

УТВЕРЖДАЮ

Начальник лаборатории химико-аналитического контроля и биотестирования
ФГУП «Научно-исследовательский институт
гигиены, профпатологии и экологии челове-
ка» Федерального медико-биологического
агентства, доктор химических наук



E.I. Savelyeva

Е.И. Савельева

«22»

мая

2015 г.

Заключение

по результатам исследования образца препарата «ОСТАРИН»

Образцы предоставлены: Envenom Pharm

Цель проведения исследований: идентификация и определение действующего начала в образце препарата «Остарин».

Объект исследования: лекарственная форма – капсулы

Определяемый компонент: 3-(4-цианофенокси)-N-[4-циано-3-(трифторметил)фенил]-2-гидрокси-2-метилпропанамид.

Дата поступления образца на исследование: 12.05.2015

Метод исследований: высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) и высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-селективным детектированием в режиме высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС).

Средства измерений:

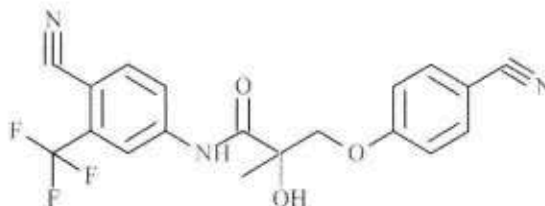
- жидкостной хроматограф LC-20 Prominence фирмы «Шимадзу» (Япония) с ультрафиолетовым детектором Prominence SPD-M20A.
- жидкостной хроматограф Ultimate 3000, с масс-селективным детектором Q-Exactive с орбитальной ионной ловушкой (Orbitrap).

Метод измерений: идентификацию 43-(4-цианофенокси)-N-[4-циано-3-(трифторметил)фенил]-2-гидрокси-2-метилпропанамид проводили методом ВЭЖХ-МС; определение содержания 3-(4-цианофенокси)-N-[4-циано-3-(трифторметил)фенил]-2-гидрокси-2-метилпропанамид в образце препарата «Остарин» методом ВЭЖХ-УФ.

Краткая характеристика образца, представленного на анализ

Торговое название препарата: «Остарин». Синонимы: Ostarine, Enobosarm, GTx-024, МК-2866). Лекарственная форма – капсулы, содержащие 25 мг активного компонента. Активным компонентом является вещество с химическим названием 3-(4-цианофенокси)-N-[4-циано-3-(трифторметил)фенил]-2-гидрокси-2-метилпропанамид. Брутто-формула: $C_{19}H_{14}F_3N_3O_3$. Внешний вид препарата: порошок в двухцветной, сине-белой капсуле.

Структурная формула активного компонента:



Подготовка образца к ВЭЖХ анализу

Навеску образца массой 10 мг растворяли в 1 мл ацетонитрила (чистый для ВЭЖХ). 10 мкл полученного раствора анализировали методом ВЭЖХ-УФ.

Для ВЭЖХ-МС/МС анализа приготовленный раствор разбавляли в 100 раз. 5 мкл полученного раствора анализировали методом ВЭЖХ-УФ.

Оборудование и условия проведения ВЭЖХ-УФ анализа: жидкостный хроматограф LC-20 Prominence фирмы «Шимадзу» (Япония) с ультрафиолетовым детектором Prominence SPD-M20A. Хроматограф оборудован колонкой Zorbax SB-C8 длиной 15 см, внутренним диаметром 4,6 мм, с размером частиц 1,8 мкм. Режим элюирования изократический (20% элюента Б): элюент А - 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, элюент Б – ацетонитрил. Объемная скорость подвижной фазы через колонку - 0,4 см³/мин. Температура термостата колонки - 35 °С. Длина волны 254 нм. Ширина щели - 4 нм. Объем пробы для анализа 10 мкл.

Оборудование и условия проведения ВЭЖХ-МС анализа: жидкостного хроматографа Ultimate 3000, с масс-селективным детектором Q-Exactive с орбитальной ионной ловушкой (Orbitrap). Режим ионизации: ионизация электрораспылением при атмосферном давлении. Хроматограф оборудован колонкой Zorbax SB-C8 длиной 15 см, внутренним диаметром 4,6 мм, с размером частиц 1,8 мкм. Режим элюирования градиентный: элюент А - 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, элюент Б – ацетонитрил. 5% Б от 0 до 1 мин, затем от 1 до 9 мин 90% Б, затем от 9 до 11 мин 90 % Б, затем от

11 до 14 мин 5 % Б. Объемная скорость подвижной фазы через колонку – 0.4 см³/мин. Температура термостата колонки – 5 °С. Объем пробы для анализа 5 мкл.

