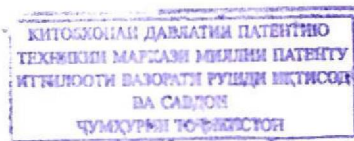




Республика Таджикистан



(19) **TJ** (11) **491**

**МПК С 07 К 5/062;
А 61 К 38/05**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 13000993

(22) 23.09.2013

(46) Бюл. 137, 2018

(71) Бобиев Г.М. (TJ).

(72) Бобиев Г.М. (TJ); Холназаров Б.М.

(TJ); Бунятян Н.Д. (TJ); Шахматов А.Н.

(TJ).

(73) Бобиев Г.М. (TJ).

(54) **Фармацевтическая композиция.**

(56) 1. Тимоген. Инструкция по медицинскому применению.

2. Глутоксим. Инструкция по медицинскому применению.

3. Бобиев Г.М. Способ получения иммуностимулирующего препарата тимогара и его состав. Патент Республики Таджикистан № TJ 283. Оpubл. Бюл.; 4(20) 13.12.2000 г., приоритет 23.10.1998 г.

4. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности /Методические рекомендации. М.: - Изда-

тельство «Спорт и культура – 2000», 2007, 192 с.

(57) Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к лекарственным композициям и может быть использовано в медицине для регуляции деятельности иммунной системы человека и животных. Целью изобретения является обеспечение безболезненности введения тимогара. Указанная цель достигается тем, что в состав фармацевтической композиции вводится новокаина гидрохлорид в концентрации 0,25%. Таким образом, предлагается композиция состава: дипептид изолейцил-триптофан – 0,1 г, новокаина гидрохлорид – 2,5 г, воды – до 1 л. Применение указанной композиции позволяет: исключить болезненность введения препарата, понизить вероятность внешнего загрязнения препарата.

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к лекарственным формам и может быть использовано в медицине для регуляции деятельности иммунной системы человека и животных.

Известна лекарственная форма препарата тимоген, представляющая собой 0,01%-ный раствор натриевой соли дипептида глутамил-триптофан в 0,9%-ном физиологическом растворе натрия хлорида [1].

Известна лекарственная форма препарата глутоксим [2], представляющая собой раствор бис – (гамма – L-глутамил)-L-цистеинил-бис-глицина динатриевой соли в 0,9%-ном физиологическом растворе натрия хлорида.

Недостатком указанных композиций является при повышенной индивидуальной чувствительности болезненность введения препарата. В таких случаях рекомендуется смешивать препарат с 1-2 мл 0,5%-ного раствора новокаина. Однако при этом повышается вероятность загрязнения препарата внешними агентами.

Прототипом заявляемой композиции является препарат тимогар, представляющий собой 0,01%-ный водный раствор дипептида изолейцил-триптофан [3]. Недостатком данной композиции является болезненность введения препарата.

Целью изобретения является обеспечение безболезненности введения тимогара.

Указанная цель достигается тем, что в состав фармацевтической композиции вводится новокаина гидрохлорид в концентрации 0,25%.

Таким образом, предлагается композиция состава:

дипептид изолейцил - триптофан – 0,1 г
новокаина гидрохлорид – 2,5 г
вода – до 1 л.

Применение указанной композиции позволяет:

1. Исключить болезненность введения препарата.
2. Понизить вероятность внешнего загрязнения препарата.

Пример 1

В реактор помещают 0,1 г дипептида изолейцил-триптофан, 2,5 г новокаина гидрохлорида и 1 л воды для инъекций. Перемешивают до полного растворения веществ.

Пример 2.

Количественное определение новокаина.

5 мл препарата помещают в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят водой до метки и тщательно перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят водой до метки и тщательно перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при 290 нм. Одновременно измеряют оптическую плотность стандартного раствора новокаина, приготовленного аналогичным образом, исходя из 0,25%-ного раствора.

Содержание новокаина в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_1}{D_0} \cdot 0,25$$

Содержание новокаина в препарате должно составлять 0,242-0,258%.

