

Vibrational detection of acetaminophen in commercial tablets by QCL spectroscopy and Chemometrics

DetECCIÓN VIBRACIONAL DE ACETAMINOFÉN EN TABLETAS COMERCIALES USANDO ESPECTROSCOPÍA QCL Y QUIMIOMETRÍA

John R. Castro-Suarez, Ph.D^{1*}, Adolfo A. Pájaro-Payares, B.S², Eduardo Espinosa-Fuentes, Ph.D³, Edgardo Meza-Fuentes, Ph.D²

¹ Molecular Spectroscopy, Research Group, Fundación Tecnológica Antonio de Arévalo, Tecnar, Cartagena, Colombia, john.castro@tecnar.edu.co

² Materials and Fuel, Research Group, Department of Chemistry, University of Cartagena, Cartagena, Colombia.

³ GESSA, Research Group, Department of Environmental Sciences, Corporación Universidad de la Costa (CUC), Barranquilla, Colombia

* ORCID: 0000-0003-3210-1167

Abstract– Acetaminophen (AAP) is active ingredient very used in many pharmaceutical preparations. AAP is a pain reliever and a fever reducer drug. Generally, it is used to treat many conditions such as headache, muscle aches, arthritis, backache, toothaches, colds, and fevers. Standard methods most used for AAP chemical detection are based on chromatography and spectrophotometry techniques, these methods generally imply a sample preparation step, while FTIR based methods do not. Hence, an analytical methods based on IR spectroscopy are very important for the pharmaceutical industry and law enforcement agency, given that allow obtain a way easy and fast molecular information for its detection. In effort for attaining a reliable identification procedure for qualitative determination of AAP in different pharmaceuticals product, an additional chemometrics treatment of ATR-FTIR data is proposed. The proposed method was tested on solid samples containing API. The statistical routine of principal component analysis (PCA) yielded excellent results. The results show that the multivariate sensor is useful for detection of AAP in the drugs tested. Using the proposed method allowed to know if drug is present as desired product or it is counterfeit drugs.

Keywords– MIR Spectroscopy; Acetaminophen detection; Chemometrics; counterfeit drugs; PCA.

Resumen - Acetaminofén (AAP) es un ingrediente activo muy utilizado en muchas preparaciones farmacéuticas. AAP es un analgésico y un fármaco reductor de la fiebre. Generalmente, se utiliza para tratar muchas condiciones tales como dolor de cabeza, dolores musculares, artritis, dolor de espalda, dolores de muelas, resfriados y fiebres. Los métodos estándar más utilizados para la detección química de AAP se basan en técnicas de cromatografía y espectrofotometría, estos métodos generalmente implican una etapa de preparación de la muestra, mientras que los métodos

basados en FTIR no. Por lo tanto, los métodos analíticos basados en espectroscopia IR (FTIR) son muy importantes para la industria farmacéutica y agencia policial, dado que permiten obtener de forma fácil y rápida información molecular de una compuesto químico que permite su detección. En un esfuerzo por lograr un procedimiento de identificación fiable para la determinación cualitativa de AAP en diferentes productos farmacéuticos, se propone un tratamiento quimiométrico adicional a los datos ATR-FTIR. El método propuesto fue probado en muestras sólidas que contenían AAP. La estadística de rutina de análisis de componentes principales (PCA) produjo excelentes resultados. Los resultados muestran que el sensor multivariado es útil para la detección de AAP en los fármacos ensayados. El uso del método propuesto permite conocer si el fármaco está presente como producto deseado o si se trata de medicamentos falsificados.

Palabras clave - Espectroscopia MIR; Detección de acetaminofén; Quimiometría; Medicamentos falsificados; PCA.

I. INTRODUCCIÓN

Acetaminofén (AAP, por sus siglas en inglés) o paracetamol es uno de los ingrediente activo más utilizado en formulaciones farmacéuticas. AAP es generalmente usado como analgésico y antipirético para calmar el dolor y bajar la fiebre, es usado específicamente para tratar varias afecciones como el dolor de cabeza, dolores musculares, artritis, dolor de espalda, dolores de muelas, resfriados y fiebres. La cantidad suministrada en el paciente es de suma importancia, insuficiente podría prolongar el tratamiento de una determinada afección, y peor aún mucha cantidad podría tener consecuencias adversas para la salud del paciente. Debido a su

Digital Object Identifier: (to be inserted by LACCEI).
ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).

fácil disposición sin receta médica su consumo deliberado o sobredosis puede llegar a pasar. Sobre dosis de AAP están asociada con intoxicación hepática e insuficiencia renal. La toxicidad hepática comienza con niveles plasmáticos de AAP en el rango de $120\mu\text{g mL}^{-1}$ de 4 h después de la ingestión y daños grave se presenta con niveles plasmáticos de hasta $200\mu\text{g mL}^{-1}$ después de 4 h la ingestión [1]. Muchos métodos analíticos han sido usados y propuestos por la comunidad científica para la determinación de AAP, tanto para formulaciones farmacéuticas como para muestras biológicas. Entre ellos, métodos cromatográficos [2-5] y ópticos (UV-VIS) [6-8] son los más usados. Otros métodos analíticos tales como electroquímicos [9-10] han sido recientemente reportados por la comunidad científica. Estas técnicas han mostrado ser eficiente en cuanto a reproducibilidad y obtención de bajos límites de detección. Sin embargo, en su proceso de análisis químicos, pasos de preparación de muestras son llevados a cabo alargando el tiempo de análisis y dificultando su uso en el campo.

En los últimos años, métodos analíticos basados en el uso de la espectroscopia en especial Infrarrojo (IR) y Raman han demostrado ser útiles para el análisis de diferentes compuestos químicos [11-13], incluyendo drogas en diferentes productos farmacéuticos, desde el proceso de su manufactura hasta validación del producto final [14-15]. La espectroscopia IR y Raman tienen la capacidad de producir vibraciones entre los átomos de un compuesto, por lo que se le llama comúnmente espectroscopia vibracional, de esta manera podemos obtener información molecular característica de una determinada sustancia química. Dentro del infrarrojo, la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés) ha sido ampliamente usada en aplicaciones farmacéuticas [16], y en especial para la determinación de AAP en formulaciones farmacéuticas sólidas y líquidas [17].

En los últimos años la espectroscopia del infrarrojo medio (MIRS, por sus siglas en inglés) ha jugado un papel importante en aplicaciones farmacéuticas. Algunas contribuciones que han hecho uso de MIRS para el análisis de AAP son: Z. Bouhsain, et al. [18], Describe un procedimiento para la determinación directa de paracetamol usando espectrométrica FTIR en productos farmacéuticos con inyección de flujo. El método se basa en la solubilización del paracetamol en una solución de etanol al 10% v/v en CH_2Cl_2 y medición de la absorbancia directa a 1515 cm^{-1} , utilizando la línea de base establecida en 1900 cm^{-1} para la corrección de medición. Este estudio, cafeína, ácido acetilsalicílico, propifenazona y ácido ascórbico no interfieren con la determinación de FTIR de paracetamol, y la interferencia de ácido cítrico se puede eliminar mediante el uso de mediciones entre 1518 y 1509 cm^{-1} en modo de primera derivada. H. A. Moynihan et al. [19], realizó una caracterización espectroscópica de las formas polimorfa del paracetamol, se encontraron diferencias en los espectros de infrarrojos de ambas formas, sobre todo en la región de $1260 - 1.225\text{ cm}^{-1}$, en la que se observa tres fuertes absorciones de

aproximadamente igual intensidad en los espectros de la forma monoclinica, y dos absorciones, una fuerte y una media, en los espectros de la forma ortorrómbica. Finalmente, M. A. Mallah, et al. [20], recientemente reportó el desarrollo de un método espectroscópico FTIR de transmisión para la cuantificación directa, barata y rápida de contenido de paracetamol en formulaciones farmacéuticas sólidas. Sin embargo la literatura a un no ha reportado el desarrollo de un sensor multivariado con datos espectroscópicos para la detección de AAP en diferentes presentaciones farmacéuticas al mismo tiempo sin preparación de muestra.

En este estudio, una metodología sencilla, rápida y reproducible usando espectroscopia FTIR de reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) para la detección directa de acetaminofén en diferentes presentaciones farmacéuticas fue llevada a cabo. Estadísticas de rutinas de quimiometría tales como el análisis de componentes principales (PCA) con varios pasos de pre-procesamiento fueron aplicados a los espectros infrarrojos obtenidos. Los resultados muestran que el sensor multivariado mediante ATR-FTIR es útil para la detección de AAP en fármacos estudiados. Utilizando el método propuesto permite saber si el fármaco está presente como producto deseado o si se trata de medicamentos falsificados.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. *Reactivos y muestras*

Los reactivos usados en este estudio corresponden a estándar y muestras. Como estándar se usó acetaminofén puro grado analítico comprado desde Sigma-Aldrich, y fue usado para obtener el espectro vibracional de infrarrojo medio de referencia de AAP. Como muestras se usaron algunas formulaciones sólidas en forma de tabletas que contenían AAP como API. Estas muestras se obtuvieron de los mercados locales de Cartagena-Colombia. Las muestras adquiridas conteniendo AAP eran provenientes de diferentes laboratorios de manufactura, los laboratorios eran AG, BEST, Genfar, Lafranco, La Santé, MK, Sanofi-aventis y GRUNENTHAL.

B. *Preparación de la muestra*

A diferencia de otros métodos comúnmente empleados, en este método se empleó una preparación simple de la muestra (tabletas) antes de la adquisición de los espectros FTIR. El único paso involucrado es la pulverización de una pequeña porción de las muestras farmacéuticas sólidas (después de retirar el recubrimiento si tuviera) como polvo fino en un mortero para reducir el tamaño de partícula de la muestra. Se tomaron 80 mediciones independientes (espectro) para los ocho tipos de muestras y 10 mediciones independientes para el estándar de AAP, para un total de 90 espectros vibracionales del infrarrojo medio con información molecular de AAP.

C. Configuración experimental

Para realizar nuestro análisis vibracional para la detección directa de acetaminofén en las diferentes presentaciones farmacéuticas solidas usando espectroscopia FTIR de reflectancia total atenuada, espectros vibracionales infrarrojo para la detección de AAP sobre las muestras ensayadas, al igual que los espectros tomados desde el estándar solido de AAP fueron registrados utilizando el espectrómetro 5700-FTIR de Thermo Nicolet con accesorio ATR y detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS). La resolución fue de 4 cm^{-1} haciendo un promedio de 64 barridos (scan) en la región Mid IR de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. El espectro de background se registró a partir de aire (es decir, porta muestra sin muestra) antes de cada prueba FTIR para el estándar y la muestra. Estos espectros fueron guardados en archivos SPC y posteriormente

analizados con un software de quimiometría. El software de análisis multivariado utilizado fue PLS Toolbox bajo la plataforma de MatLab 2014. A los espectros obtenidos se le realizaron análisis de estadísticas de rutinas de quimiometría tales como el análisis de componentes principales (PCA) con varios pasos de pre-procesamiento. La Fig. 1, muestra la configuración experimental utilizada en esta investigación, describe de forma resumida los pasos realizado en esta investigación: (a) Paso I, selección y preparación de muestra; (b) Paso II, registro del espectro vibracional y (c) Paso III, análisis multivariado de los datos espectrales.

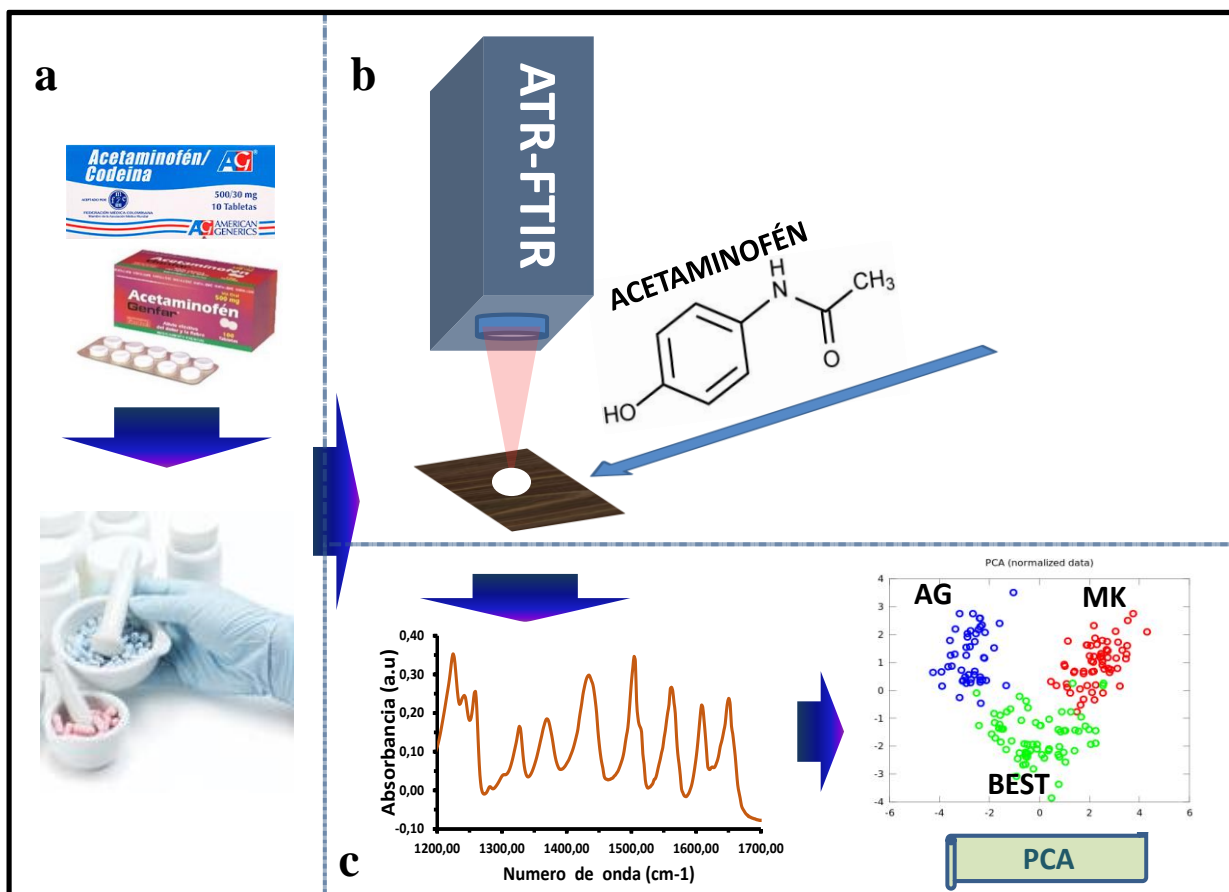


Fig. 1 Configuración Experimental para la detección de AAP sólido presente en diferentes productos farmacéuticos.

III. RESULTADO Y DISCUSIONES

A. Identificación espectral de AAP

La Fig. 2 muestra el espectro de acetaminofén (AAP) solido estándar. El espectro fue tomado usando una geometría reflexión total atenuada (ATR) utilizando un

espectrofotómetro Nicole 6700 FTIR como fue ilustrado en Fig. 1. Para obtener los espectros IR de AAP se tomó como background el espectro de aire. Podemos observar en la Fig. 2 que el espectro tomado con ATR-FTIR tienen las bandas vibracionales IR características de AAP cuando son comparados con los espectros FTIR de la literatura [19]. Entre

las bandas vibracionales IR más importantes observadas en la Fig. 2 están para Acetaminofén aquellas que aparecen en 1657 cm^{-1} asignado a estiramiento del grupo carbonilo de amida I, 1610 cm^{-1} asignado al estiramiento C - C Arilo esquelético, 1562 cm^{-1} asignado a la deformación N -H in el plano de amida II, 1504 cm^{-1} asignado a la deformación simétrica de C- H Arilo y C -H, y 1434 cm^{-1} asignado al estiramiento C - C Arilo esquelético.

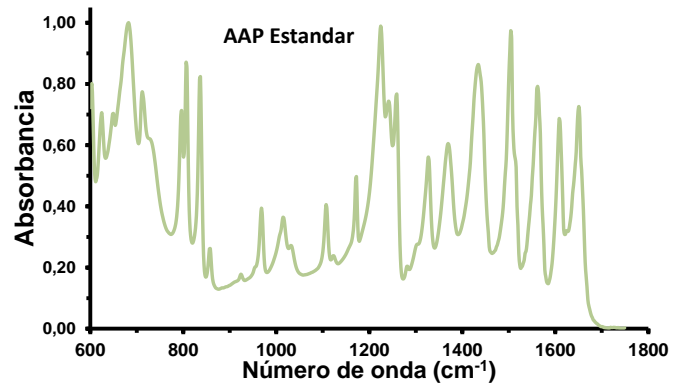


Fig. 2 Espectro de Infrarrojo medio de AAP estándar

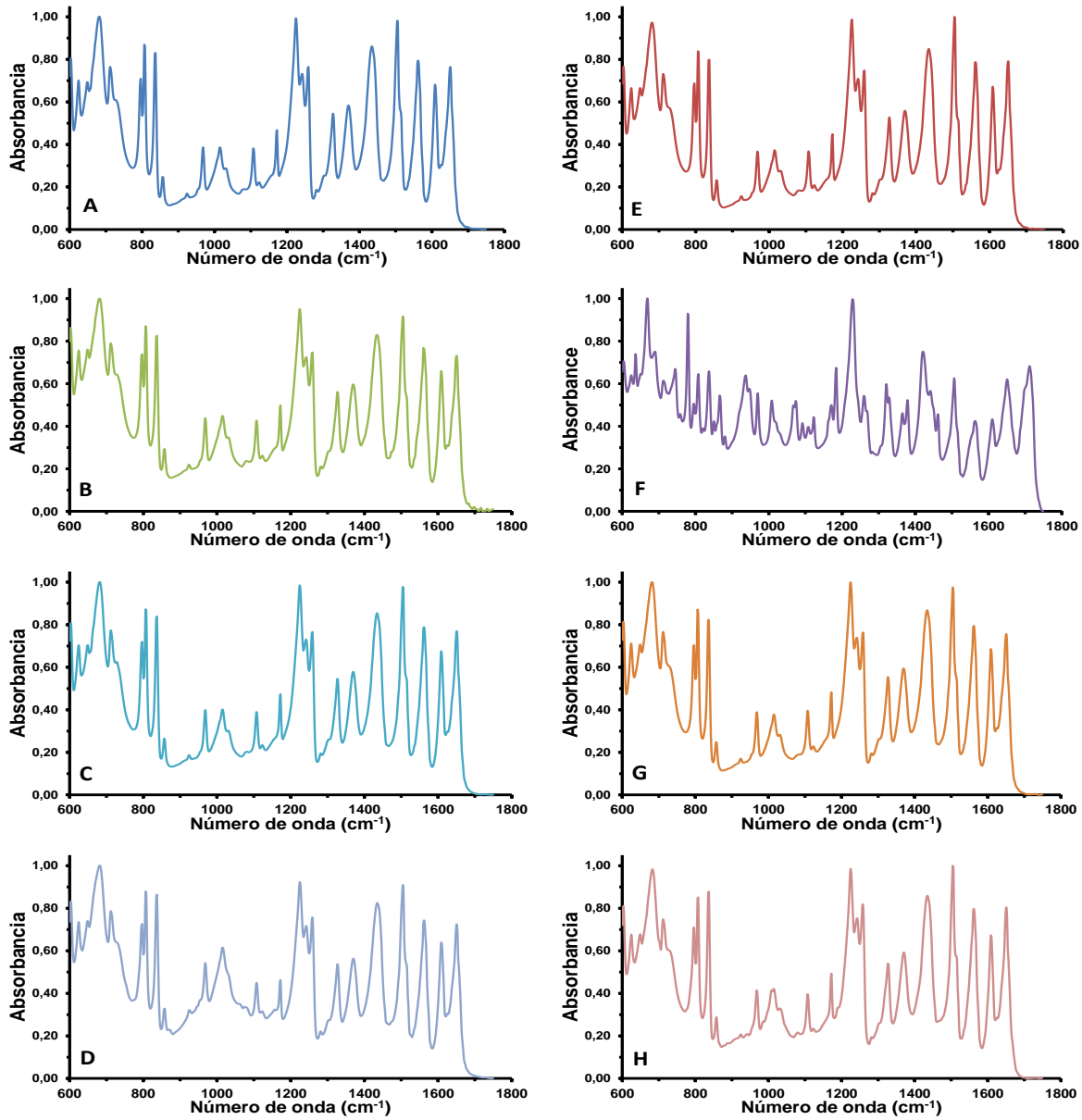


Fig. 3 Espectros de infrarrojo medio de tabletas farmacéuticas provenientes de diferentes laboratorios. A) AG, B) Genfar, C) La Santé, D) Sanofi, E) Best, F) LaFrancol, G) MK y H) Zaldiar

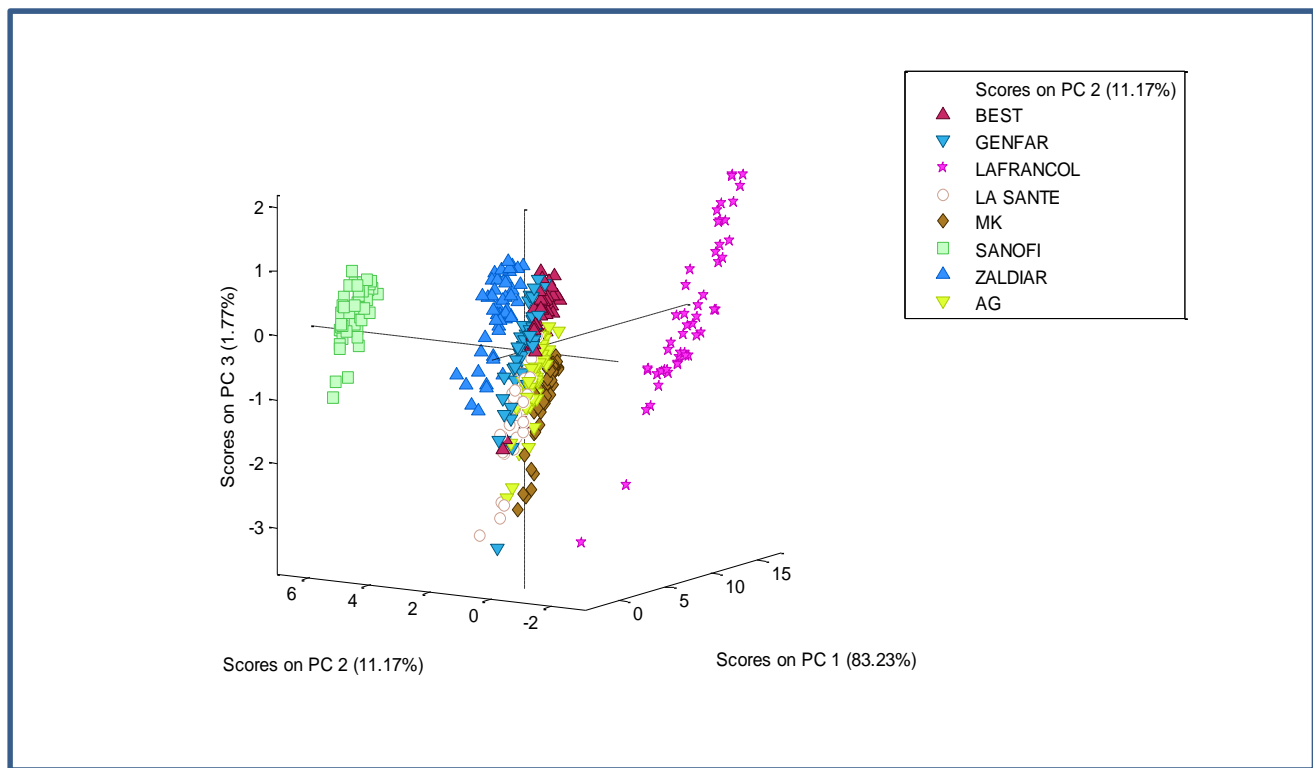


Fig. 4 Análisis de componentes principales de acetaminofén presente en tabletas de diferentes laboratorios usando datos del infrarrojo medio.

Esta nueva manera de analizar AAP en formulaciones farmacéuticas directamente aplicando espectroscopía FTIR de ATR tiene una serie de ventajas sobre los procedimientos ya establecidos y consumidores de tiempo sobre todo en la preparación de muestra. Los procedimientos de extracción de AAP desde muestras sólidas han sido completamente eliminados con el fin de lograr un método rápido, barato y amigable con el medio ambiente. Esto no sólo minimiza el costo y el tiempo del análisis, sino que también se ha minimizado el uso de productos químicos tóxicos.

En la formulación sólida de acetaminofén se usan sustancias distintas de los API para diversos fines que se denominan excipientes. Los excipientes comúnmente utilizados para la formulación son lactosa, estearato de magnesio, talco en polvo, almidón y celulosa microcristalina. Estos se añaden en diferentes proporciones y varían de un producto a otro. La Fig. 3 muestra ocho espectros de infrarrojo medio de tabletas farmacéuticas provenientes de diferentes laboratorios en el rango espectral de 600-1800 cm^{-1} . Estas tabletas son mezclas solidas conteniendo como API acetaminofén y excipientes. Sin embargo podemos observar que en su gran mayoría los espectro vibracionales IR ilustrado in Fig. 3 son muy parecido al espectro IR de AAP estándar ilustrado en la Fig. 2, por tanto señales características de acetaminofén se pueden apreciar claramente alrededor de 1657, 1610, 1562 y 1504 cm^{-1} en los espectros mostrado en la Fig. 3. Adicionalmente, no parece haber interferencia significativa

causada por los otros componentes de la tableta, es decir el excipiente. Lo que establece que el método es práctico sin llevar a cabo procesos de preparación de muestras más laboriosos como son la extracción.

A los datos espectroscópico IR obtenidos usando ATR-FTIR fueron aplicado herramientas de rutina de quimiometría tales como análisis de componentes principales (PCA) usando PLS Toolbox™ versión 6.5 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, EE.UU.) para MATLAB™ (The MathWorks, Inc. Natick, MA, EE.UU.). 50 espectros en el rango espectral de 400-4000 cm^{-1} fueron tomados desde las tableta proveniente de cada laboratorio que manufactura el medicamento a evaluar conteniendo AAP como API. Las concentraciones del API en las tabletas analizadas estaban alrededor de 500mg. PCA fue aplicado a los datos espectrales con el fin de agrupar los espectros IR según el laboratorio que las manufactura permitiendo distinguir y discriminar los espectros IR según el tipo de tabletas de diferentes laboratorio.

La Fig. 4 muestra el resultado del análisis multivariado que se llevó a cabo. El resultado de PCA de AAP presente en las tabletas representa el mejor resultado obtenido para los diferentes modelos de PCA generados después de aplicar los pasos de preprocesamiento. Para el PCA los espectros IR de tableta conteniendo AAP, tres componentes principales (PC) fueron necesarios para conseguir el 96% de la varianza total de los datos espectrales. Sin embargo, el primer PC logro aproximadamente 83% de la varianza. Rango espectral 600-

1670 cm^{-1} , SNV + Mean Centering fueron usado como preprocesamiento. Como puede ser observado en la Fig. 4, los tres PC fueron suficientes para tener una agrupación espectral de tabletas con AAP de acuerdo al laboratorio que las elabora permitiendo así identificar la procedencia una tableta conteniendo AAP cuando el espectro vibracional infrarrojo es obtenido.

IV. CONCLUSIONES

Un sistema basado en espectroscopia infrarrojo medio usando reflexión total atenuada fue utilizado para la detección de acetaminofén como API presentes en tabletas farmacéuticas manufacturado por ocho diferentes laboratorios con concentraciones de 500mg/tableta. Muchas características vibracionales de acetaminofén pueden ser observadas en los espectros ATR de las tabletas analizadas, por lo que las contribuciones vibracionales por parte de los excipientes no es un factor crítico en el momento de decidir si AAP está presente en una determinada tableta. Para el análisis multivariado de análisis de componentes principales (PCA) permitieron la identificación tableta conteniendo AAP según el laboratorio que las produce. En general, nosotros hemos demostrado que espectroscopia ATR-FTIR es útil para el desarrollo de una metodología rápida para la detección y la discriminación de AAP presentes en tabletas.

REFERENCES

- [1] M.E. Bosch, A.R. Sánchez, F.S. Rojas, C.B. Ojeda, "Determination of paracetamol: Historical evolution," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 42, no. 3, pp. 291-321, Sept 2006.
- [2] G.R. Gotelli, P.M. Kabra, L.J. Marton, "Determination of acetaminophen and phenacetin in plasma by high-pressure liquid chromatography," *Clinical chemistry*, vol. 23, no. 6, pp. 957-959, Jun 1977
- [3] M.L. Qi, P. Wang, Y.X. Leng, J.L. Gu, R.N. Fu, "Simple HPLC method for simultaneous determination of acetaminophen, caffeine and chlorpheniramine maleate in tablet formulations," *Chromatographia*, vol. 56, no. 5-6, pp. 295-298, Sept 2002.
- [4] G.M. Hadad, S. Emara, W.M. Mahmoud, "Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms," *Talanta*, vol. 79, no. 5, pp. 1360-1367, Oct 2009.
- [5] N.F. Farid, E.A. Abdalaleem, "HPTLC Method for the Determination of Paracetamol, Pseudoephedrine and Loratidine in Tablets and Human Plasma," *Journal of chromatographic science*, vol. 54, no. 4, pp. 647-652, Jan 2016.
- [6] J.B. Vaughan, "Colorimetric determination of acetaminophen," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 58, no. 4, pp. 469-470, Apr 1969.
- [7] L. Chafetz, R.E. Daly, H. Schrifman, J.J. Lomner, "Selective colorimetric determination of acetaminophen," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 60, no. 3, pp. 463-466, Mar 1971.
- [8] R.N. Gupta, R. Pickersgill, M. Stefanec, "Colorimetric determination of acetaminophen," *Clinical biochemistry*, vol. 16, no. 4, pp. 220-221, Aug 1983.
- [9] S. Chitravathi, N. Munichandraiah, "Voltammetric determination of paracetamol, tramadol and caffeine using poly (Nile blue) modified glassy carbon electrode," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 764, pp. 93-103, March 2016.
- [10] B. Liu, X. Ouyang, Y. Ding, L. Luo, D. Xu, Y. Ning, "Electrochemical preparation of nickel and copper oxides-decorated graphene composite for simultaneous determination of dopamine, acetaminophen and tryptophan," *Talanta*, vol. 146, pp. 114-21, Jan 2016.
- [11] E. A. Espinosa-Fuentes, J. R. Castro-Suarez, D. Meza-Payares, L. C. Pacheco-Londono, S. P. Hernández-Rivera, "Sublimation enthalpy of homemade peroxide explosives using a theoretically supported non-linear equation," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 119, no. 1, pp. 681-688, 2015.
- [12] J. R. Castro-Suarez, L. C. Pacheco-Londoño, W. Ortiz-Rivera, M. Vélez-Reyes, M. Diem, S. P. Hernandez-Rivera, "Open path FTIR detection of threat chemicals in air and on surfaces," *In SPIE Defense, Security, and Sensing. International Society for Optics and Photonics*. pp. 801209-801209, 2011.
- [13] S. P. Hernandez-Rivera, L. C. Pacheco-Londoño, W. Ortiz-Rivera, J. R. Castro-Suarez, O. M. Primera-Pedrozo, H. Félix-Rivera, "Remote Raman and infrared spectroscopy detection of high explosives," in *Explosive Materials: Classification, Composition and Properties*, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, pp. 231-258, 2011.
- [14] S. Wartewig, R.H. Neubert, "Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 57, no. 8, pp. 1144-1170, Jun 2005.
- [15] Y. Roggo, P. Chaluz, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, "A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 44, no. 3, pp. 683-700, Jul 2007.
- [16] W. Li, G.D. Worosila, "Quantitation of active pharmaceutical ingredients and excipients in powder blends using designed multivariate calibration models by near-infrared spectroscopy," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 295, no. 1, pp. 213-219, May 2005.
- [17] E. Ziemons, J. Mantanus, P. Lebrun, E. Rozet, B. Evrard, P. Hubert, "Acetaminophen determination in low-dose pharmaceutical syrup by NIR spectroscopy," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 53, no. 3, pp. 510-6, Nov 2010.
- [18] Z. Bouhsain, S. Garrigues, M. de La Guardia, "Flow injection-Fourier transform infrared spectrometric determination of paracetamol in pharmaceuticals," *Analyst*, vol. 121, no. 5, pp. 635-639, 1996.
- [19] H.A. Moynihan, I.P. O'Hare, "Spectroscopic characterisation of the monoclinic and orthorhombic forms of paracetamol," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 247, no. 1, pp. 179-85, Oct 2002.
- [20] M.A. Mallah, S.T. Sherazi, M.I. Bhangar, S.A. Mahesar, M.A. Bajeer, "A rapid Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopic method for direct quantification of paracetamol content in solid pharmaceutical formulations," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 141, pp. 64-70, Apr 2015.