



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00783

(22) Data de depozit: 03/11/2015

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. 5/2017

(71) Solicitant:
• AC HELCOR S.R.L., STR. VICTOR BABEȘ
NR. 50, BAIA MARE, MM, RO

(72) Inventatori:
• POP ANCA LUCIA,
STR. BANUL ANTONACHE NR. 52-60, SC.C,
AP. 1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• POP CORIOLAN, STR. TRAIAN VUIA
NR. 23, BAIA MARE, MM, RO

(54) FORMULĂ INOVATIVĂ, CU ELIBERARE PRELUNGITĂ,
CU ASCORBAT DE CALCIU ȘI HESPERIDINĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un supliment alimentar cu potențial antioxidant și imunostimulator. Suplimentul conform invenției este constituit, în procente în greutate, din 70,35% ascorbat de calciu, 1,16% complex de bioflavonoide standardizat la 80% hesperidină, și

excipienți acceptabili farmaceutic, pentru formularea de comprimat cu eliberare prelungită.

Revendicări: 3
Figuri: 12

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



DESCRIEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție are aplicabilitate în industria farmaceutică și alimentară, referindu-se la un supliment alimentar cu beneficii pentru sănătate (urmărind în special beneficiile asupra sistemului imunitar uman). Produsul propus spre brevetare este realizat pe bază de:

- *vitamina C non-acidă* (sub formă de ascorbat de calciu) și
- *complex de bioflavonoide din portocală amară* (standardizat la 80% hesperidină)
- sub formă de comprimate cu eliberare prelungită

Sunt cunoscute numeroase produse pe bază de Vitamina C pe piața din România. Dintre cele cu un conținut în vitamina C între 500 și 1000 mg și cu forma farmaceutică de *comprimate*, menționăm:

- Vitamina C 500 mg (Horizon Vita) – conține ca ingrediente active: acid ascorbic - 500mg/ cpr.;
- Vitamina C 500 mg cu măceșe (VitaKing) – conține/ cpr: acid ascorbic - 500mg, 30mg extract de măceșe;
- Vitamina C 1000 mg cu măceșe (VitaKing) conține acid ascorbic - 1000mg, 25mg extract de măceșe;
- Vitamina C1000 mg bioflavonoide, acerola și măceșe conține: acid ascorbic – 1000 mg, bioflavonoide din citrice 50 mg, fructe de acerola (*Malpighia punicifolia*) 50 mg, fructe de măceș (*Rosa canina*) 10 mg;
- Vitamina C 600 mg (Naturline) – conține acid ascorbic – 600mg/ cpr.;
- Super vitamina C (Walmark) – conține acid ascorbic – 600mg/ cpr.;
- Vitamina C 1000 mg (Beres Pharmaceuticals) – conține acid ascorbic - 1000mg/ cpr.;
- High Potency Vitamin C 1000mg with Rose Hips (HAYA LABS) - conține acid ascorbic - 1000mg/ cpr.

Vitamina C este o vitamină hidrosolubilă, care după absorbția din tractul intestinal are tendința de a se elimina rapid din organism. Evitarea acestui fenomen a condus la dezvoltarea produsului AC HELCOR sub formă de comprimate cu eliberare prelungită, care pun în libertate vitamina C în mod controlat, treptat, atingând astfel valori constante în sânge (spre deosebire de produsele menționate

mai sus, cu eliberare imediată). Așadar, suplimentul alimentar, conform invenției, se prezintă sub formă de comprimate cu eliberare prelungită (retard).

Se regăsesc pe piața din România și alte produse conținând vitamina C, într-o formă farmaceutică de comprimate/ capsule retard (cu eliberare prelungită), dintre care menționăm:

- Vitamina C 600mg - Zinc (Beres) – conține ca ingrediente active: acid ascorbic - 600 mg, Zinc - 15mg;
- SuperVit C EFECT+ (Walmark) – conține acid L-ascorbic - 600 mg, Măceșe- 30 mg;
- Vitamina C 500 (Calivita) – conține Vitamina C din extracte naturale - 500 mg;
- Vitamina C 1000 Plus (Calivita) – Vitamina C din extracte naturale - 1000 mg;
- Vitamina C 1000 mg cu absorbție lentă (VitaKing) acid ascorbic – 1000 mg, fructe de măceș (*Rosa canina*) – 30 mg;
- Vitamina C 500 (Eurovita) – conține/ cpr.: acid ascorbic – 500 mg, Zinc – 10 mg, extract din fructe de merișor – 8mg, Seleniu - 55 μm, Vitamina D3 - 5 μm;
- Cetebe - conține/ cps.: acid ascorbic - 500 mg.

Produsul propus spre brevetare de către AC HELCOR se deosebește însă de produsele menționate anterior, remarcându-se prin îmbinarea, într-un singur produs, a următoarelor caracteristici:

- *caracter alcalin* - conform invenției, formula are în compoziție ascorbat de calciu. Spre deosebire de acesta, produsele menționate anterior conțin acid ascorbic. Acest fapt sprijină păstrarea pH-ului mediului intern la un nivel apropiat de cel fiziologic, cu beneficii asupra stării de sănătate. De asemenea, hiperaciditatea gastrică și problemele care derivă din aceasta sunt evitate prin administrarea vitaminei C sub formă de ascorbat de calciu;

- *conținutul în bioflavonoide* (sub formă de complex standardizat la 80% hesperidină).

- *formulare farmaceutică* – comprimate cu eliberare prelungită (retard) comparativ cu produsul princeps.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta invenție constă în stimularea și susținerea funcționării adecvate a sistemului imunitar (prin conținutul crescut în vitamina C, potențat de adaosul de hesperidină), într-o manieră care asigură acțiunea pe termen lung a acestor ingrediente (datorită formulării retard), evitându-se, în același timp, crearea unui mediu acid la nivelul stomacului și în

organism prin utilizarea ascorbatului de calciu (în locul variantei clasice de acid ascorbic).

Astfel, formula inovativă în discuție este constituită din: 70.35% ascorbat de calciu, 1.16% complex de bioflavonoide (standardizat la 80% hesperidină) și excipienți. Procentele sunt exprimate în greutate, iar formularea farmaceutică (de comprimate cu eliberare prelungită) favorizează absorbția lentă a ingredientelor active (și implicit) acțiunea îndelungată a acestora în organism.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- datorită formei farmaceutice retard, care favorizează o eliberare treptată a ingredientelor active în organism, a căror administrare în forma de eliberare imediată ar determina eliminarea rapidă și absorbția unei cantități de circa trei ori reduse, astfel efectele caracteristice, benefice, sunt de durată crescută. Formularea retard este demonstrată prin studiul de biodisponibilitate – dizolvare - *in vitro*;

- nu prezintă aciditate la nivelul stomacului (datorită utilizării formei de ascorbat de calciu), putând fi astfel utilizat pe termen lung, chiar și de către persoanele care prezintă afecțiuni la acest nivel. Caracterul neutru s-a demonstrat prin cercetarea pH-ului în condiții de laborator, *in vitro*;

- efectul antioxidant al produsului este datorat conținutului în vitamina C și hesperidină, aceasta din urmă potențând efectul antioxidant al vitaminei C. Prezența acestor ingrediente, în concentrațiile menționate, este demonstrată prin dozarea acestora în cadrul Laboratorului de Control Fizico-Chimic din cadrul Centrului de Cercetare Dezvoltare Farmaceutică.

Invenția este prezentată pe larg în continuare:

Vitamina C (vezi fig. 1) este o substanță indispensabilă în desfășurarea normală a celor mai importante procese biologice, printre care: sinteza hormonilor corticosuprarenaleni, transformarea acidului folic în acid folic și a transferinei în feritină, sinteza noradrenalinei și a substanțelor intracelulare (ex.: colagenul, matricea osoasă și dentară). De asemenea, are un rol important în răspunsul imunitar la stres și la infecțiile virale și bacteriene (răceala simplă și gripa, deoarece participă la formarea anticorpilor și interferonilor), activează numeroase enzime, joacă un rol important în respirația celulară, accelerează procesul de vindecare a rănilor, protejează împotriva apariției cancerului (stopând formarea nitrozaminelor – agenți cancerigeni care se formează în timpul asimilării aminoacizilor în stomac).

Stările de deficit de vitamina C se pot datora unei diete inadecvate, din care lipsesc fructele și legumele, dar sunt rare la adult (apar mai ales la: copii, alcoolici și vârstnici). Stresul, expunerea la frig, exercițiile fizice de performanță duc la o creștere a proceselor oxidative ale plasmei, iar în toate aceste situații este absolut necesar un supliment de vitamina C. În timpul activităților fizice intense, cât și la copiii expuși regulat la fumul de țigară, necesarul de vitamina C crește.

Vitamina C este indicată de asemenea în sarcină și alăptare, în perioada de creștere a copiilor, în afecțiuni precum: paradontoze, gingivite, stomatite, fracturi, osteoporoză, hemoragii datorate fragilității capilare, anemii feriprive (în asociere cu fier sau acid folic), surmenaj, neurastenii, efort fizic prelungit, boli grave, intervenții chirurgicale. De asemenea, ajută la absorbția fierului și împreună cu acidul folic și vitamina B₁₂, stimulează formarea globulelor roșii.

La nivel intestinal, absorbția vitaminei C se realizează împotriva gradientului de concentrație, prin intermediul unui sistem de transport specific (transport activ). În cazul administrării unor doze mari de vitamina C, absorbția intestinală se realizează prin transport pasiv (difuzie). Capacitatea maximă de absorbție intestinală este limitată la 1200 mg în 24 de ore, la o doză de 3 g/zi. Concentrația plasmatică fiziologică este de 0,7 – 1 μg/100 ml. Vitamina C are avantajul de a nu se acumula în organism. Prin urmare, nu prezintă vreun pericol de supradozare sau toxicitate (LD₅₀ pentru șobolani este de 11900 mg/kg), permițând astfel utilizarea fără restricții. Datorită faptului că organismul nu depozitează vitamina C, se impune un aport constant prin alimentație sau prin suplimente alimentare.

Acidul ascorbic determină un pH acid în organism, ceea ce poate întreține sau declanșa sensibilitate gastrointestinală atunci când este administrată în cantități mari, la persoanele cu sensibilitate gastrică. Sărurile minerale ale acidului ascorbic (ascorbații) sunt tamponate și, astfel, mai puțin acide decât acidul ascorbic. Astfel, ascorbații (minerali) sunt recomandați mai ales persoanelor care au probleme gastrointestinale (dureri abdominale sau diaree) provocate de acidul ascorbic. Absorbția vitaminei C în organism este foarte bună și în cazul utilizării ascorbaților.

În industria alimentară se folosesc sărurile acidului ascorbic cu sodiu, potasiu, magneziu și calciu. Ingerate, prin hidroliză la nivel gastric, eliberează ionul ascorbat (cu biodisponibilitate superioară acidului ascorbic) și mineralul corespunzător, ce se absoarbe de asemenea. În timp ce necesarul zilnic de magneziu (400 mg RDA) este la nivelul miligramelor, un aport crescut de potasiu (4700 mg RDA) poate determina

hiperkaliemia cu aritmie cardiacă la pacienții cu afectare renală (sau cu tratamente cu diuretice economizatoare de potasiu, inhibitori de angiotensină- conform autorilor John SK, Rangan Y, Block CA și Koff MD), iar un aport suplimentar neajustat de sodiu (1500 mg RDA) poate determina modificari la nivelul tensiunii pereților arteriali.

Astfel, în formula inovativă propusă am ales pentru înlocuirea acidului ascorbic cu o sare minerală - forma sării de calciu (cu 10% calciu) – ascorbat de calciu (vezi fig. nr. 2), care, pe lângă un aport de ascorbat, asigură un aport de 1/2 molecule de calciu pentru fiecare moleculă de Vitamina C, necesar completării cantităților de calciu antrenat prin eliminare renală de către vitamina C.

Bioflavonoidele (flavonoizi din lat. „*flavus*”- galben) sunt o clasă de metaboliți secundari vegetali colorați în galben, constând dintr-o structură de bază tricyclică, cu doi radicali fenil și un heterociclu de oxigen cu legatura «ceto» (vezi fig. 3 și fig. 4).

Ca subgrupe, au fost subclasificate în funcție de structura chimică în antoxatine, flavanone, flavanoli, flavani și antocianidine). Flavonoidele din citrice conțin hesperidină, quercitrină, rutin și tangeritină.

Antioxidanți hidrosolubili, protejează celulele de distrugerile provocate de radicalii liberi, la diferite nivele ale organismului. Se regăsesc sub formă de microcristale în unele plante, pe care le pigmentează în diverse culori și se pare că intervin în apărarea acestora. Surse naturale bogate în bioflavonoizi sunt: citricele (îndeosebi grapefruit), strugurii, merele, prunele, cireșele, vișinele, murele, zmeura, afinele, coacăzele negre, ceapa, spanacul etc. Cantitatea de flavonoizi este mai ridicată în coaja fructelor sau legumelor, cu excepția citricelor la care flavonoizii sunt mai prezenți în cuticulele albe care înconjoară feliile acestor fructe.

Bioflavonoidele din citrice asigură o mai bună absorbție și o biodisponibilitate superioară vitaminei C în organism și potențează efectul acesteia. Această acțiune sinergică a fost descoperită de doctorul Albert Szent, descoperitorul vitaminei C, atunci când, administrând pacienților săi vitamina C în stare pură și impură, a constatat că cea în stare impură a avut o eficiență sporită (datorită prezenței bioflavonoidelor).

La nivelul aparatului cardiovascular, flavonoizii protejează structura și mențin elasticitatea vaselor sanguine, le reglează permeabilitatea, îmbunătățesc circulația, au efect vasodilatator, antiaterosclerotic și antitrombotic, împiedică oxidarea acizilor grași, reduc riscul de: ateroscleroză, hipertensiune arterială, hipercolesterolemie, infarct miocardic, accident vascular cerebral, varice și hemoroizi.

La nivelul aparatului respirator, bioflavonoidele protejează membranele căilor respiratorii împotriva efectului nociv al poluării aerului atmosferic și a fumatului, cresc rezistența la infecțiile respiratorii, prezintă eficiență în astmul bronșic.

La nivelul sistemului nervos, bioflavonoidele au o puternică acțiune neuroprotectoare, au efect direct asupra regenerării celulelor nervoase, previn declinul mental și bolile degenerative precum: Alzheimer, Parkinson, demență. Bioflavonoidele au un efect benefic și asupra țesuturilor (favorizează regenerarea), reduc inflamațiile, cresc metabolismul energetic al organismului.

Flavonoidele sunt ușor distruse de căldură, aciditate și prin procesare, motiv pentru care este necesară suplimentarea cu produse naturiste bogate în aceste elemente.

