSA J.* 13:4102-4122. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2015.4102/epdf>. Accessed 21 Oct 2021.

[20] Cannon, M.E., Cooke, C.T., McCarthy, J.S., 2001. Caffeine-induced cardiac arrhythmia: an unrecognised danger of healthfood products. *Med J Aust.* 174:520-521.

[21] Lieberman, H.R., Tharion, W.J., Shukitt-Hale, B., Speckman, K.L., Tulley, R., 2002. Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. *Psychopharmacology* 164:250-261.

[22] Venhuis, B.J., Zwaagstra, M.E., Van den Berg, J.D.J., Wagenaar, H.W.G., Van Riel, A.J.H., Barends, D.M., 2009. Trends in drug substances detected in illegal weight-loss medicines and dietary supplements. *RIVM Report* 370030002.

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

Студиска програма: трет циклус, докторски студии од областа медицински науки
и здравство, поле фармација

РЕЦЕНЗИЈА

на семинарски труд

Рецензентската комисија во состав проф. д-р Руменка Петковска (ментор), проф. д-р Лидија Петрушевска-Този и проф. д-р Тања Петреска Ивановска, до Стручниот совет на докторските студии на програмата ФАРМАЦИЈА при Фармацевтскиот факултет ја доставува рецензијата за оценка на семинарскиот труд од 3 семестар на Докторските студии од кандидатот Зоран Живиќ под наслов „ИДЕНТИФИКАЦИЈА И ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА НЕДЕКЛАРИРАНИ КОМПОНЕНТИ ВО ДОДАТОЦИТЕ НА ИСХРАНА ЗА СЛАБЕЕЊЕ“

ИЗВЕШТАЈ

Во приложениот семинарски труд, докторандот опишува развој и валидација на HPLC-DAD метод за идентификација и определување на недекларирани компоненти во додатоците на исхрана за слабеење. Мотивацијата за ова истражување произлегува од неопходноста за развој на брзи, точни и специфични аналитички методи што ќе овозможат истовремена идентификација и определување на повеќе синтетски супстанции, кои нелегално се додаваат во додатоците на исхраната за слабеење со цел да се постигнат побрзи ефекти во намалување на телесната тежина и поголема економска корист за производителите. Во воведниот дел, кандидатот објаснува дека оваа нелегална пракса е позната како адултерација на додатоците на исхраната за слабеење и се поврзува со намалување на квалитетот и ефикасноста на производот, а во некои случаи и со животозагрозувачки последици. Во продолжение кандидатот наведува дека недоволната контрола и отсуството на законска регулатива за задолжителна анализа на квалитетот и безбедноста на додатоците на исхраната за слабеење ја зголемуваат можноста од појава на неочекувани несакани ефекти кај корисниците на овие производи како последица на присуството на адултерации. Во оваа смисла е истакната потребата од воспоставување на соодветни аналитички методи што ќе овозможат сигурна детекција, недвосмислена идентификација, како и квантитативно определување на непознати адултерации во додатоците на исхраната за слабеење.

Примероци во ова истражување се производи од категоријата на додатоци на исхраната за слабење што се достапни на пазарот во Република Северна Македонија. Хроматографските услови во рамки на HPLC-DAD методот предложен за разделување на пет супстанции што често се користат за адултирање на додатоците на исхраната за слабење (сIBUTрамин, флуоксетин, фенолфталеин, кофеин и теобромин), како и нивна идентификација и квантификација се прикажани табеларно. Потоа, концизно се образложени валидациските параметри: специфичност, лимит на детекција (limit of detection, LOD), лимит на квантификација (limit of quantification, LOQ), линеарност, точност, прецизност и робустност.

Добиените резултати од валидацијата на методот ги исполнуваат критериумите за линеарност, точност, специфичност и прецизност, од каде произлегува дека методот е применлив за истовремена идентификација и определување на испитуваните пет супстанции во додатоците на исхрана за слабење. Во резултатите од скрининг анализата, кандидатот потенцира дека некои од анализираните додатоци на исхрана за слабење покрај активните компоненти што се декларирани на амбалажата на производот, содржат и други супстанции во нивниот состав наспроти тврдењата на производителите. Притоа, во два од испитуваните 19 производи како адултерација е детектиран флуоксетин, а во еден производ теобромин.

Во делот дискусија кандидатот ја образложува потребата од воспоставување на рутински применлив брз и едноставен аналитички метод, со кој ќе може да се спроведува истовремена анализа, вклучително идентификација и квантификација на повеќе супстанции што се користат за адултирање на додатоците на исхрана за слабење. Притоа, истакнати се предностите на опишаниот метод од аспект на моќта на методот за разделување на испитуваните супстанции, како и во однос на ексципиенсите, и способноста на методот да овозможи истовремена идентификација на пет супстанции кои имаат различни физичко-хемиски својства и различна поларност со оглед на тоа што припаѓаат на различни фармаколошки групи. Понатаму, докторандот наведува дека развиениот и валидиран метод е успешно применет за истовремена идентификација и квантификација на сIBUTрамин, флуоксетин, фенолфталеин, кофеин и теобромин во додатоци на исхрана за слабење достапни на пазарот во Република Северна Македонија, што според расположливите податоци е иницијален обид во нашата земја да се воспостави метод што би можел да се користи во контролни и регулаторни цели. Во завршниот дел од дискусијата накратко се дадени можните несакани ефекти поврзани со адултирање на додатоците на исхраната со испитуваните пет супстанции. Притоа, истакнувајќи ги фактите за зголемениот интерес на корисниците на производи за слабење и повеќекратните здравствени ризици поврзани со присутните адултерации, кандидатот ја подвлекува потребата од преземање на соодветни мерки за детекција на можни адултерации, а со тоа и неопходноста од брзи, едноставни и рутински применливи аналитички методи.

Врз основа на добиените резултати докторандот изведува заклучок дека воспоставениот метод се карактеризира со задоволителни својства за линеарност, прецизност, робустност и специфичност согласно најновите критериуми во интернационалните водичи и може да се користи за истовремена идентификација и квантификација на пет супстанции (сIBUTрамин, флуоксетин, фенолфталеин, кофеин и теобромин) како можни адултерации во додатоците на исхрана за слабење. Согласно резултатите, во заклучокот е истакнато краткото време на анализа со примена на предложениот метод, како и неговата едноставност и исплатливост, поради што е соодветен за примена во рутинските контролни лаборатории.

ОЦЕНКА

Комисијата оценува дека добиените резултати во пријавениот труд под наслов „ИДЕНТИФИКАЦИЈА И ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА НЕДЕКЛАРИРАНИ КОМПОНЕНТИ ВО ДОДАТОЦИТЕ НА ИСХРАНА ЗА СЛАБЕЕЊЕ“ на докторандот Зоран Живиќ претставуваат основа за потенцијална примена на валидираниот метод за истовремена идентификација и определување на пет супстанции (сIBUTРАМИН, флуоксетин, фенолфталеин, кофеин и теобромин) што често се користат за адултерирање на додатоци на исхраната за слабеење. Резултатите од направеното истражување претставуваат и еден вид на стимулативна препорака за воведување на построга контрола на составот на додатоците на исхраната за слабеење, како во насока на анализа на квалитетот и безбедносниот профил, така и во регулаторна смисла.

Рецензентска комисија:

Проф. д-р Еуменка Петковска (ментор),

Проф. д-р Лидија Петрушевска-Този

Проф. д-р Тања Петреска Ивановска

Скопје, 25.10.2021