Условия работы масс-селективного детектора: поток газа-осушителя 45 у.е. Поток вспомогательного газа 12 у.е. Давление на распылителе 35 psi. Температура газа-осушителя 350 °С. Температура вспомогательного потока 400°С. Напряжение на капилляре 3500В. Детектирование в режиме сканирования по полному ионному току (SCAN): регистрация ионов в диапазоне m/z от 70 до 1000 на протяжении всего анализа. Детектирование основного компонента осуществляли по m/z 388.0914 [М-Н].

Определение действующего начала в образце препарата методом ВЭЖХ-УФ

На рисунке 1 и в таблице 1 представлены результаты исследования раствора образца препарата методом ВЭЖХ-УФ.

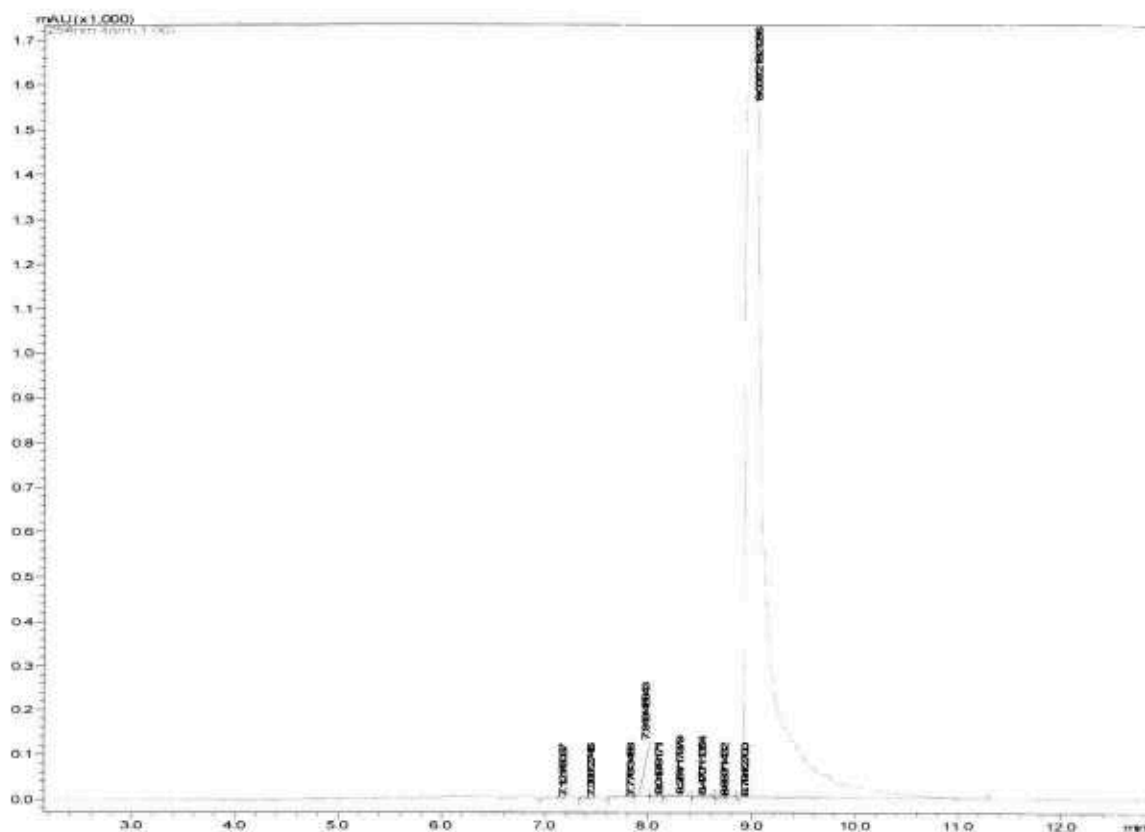


Таблица 1 – Характеристика пиков, представленных на ВЭЖХ-УФ - хроматограмме образца препарата «Остарин»

| Время удерживания, мин | Площадь, усл.ед. | Содержание компонента (%) |
|------------------------|------------------|---------------------------|
| 7.121 | 5037 | 0.02 |
| 7.388 | 2745 | 0.01 |
| 7.776 | 3458 | 0.01 |
| 7.919 | 45943 | 0.20 |
| 8.048 | 8171 | 0.03 |
| 8.251 | 17979 | 0.07 |
| 8.470 | 11354 | 0.04 |
| 8.683 | 1432 | 0.01 |
| 8.784 | 2700 | 0.01 |
| <i>9.006 (Остарин)</i> | 21921296 | 99.6 |

Хроматографический пик с временем удерживания 9.006 мин соответствует 4-((R)-2-((R)-2,2,2-трифтор-1-гидроксиэтил)пирролидин-1-ил)-2-трифтометил)бензонитрилу.