Descrierea procesului tehnologic

Pentru obținerea produsului, toate materiile prime și materialele utilizate sunt achiziționate de la producători și/ sau importatori autorizați și însoțite de declarațiile de conformitate și/ sau certificatele de calitate corespunzătoare.

Etapele procesului tehnologic sunt următoarele:

Etapa 1 Materiile prime se recepționează conform prevederilor *Specificațiilor tehnice* ale producătorului, ale Farmacopeei Europene ediția curentă și ale Farmacopeei Române (ediția X). Ambalajele se recepționează calitativ și cantitativ, conform documentației însoțitoare de la producător.

Etapa 2 Cântărirea primară și secundară (de control a cântării primare) pentru o serie de produs se realizează pe balanțe electronice, în încăpere cu climatizare controlată (temperatură și umiditate constante: 21 ± 2 °C, respectiv 50 % UR ± 10 %).

Etapa 3 Omogenizarea materiilor prime se realizează în utilajul Roto P, timp de 10 minute, cu o viteză a impeller-ului de 150 rpm, în sistem închis. În această etapă, controlul interfazic determină pierderea prin uscare a amestecului, pe o probă de 5 g. Se determină randamentul practic al etapei de omogenizare, care trebuie să fie de minim 98 %. Amestecul omogen, ca produs intermediar, se descarcă într-un container din oțel inoxidabil, etichetat corespunzător și este analizat de către Laboratorul de control al calității, conform prevederilor S.T. Abia după obținerea buletinului de analiză, care atestă conformitatea, se poate trece la etapa următoare, de comprimare.

Etapa 4 Comprimarea amestecului se realizează cu mașina rotativă Horn Noack HRP36. *Controlul interfazic* verifică masa medie pe comprimat, uniformitatea masei, dimensiunile, rezistența, timpul de dezagregare. Randamentul etapei de comprimare este de minimum 97 %. Comprimatele, ca produs intermediar – vrac, se descarcă în containere din oțel inoxidabil, etichetate corespunzător și sunt analizate de către Laboratorul de Control al Calității. După eliberarea buletinului de analiză, care atestă conformitatea produsului, se poate trece la etapa următoare, cea de ambalare.

Etapa 5 Ambalarea primară se realizează flacoane brune inscripționate conform normelor laboratorului de cercetare dezvoltare.

Etapa 6 Depozitarea produsului, la care s-a adăugat buletinul de analiză cu mențiunea ADMIS, se face în condițiile prevăzute de S.T., până la livrare. Fig. nr. 6 schematizează fluxul tehnologic de producție.

Cercetarea formulei testate

Testarea caracterului neutru

Obiectiv: testarea pH-ului soluției formulelor existente în circulație comparativ cu formula propusă.

Material și metodă: măsurarea pH-ului soluțiilor rezultate în urma dizolvării comprimatelor retard din suplimentul alimentar propus spre brevetare (după 8 ore) și a produselor comparative. Testarea a fost realizată pentru soluțiile obținute prin dizolvare progresivă în interval de 8 ore, în 900 mL apă distilată. S-a considerat un *pH 1-6 Acid, PH în interval 6 - 7 neutru, peste 7 - mediu alcalin. Au fost luate în lucru câte trei loturi de probe pentru fiecare formulă propusă. S-a determinat valoarea medie și deviația standard ($p < 0,05$).*

Rezultat: au fost testate trei formule de Vitamina C cu eliberare prelungită comparativ cu formula propusă. pH-ul formulelor existente s-a situat în jurul valorii de 3,52 pentru primul produs, respectiv în jurul valorii de 4 în cazul a trei produse concurente pe bază de vitamina C, sub forma farmaceutică de comprimate/ capsule cu eliberare prelungită. Produsele menționate conțin vitamina C sub formă de acid ascorbic (prin urmare, au un pH acid). Pentru formula inovativă propusă, valoarea medie obținută a pH-ului a fost de 6.39 (vezi tabel nr. 1). Reprezentarea grafică a datelor obținute se regăsește în figura nr. 5 (secțiunea „Desene”).

Tabel nr. 1

Nr. Probă	Produs testat	Lot	Forma farmaceutică	Valoare pH, după 8 ore dizolvare în 900ml apă X+/- e.s.			pH 1-6 Acid 6-7 neutru >7,4 alcalin
1.	Vitamina C 600mg+ Zn	S150 341R OAA	Cpr. filmate retard	3.51+ 0,14	3.52+ 0,17	3.52+/ -0,17	Acid
2.	Vitamina C 500 + Zn, Se, vit D3	L415 0511	Cpr. cu elib. prelungită	4.24+ 0,16	4.19+ 0,19	4.22+/ -0,11	Acid
3.	Cetebe vit C + Zn	L445 0640	Cps. cu elib. prelungită	3.92+ 0,13	3.94+/- 0,17	3.92+/ -0,4	Acid
4.	Formula inovatoare		Cpr. cu elib. prelungită	6,39+ 0,31	6,31+/- 0,05	6,44+/ -0,18	Neutru

Dozarea vitaminei C în formula testată

Introducere: vitamina C este considerată responsabilă de efectul imunostimulator și antioxidant al oricărui produs ce conține acest ingredient. Identificată ca și factorul cauzator de scorbut la persoanelor ce consumă exclusiv mâncare procesată termic, fără a avea legume și fructe proaspete în alimentație, este un constituent omniprezent în dieta omului modern, sub formă de aliment și chiar în formule de vitamine pentru suplimentarea aportului. Sintetizat chimic sau extras din alimente, dozarea acidului ascorbic este o etapă obligatorie în procesul de control a vitaminelor ce conțin acest ingredient. Acest proces are loc în etapa de control a materiilor prime ce conțin Vitamina C, a produsului finit la eliberarea din producție, pentru fiecare serie și asupra produselor de referință păstrate în laborator pe durata termenului de valabilitate a unei serii de produs.

Obiectiv: Scopul prezentei cercetari este de a determina concentrația vitaminei C sub forma de ascorbat de Ca în produsul din formula inovativ.

Material și metodă: Testarea s-a făcut prin metoda specificată de Farmacopeea Europeană 8.0 în cadrul Laboratorului de Control Fizico-Chimic din cadrul Centrului de Cercetare Dezvoltare Companiei AC HELCOR. Au fost luate în lucru șase probe de produs finit, pulverizate, diluate, respectiv 6 soluții test conform metodei de dozare.

Reactivi: apă distilată; acid sulfuric diluat, 98g/l; amidon soluție R; soluție de iod (iodură de potasiu) 0.05M.

Mod de lucru

- *Soluție probă:* la 113.7 2mg pulbere de comprimate corespunzătoare la 80 mg ascorbat de calciu, se adaugă 10 ml acid sulfuric diluat, 98g/l și 80ml apă distilată apoi se agită. Se adaugă 1ml amidon soluție R. Se titrează cu soluție de iod-iodură de potasiu 0.05M cu până la colorația persistentă violet-albăstrui.
- 1 ml soluției de iod-iodură de potasiu 0.05M corespunde la 10,66 mg $C_{12}H_{14}CaO_{12} \cdot 2H_2O$.

Formula de calcul

$$\text{Ascorbat de calciu, mg/ cpr.} = \frac{V \times 10,66 \times M}{G_p}, \text{ în care:}$$

V: volumul soluției de iod-iodură de potasiu 0.05M folosit la titrare, în ml;

M: masa medie a comprimatelor, în mg;

G_p: masa pulberii de comprimate luată în lucru, în mg;

10,66 = echivalentul soluției de iod-iodură de potasiu 0.05M utilizată la titrare

Determinările se efectuează cu biureta;

Standard Conținutul de ascorbat de calciu pe comprimat trebuie să se situeze în intervalul: 605,0 mg ± 5%.

Rezultate

Rezultatele sunt prezentate în tabelul numărul 2.

Tabel nr. 2

Nr. probă	Volum de titrare, ml	Rezultate (mg ascorbat de calciu pentru un cpr.)
1	7,50	605.27
2	7.60	606.41
3	7.55	605.74
4	7.60	606.45
5	7.50	605.53
6	7.50	605.26
Nr. de valori (n):		6
Media (X):		605.77
Deviația standard (SD):		0,56
Deviația standard relativă (RSD), %:		0,09
Limita de încredere, P = 0,95		± 0,56
Intervalul de încredere al mediei, mg/ cpr.		605,21 ÷ 606,33

Concluzii: calculul statistic atestă că deviația standard relativă este de 0,09%, în limita de acceptanță, ceea ce demonstrează că metoda de dozare este precisă,

respectând condiția de repetabilitate. Fiecare comprimat din formula propusă conține $605.77 \pm 0,56$ mg ascorbat de calciu.

Dozarea hesperidinei

Obiectivul cercetării: determinarea concentrației de hesperidina conform specificațiilor formulei pentru un număr de serii pilot statistic semnificativ pentru formula propusă.

Material și metodă: Studiile au fost efectuate pentru trei serii din formula inovativă și pentru complexul de bioflavonoide standardizat la 80% hesperidină (raw) față de etalonul de hesperidina (s.r). Determinarea hesperidinei a fost realizată prin metoda cromatografiei de lichide HPLC, prin eluție izocratică, pentru evaluare folosind metoda standardului extern.

Cerințe: Deviația standard relativă pentru injecții repetate - cel mult 2,0 %.

Material Reactivi: Apă bidistilată; Acid fosforic 85 %; Metanol HPLC

Aparatură și condiții de cromatografiere: Cromatograf de lichide de înaltă performanță, echipat cu: două pompe, detector UV cu lungime de undă variabilă, camera de termostatare a coloanei cromatografice etc; Coloana Luna C18, 150 x 4 mm, 5 μ m; Faza mobilă: 0.1% acid fosforic și metanol, în proporție de 60 : 40, amestecul se omogenizează, se filtrează și se degazează; Temperatura coloanei: temperatura camerei; Viteza de eluție: 1 ml/ min; Detecție UV la 280 nm; Volum de injecție: 10 μ l; Evaluare: metoda standardului extern.

Soluții folosite în determinare

Soluția etalon: 20.0 mg hesperidină s.r. se dizolvă în metanol și se diluează la 50 ml cu același solvent, într-un balon cotat (0,40 mg/ ml hesperidină); Soluția probă: 1720.0 mg pulbere de comprimate corespunzătoare la 20.0 mg complex de bioflavonoide, standardizat la 80% hesperidină, se agită timp de 30 minute la ultrasunete, cu aproximativ 30 ml metanol, iar apoi se diluează la 50 ml cu același solvent, într-un balon cotat. Soluția se filtrează prin filtru de 0,45 μ m.

Mod de lucru: Coloana cromatografică se echilibrează cu faza mobilă. Se injectează câte 10 μ l soluție etalon și 10 μ l soluție probă, se înregistrează cromatogramele și se obțin prin integrare:

- aria picului corespunzător hesperidinei din soluția etalon;
- aria picului corespunzător hesperidinei din soluția probă.

Rezultate Au fost măsurate ariile picurilor principale din cele două cromatograme și a fost calculată cantitatea de hesperidină, mg/ cpr:

$$\text{Concentrația de hesperidină (mg)/ cpr.} = \frac{A_p \times G_e \times M}{A_e \times G_p}, \text{ în care:}$$

A_e – aria picului corespunzător hesperidinei din *soluția probă*;

G_e – masa etalonului de hesperidină s.r. luată în lucru, mg;

M – masa medie a comprimatelor, mg;

A_e – aria picului corespunzător hesperidinei din *soluția etalon*;

G_p – masa pulberii de comprimate luată în lucru, mg.

Limitele prevăzute pentru hesperidină pentru un comprimat sunt de 8 mg \pm 10% (7.20 \div 8.80).

Stabilitatea și performanțele sistemului cromatografic (fiabilitatea sistemului).

Pe baza cromatogramelor obținute în urma injectării repetate (6 injectări) a *soluției etalon – 0,40mg/ ml hesperidină* în solventul de extracție preparată conform metodei, s-au determinat parametri de caracterizare ai performanțelor sistemului.

REZULTATE Studiile au fost efectuate pentru complexul de bioflavonoide standardizat la 80% hesperidină și pentru trei serii din formula inovativă propusă spre brevetare.

A. Dozarea hesperidinei în substanța de referință prin metoda cromatografică

Rezultatele obținute sunt redate în tabelele nr. 3, 4 și 5, iar cromatogramele obținute în *figura nr. 6* (vezi secțiunea „Desene”)

Tabel nr. 3. Rezultatele cromatogramelor probelor de hesperidină (proba 1-6)

Proba testată	timp (min)	H (μV)	A (μV x s)
1.	8.56	215901	8357440
2.	8.52	217573	8337543
3.	8.48	220967	8354387
4.	8.46	221205	8383275
5.	8.46	219536	8407282
6.	8.56	217465	8367260
Număr injectări, n	6	6	6

61

Valoare medie, X	8.51	218774.5	8367865
Deviația standard, SD	0.05	2131.18	24500.2
Dev. stand. rel., RSD (%)	0.55	0.97	0.29

Tabel nr. 4 Rezultatele cromatogramelor probelor de hesperidină (proba 1-6)

Compusul		W _{h/2} , min	Factor asimetrie, T	Nr. talere teoretice, N
Hesperidină				
Proba	1.	0.5292	2.104	1450
	2.	0.5290	2.125	1435
	3.	0.5246	2.143	1448
	4.	0.5215	2.133	1459
	5.	0.5239	2.114	1445
	6.	0.5253	2.116	1456
Număr injecții, n		6	6	6
Valoare medie, X		0.5256	2.123	1448.8
Deviația standard, SD		0.00	0.01	8.52
Dev. stand. rel., RSD (%)		0.57	0.66	0.59

Tabel nr. 5 Valoarea medie a rezultatelor obținute pentru 6 probe luate în lucru (hesperidină s.r.)

Nr. crt.	Compusul	Timp de retenție (t), min	Nr. talere teoretice, N	Factor asimetrie, T
1.	Hesperidină	8.51	1448.8	2.123

Concluzii Parametrii care definesc picurile (timp de retenție, înălțime, arie, lățimea picului la jumătatea înălțimii) precum și parametri de performanță ai sistemului (factor de asimetrie, număr de talere teoretice) sunt reproductibili, prezentând o deviație standard relativă sub 2 % (pentru timp de retenție, aria picului), fapt ce demonstrează că sistemul este stabil și performant, deci corespunde scopului propus (vezi tabel nr. 3, 4, 5 și figura nr.1).

Cerințele impuse metodei pentru a fi satisfăcătoare sunt îndeplinite, adică:

- Deviația standard relativă la injecții repetate, pentru:
- timpul de retenție: 0.55% < 2.0 %;
- arie: 0.29% < 2.0%.

B. Dozarea hesperidinei în formula propusă spre brevetare prin metoda cromatografică

S-au testat 3 probe de produs (S350515; S460615 și S550715) pregătite și analizate conform metodei de dozare. Din fiecare proba au fost pregătite probe unice și omogene (pulberea a 20 de comprimate cărora li s-a determinat masa medie). Rezultatele sunt prezentate în cromatogramele din figurile nr. 6, 7, 8, 9 (vezi secțiunea „Desene”) și tabelul nr. 6.

Tabel nr. 6. Valori obținute la dozarea hesperidinei în formula propusă

Nr. probe	Număr serie	Aria picului $\mu V \times s$	Concentrația de hesperidină, (mg/ cpr)
Proba 1	S350515	6665548	8,48
Proba 2		6645422	8,46
Proba 3	S460615	6295257	8,01
Proba 4		6253436	7,96
Proba 5	S550715	6213865	7,91
Proba 6		6242824	7,95

Dozarea hesperidinei pentru 6 probe ale formulei propuse (testate) este reprezentată grafic în figura nr. 10 (vezi secțiunea „Desene”).

C. dozarea hesperidinei în substanța complex de bioflavonoide 80%

În aceleași condiții s-a testat și complexul de bioflavonoide pe care producătorul îl declară cu un conținut de minim 80% hesperidină (lot C20140412). Rezultatele sunt prezentate în Tabelul nr. 7 și Figura nr. 11 (vezi secțiunea „Desene”).

Tabel nr. 7 Dozarea concentrației de hesperidină în complexul de bioflavonoide (80% hesperidină)

Număr probă	Aria $\mu V \times s$	Hesperidină, % (g/g)
Proba 1 complex BF	6947139	84.2
Proba 2 complex BF	6985394	84.7
Media		84.45

Concluzii: Dozarea de hesperidină din cele trei serii de comprimate testate se încadrează între valoarea minimă de 7.91mg/cpr., și valoarea maximă de 8.48 mg/cpr, in limitele prevăzute de specificație (7.20 + 8.80 mg/cpr.). Dozarea de hesperidină din complexul de bioflavonoide standardizat la minim 80% hesperidină are valoarea medie de 84.45%.

Studiul de dizolvare *in vitro*. Testarea formulei de eliberare prelungită

Introducere: realizarea adecvată a formei farmaceutice de comprimate cu vitamina C în forma ascorbat și hesperidina - cu eliberare prelungită se verifică prin intermediul studiului de dizolvare *in vitro*, efectuat pentru a stabili dacă produsul analizat respectă termenii Specificației de calitate, care prevede ca produsul să fie cu eliberare prelungită.

Materiale și metodă: a fost testat produsul propus spre brevetare realizat sub forma farmaceutică de comprimate cu eliberare prelungită (ce conțin 605mg ascorbat de calciu, echivalent cu 500mg acid ascorbic) prin metoda descrisă în Farmacopeea Europeană Ph. Eur./ U.S.P. în vigoare, în aparat de dizolvare *in vitro* SR 8 – PLUS – Hanson Research (coșulețe) în mediu de apă distilată.

A fost luată în lucru următoarea probă pentru determinarea gradului de eliberare a ascorbatului de calciu din formula propusă.

Produs test	Substanța activă	Forma farmaceutică
Formula propusă	Ascorbat de calciu	comprimate cu eliberare prelungită

Volumul mediului: 900 ml

Număr de rotații: 50/ minut

Timp de dizolvare: 480 minute

Temperatura: $37 \pm 0,5$ °C

Cantitatea de ascorbat de calciu dizolvată a fost evaluată prin titrare volumetrică cu o soluție de iod-iodură de potasiu. Timpi de prelevare a probelor au fost la 1 oră și la 8 ore.

Mod de lucru: Testul a fost efectuat pe câte șase (6) comprimate cu eliberare prelungită din produsul propus spre brevetare. Se introduce câte un comprimat în fiecare din vasele dispozitivului de dizolvare, în care se găsesc 900 ml mediu de dizolvare încălzit la $37 \pm 0,5$ °C. La 1 oră și 8 ore se prelevează câte 100 ml soluție. Din probele prelevate se determină concentrația de acid ascorbic dizolvat, prin titrare volumetrică. Cantitatea de ascorbat de calciu dizolvată din comprimatele cu eliberare prelungită ale suplimentului alimentar propus spre brevetare a fost determinată prin titrare volumetrică, conform metodei de dozare din Farmacopeea Europeană 8.0 a ascorbatului de calciu.

Formula de calcul utilizată pentru determinarea procentului de ascorbat de calciu dizolvat este:

$$Q_1 = \frac{V \times E_1 \times 900}{605}$$

$$Q_8 = \frac{V \times E_8 \times 900}{605} + \frac{100}{900} \times Q_1, \text{ în care}$$

$Q_{1,8}$ = ascorbat de calciu dizolvat după 1 oră și respectiv 8 ore, %;

E_1 = echivalentul soluției de iod-iodură de potasiu utilizată la titrare după 1 oră pentru soluția I₂-KI 0,01N = 1.066

E_8 = echivalentul soluției de iod-iodură de potasiu utilizată la titrarea după 8 ore pentru soluția I₂-KI 0,025N = 2.665, 605, 100, 900 = factori de diluție;

Observație: După o oră probele se titrează cu soluție I₂-KI 0,01N iar după 8 ore se titrează cu soluție I₂-KI 0,025N, utilizându-se, de fiecare dată, ca indicator 1 ml soluție amidon (R) și 10 ml H₂SO₄ 98 g/l. Conținutul de ascorbat de calciu dizolvat trebuie să fie dizolvat în proporție de 20 ÷ 40 % după o oră și de minim 70% după 8 ore.

Tabel nr. 8. Rezultatele testului de dizolvare a ascorbatului de calciu la o oră pentru probele analizate

Nr. Proba (comprimate)	1	2	3	4	5	6
ascorbat de calciu dizolvat (%)	22.4	23.1	25.2	23.6	25.2	25.0
Valoare medie (%)	24.1					
Valoare minima (%)	22.4			SD	1.21	
Valoare maxima (%)	25.2			RSD	5.04	

Rezultat: Proba analizată la parametrul dizolvare are cea mai mică valoare obținută de 24.1% iar cea mai mare de 25.2% care se situează în intervalul prevăzut de specificație 20÷40%; deci sunt respectate cerințele Specificației.

Tabel nr. 9. Rezultatele testului de dizolvare a ascorbatului de calciu la 8 ore, pentru probele analizate

Proba nr.	1	2	3	4	5	6
Ascorbat de calciu dizolvat (%)	86.7	89.2	89.2	86.3	87.2	84.7
MEDIA	87.2					
MIN	84.7			SD	1.75	
MAX	89.2			RSD	2.01	

Rezultat: Valoarea medie a ascorbatului de calciu dizolvat la interval de 8 ore a fost de 87,2% +/- 1,75 din cantitatea initiala. Proba analizată la parametrul dizolvare

are cea mai mică valoare obținută de 84.7% față de limita minimă impusă de 70%, fiind în conformitate cu cerințele specificației.

Concluzii: din studiul efectuat pentru proba luată în lucru în mediul apă distilată, reiese că proba corespunde specificației cu privire la parametrul dizolvare a ascorbatului de calciu din forma dozată cu eliberare prelungită studiată, valorile % de dizolvare la o oră situându-se în intervalul $20 \pm 40\%$ (24.1%), iar la 8 ore peste 70% (87.2%).

Studiile menționate relevă caracterul neutru și conținutul în substanțe active ale produsului, precum și formularea farmaceutică retard, care conferă o prelungire a duratei temporale de manifestare a efectelor benefice asupra organismului uman.

REVEDICĂRI

1. Supliment alimentar cu potențial antioxidant și imunostimulator caracterizat prin aceea că este constituit din: 70.35% ascorbat de calciu, 1.16% complex de bioflavonoide (standardizat la 80% hesperidină) și excipienți, procentele fiind exprimate în greutate.

2. Supliment alimentar conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că se prezintă sub formă de comprimate cu eliberare prelungită (retard), favorizând absorbția lentă a ingredientelor active (vitamina C și hesperidina) și implicit o acțiune îndelungată a acestora în organism (susținând un efect antioxidant prelungit și funcționarea optimă a sistemului imunitar pe o durată mai mare de timp).

3. Utilizarea suplimentului alimentar definit la revendicările 1 și 2, pentru susținerea funcționării adecvate a sistemului imunitar (prin conținutul crescut în vitamina C, potențat de adaosul de hesperidină), într-o manieră care asigură acțiunea pe termen lung a acestor ingrediente (datorită formulării retard), evitându-se, crearea unui mediu acid în organism, prin utilizarea ascorbatului de calciu (în locul variantei clasice de acid ascorbic).

DESENE EXPLICATIVE

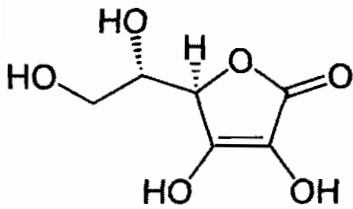


Figura nr. 1 Structura chimică a acidului ascorbic (IUPAC 2-oxo-L-treo-hexono-1,4-lactone-2,3-enediol)

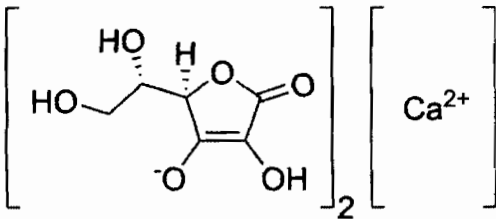


Figura nr. 2 Structura chimică a ascorbatului de calciu (calciu (2R)-2-[(1S)-1,2-dihidroxietyl]-4-hidroxi-5-oxo-2H-furan-3-olat)

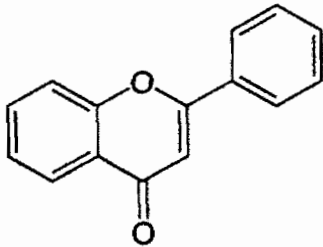


Figura nr. 3 Structura moleculară a scheletului (bio)flavonoidelor (2 fenil, 1,4-benzopirona)

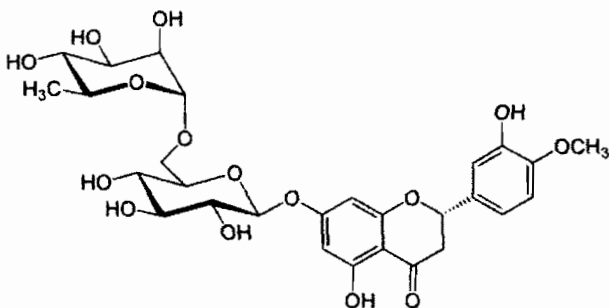


Figura nr. 4 Hesperidin 7 rutinozid – structura chimică (glicozida flavanonei hesperetină)

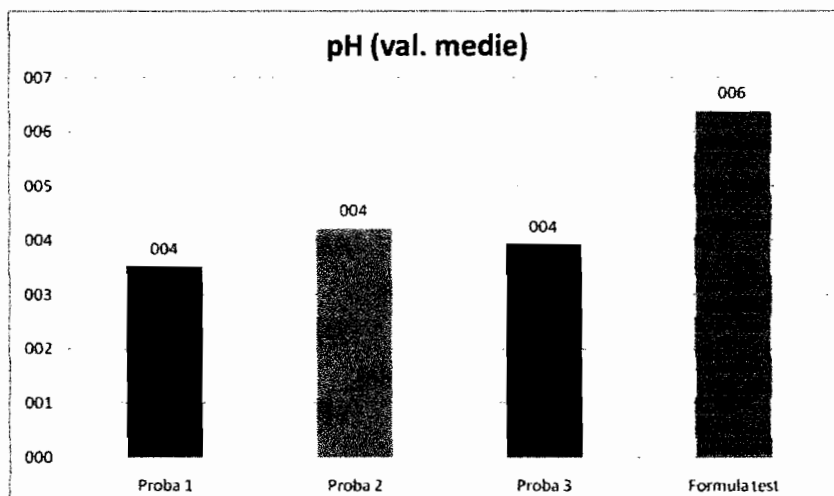


Figura nr. 5. pH-ul soluțiilor probelor de produs testat existent față de formula inovatoare propusă. Formula test prezintă un pH neutru (6,38) față de un pH acid al produselor existente, testate (3,52; 4,22; 3,93)

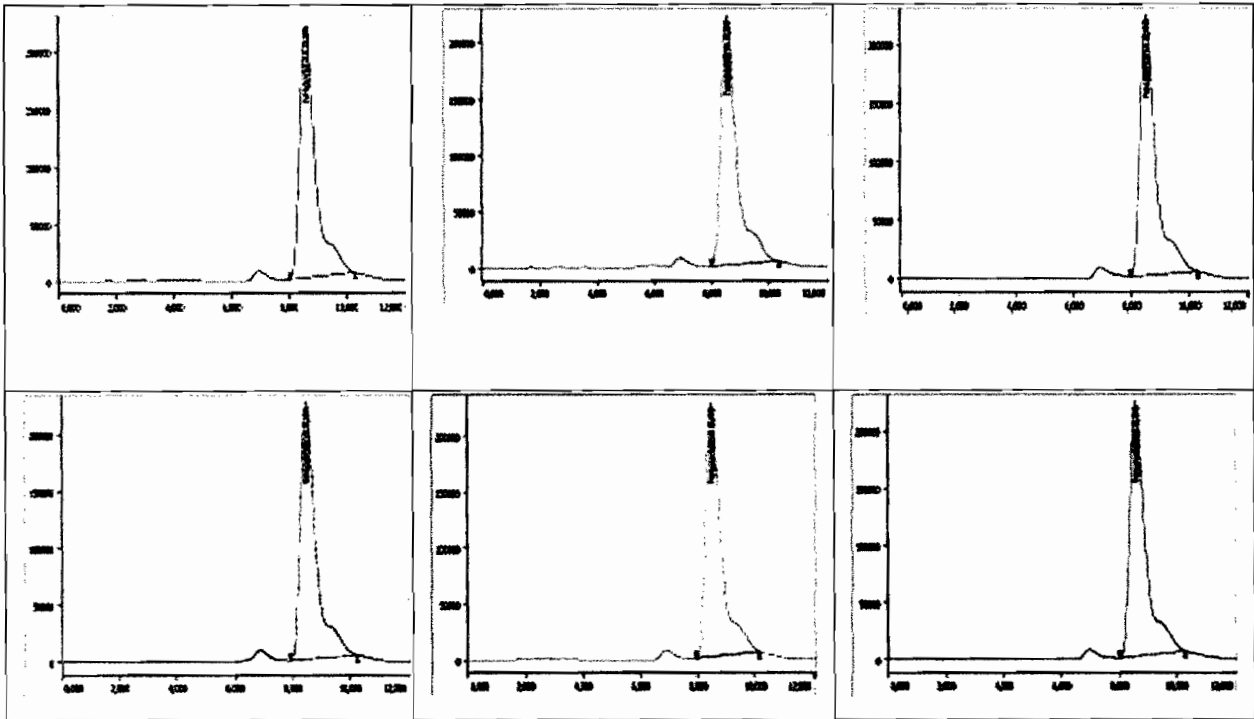


Figura nr. 6. Cromatogramele determinărilor pentru substanța de referință în soluția etalon 0,40 mg/ml hesperidină s.r. în metanol

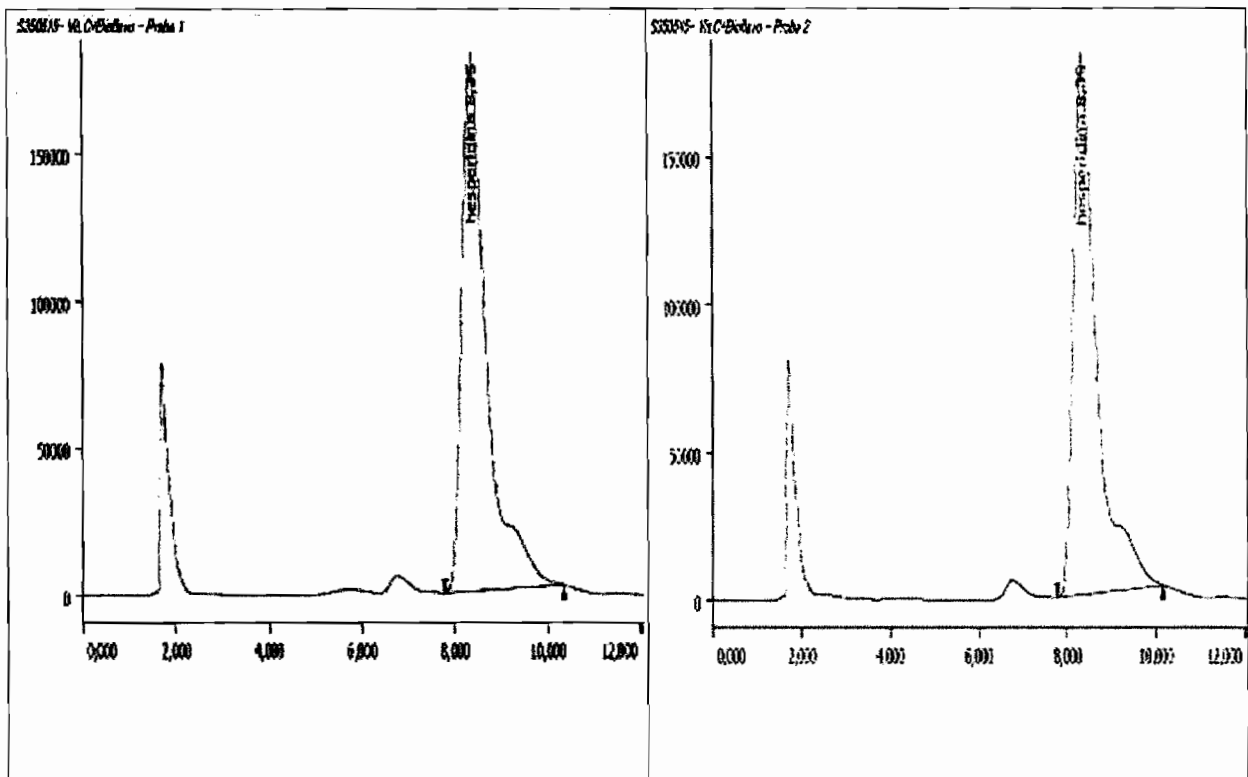


Figura nr. 7 Cromatogramele pentru dozarea hesperidinei din formula propusă (comprimate, seria S350515)

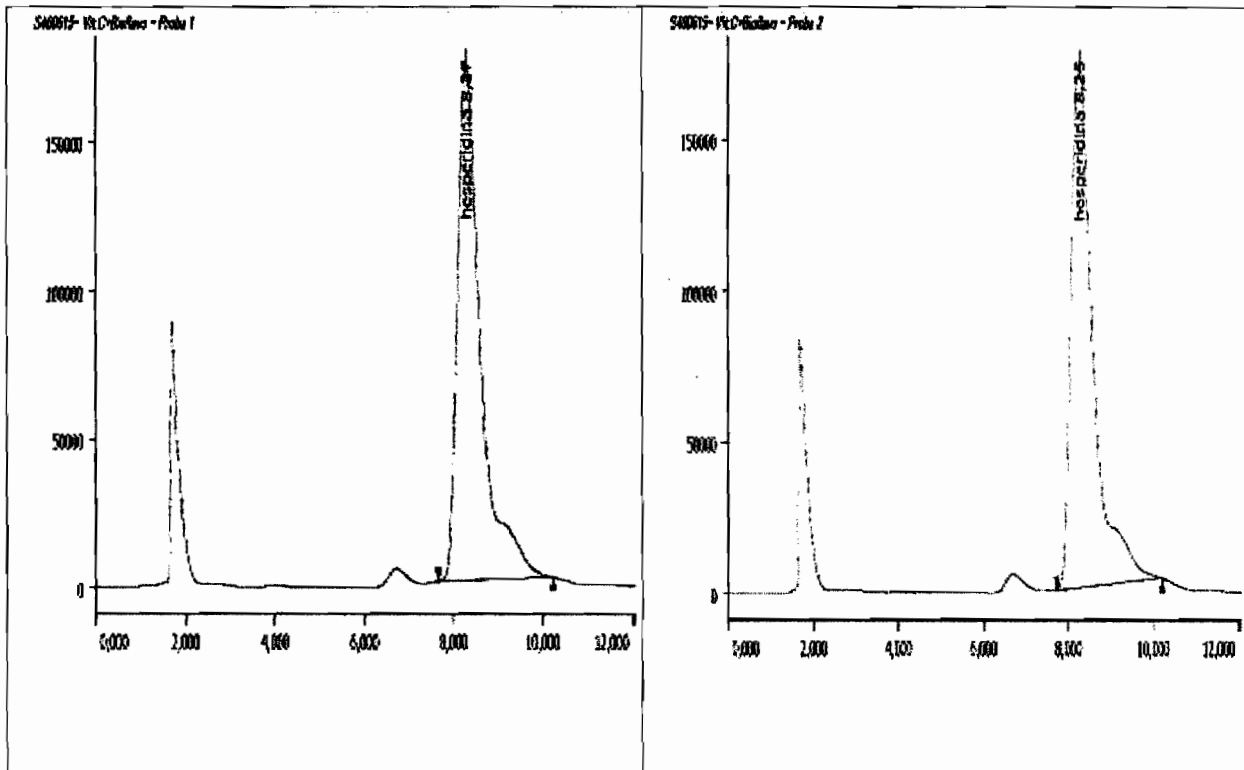


Figura nr. 8 Cromatogramele pentru dozarea hesperidinei din formula propusă
(comprimate, seria S460615)

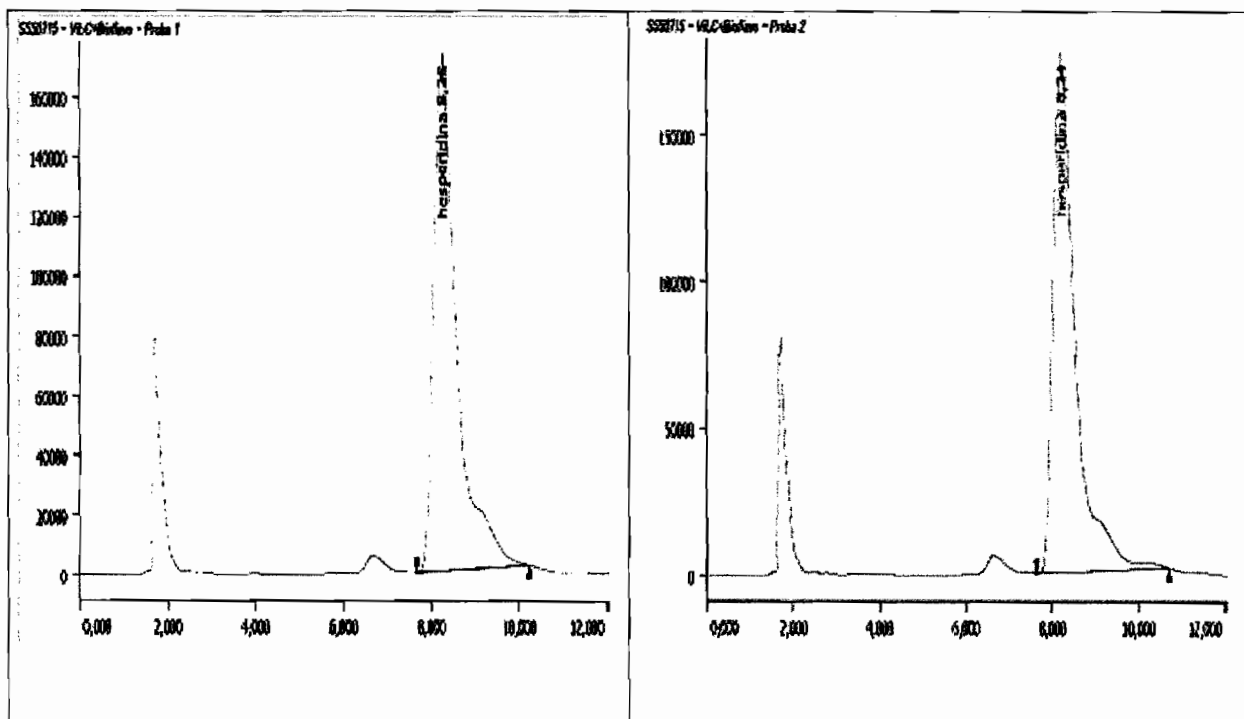


Figura nr. 9 Cromatogramele pentru dozarea hesperidinei din formula propusă
(comprimate, seria S550715)

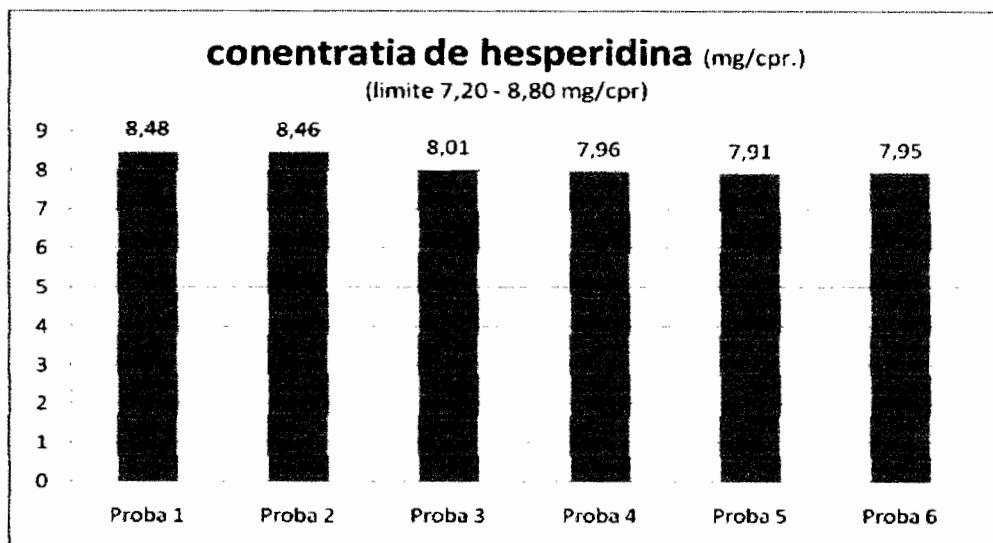


Figura nr. 10. Dozarea hesperidinei pentru 6 probe ale formulei propuse (testate).
Concentrația pentru probe se încadrează în limitele standard impuse (8+/- 10%)

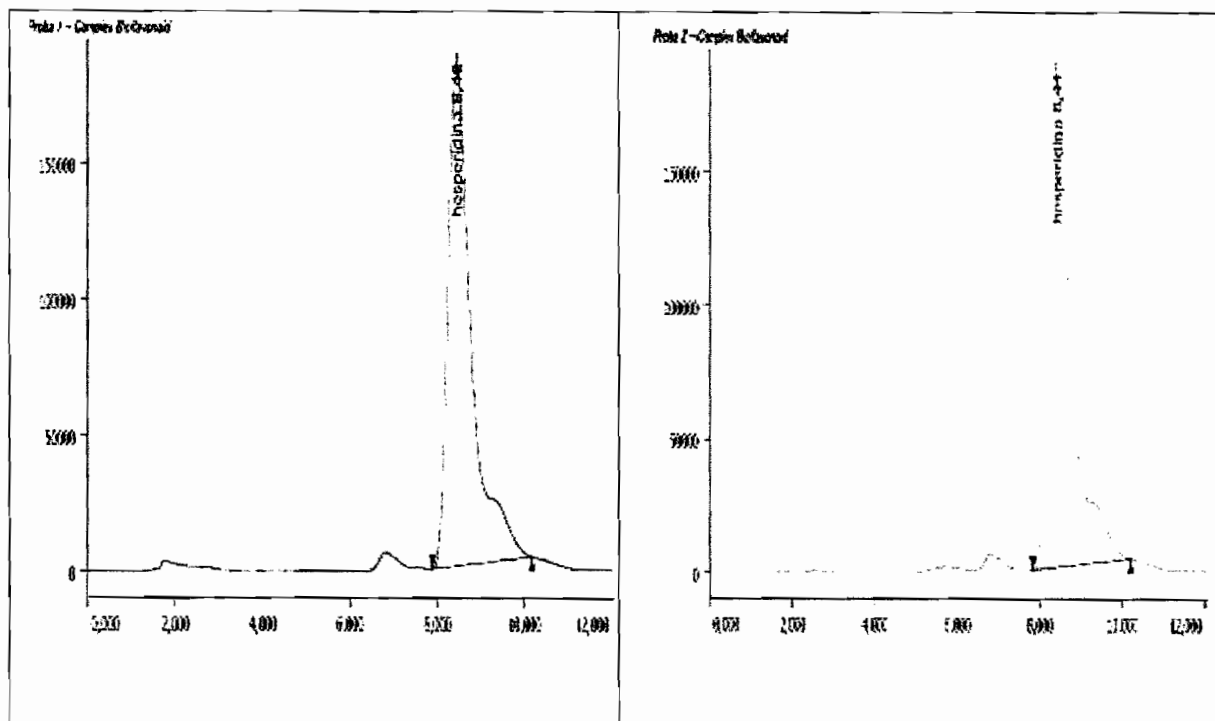


Figura nr. 11 Dozarea hesperidinei prin metoda cromatografica din complexul de bioflavonoide (standardizat la 80% hesperidină)

5/

Figura nr. 12. Schema fluxului tehnologic

