



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00485

(22) Data de depozit: 09.08.2022

(41) Data publicării cererii:  
28.02.2024 BOPI nr. 2/2024

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICA MATERIALELOR,  
STR. ATOMIȘTILOR NR. 405A,  
MĂGURELE, IF, RO;  
• PRO-VITAM S.R.L.,  
STR. MUNCITORILOR, NR.16,  
SFÂNTU GHEORGHE, CV, RO

(72) Inventatori:  
• BAIBARAC MIHAELA, ALEEA BARAJUL  
DUNĂRII, NR.1, BL.M35, SC.5, ET.10,  
AP.217, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• FEJER SZILARD, STR.PETOFI SANDOR,  
NR.16, BL.47, AP.3, TG.SECUIESC, CV, RO

(54) METODA OPTICĂ DE DETECȚIE A SĂRII DE CALCIU  
A ATORVASTATINEI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție a sării de calciu a atorvastatinei (ATC) în absența și în prezența excipienților. Metoda conform invenției implică înregistrarea spectrelor de fotoluminescență ale soluțiilor de ATC în prezența tamponului fosfat cu pH egal cu 7, în baza cărora este reprezentată o curbă de calibrare care corespunde dependenței liniare a intensității spectrelor de fotoluminescență cu concentrația soluțiilor de ATC care permite calcularea limitei de detecție determinată a fi egală cu  $0.75 \times 10^{-6}M$ , iar domeniul concentrațiilor soluțiilor de ATC în care intensitatea spectrelor de fotoluminescență prezintă o dependență liniară este cuprins între  $2 \times 10^{-3}M$  și  $1.56 \times 10^{-5}M$ .

Revendicări: 1  
Figuri: 2

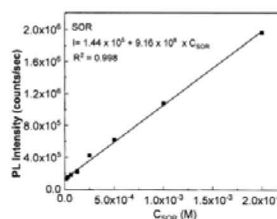
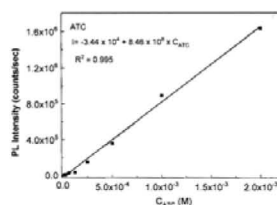


Fig. 2

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).

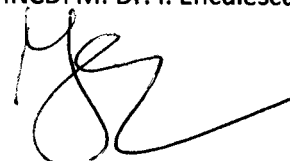


## METODA OPTICĂ DE DETECȚIE A SĂRII DE CALCIU A ATORVASTATINEI

24

Invenția se referă la metoda de detecție a sării de calciu a atorvastatinei (ATC) prin fotoluminescență atât în absența cât și în prezența excipienților existenți în medicamentul Sortis (SOR).


Principalele metode de detecție ale ATC raportate până în prezent sunt: a) cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) [T.G. Altuntas, N. Erk, Liquid Chromatographic Determination of Atorvastatin in Bulk Drug, Tablets, and Human Plasma, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 27 (2004) 83], b) spectroscopia de absorbție UV-VIS [M. Hasan, Z. Ahmed, Md R. Amin, N.S. Sherin, Development and validation of a spectrophotometric method for determination of atorvastatin calcium in bulk drug and pharmaceutical formulation, Int. J. Pharm. Res. Dev. 2 (2011) 116], c) spectroscopia Raman [D. Skorda, C.G. Kontoyannis, Identification and quantitative determination of atorvastatin calcium polymorph in tablets using FT-Raman spectroscopy, Talanta 74 (2008) 1066] și d) metodele electrochimice precum polarografia pulsată diferențiat [A.A. Ramadan, H. Mandil, B. Hafez, Differential pulse polarographic determination of atorvastatin in pharmaceutical dosage forms using dropping mercury electrode, Asian J. Chem. 25 (2013) 3467], voltametria ciclică [J.C. Abbar, S.T. Nandibewoor, Voltammetric oxidation and determination of atorvastatin based on the enhancement effect of cetyltrimethyl ammonium bromide at a carbon paste electrode, Colloids Surf. B. Biointerf 106 (2013) 158] și analizele potențimetrice [F. Jalali, M. Ardeshiri, application of carbon nanotubes-ionic liquid hybrid in a sensitive atorvastatin ion-selective electrode, Mater. Sci. Eng. C 69 (2016) 276]. În cazul metodelor electrochimice au fost utilizați diferiți electrozi de tipul: a) electrodului pastă de grafit modificată cu nanotuburile de carbon cu mai mulți pereți [A. Mohammadi, A.B. Moghaddam, K. Elikhanizadeh, E. Alikhani, S. Mozaffari, T. Yavari, Electro-oxidation and simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin in commercial tablets using carbon nanotube modified electrode, Micro Nano Lett. 8 (2013) 412], b) electrozi de oxid de grafenă și nanotuburi de carbon aliniată vertical [T.A. Silva, H. Zanin, F.C. Vicentini, E.J. Corat, O. Fatibello-Filho, Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of atorvastatin calcium in pharmaceutical and biological samples using a vertically aligned carbon nanotube/graphene oxide electrode, Analyst 139 (2014) 2832], c) electrod de carbon



sticlos/nanotuburi de carbon/polipirol [Z. Kamalzadeh, S. Shahrokhian, Electrochemical determination of atorvastatin on nanoscaled polypyrrole film, bioelectrochem 98 (2014) 1], d) electrod pastă de carbon/ nanoparticule de ZnO/nanoparticule de SiO<sub>2</sub> [S.D. Bukkitgar, N.P. Shetti, R.M. Kulkarni, Construction of nanoparticles composite sensor for atorvastatin and its determination in pharmaceutical and urine samples, Sens. Actuators B: Chem. 255 (2018) 1462], e) electrod serigrafat modificat cu nanoparticule de PbTe [E. Pourtaheri, M.A. Taher, G.A. Ali, S. Agarwal, V.K. Gupta, Low-cost and highly sensitive sensor for determining atorvastatin using PbTe nanoparticles-modified graphite screen-printed electrode, Int. J. Electrochem. Sci. 14 (2019) 9622] și f) electrod de carbon sticlos/particule de Au/nanofire de Ag [A. Naseri, M.R. Hormozi-Nezhad, S. Shahrokhian, E. Asadian, Silver nanowires immobilized on gold-modified glassy carbon electrode for electrochemical quantification of atorvastatin, J. Electroanal. Chem. 876 (2020) 114540].

În ceea ce privește limita de detecție (LOD), funcție de metoda electrochimică și tipul de electrod folosit în detecția electrochimică sunt raportate valori în domeniul de concentrații 1.2 μM [Wei, L. Electrochemical Sensor for Ultrasensitive Determination of Atorvastatin Based on Polypyrrole Functionalized Graphene Sheets, Int. J. Electrochem. Sci. (2018) 10173] – 1.2 x 10<sup>-4</sup> μM [Bukkitgar, S.D.; Shetti, N.P.; Kulkarni, R.M. Construction of Nanoparticles Composite Sensor for Atorvastatin and Its Determination in Pharmaceutical and Urine Samples. Sens. Actuators B Chem. 255, (2018) 1462]. Valorile LOD ale ATC în cazul utilizării ca metoda de detecție: a) HPLC este 1.5 x 10<sup>-8</sup> M (0.0084 μg/ml) [T.G. Altuntas, N. Erk, Liquid Chromatographic Determination of Atorvastatin in Bulk Drug, Tablets, and Human Plasma, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 27 (2004) 83] și b) spectroscopia UV-VIS este 1.9 x 10<sup>-6</sup> M (1.07 μg/ml) [M. Hasan, Z. Ahmed, Md R. Amin, N.S. Sherin, Development and validation of a spectrophotometric method for determination of atorvastatin calcium in bulk drug and pharmaceutical formulation, Int. J. Pharm. Res. Dev. 2 (2011) 116].

Principalele dezavantaje ale metodelor de detecție ale ATC de mai sus sunt numărul mare de reactanți suplimentari, timpul mare de preparare al electrozilor necesari pentru detecția prin metode electrochimice, personalul înalt specializat și echipamente scumpe cum este cazul cromatografului de lichide de înaltă performanță sau al spectrofotometrelor Raman.



Înlăturarea acestor dezavantaje este realizată în prezenta invenție utilizând fotoluminescența ca metodă optică de detecție. Conform invenției, fotoluminescența va fi utilizată ca metodă optică de detecție a ATC și a SOR. Proprietățile fotoluminescente ale ATC și SOR au fost raportate recent în 2021 [M. Oprica, M. Iota, M. Daescu, S.N. Fejer, C. Negrila, M. Baibarac, Spectroscopic studies on photodegradation of atorvastatin calcium, Sci. Rep. 11 (2021) 15338].

În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției. În vederea detecției ATC și a SOR, spectrele de fotoluminescență (PL) au fost efectuate folosind un spectrofotometru Fluorolog, model 3.2.2.1, de la Horiba Jobin Yvon, în configurația „right angle”. ATC a fost achiziționat de la compania Sigma-Aldrich și SOR de la o farmacie locală. Compoziția medicamentului SOR este 10 sau 20 mg ATC, microcristale de celuloză, carbonat de calciu, lactoză monohidrată, poli sorbat 80, magneziu stearat, hidroxil propil celuloză și croscarmeloză de sodiu. În vederea detecției ATC și SOR, au fost preparate în fiecare caz câte opt soluții în prezența tampon fosfatului cu pH=7 având concentrațiile egale cu:  $2 \times 10^{-3}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $2.5 \times 10^{-4}$  M,  $1.25 \times 10^{-4}$  M,  $6.25 \times 10^{-5}$  M,  $3.12 \times 10^{-5}$  M și  $1.56 \times 10^{-5}$  M. Cele opt soluții de ATC și respectiv de SOR au fost stocate la întuneric înainte de înregistrarea spectrelor de PL. Spectrele de PL au fost înregistrate la lungimea de undă de excitație de 275 nm în domeniul spectral 300 - 530 nm, timpul de incrementare fiind egal cu 0.5 sec. Conform Figurii 1, care prezintă spectrele de PL ale soluțiilor de ATC (Figura 1a) și ale SOR (Figura 1b) la cele 8 concentrații menționate mai sus se observă că în toate cazurile spectrele de PL sunt caracterizate printr-o bandă de emisie având maximumul la 370 nm în cazul ATC și la 388 nm în cazul SOR. O scădere a intensității spectrelor de PL ale ATC și SOR se observă a avea loc în mod gradual când concentrația soluțiilor celor două probe scade. Figura 2 prezintă dependența intensității spectrelor de PL cu concentrația soluțiilor de ATC și SOR. Această dependență este de tip liniară. Acest fapt permite a concluda ca domeniul de liniaritate al intensităților spectrelor de PL corespunde domeniului de concentrații al ATC și SOR cuprins între  $2 \times 10^{-3}$  și  $1.56 \times 10^{-5}$  M.

Curba de calibrare în cele două cazuri poate fi descrisă de următoarele ecuații în cazul:

a) ATC,  $I_{PL} = -3.44 \times 10^4 + 8.46 \times 10^8 \times C_{ATC}$ , unde  $C_{ATC}$  = concentrația molară a ATC;

b) SOR,  $I_{PL} = 1.44 \times 10^5 + 9.16 \times 10^8 \times C_{SOR}$ , unde  $C_{SOR}$  = concentrația molară a SOR.



În scopul detecției ATC și SOR prin fotoluminescență, în cele ce urmează va fi calculată limita de detecție (LOD) și limita cantitativă (LOQ). LOD poate fi determinat printr-o abordare statistică bazată pe măsurarea probelor martor sau printr-o abordare empirică, constând în măsurarea concentrațiilor din ce în ce mai diluate de analit. În cazul nostru s-a utilizat abordarea empirică. LOQ corespunde concentrației la care rezultatele cantitative pot fi raportate cu un grad ridicat de încredere. LOD și LQD pot fi calculate cu următoarele ecuații:

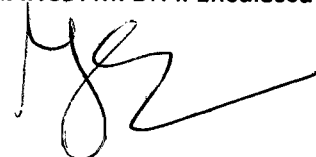
$LOD = 3.3 * \sigma/S$  și  $LQD = 10 * \sigma/S$ , unde  $\sigma$  este deviația standard reziduală a unei regresii liniare și S este panta curbei de calibrare.

Valorile LOD și LQD în cazul: a) ATC sunt egale cu  $0.75 \times 10^{-6} M$  și  $0.23 \times 10^{-5} M$  și b) SOR sunt egale cu  $0.58 \times 10^{-6} M$  și  $0.18 \times 10^{-5} M$ .

Acuratețea metodei propuse a fost evaluată folosind trei concentrații diferite ale probei ATC care acoperă intervalul de liniaritate prezentat în Figura 1a, și anume  $7.5 \times 10^{-4} M$ ,  $1 \times 10^{-4} M$  și  $5 \times 10^{-5} M$ , fiecare în trei exemplare, precizia de determinare a ATC fiind fost calculată ca procent de recuperare (%R), acesta fiind egal cu 99.75%.

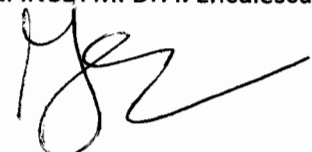
În vederea evaluării preciziei metodei, spectrele de PL ale trei soluții de ATC având concentrația de  $10^{-3} M$  au fost înregistrate după stocarea soluțiilor la întuneric timp de o zi în vedere ilustrării repetabilității și respectiv după stocarea soluțiilor 4 zile succesive pentru ilustrarea preciziei intermediare. Precizia metodei a fost calculată pe baza intensității spectrelor de PL, deviația standard relativă în procente (%RSD) în cazul repetabilității fiind egală cu 1.13%, în timp ce în cazul preciziei intermediare aceasta este de 1.83%.

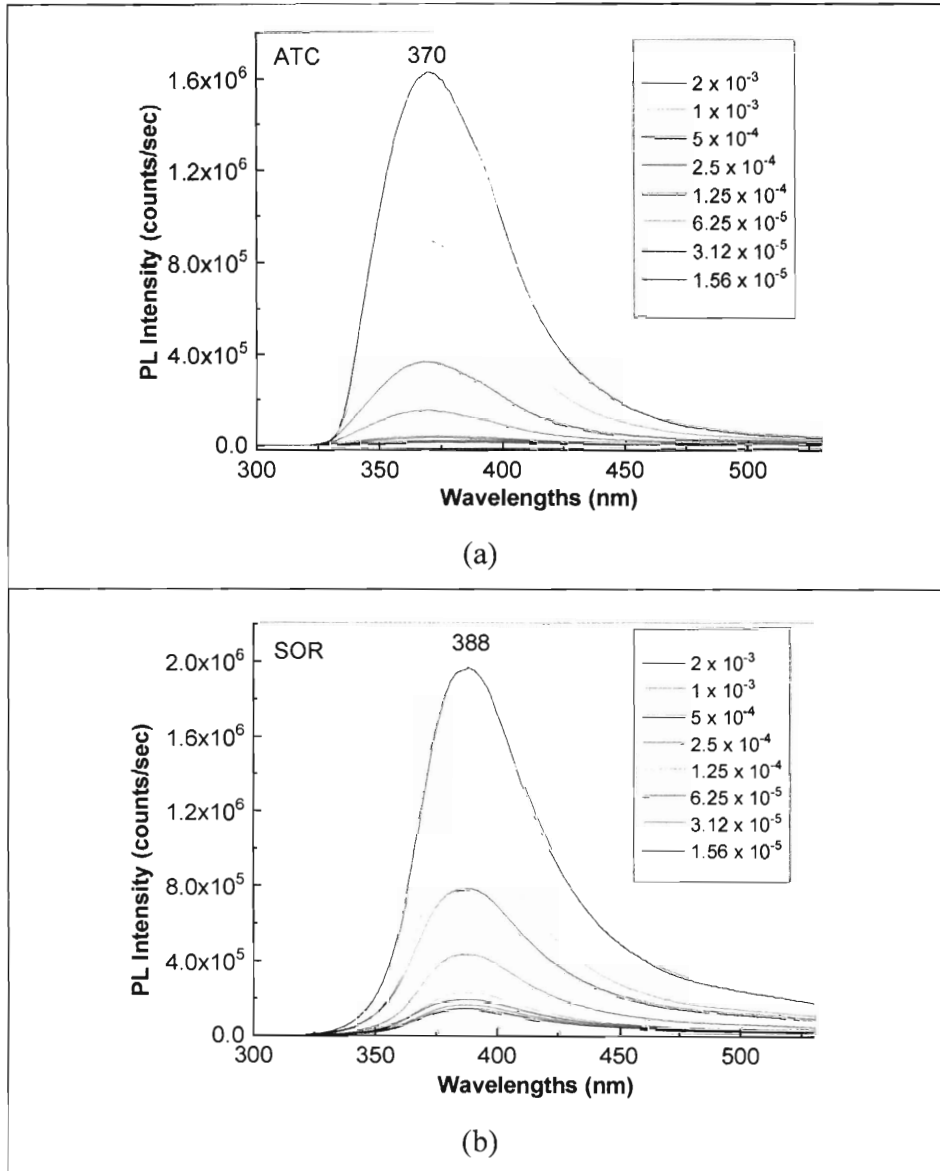
Metoda de detecție a ATC și SOR prin fotoluminescență, conform invenției prezintă următoarele avantaje: i) metoda implică dizolvarea ATC și SOR în soluții tampon fosfat cu pH egal cu 7, numărul de reactivi fiind mai mic decât în cazul altor tehnici cum ar fi metodele electrochimice, spectroscopia Raman și cromatografia de lichide de înaltă performanță; ii) valoarea limitei optime de detecție (LOD) este de  $0.75 \times 10^{-6} M$ , valoare care este mai mică în comparație cu alte metode de detecție optică cum ar fi spectroscopia de absorbție UV-VIS; iii) liniaritatea intensității spectrelor de PL este în domeniul de concentrații al ATC cuprins între  $2 \times 10^{-3}$  și  $1.56 \times 10^{-5} M$ ; iv) metoda este rapidă și precisă, având posibilitatea de a fi folosită și în cazul altor medicamente.



**METODA OPTICĂ DE DETECȚIE A SĂRII DE CALCIU A ATORVASTATINEI****RE V E N D I C A R E**

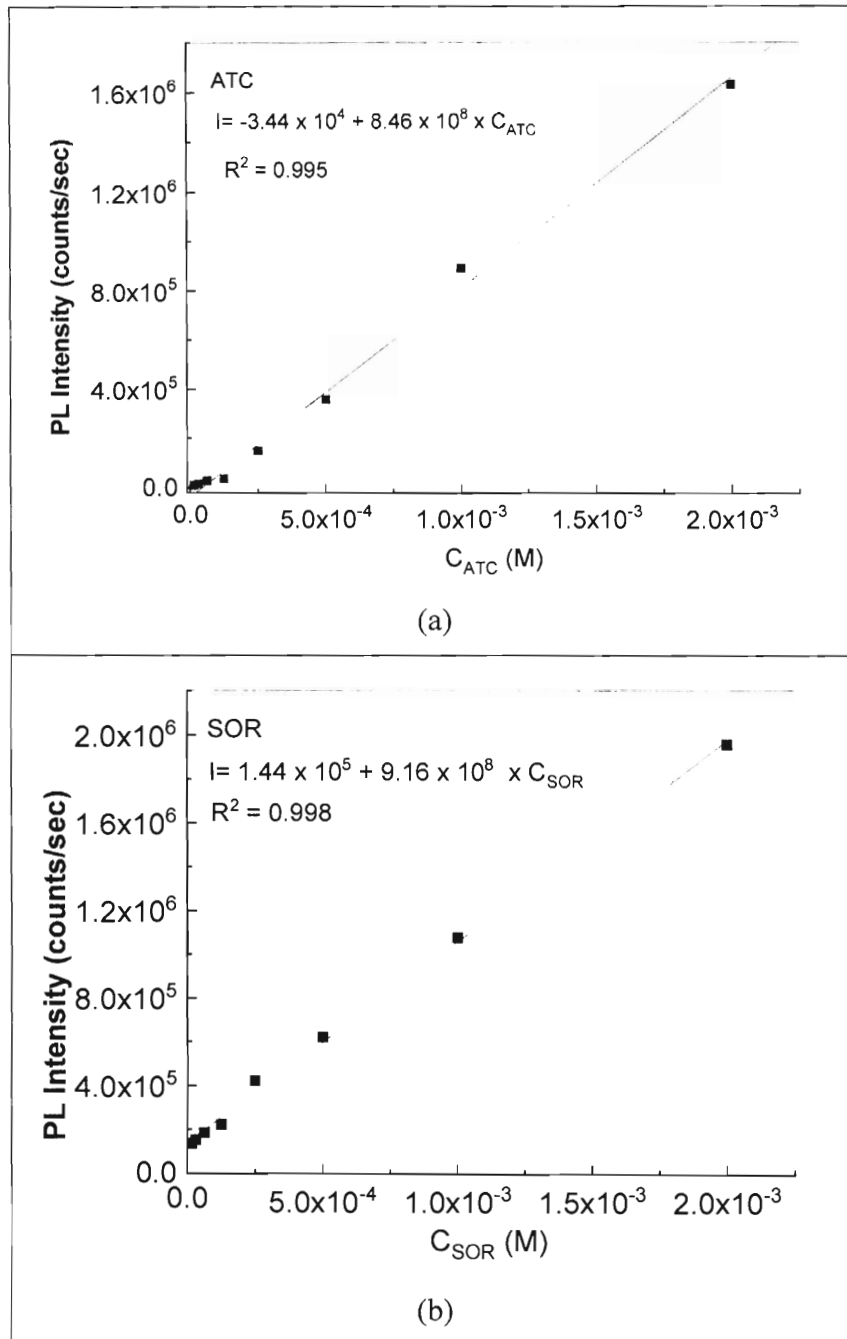
1. Invenția se referă la metoda de detecție a sării de calciu a atorvastatinei care este realizată utilizând fotoluminescența, aceasta fiind caracterizată prin aceea că permite evidențierea dependenței intensităților spectrelor de fotoluminescență ale atorvastatinei, înregistrate în domeniul spectral 300-530 nm, când lungimea de undă de excitație este de 275 nm, cu concentrația soluțiilor de atorvastatin calciu preparate în prezența tamponului fosfat cu pH egal cu 7, când domeniul de liniaritate al intensităților spectrelor de fotoluminescență este cuprins între  $2 \times 10^{-3}$  și  $1.56 \times 10^{-5}$  M și limita de detecție este de 0.75 pM.





**Figura 1.** Spectrele de fotoluminescență ale soluțiilor de ATC (a) și de SOR (b) la diferite concentrații molare menționate în inserturile figurilor (a) și (b), când lungimea de undă de excitare este de 275 nm.

18



**Figura 2.** Dependența intensității spectrelor de fotoluminescență ale soluțiilor de ATC (a) și SOR (b).