Перед применением методики была проведена ее валидация.

Для проверки линейности разработанной методики готовили растворы состава с концентрациями от 80 до 120% с шагом 5% согласно [4], разбавляли согласно разработанной методике и измеряли значение оптической плотности при 290 нм.

Полученные данные приведены в таблице 1 и на Фиг.1 и 2. (См. таблица 1.)

Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Величина коэффициента корреляции должна быть не ниже 0,99. Коэффициент корреляции составил 0,999.

Для определения параметров линейности использовали методические рекомендации [4]. Методом наименьших квадратов была рассчитана регрессионная прямая $Y_i = bX_i + a$, где a – свободный член для рассчитанной регрессионной прямой (отрезок, отсекаемый на оси ординат), b – угол наклона рассчитанной регрессионной

прямой: $b = 0,01$, $a = 0,058$. Свободный член a согласно [4] должен удовлетворять условию

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n-2) \cdot s_a,$$

где s_a – стандартное отклонение для отрезка, который отсекается на оси ординат (для рассчитанной регрессионной прямой), t – коэффициент Стьюдента для одностороннего

распределения, доверительной вероятности 95% и числа степеней свободы $f = n - 2$.

При выражении концентрации новокаина в %:

Для нахождения уравнения прямой $Y = b \cdot X + a$ по полученным данным составляли и решали систему уравнений:

А. С использованием концентрации в анализируемом растворе после разбавления:

$$a = \begin{cases} \frac{\sum X_i^2 \cdot b + \sum X_i \cdot a = \sum X_i \cdot Y_i}{\sum X_i \cdot b + 9 \cdot a = \sum Y_i} \end{cases} \begin{cases} 0,00000229 \cdot b + 0,0045 \cdot a = 0,001463 \\ 0,0045 \cdot b + 9 \cdot a = 2,879 \end{cases}$$

$$0,00000229 \cdot b + 0,0045 \cdot \frac{(2,879 - 0,0045 \cdot b)}{9} = 0,001463$$

$$0,00000229 \cdot b + \frac{0,0129555 - 0,00002025 \cdot b}{9} = 0,001463$$

$$0,00000229 \cdot b + 0,0014395 - 0,00000225 \cdot b = 0,001463$$

$$0,00000004 \cdot b = 0,001463 - 0,0014395 = 0,0000235$$

$$b = 587,5$$

$$a = \frac{2,879 - 0,0045 \cdot b}{9} = \frac{2,879 - 0,0045 \cdot 587,5}{9} = \frac{2,879 - 2,64375}{9} = \frac{0,23525}{9} = 0,0261$$

$$D = 587,5 \cdot C + 0,0261$$

В нашем случае $\Delta_A = 2,13 \cdot 0,05 = 0,1065$, рассчитанное значение свободного члена $a = 0,0261$, что ниже Δ_A , следовательно соблюдается критерий статистической незначимости.

Б. С использованием концентрации в составе:

$$\begin{cases} \sum X_i^2 \cdot b + \sum X_i \cdot a = \sum X_i \cdot Y_i \\ \sum X_i \cdot b + 9 \cdot a = \sum Y_i \end{cases} \begin{cases} 0,571875 \cdot b + 2,25 \cdot a = 0,731738 \\ 2,25 \cdot b + 9 \cdot a = 2,879 \end{cases}$$

$$a = \frac{2,879 - 2,25 \cdot b}{9}$$

$$0,571875 \cdot b + \frac{2,25 \cdot (2,879 - 2,25 \cdot b)}{9} = 0,731738$$

$$0,571875 \cdot b + \frac{6,47775 - 5,0625 \cdot b}{9} = 0,731738$$

$$0,571875 \cdot b + 0,71975 - 0,5625 \cdot b = 0,731738$$

$$0,009375 \cdot b = 0,731738 - 0,71975 = 0,011988$$

$$b = 1,279$$

$$a = \frac{2,879 - 2,25 \cdot 1,279}{9} = \frac{2,879 - 2,87775}{9} = \frac{0,00125}{9} = 0,000139$$

$$D = 1,279 \cdot C + 0,000139$$

Для определения повторяемости методики проводили количественное определение новокаина в одном образце препарата в 10 повторностях. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 2% и составил 0,282% (табл. 2), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости. (См. таблица 2.)

Определение воспроизводимости методики определения новокаина проводили 2 аналитика в 5 повторностях на 5 образцах препарата (табл.3). (См. таблица 3.)

Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%. Среднее его значение находилось в пределах 0,216-0,337%, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания новокаина в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору до получения концентрации 0,25% (таблица 4). Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, должен находиться в пределах $100 \pm 5\%$. (См. таблица 4.)

Данные таблицы 4 показывают, что средний процент восстановления находится в пределах от -102,01 до +101,19, среднее его значение составляет 100,0%.

Таким образом, методика легко воспроизводима, доступна, занимает минимум рабочего времени, не требует дорогостоящих реактивов. Она позволяет объективно оценивать количественное содержание новокаина в присутствии дипептида изолейцил-триптофан.

Пример 3.

Количественное определение дипептида изолейцил-триптофан.

15 мл препарата подщелачивают до pH 11,0,1 н раствором натрия гидроксида и 4 раза (4x10 мл) экстрагируют этилацетатом. У четвертой порции этилацетата измеряют оптическую плотность при 290 нм. Если значение оптической плотности на уровне фоновых значений, обработку этилацетатом прекращают. Этилацетатный слой отделяют. Водный слой переносят в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят водой до метки. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при 278 нм. Концентрацию дипептида в мкг/мл рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_1}{D_0} \cdot 100$$

Перед применением эту методику также было необходимо валидировать. Валидация была проведена в соответствии с требованиями [4].

Первым этапом валидации методики было изучение линейности метода. Для этого готовили растворы дипептида с концентрациями от 80 до 120% с шагом 5% согласно [4] и измеряли значение оптической плотности. Полученные данные приведены в таблице 5 и на Фиг.3.

Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Величина коэффициента корреляции должна быть не ниже 0,99. Коэффициент корреляции составил 0,999.

Для определения параметров линейности использовали методические рекомендации [4]. (См. таблица 5.)

Методом наименьших квадратов была рассчитана регрессионная прямая

$$Y_i = bX_i + a,$$

где a – свободный член для рассчитанной регрессионной прямой (отрезок, отсекаемый на оси ординат), b – угол наклона рассчитанной регрессионной прямой: $b = 0,01$, $a = 0,058$. Свободный член a согласно [4] должен удовлетворять условию

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n - 2) \cdot s_a,$$

где s_a – стандартное отклонение для отрезка, который отсекается на оси ординат (для рассчитанной регрессионной прямой), t – коэффициент Стьюдента для одностороннего распределения, доверительной вероятности 95% и числа степеней свободы $f = n - 2$.

А. При выражении концентрации тимогара в мкг/мл:

Для нахождения уравнения прямой $Y = b \cdot X + a$ по полученным данным составляли и решали систему уравнений:

$$\begin{cases} \sum X_i^2 \cdot b + \sum X_i \cdot a = \sum X_i \cdot Y_i & \begin{cases} 91500 \cdot b + 900 \cdot a = 920,325 \\ 900 \cdot b + 9 \cdot a = 9,052 \end{cases} \\ \sum X_i \cdot b + 9 \cdot a = \sum Y_i & \end{cases}$$

$$a = \frac{9,052 \cdot 900 - b}{9}$$

$$91500 \cdot b + 900 \cdot \frac{(9,052 - 900 \cdot b)}{9} = 920,325$$

$$91500 \cdot b + 8146,8 - 81000 \cdot b = 920,325$$

$$91500 \cdot b + 905,2 - 90000 \cdot b = 920,325$$

$$1500 \cdot b = 920,325 - 905,2 = 15,125$$

$$b = 0,01$$

$$a = \frac{9,052 - 900 \cdot b}{9} = \frac{9,052 - 900 \cdot 0,01}{9} = \frac{9,052 - 9}{9} = \frac{0,052}{9} = 0,0058$$

$$D = 0,01 \cdot C + 0,0058$$

В нашем случае $\Delta_A = 2,13 \cdot 0,05 = 0,1065$, рассчитанное значение свободного члена $a = 0,0058$, что ниже Δ_A , следовательно соблюдается критерий статистической незначимости.

