

Razvoj i validacija metode za određivanje paracetamola u tabletama primjenom Ramanove spektroskopije

Ivanjko, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:398952>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Petra Ivanjko

**Razvoj i validacija metode za određivanje
paracetamola u tabletama primjenom Ramanove
spektroskopije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u laboratoriju Odsjeka kemijsko-fizikalnih vještačenja u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" Ministarstva unutarnjih poslova RH pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan, uz komentorstvo dr. sc. Ivane Bačić.

Želim se zahvaliti svojim mentoricama, doc. dr. sc. Jasni Jablan i dr. sc. Ivani Bačić na velikoj pomoći, izrazitoj strpljivosti i susretljivosti tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Zajedničkim snagama, iako uz puno prepreka, uspjeli smo doći do cilja i još jednom neizmjereno hvala.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci tijekom svih godina studiranja. Bez vas to ne bi bilo to.

I na kraju, mama, neizmjereno ti hvala na podršci i svoj požrtvornosti tijekom cijelog školovanja i slušanju svih mojih jadikovki i suza. Ipak su se isplatile.

Sadržaj

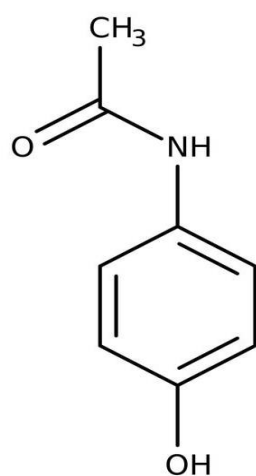
| | | |
|------------|--|-----------|
| 1. | UVOD..... | 1 |
| 1.1 | Paracetamol | 1 |
| 1.1.1 | Polimorfizam paracetamola | 2 |
| 1.2 | Ramanova spektroskopija | 3 |
| 1.2.1 | Ramanov spektrometar | 5 |
| 1.2.2 | Ramanovo mapiranje | 6 |
| 1.2.3 | Primjena Ramanove spektroskopije..... | 7 |
| 1.3 | Validacija analitičke metode | 8 |
| 1.3.1 | Preciznost | 8 |
| 1.3.2 | Specifičnost/selektivnost..... | 9 |
| 1.3.3 | Linearnost..... | 9 |
| 1.3.4 | Točnost | 10 |
| 1.3.5 | Radno područje | 10 |
| 1.3.6 | Granica dokazivanja i granica određivanja..... | 10 |
| 1.3.7 | Izdržljivost/otpornost | 11 |
| 1.4 | Punila kao pomoćne tvari | 12 |
| 1.4.1 | Laktoza..... | 12 |
| 1.4.2 | Škrob..... | 13 |
| 1.4.3 | Mikrokristalinična celuloza (MCC)..... | 13 |
| 1.4.4 | Dikalcij fosfat dihidrat (DCPD) | 14 |
| 1.4.5 | Magnezijev stearat | 14 |
| 1.4.6 | Talk | 15 |
| 1.4.7 | Aerosil..... | 15 |
| 2. | OBRAZLOŽENJE TEME..... | 16 |
| 3. | MATERIJALI I METODE..... | 17 |
| 3.1 | Materijali..... | 17 |
| 3.1.1 | Korištene kemikalije | 17 |
| 3.1.2 | Laboratorijski pribor i posuđe | 17 |
| 3.1.3 | Radni instrumenti | 17 |
| 3.2 | Metode | 19 |
| 3.2.1 | Priprema uzoraka za Ramanovu analizu | 19 |
| 3.2.2 | Princip metode | 20 |
| 3.2.3 | Statistička obrada podataka | 21 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 22 |
| 4.1 | Preliminarna ispitivanja | 22 |
| 4.1.1 | Priprema uzoraka | 22 |
| 4.1.2 | Rezultati..... | 23 |
| 4.2 | Validacija analitičke metode | 25 |
| 4.2.1 | Linearnost..... | 25 |
| 4.2.2 | Homogenost | 27 |
| 4.2.3 | Preciznost | 28 |
| 4.2.4 | Granica dokazivanja i granica određivanja..... | 30 |
| 4.3 | Primjena metode na realne uzorke | 31 |
| 5. | ZAKLJUČAK..... | 33 |
| 6. | LITERATURA..... | 34 |
| 7. | SAŽETAK/SUMMARY | 36 |
| 8. | TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1 Paracetamol

Paracetamol ili acetaminofen (naziv korišten u SAD-u) jedan je od najpopularnijih i najčešće korištenih analgetika i antipiretika koji je dostupan u bezreceptnom režimu. Paracetamol je aktivni metabolit fenacetina i odgovaran je za njegov analgetski učinak (Bebenista i Nowak, 2014).



Slika 1. Kemijska struktura paracetamola
(preuzeto sa www.fishersci.com, pristupljeno 11.8.2020.)

Mehanizam djelovanja paracetamola još uvijek nije dovoljno razjašnjen. Spada u skupinu neselektivnih inhibitora ciklooksigenaze. Smatra se da djeluje preko inhibicije sinteze prostaglandina i drugih supstancija koje senzibiliziraju receptore za bol u centralnom živčanom sustavu i na periferiji. Blokira i stvaranje impulsa bola na periferiji, ali neznatno (Zrilić i sur., 2017). Često se paracetamol zbog određenih farmakoloških sličnosti poistovjećuje s lijekovima iz skupine nesteroidnih protuupalnih lijekova (acetilsalicilna kiselina), no zbog nedostatka protuupalnog djelovanja ne pripada toj skupini lijekova. Analgetsko i antipiretsko djelovanje čini paracetamol sličnim ostalim protuupalnim lijekovima. Nedostatak protuupalnog djelovanja tumači se činjenicom da je paracetamol slab inhibitor ciklooksigenaze u prisutnosti peroksida, spoja koji je prisutan u upalnim lezijama (Bebenista i Nowak, 2014).

Za razliku od acetilsalicilne kiseline, paracetamol ne utječe na razinu mokraćne kiseline, na inhibiciju trombocita, a isto tako ne dovodi ni do želučanih poteškoća. Stoga je koristan za pacijente s peptičkim ulkusom ili dugotrajnim krvarenjem izazvanim primjenom acetilsalicilne kiseline (Mimica, 2014).

Paracetamol je uglavnom poznat kao siguran lijek, no istraživanja pokazuju kako je predoziranje paracetamolom glavni uzrok transplantacije jetre u Sjedinjenim Američkim Državama (Yoon i sur., 2016). Na našem tržištu postoje različiti pripravci paracetamola: peroralni, rektalni i parenteralni oblik. Dostupan je u bezreceptnom i receptnom režimu. Kao bezreceptni lijek (engl. *Over The Counter, OTC*) dostupan je sam (Lekadol, Lupocet, Panadol) ili u kombiniranim pripravcima za liječenje prehlade (Caffetin Cold, Coldrex, Efferalgan i dr.).

1.1.1 Polimorfizam paracetamola

Pojava kada se određena farmaceutska tvar pojavljuje u različitim kristalnim oblicima naziva se polimorfizam. Svaki polimorf ima različita fizikalna svojstva kao što su topljivost, stabilnost, tvrdoća i gustoća. Polimorfni oblik aktivne tvari može izravno utjecati na proces otapanja lijeka, a time i na bioraspodivnost. Do promjene polimorfnog oblika može doći tijekom procesa izrade same formulacije, ali i u gotovom proizvodu (ovisno o uvjetima skladištenja). Iz tog razloga određivanje polimorfnog oblika predstavlja veliki izazov u farmaceutskoj industriji (Ainurofiq i sur., 2019).

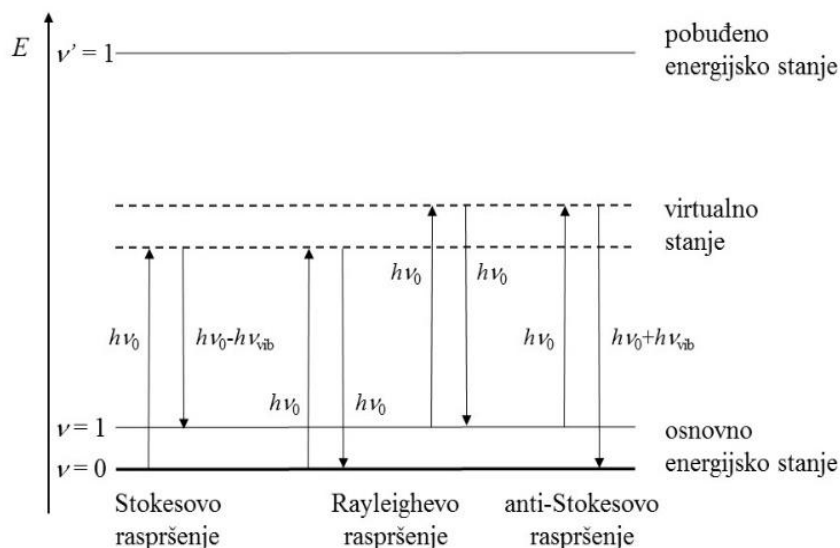
Poznata su tri polimorfna oblika paracetamola: monoklinski (oblik I), ortorompski (oblik II) i oblik III. Komercijalno dostupan i ujedno najstabilniji oblik s temperaturom taljenja oko 167-169 °C je oblik I. