

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2011/075002 A1

(43) Дата международной публикации
23 июня 2011 (23.06.2011)

РСТ

- (51) Международная патентная классификация: **G01N 30/88** (2006.01) **drovna** [RU/RU]; ул. Профсоюзная, 130/1-274, Москва, 117321, Moscow (RU).
- (21) Номер международной заявки: РСТ/RU2010/000627 (74) Агент: **ЧИКИН, Иван Анатольевич (CHIKIN, Ivan Anatol'evich)**; а/я 4, Москва, 115372, Moscow (RU).
- (22) Дата международной подачи: 28 октября 2010 (28.10.2010) (81) **Указанные государства** (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (25) Язык подачи: Русский
- (26) Язык публикации: Русский
- (30) Данные о приоритете: 201000173 18 декабря 2009 (18.12.2009) EA
- (71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US): **НЕКОММЕРЧЕСКОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЦИТОХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ" (NEKOMMERCHESKOE UCHREZHDENIE "NAUCHNO-ISSLEDOVATEL'SKIY INSTITUT TSITOKHIMII I MOLEKULARNOY FARMKOLOGII")** [RU/RU]; ул. 6-я Радиальная, 24/14, Москва, 115404, Moscow (RU).
- (72) Изобретатели; и
- (75) Изобретатели/Заявители (только для US): **КОМИССАРОВА, Ирина Алексеевна (KOMISSAROVA, Irina Alekseevna)** [RU/RU]; ул. Медиков, 24-47, Москва, 115304, Moscow (RU). **НАРЦИССОВ, Ярослав Юрикович (NARTISSOV, Yaroslav Ryurikovich)** [RU/RU]; ул. Медиков, 24-47, Москва, 115304, Moscow (RU). **ВОЛЧЕНКОВА, Татьяна Александровна (VOLCHENKOVA, Tatiana Aleksan-**
- (84) **Указанные государства** (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

— об авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

Опубликована:

— с отчетом о международном поиске (статья 21.3)

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING IN A TABLET THE AMOUNT OF ACTIVE INGREDIENTS IN THE FORM OF THE AMINO-ACIDS GLYCINE, L-GLUTAMIC ACID AND L-CYSTINE

(54) Название изобретения : СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ТАБЛЕТКЕ КОЛИЧЕСТВА АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ВИДЕ АМИНОКИСЛОТ ГЛИЦИНА, L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И L-ЦИСТИНА

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to carry out a reliable, qualitative and quantitative determination in a short time, a single analysis and with a simple sample preparation, of three amino acids, namely glycine, L-glutamic acid and L-cystine, present in equal parts in the general composition of a tablet. The method comprises the following sequential steps: preparing in an aqueous sodium carbonate solution, a standard solution of the amino acids glycine, L-glutamic acid and L-cystine and a solution of the tablets to be tested including the above amino acids in equal parts from the tablet powder; preparing solutions of the tosyl derivatives of the standard amino acid solution and the solution of the tablets to be tested by adding to the standard solution and the amino acid solution to be tested an excess amount of a modifying reagent obtained by dissolving p-toluene sulfochloride in acetonitrile, and by adding a stop reagent in the form of an orthophosphoric acid solution; carrying out high-efficiency liquid chromatography of the solutions of the tosyl derivatives of the standard amino acid solution and the solution of the tablets to be tested using as mobile phase an aqueous solution of potassium phosphate single-substituted by acetonitrile; identifying the amino acids on the obtained chromatograms based on the residence time of the standard solution and the solution to be tested so as to determine the surface areas of the amino acid peaks; calculating the content of each amino acid in the tablet based on the determined surface areas of the amino acid peaks in the standard amino acid solution and in the solution of the tablets to be tested, and based on the weights of the amino acids in the standard amino acid solution, the weight of the tablet powder in the solution of tablets to be tested, and the mass of the tablet.

(57) Реферат: Задача изобретения заключается в надежном качественном

[продолжение на следующей странице]