Для определения повторяемости методики проводили количественное определение одного образца препарата в 10 повторностях. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 2% и составил 0,66% (табл. 6), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости. (См. таблица 6.)

Определение воспроизводимости методики определения тимогара проводили 2

аналитика в 5 повторностях на 5 образцах препарата (табл.7).

Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%. Среднее его значение находилось в пределах 0,41-0,59%, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания тимогара в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору до получения концентрации 100 мкг/мл (таблица 8). Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, должен находиться в пределах $100 \pm 5\%$. (См. таблица 7.)

Данные таблицы 8 показывают, что средний процент восстановления находится в пределах от -101,71 до +101,39, среднее его значение составляет 100,0%. (См. таблица 8.)

Таким образом, методика легко воспроизводима, доступна, занимает минимум рабочего времени, не требует дорогостоящих реактивов. Она позволяет объективно определять количество дипептида при его совместном присутствии в препарате.

Пример 4

Стабильность разработанного состава.

После разработки методик количественного определения компонентов были проведены исследования стабильности разработанного состава. Полученные результаты приведены в таблице 9. (См. таблица 9.)

Как показывают полученные результаты новая композиция достаточно стабильна в условиях длительного хранения.

Как показывают полученные данные, разработанная композиция стабильна в условиях длительного хранения при температурах 4 и 35°C.

Формула изобретения

Фармацевтическая композиция, содержащая дипептид изолейцил-триптофан и воду, *отличающаяся* тем, что дополнительно содержит новокаина гидрохлорид при следующем соотношении компонентов:

дипептид изолейцил - триптофан –
0,1 г
новокаина гидрохлорид – 2,5 г
вода – до 1 л.

Компьютерный набор: Фатхуллова М.С.

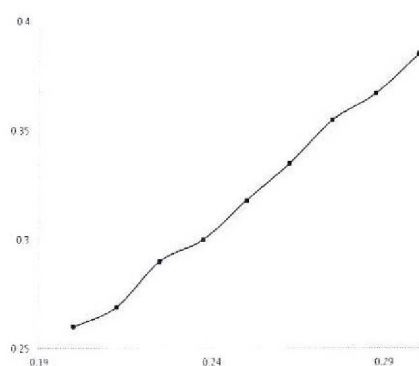
Заказ

Тираж

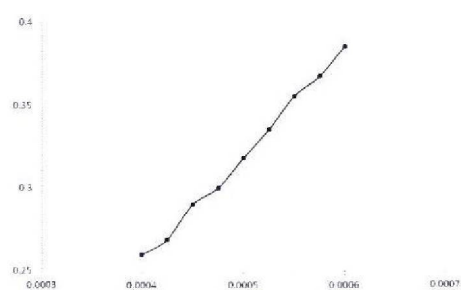
Подписное

Национальный патентно-информационный центр РТ
734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а.

Фармацевтическая композиция

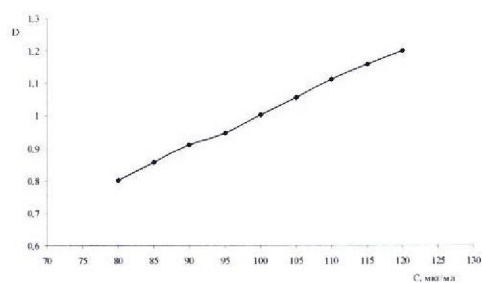


Фиг.1. График линейности методики количественного определения новокаина по его процентному содержанию в составе



Фиг.2. Линейность методики количественного определения новокаина по его концентрации в анализируемом растворе (после разбавления).

Фармацевтическая композиция



Фиг.3. Линейность метода количественного определения содержания дипептида изолейцил-триптофан.

Таблица 1.

Линейность спектрофотометрического метода определения количественного содержания тимогара

№ измерения	Содержание, % от нормируемого значения	С, %		Аналитический отклик (оптическая плотность)
		В составе	В анализируемом растворе после разбавления	
1	120	0,2	0,0004	0,26
2	115	0,2125	0,000425	0,269
3	110	0,225	0,00045	0,29
4	105	0,2375	0,000475	0,3
5	100	0,25	0,0005	0,318
6	95	0,2625	0,000525	0,335
7	90	0,275	0,00055	0,355
8	85	0,2875	0,000575	0,367
9	80	0,3	0,0006	0,385

Таблица 2.

Определение повторяемости разработанной методики.

Повторность		Аналитический отклик (оптическая плотность)		Содержание новоквина, %
1	2	0,319	0,321	
1		0,319	0,321	0,2496
2				0,2506
3		0,317		0,247625
4		0,327		0,25525
5		0,318		0,248125
6		0,319		0,2491
7		0,315		0,246375
8		0,318		0,248625
9		0,322		0,251325
10		0,325		0,254075
Среднее значение		0,32		0,25007
стандартное отклонение, %		0,66		0,282

Определение воспроизводимости методики

Таблица 3

повторность	аналитик	образцы									
		№1		№2		№3		№4		№5	
		D*	C**	D*	C**	D*	C**	D*	C**	D*	C**
1	1	0.3160	0.247	0.3170	0.248	0.3150	0.246	0.3220	0.252	0.3150	0.246
2	1	0.3190	0.249	0.3240	0.253	0.3230	0.252	0.3150	0.246	0.3190	0.249
3	1	0.3250	0.254	0.3140	0.245	0.3160	0.247	0.3200	0.25	0.3240	0.253
4	1	0.3150	0.246	0.3220	0.252	0.3220	0.252	0.3250	0.254	0.3140	0.245
5	1	0.3230	0.252	0.3150	0.246	0.3250	0.254	0.3180	0.248	0.3230	0.252
6	2	0.3210	0.251	0.3270	0.255	0.3170	0.248	0.3170	0.2478	0.3210	0.251
7	2	0.3160	0.247	0.3230	0.252	0.3180	0.248	0.3180	0.248	0.3160	0.247
8	2	0.3200	0.25	0.3170	0.248	0.3190	0.249	0.3190	0.249	0.3190	0.249
9	2	0.3240	0.253	0.3230	0.252	0.3140	0.245	0.3220	0.252	0.3200	0.25
10	2	0.3150	0.246	0.3250	0.254	0.3200	0.25	0.3180	0.248	0.3170	0.248
Среднее значение		0.3194	0.2495	0.3207	0.2505	0.3189	0.2491	0.3194	0.2495	0.3188	0.249
Относительное стандартное отклонение (RSD), %			0,282		0,337		0,267		0,216		0,247

* - значение оптической плотности

** - концентрация новокаина, %

Таблица 4

Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)

№	Содержание ново-каина, %	Добавлено ново-каина, %	Ожидаемое содержание, %	Полученное содержание, %	Ошибка, %
1	0.05	0.195	0.25	0.245	1.190
2	0.08	0.171	0.25	0.251	-1.210
3	0.1	0.153	0.25	0.253	-2.010
4	0.12	0.13	0.25	0.250	-0.810
5	0.17	0.079	0.25	0.249	-0.410
6	0.2	0.047	0.25	0.247	0.390
7	0.22	0.026	0.25	0.246	0.790
Среднее значение					0.000
Относительное стандартное отклонение (RSD), %					0.22%

Таблица 5.

Линейность спектрофотометрического метода определения количественного содержания дипептида изолейцил-триптофан

№ измерения	Содержание, % от нормируемого значения	C, мкг/мл	Аналитический отклик (оптическая плотность)
1	120	120	1.201
2	115	115	1.16
3	110	110	1.112
4	105	105	1.06
5	100	100	1.003
6	95	95	0.948
7	90	90	0.91
8	85	85	0.857
9	80	80	0.801

Определение повторяемости разработанной методики.

Таблица 6.

Повторность	Аналитический отклик (оптическая плотность)	Содержание тимогара, мкг/мл
1	1,004	99,84
2	1,008	100,24
3	0,996	99,05
4	1,013	100,73
5	0,998	99,25
6	1,002	99,64
7	0,996	99,05
8	1	99,45
9	1,011	100,53
10	1,012	100,63
Среднее значение	1,004	99,84
стандартное отклонение, %	0,66	0,66

Таблица 7
Определение воспроизводимости методики

повторность	аналитик	образец									
		№1	№2	№3	№4	№5					
		D*	C**	D*	C**	D*	C**	D*	C**	D*	C**
1	1	0,997	99,15	0,999	99,35	0,997	99,15	1,013	100,73	0,997	99,15
2	1	1,002	99,64	1,013	100,73	1,005	99,94	0,997	99,15	1,002	99,64
3	1	1,01	100,44	0,998	99,25	0,998	99,25	1,007	100,14	1,004	99,84
4	1	0,995	98,95	1,011	100,53	1,011	100,53	1,001	99,55	0,998	99,25
5	1	1,011	100,53	0,995	98,95	1,013	100,73	0,999	99,35	0,995	98,95
6	2	1,009	100,34	1,002	99,64	0,996	99,05	0,996	99,05	1,007	100,14
7	2	1,004	99,84	1,006	100,04	0,999	99,35	0,998	99,25	0,999	99,35
8	2	1,005	99,94	0,997	99,15	1,002	99,64	1,004	99,85	1,002	99,64
9	2	1,008	100,24	1,004	99,84	1,001	99,55	1,008	100,24	1,004	99,84
10	2	0,997	99,15	1,001	99,54	0,999	99,35	1	99,44	1,007	100,14
Среднее значение		1,004	99,828	1,0026	99,70	1,0021	99,65	1,0023	99,677	1,0015	99,59
Относитель-ное стандартное отклонение (RSD), %			0,58		0,59		0,58		0,55		0,41

* - значение оптической плотности

** - концентрация тимогара, мкг/мл

Таблица 8

Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)

№	Содержание тимо-гара, мкг/мл	Добав-лено тимо-гара, мкг/мл	Ожи-даемое содер-жание, мкг/мл	Полу-ченное содержание, мкг/мл	Ошибка, %
1	20	80	100	100,8	-0,81
2	30	70	100	101,7	-1,71
3	40	60	100	98,6	1,39
4	50	50	100	100	-0,01
5	60	40	100	98,7	1,29
6	80	20	100	99,7	0,29
7	90	10	100	100,4	-0,41
Среднее значение					99,985
Относительное стандартное отклонение (RSD), %					1,11
					1,11

Таблица 9.

Стабильность разработанной композиции тимогара в условиях длительного хранения

Время (месяцы)	Характеристика исследуемого параметра и норма															
	Описание	Прозрачность		Цветность		Механические включения	pH	Стерильность	Пирогенность	Посторонние примеси (ТСХ)		Содержание новокаина, 0,242-0,258%		Содержание дипептида 0,09-0,11 мг/мл		
	4°C	35°C	4°C	35°C	4°C	35°C	4°C	35°C	4°C	35°C	4°C	35°C	4°C	35°C	4°C	35°C
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,1
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,1
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,1
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,1
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,1
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,1
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,1
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,1
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,099
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,099
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,098
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,9	0,9	0,1	0,098

Примечание: «+» – параметр соответствует требованиям ФСП 42 ТЈ-00001-08 «Тимогар».