

УТВЕРЖДАЮ

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



E.I. Savelyeva

Е.И. Савельева

«22» мая 2015 г.

Заключение

по результатам исследования образца препарата «ЛИГАНДРОЛ»

Образцы предоставлены: Envenom Pharm

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

Объект исследования: лекарственная форма – капсулы

Определяемый компонент: 4-((R)-2-((R)-2,2,2-трифтор-1-гидроксиэтил)пирролидин-1-ил)-2-трифторметил)бензонитрил.

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.

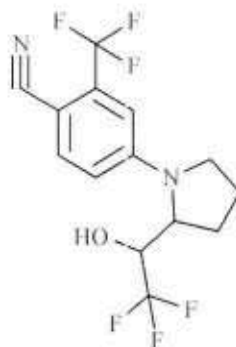
- жидкостной хроматограф Ultimate 3000, с масс-селективным детектором Q-Exactive с орбитальной ионной ловушкой (Orbitrap).

Метод измерений: идентификацию 4-((R)-2-((R)-2,2,2-трифтор-1-гидроксиэтил)пирролидин-1-ил)-2-трифторметил)бензонитрила проводили методом ВЭЖХ-МС; определение содержания 4-((R)-2-((R)-2,2,2-трифтор-1-гидроксиэтил)пирролидин-1-ил)-2-трифторметил)бензонитрила в образце препарата «Лигандрол» методом ВЭЖХ-УФ.

Краткая характеристика образца, представленного на анализ

Торговое название препарата: «Лигандрол». Синонимы: Ligandrol, LGDRx, LGD-4033. Лекарственная форма – капсулы, содержащие 10 мг активного компонента. Активным компонентом является вещество с химическим названием 4-((R)-2-((R)-2,2,2-трифтор-1-гидроксиэтил)пирролидин-1-ил)-2-трифторметил)бензонитрил. Брутто-формула: $C_{14}H_{12}F_6N_2O$. Внешний вид препарата: порошок в двухцветной, красно-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 339.0926 $[M+H]^+$.

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.

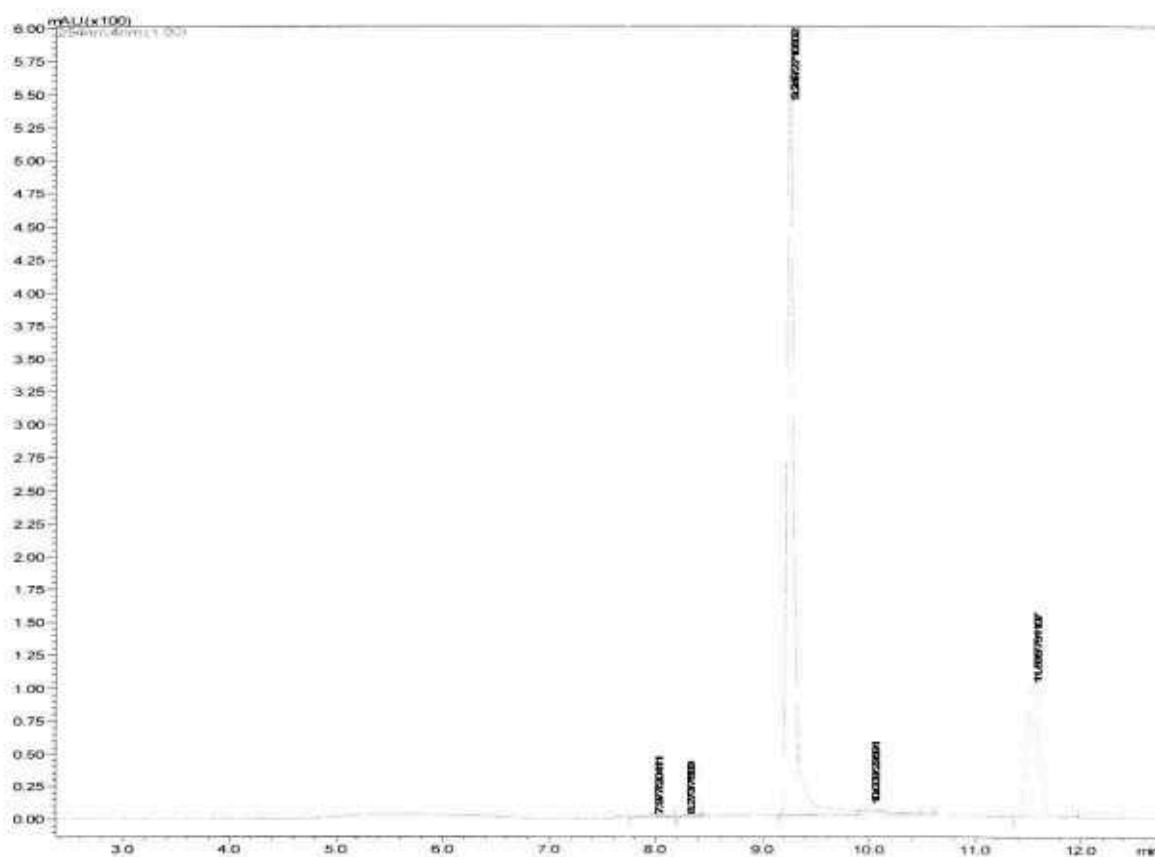


Рисунок 1 – ВЭЖХ-УФ – хроматограмма раствора образца препарата «Лигандрол»