Хроматографические пики с временами удерживания 7.121, 7.388, 7.776, 7.919, 8.048, 8.251, 8.470, 8.683 и 8.784 мин соответствуют примесным компонентам.

Количественную оценку основного вещества проводили методом внутренней нормализации. Содержание активного компонента в образце препарата Остарин составило 99.6 %.

*Идентификация основного компонента в образце препарата
методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения*

На рисунке 2 приведена масс-хроматограмма и масс-спектр, полученные при анализе раствора образца препарата методом ВЭЖХ-МС.

Идентификацию проводили по точной массе m/z 388.0914, соответствующей $[M-H]^+$.

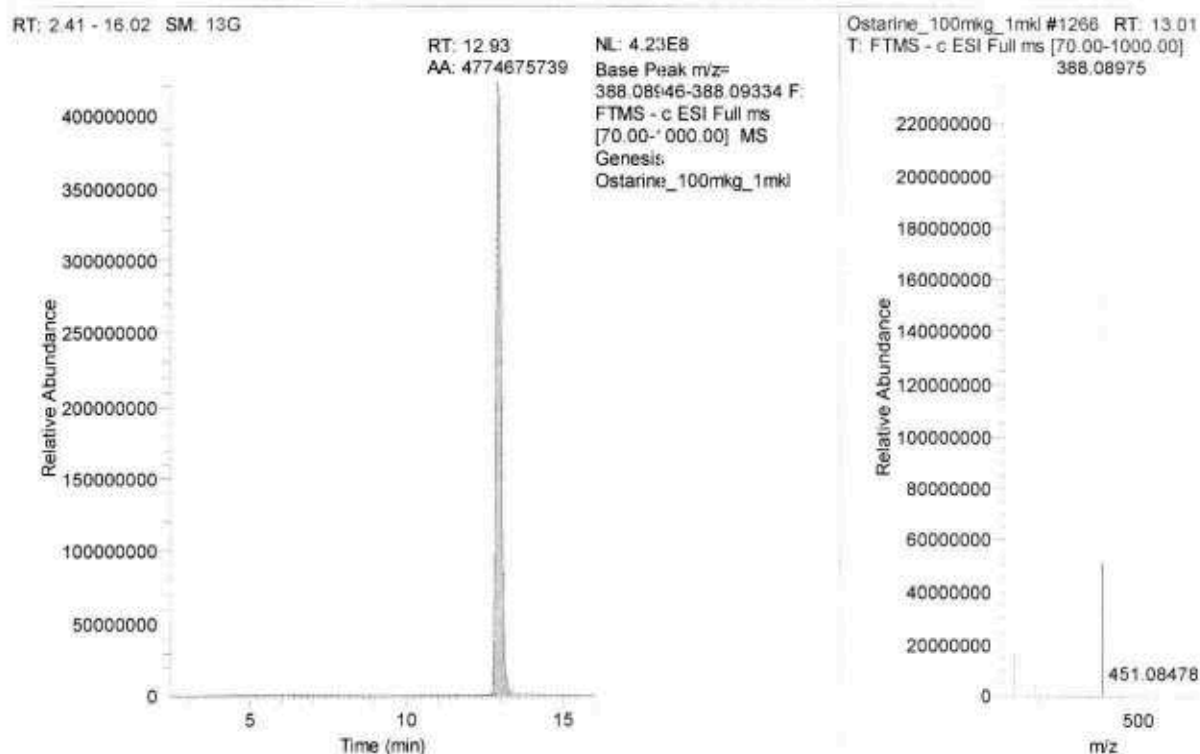


Рисунок 2– ВЭЖХ-МС - хроматограмма раствора образца препарата «Остарин»

Хроматографический пик с временем удерживания 12.93 мин соответствует определяемому соединению. Экспериментально зарегистрированная масса 388.08975, отклонение от теоретической составляет 4.2 ppm. Ошибка измерения точной массы и элементного состава иона (отличие измеренной массы от расчетной) < 5 ppm, идентификация является достоверной.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что в представленном на исследование образце основным веществом является 3-(4-цианофенокси)-N-[4-циано-3-(трифторметил)фенил]-2-гидрокси-2-метилпропанамид. Ориентировочное содержание определяемого вещества в препарате составляет 99.6 %.

Руководитель работ
ведущий научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 /Каракашев Г.В./