WO 2011/075002 A1



и количественном определении за короткий промежуток времени за один анализ при простой пробоподготовке входящих в общую композицию таблетки в равных долях трех аминокислот L-цистина, L-глутаминовой кислоты и глицина. Способ включает последовательное выполнение: приготовления в водном растворе натрия карбоната стандартного раствора аминокислот глицина, L-глутаминовой кислоты и L-цистина и испытуемого раствора таблеток, включающих перечисленные аминокислоты в равных долях, из порошка таблеток; приготовления растворов тозил-производных стандартного раствора аминокислот и испытуемого раствора таблеток введением в стандартный раствор и в испытуемый раствор аминокислот избыточного количества модифицирующего реагента, приготовленного растворением п-толуолсульфохлорида в ацетонитриле, а затем введением стоп-реагента в виде раствора ортофосфорной кислоты; проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии растворов тозил-производных стандартного раствора аминокислот и испытуемого раствора таблеток с использованием в качестве мобильной фазы водного раствора калия фосфата однозамещенного с ацетонитрилом; осуществление идентификации аминокислот на полученных хроматограммах по времени удерживания стандартного раствора и испытуемого раствора с определением площадей пиков аминокислот; расчет содержания каждой аминокислоты в таблетке по определенным площадям пиков аминокислот в стандартном растворе аминокислот и в испытуемом растворе таблеток, а также по величинам навесок аминокислот в стандартном растворе аминокислот, навески порошка таблеток в испытуемом растворе таблеток и по величине массы таблетки.

**Способ определения в таблетке количества активных компонентов
в виде аминокислот глицина, L-глутаминовой кислоты и L-цистина**

Область применения

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а
5 конкретно к способу определения в таблетке количества активных
компонентов в виде аминокислот: глицина, L-глутаминовой кислоты и
L-цистина.

Уровень техники

Исследования лекарственных возможностей композиции аминокислот
10 L-цистина, L-глутаминовой кислоты и глицина проводятся достаточно давно.
Известен препарат, включающий аминокислоты: L-цистин, L-глутаминовую
кислоту и глицин при массовом соотношении компонентов 1:1:1 и при
количественном содержании 0,1 г для каждого компонента, который
используется в качестве средства, индуцирующего биосинтез глутатиона,
15 активность глутатионтрансферазы и оказывающего антиоксическое,
радиопротекторное и антигипоксическое действие (RU 2096034 С1, МПК 6
А61К 31/195, 1997).

При производстве такого лекарственного препарата или аналогичного,
включающего равные доли аминокислот L-цистина, L-глутаминовой кислоты и
20 глицина в большем или меньшем количестве, необходим надежный и простой
метод контроля лекарственного препарата, предусматривающий качественное
и количественное определение перечисленных аминокислот.

Известен способ качественного и количественного определения
аминокислот с использованием высокоэффективной жидкостной
25 хроматографии, при котором хроматографическое определение производится с
использованием предварительно полученных флуоресцентных N₂-
бензоксазоллил производных аминокислот.

Этот известный способ не позволяет с достаточной степенью точности
определить все входящие в препарат, представляющий собой таблетку,
30 аминокислоты, в частности глицин и L-глутаминовую кислоту, пики которых
на хроматограммах при недостаточном времени удерживания могут

пересекаться, чему дополнительно способствуют наряду с свойствами этих аминокислот входящие в таблетку вспомогательные вещества, а также равная концентрация аминокислот.

Сущность изобретения

- 5 Задача изобретения заключается в надежном качественном и количественном определении за короткий промежуток времени за один анализ при простой пробоподготовке входящих в общую композицию таблетки в равных долях трех аминокислот: L-цистина, L-глутаминовой кислоты и глицина.
- 10 Эту задачу решает способ определения в таблетке количества активных компонентов в виде аминокислот: глицина, L-глутаминовой кислоты и L-цистина, который включает последовательное выполнение следующих операций:
- 15 - приготовление в водном растворе натрия карбоната стандартного раствора аминокислот глицина, L-глутаминовой кислоты и L-цистина и испытуемого раствора таблеток, включающих перечисленные аминокислоты в равных долях, из порошка таблеток;
 - 20 - приготовление растворов тозил-производных стандартного раствора аминокислот и испытуемого раствора таблеток введением в стандартный раствор и в испытуемый раствор аминокислот избыточного количества модифицирующего реагента, приготовленного растворением п-толуолсульфохлорида в ацетонитриле (ПТСХ), а затем введением стоп-реагента в виде раствора ортофосфорной кислоты;
 - 25 - проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии растворов тозил-производных стандартного раствора аминокислот и испытуемого раствора таблеток с использованием в качестве мобильной фазы водного раствора калия фосфата однозамещенного с ацетонитрилом;
 - 30 - осуществление идентификации аминокислот на полученных хроматограммах по времени удерживания стандартного раствора и испытуемого раствора с определением площадей пиков аминокислот;

- расчет содержания каждой аминокислоты в таблетке по определенным площадям пиков аминокислот в стандартном растворе аминокислот и в испытуемом растворе таблеток, а также по величинам навесок аминокислот в стандартном растворе аминокислот, навески порошка таблеток в испытуемом растворе таблеток и по величине массы таблетки.

Для большей точности определения аминокислот глицина, L-глутаминовой кислоты и L-цистина возможно проведение идентификации модифицирующего реагента на полученных хроматограммах с определением площадей соответствующих ему пиков, а расчета содержания каждой аминокислоты в таблетке проводить с введением поправки на величину отношения площадей пиков модифицирующего реагента в стандартном растворе аминокислот и в испытуемом растворе таблеток.

Модифицирующий реагент, приготовленный растворением п-толуолсульфохлорида в ацетонитриле, удобный в работе, является своеобразным внутренним стандартом. Контроль над полнотой прохождения реакции дериватизации (получения тозил-производных аминокислот) в каждой отдельной пробирке – это важный момент, так как мы имеем дело с гетерофазной реакцией, на которую влияет множество факторов: температура внешней среды (реакция идет при комнатной температуре), концентрация реагентов, рН содового раствора (0,2 М раствор натрия карбоната) и его диссоциация; кроме того при добавлении раствора ортофосфорной кислоты («стоп-реагента») происходит выделение газа, а следовательно, изменяется объем реакционной смеси, что также влияет на точность определения содержания аминокислот в препарате. П-толуолсульфохлорид не является по своей природе высокоспецифичным модифицирующим (дериватирующим) агентом, так как может взаимодействовать не только с NH_2 - группой аминокислот и функциональной группой аминов (первичных и вторичных с образованием сульфамидных соединений), но и с гидроксильной OH - группой или карбоксильной COOH - группой. OH - группы образующиеся при диссоциации 0,2 М водного раствора натрия карбоната могут вступать в неконтролируемую реакцию с ПТСХ, и несмотря на то, что ПТСХ взят в избытке (минимум 13-кратный избыток по отношению к модифицируемому

веществу) для проведения реакции дериватизации, изобретение позволяет с достаточной степенью точности осуществлять расчет количественного содержания каждой аминокислоты в лекарственном препарате. В частности по причине контролируемого прохождения реакций дериватизации аминокислот перед их количественным определением.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, когда характеристики высокоэффективной жидкостной хроматографии лежат для стандартных растворов аминокислот и испытуемых растворов препарата в интервалах по времени выхода пиков менее 2 %, по площади пиков – менее 10 %, а пробоподготовка стандартных растворов аминокислот и испытуемых растворов препарата четко отработана, хроматографический анализ может выполняться для трех порций стандартного раствора аминокислот и для трех порций испытуемого раствора таблеток. При этом расчет содержания каждой аминокислоты в таблетке в мг проводится по формуле:

$$X(\text{мг}) = \frac{S_{AK\ i} \cdot m_{AK\ ст} \cdot m_{cp}}{S_{AK\ ст} \cdot a}, \text{ где}$$

$S_{AK\ i}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в испытуемом растворе таблеток,

$S_{AK\ ст}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот,

$m_{AK\ ст}$ – навеска каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот, мг,

m_{cp} – средняя масса таблетки, мг,

a – навеска порошка таблеток в испытуемом растворе таблеток, мг.

Если характеристики высокоэффективной жидкостной хроматографии не удовлетворяют указанным выше условиям, то хроматографический анализ выполняется также для трех порций стандартного раствора аминокислот и для трех порций испытуемого раствора таблеток, но расчет содержания каждой аминокислоты в таблетке в мг в этом случае проводят по формуле:

$$X(\text{мг}) = \frac{(S_{AK\ i} / S_{ПТСХ\ i}) \cdot m_{AK\ ст} \cdot m_{cp}}{(S_{AK\ ст} / S_{ПТСХ\ ст}) \cdot a}, \text{ где}$$

$S_{AK\ i}$ – средняя по трем определениям площадь аминокислоты в испытуемом растворе таблеток,

$S_{ПТСХ\ i}$ – средняя по трем определениям площадь п-толуолсульфохлорида в испытуемом растворе таблеток,

5 $S_{AK\ ст}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот,

$S_{ПТСХ\ ст}$ – средняя по трем определениям площадь п-толуолсульфохлорида в стандартном растворе аминокислот,

10 $m_{AK\ ст}$ – навеска каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот, мг,

$m_{ср}$ – средняя масса таблетки, мг,

a – навеска порошка таблеток в испытуемом растворе таблеток, мг.

Поправка $S_{ПТСХ\ ст} / S_{ПТСХ\ i}$ может быть введена в расчет благодаря использованию избыточного количества модифицирующего реагента, обеспечивающего контролируемое прохождение реакций дериватизации аминокислот перед их количественным определением.

При осуществлении изобретения предпочтительно использовать 0,2 М водный раствор натрия карбоната.

20 Стандартный раствор аминокислот предпочтительно приготавливать растворением навесок по 10,0- 15,0 мг каждой из аминокислот L-цистина, L-глутаминовой кислоты и глицина в 100 – 150 мл раствора натрия карбоната при перемешивании с последующим доведением объема раствора до 250 мл и его фильтрацией.

25 Испытуемый раствор таблеток предпочтительно приготавливать измельчением, по меньшей мере, трех таблеток и растворением навески в 35,0 – 40,0 мг. полученного порошка в 100-150 мл раствора натрия карбоната с последующим доведением объема раствора до 250 мл и его фильтрацией.

30 Приготовление модифицирующего реагента в наилучшем варианте реализации изобретения осуществляют растворением 15,0 мг п-толуолсульфохлорида в 1,0 мл ацетонитрила с последующим встряхиванием со скоростью 1500 об/мин. в течение 2 мин.

Приготовление растворов тозил-производных стандартного раствора аминокислот и испытуемого раствора таблеток в наилучшем варианте реализации изобретения осуществляют добавлением по 50 мкл раствора модифицирующего реагента в 200 мкл, стандартного раствора аминокислот и в
5 200 мкл испытуемого раствора таблеток с последующим их встряхиванием со скоростью 1500 об/мин в течение 30 секунд и выдерживанием 30 минут при комнатной температуре, после чего в реакционные смеси добавляют по 25 мкл стоп-реагента в виде 42,5% раствора ортофосфорной кислоты, а затем вновь встряхивают со скоростью 1500 об/мин. до окончания выделения углекислого
10 газа в течение 0,45 – 1,5 мин.

Мобильная фаза для высокоэффективной жидкостной хроматографии может быть приготовлена растворением 7,0 г калия фосфата однозамещенного в 700 мл воды, после чего pH раствора доводят добавлением концентрированной ортофосфорной кислоты до значения 2,8, затем раствор
15 перемешивают, добавляют 250 мл ацетонитрила, а затем объем раствора доводят водой до 1000 мл и фильтруют.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения в хроматограф вводят аликвоты по 40 мкл стандартного раствора аминокислот или испытуемого раствора таблеток, при этом хроматографию проводят с
20 использованием колонки 150×4,6 мм в течение 8 мин в изократическом режиме при температуре колонки 50°C, объеме инжектора: 20 мкл и скорости потока элюента 1 мл/мин.

Пример осуществления изобретения

Осуществления изобретения поясняет примером количественного
25 определения аминокислот: глицина, L-глутаминовой кислоты и L-цистина в лекарственном препарате в форме таблетки, содержащей каждой из перечисленных аминокислот в количестве 70 мг.

Вначале готовят растворы, необходимые для реализации способа, которые используют свежеприготовленными.

30 Для приготовления 0,2 М раствора натрия карбоната в мерной колбе вместимостью 1000 мл растворяют 21,2 г натрия карбоната в 700 мл воды

очищенной на магнитной мешалке, доводят водой очищенной до метки и перемешивают.

Для приготовления стандартного раствора аминокислот навески L-цистина – 12,0 мг, L-глутаминовой кислоты – 12,0 мг, глицина – 12,0 мг помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 100 мл ранее
5 приготовленного 0,2 М раствора натрия карбоната при перемешивании в течение 20 минут на магнитной мешалке и доводят до метки 0,2 М раствором натрия карбоната, после чего раствор фильтруют через беззольный фильтр.

Для приготовления испытуемого раствора лекарственного препарата три
10 таблетки растирают в фарфоровой ступке, затем навеску 37,5 мг полученного порошка помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 100 мл 0,2 М раствора натрия карбоната при перемешивании в течение 20 мин. на магнитной мешалке и доводят до метки 0,2 М раствором натрия карбоната, после чего раствор также фильтруют через беззольный фильтр.

Для приготовления раствора модифицирующего реагента (ПТСХ) взвешивают 15,0 мг п-толуолсульфохлорида (тозилхлорида), помещают в герметично закрывающуюся коническую пробирку (общий объем 1,7 мл) и растворяют в 1,0 мл ацетонитрила; встряхивают на автоматическом
15 встряхивателе со скоростью 1500 об/мин. в течение 2 мин.

Для приготовления 42,5% раствора ортофосфорной кислоты (стоп-реагента) в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую 15-20 мл воды очищенной, помещают 25,0 мл концентрированной (85%) ортофосфорной кислоты, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Этот раствор имеет продолжительный срок хранения, до 1 месяца.
20

Для приготовления мобильной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 7,0 г калия фосфата однозамещенного, растворяют в 700 мл воды очищенной на магнитной мешалке, доводят рН добавлением концентрированной ортофосфорной кислоты до значения 2,8, перемешивают, добавляют 250 мл
25 ацетонитрила, доводят водой очищенной до метки, хорошо перемешивают, фильтруют через фильтр 0,45 мкм и дегазируют с помощью вакуумного насоса. Этот раствор также имеет продолжительный срок хранения, до 1 месяца.
30

После приготовления указанных выше растворов осуществляют получение тозил-производных (дериватизацию) стандартного раствора аминокислот и испытуемого раствора лекарственного препарата.

Для этого механическим дозатором отбирают по 200 мкл стандартного
5 раствора аминокислот для трех параллельных определений и испытуемого раствора препарата также для трех параллельных определений, переносят в конические пробирки, добавляют механическим дозатором по 50 мкл раствора модифицирующего реагента, закрывают крышки и интенсивно встряхивают на автоматическом встряхивателе со скоростью 1500 об/мин. в течение 30 с, а
10 затем выдерживают в течение 30 мин. при комнатной температуре для прохождения реакции.

После этого в реакционные смеси добавляют механическим дозатором по 25 мкл 42,5% раствора ортофосфорной кислоты (стоп-реагент) и снова встряхивают полученные смеси на автоматическом встряхивателе со
15 скоростью 1500 об/мин. до окончания выделения углекислого газа (около 1 мин.).

После окончания процесса модификации (дериватизации) по три параллельных образца стандартных растворов аминокислот и испытуемых растворов препарата должны быть сразу последовательно введены в
20 хроматографическую колонку высокоэффективного жидкостного хроматографа, имеющего программно-аппаратный комплекс для сбора и обработки данных со спектрофотометрическим детектором и аналого-цифровым преобразователем сигнала, совместимым с компьютером. В колонку хроматографа последовательно вводят микрошприцем вместимостью 100 мкл
25 аликвоты (40 мкл) полученных тозил-производных стандартных растворов аминокислот и испытуемых растворов препарата (по три образца).

Хроматографические условия: колонка 150×4,6 мм, мобильная фаза - раствор калия фосфата однозамещенного (0,05 М) / ацетонитрил, изократический режим, температура колонки 500°C, объем инжектора 20 мкл,
30 длина волны 254 нм, скорость потока элюента 1 мл/мин, время анализа 8 мин.

Средние значения характеристик высокоэффективной жидкостной хроматографии для стандартных растворов аминокислот и испытуемых

растворов препарата должны быть в интервалах: времена выхода пиков – 2 %, площади пиков – 10 %. При больших отклонениях характеристик от заданных анализ повторяют до достижения необходимых параметров. Для обеспечения пригодности хроматографической системы возможно отклонение от указанных выше условий хроматографирования.

По результатам анализа получают хроматограммы, представленные на иллюстрации в описании, на которых по времени удерживания проводят идентификацию аминокислот и определяют площади пиков, соответствующих каждой аминокислоте, в стандартных растворах аминокислот и в испытуемых растворах препарата.

Расчет содержания каждой аминокислоты в таблетке в мг проводят по средним площадям пиков, исходя из трех параллельных определений, как для стандартного раствора аминокислот, так и для испытуемого раствора препарата по формуле:

$$X(\text{мг}) = \frac{(S_{\text{AK } i} / S_{\text{ПТСХ } i}) \cdot m_{\text{AK ст}} \cdot m_{\text{ср}}}{(S_{\text{AK ст}} / S_{\text{ПТСХ ст}}) \cdot a}, \text{ где}$$

$S_{\text{AK } i}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в испытуемом растворе таблеток;

$S_{\text{ПТСХ } i}$ – средняя по трем определениям площадь ПТСХ в испытуемом растворе таблеток;

$S_{\text{AK ст}}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот;

$S_{\text{ПТСХ ст}}$ – средняя по трем определениям площадь ПТСХ в стандартном растворе аминокислот;

$m_{\text{AK ст}}$ – навеска каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот, мг;

$m_{\text{ср}}$ – средняя масса таблетки, мг;

a – навеска порошка таблеток, мг.

Площади пиков и расчет содержания каждой аминокислоты осуществляются программно с использованием компьютера, который, как

указано выше, связан с программно-аппаратным комплексом высокоэффективного жидкостного хроматографа.

Если средние значения характеристик хроматографической системы для стандартных растворов аминокислот и испытуемых растворов препарата
 5 находятся в интервалах по времени выхода пиков – менее 2 %, по площади пиков – менее 10 % , а пробоподготовка стандартных растворов аминокислот и испытуемых растворов препарата четко отработана (включая соблюдение всех вышеизложенных условий при приготовлении растворов, проведении дериватизации, прерывании прохождения реакции, условий
 10 хроматографирования и тому подобное), то расчет содержания каждой аминокислоты в таблетке в мг можно проводят по средним площадям пиков, исходя из трех параллельных определений, как для стандартного раствора аминокислот, так и для испытуемого раствора препарата без учета соотношения площадей пиков модифицирующего реагента в испытуемом и
 15 стандартном растворах (в данном случае соотношение близко к единицы и им можно пренебречь) по формуле:

$$X(\text{мг}) = \frac{S_{AK\ i} \cdot m_{AK\ ст} \cdot m_{cp}}{S_{AK\ ст} \cdot a}, \text{ где}$$

$S_{AK\ i}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в испытуемом растворе таблеток;

20 $S_{AK\ ст}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот;

$m_{AK\ ст}$ – навеска каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот, мг;

m_{cp} – средняя масса таблетки, мг;

25 a – навеска порошка таблеток, мг.

Способ позволяет определить количественное содержание аминокислот в одной таблетке с точностью $\pm 5,3$ мг, что соответствует допустимому пределу для таблетки лекарственного препарата, содержащей глицин, L-глутаминовую кислоту и L-цистин.

Для количественного определения аминокислот глицина, L-глутаминовой кислоты и L-цистина в лекарственном препарате в форме таблетки, содержащей каждой из перечисленных аминокислот в количестве 90 мг, способ реализуется с теми же параметрами.

5

Формула изобретения

1. Способ определения в таблетке количества активных компонентов в виде аминокислот глицина, L-глутаминовой кислоты и L-цистина, включающий последовательное выполнение

5 приготовления в водном растворе натрия карбоната стандартного раствора аминокислот глицина, L-глутаминовой кислоты и L-цистина и испытуемого раствора таблеток из порошка таблеток,

приготовления растворов тозил-производных стандартного раствора аминокислот и испытуемого раствора таблеток введением в стандартный
10 раствор и в испытуемый раствор аминокислот избыточного количества модифицирующего реагента, приготовленного растворением п-толуолсульфохлорида в ацетонитриле, а затем введением стоп-реагента в виде раствора ортофосфорной кислоты,

высокоэффективной жидкостной хроматографии растворов тозил-производных стандартного раствора аминокислот и испытуемого раствора
15 таблеток с использованием в качестве мобильной фазы водного раствора калия фосфата однозамещенного с ацетонитрилом,

идентификации аминокислот на полученных хроматограммах по времени удерживания стандартного раствора и испытуемого раствора с
20 определением площадей пиков аминокислот,

расчета содержания каждой аминокислоты в таблетке по определенным площадям пиков аминокислот в стандартном растворе аминокислот и в
испытуемом растворе таблеток, а также по величинам навесок аминокислот в стандартном растворе аминокислот, навески порошка таблеток в испытуемом
25 растворе таблеток и по величине массы таблетки

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что проводят идентификацию модифицирующего реагента на полученных хроматограммах с определением
площадей соответствующих ему пиков, а расчета содержания каждой аминокислоты в таблетке осуществляют с введением поправки на величину
30 отношения площадей пиков модифицирующего реагента в стандартном растворе аминокислот и в испытуемом растворе таблеток.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что выполняют хроматографический анализ для трех порций стандартного раствора аминокислот и для трех порций испытуемого раствора таблеток, а расчета содержания каждой аминокислоты в таблетке в мг проводят по формуле:

$$X(\text{мг}) = \frac{S_{AK\ i} \cdot m_{AK\ ст} \cdot m_{ср}}{S_{AK\ ст} \cdot a}, \text{ где}$$

$S_{AK\ i}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в испытуемом растворе таблеток,

$S_{AK\ ст}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот,

10 $m_{AK\ ст}$ – навеска каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот, мг,

$m_{ср}$ – средняя масса таблетки, мг,

a – навеска порошка таблеток в испытуемом растворе таблеток, мг.

15 4. Способ по п.2, отличающийся тем, что выполняют хроматографический анализ для трех порций стандартного раствора аминокислот и для трех порций испытуемого раствора таблеток, а расчет содержания каждой аминокислоты в таблетке в мг проводят по формуле:

$$X(\text{мг}) = \frac{(S_{AK\ i} / S_{ПТСХ\ i}) \cdot m_{AK\ ст} \cdot m_{ср}}{(S_{AK\ ст} / S_{ПТСХ\ ст}) \cdot a}, \text{ где}$$

20 $S_{AK\ i}$ – средняя по трем определениям площадь аминокислоты в испытуемом растворе таблеток,

$S_{ПТСХ\ i}$ – средняя по трем определениям площадь п-толуолсульфохлорида в испытуемом растворе таблеток,

$S_{AK\ ст}$ – средняя по трем определениям площадь каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот,

25 $S_{ПТСХ\ ст}$ – средняя по трем определениям площадь п-толуолсульфохлорида в стандартном растворе аминокислот,

$m_{AK\ ст}$ – навеска каждой аминокислоты в стандартном растворе аминокислот, мг,

$m_{ср}$ – средняя масса таблетки, мг,

а – навеска порошка таблеток в испытуемом растворе таблеток, мг.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют 0,2 М водный раствор натрия карбоната.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что стандартный раствор аминокислот получают растворением навесок по 10,0 - 20,0 мг каждой из аминокислот L-цистина, L-глутаминовой кислоты и глицина в 100 – 150 мл раствора натрия карбоната при перемешивании с последующим доведением объема раствора до 250 – 300 мл и его фильтрацией.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что испытуемый раствор таблеток получают измельчением, по меньшей мере, трех таблеток и растворением навески в 35,0 – 45,0 мг. полученного порошка в 100 - 150 мл раствора натрия карбоната с последующим доведением объема раствора до 250 – 300 мл и его фильтрацией.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что приготовление модифицирующего реагента осуществляют растворением 15,0 мг п-толуолсульфохлорида в 1,0 мл ацетонитрила с последующим встряхиванием со скоростью 1500 об/мин. в течение 2 мин.

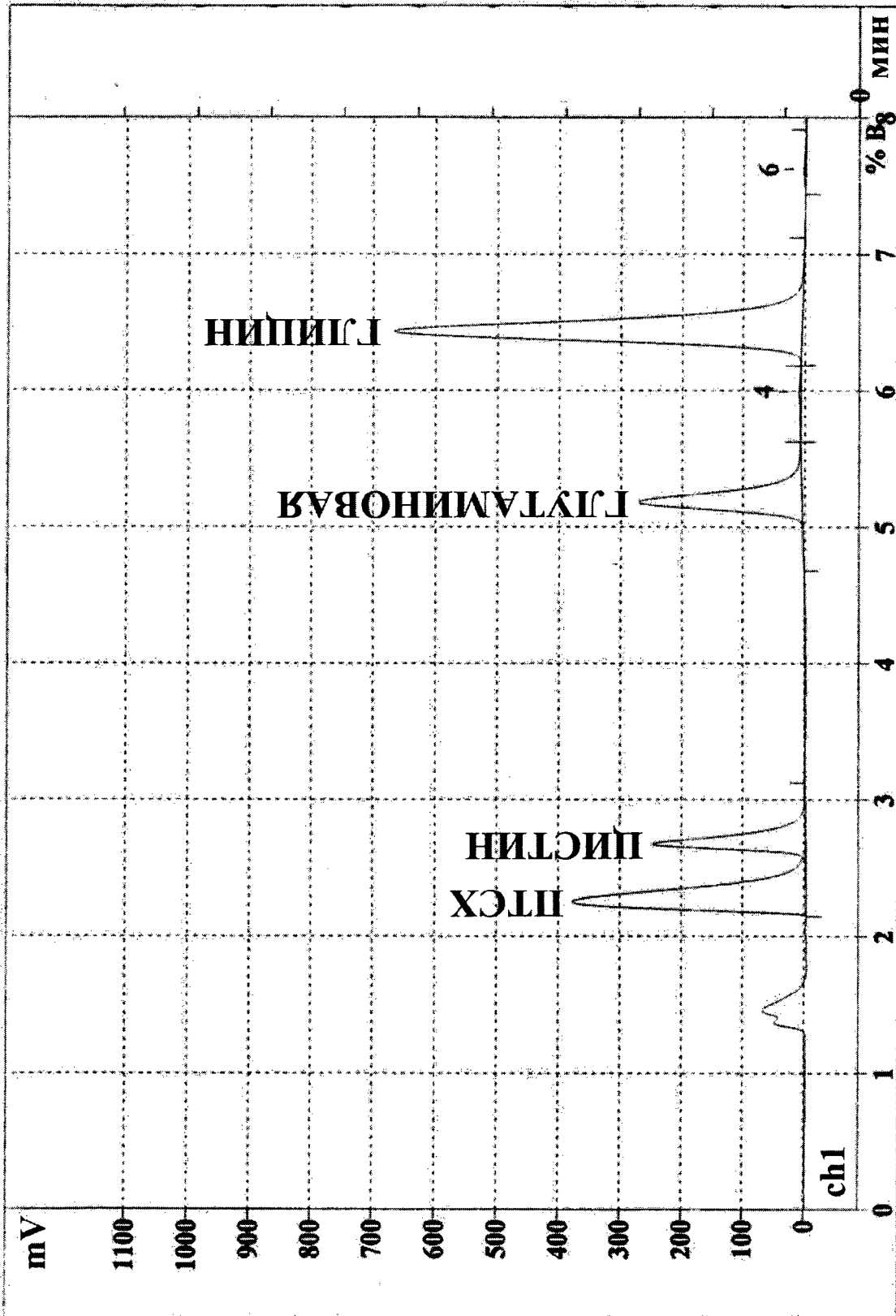
9. Способ по п.1, отличающийся тем, что приготовление растворов тозил-производных стандартного раствора аминокислот и испытуемого раствора таблеток осуществляют добавлением по 50 мкл раствора модифицирующего реагента в 200 мкл, стандартного раствора аминокислот и в 200 мкл испытуемого раствора таблеток с последующим их встряхиванием со скоростью 1500 об/мин в течение 30 секунд и выдерживанием 30 минут при комнатной температуре, после чего в реакционные смеси добавляют по 25 мкл стоп-реагента в виде 42,5% раствора ортофосфорной кислоты, а затем вновь встряхивают со скоростью 1500 об/мин. до окончания выделения углекислого газа в течение 0,45 – 1,5 мин.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что приготовление мобильной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии осуществляют растворением 7,0 г калия фосфата однозамещенного в 700 мл воды, после чего

pH раствора доводят добавлением концентрированной ортофосфорной кислоты до значения 2,8, затем раствор перемешивают, добавляют 250 мл ацетонитрила, после чего объем раствора доводят водой до 1000 мл и фильтруют.

- 5 11. Способ по п.1, отличающийся тем, что в хроматограф вводят аликвоты по 40 мкл стандартного раствора аминокислот или испытуемого раствора таблеток, при этом хроматографию проводят с использованием колонки 150×4,6 мм в течение 8 мин в изократическом режиме при температуре колонки 50°C, объеме инжектора: 20 мкл и скорости потока элюента 1 мл/мин.

10



Фиг. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2010/000627

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 30/88 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/195, G01N 30/26, 30/34, 30/88, 33/15 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAPATIS, Esp@ce, Esp@cenet, PAJ, RUPTO, USPTO, WIPO, PatSearch		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Simonyan A. V. et al. Ispolzovanie ningidrinovoy reaksii dlya kolichestvennogo opredeleniya aminokislot a razlichnykh obektakh. Metodicheskie rekomendatsii. Volgograd, 2007, page 106	1-11
A	RU 2096034 C1 (OBSHESTVO S OGRANICHENNOY OTVETSTVENNOSTYU "MEDITSINSKY NAUCHNO-PROIZVODSTVENNY COMPLEX *BIOTIKI") 20.11.1997	1-11
A	RU 2167410 C2 (PERMSKAYA GOSUDARSTVENNAYA FARMATSEVTICHESKAYA AKADEMIYA) 20.05.2001	1-11
A	JP 4275298 A (KIKKOMAN CORP) 30.09. 1992	1-11
A	RU 22671 15 C2 (OAO "FARMSTANDART-LEKSREDSTVA") 27.12.2005	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 March 2011 (25.03.2011)		Date of mailing of the international search report 31 March 2011 (31.03.2011)
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2010/000627

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009109406 A (KOWA CO) 21.05.2009	1-11
A	RU 2332662 C2 (GOLUBINTSKII GRIGORII BORISOVICH) 27.08.2008	1-11

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2010/000627

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: <i>G01N 30/88 (2006.01)</i>		
Согласно Международной патентной классификации МПК		
B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:		
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации): А61К 31/195, G01N 30/26, 30/34, 30/88, 33/15		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые EAPATIS, Esp@ce, Esp@cenet, PAJ, RUPTO, USPTO, WIPO, PatSearch		
C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
А	Симонян А. В. и др. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α-аминокислот в различных объектах. Методические рекомендации. Волгоград, 2007, с. 106	1-11
А	RU 2096034 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "МЕДИЦИНСКИЙ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ КОМПЛЕКС "БИОТИКИ") 20.11.1997	1-11
А	RU 2167410 C2 (ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ) 20.05.2001	1-11
А	JP 4275298 A (KIKKOMAN CORP) 30.09.1992	1-11
А	RU 2267115 C2 (ОАО "ФАРМСТАНДАРТ-ЛЕКСРЕДСТВА") 27.12.2005	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении		
* Особые категории ссылочных документов: А документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным Е более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее L документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) O документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	Т более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска: заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска: заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста & документ, являющийся патентом-аналогом	
Дата действительного завершения международного поиска: 25 марта 2011 (25.03.2011)	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 31 марта 2011 (31.03.2011)	
Наименование и адрес ISA/RU ФГУ ФИПС РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1 Факс: (499) 243-3337	Уполномоченное лицо: И. Жестовская Телефон № (499) 240-25-91	

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2010/000627

С. (продолжение) ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	JP 2009109406 A (KOWA CO) 21.05.2009	1-11
A	RU 2332662 C2 (ГОЛУБИЦКИЙ ГРИГОРИЙ БОРИСОВИЧ) 27.08.2008	1-11