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

Время удерживания, мин	Площадь, усл.ед.	Содержание компонента (%)
7.977	20411	0.6
8.273	7599	0.2
9.246 («Лигандрол»)	2710502	76.2
10.009	29591	0.8
11.535	791107	22.2

Хроматографический пик с временем удерживания 9.246 мин соответствует 4-((R)-2-((R)-2,2,2-трифтор-1-гидроксиэтил)пирролидин-1-ил)-2-трифторметил)бензонитрилу. Хроматографические пики с временами удерживания 7.977, 8.273, 10.009, и 11.535 мин соответствуют примесным компонентам.

Количественную оценку основного вещества проводили методом внутренней нормализации. Содержание активного компонента в образце препарата Лигандрол составило 76.2 %.

*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 339.09266, соответствующей $[M+H]^+$.

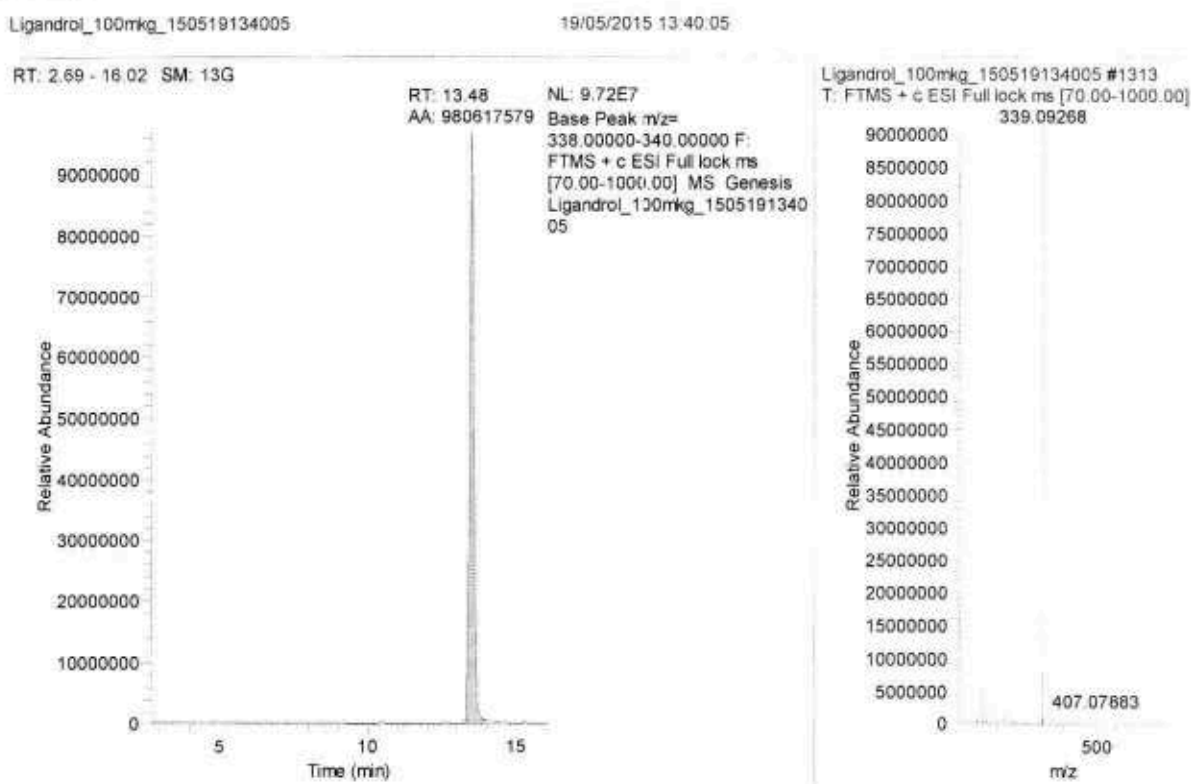


Рисунок 2– ВЭЖХ-МС - хроматограмма раствора образца препарата «Лигандрол»

Хроматографический пик с временем удерживания 13.48 мин соответствует определяемому соединению. Экспериментально зарегистрированная масса 339.09268, отклонение от теоретической составляет менее 0.1 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 4-((R)-2-((R)-2,2,2-трифтор-1-гидроксиэтил)пирролидин-1-ил)-2-трифтометил)бензонитрил. Ориентировочное содержание определяемого вещества в препарате составляет 76.2 %.

Руководитель работ
ведущий научный сотрудник,
кандидат биологических наук



/Каракашев Г.В./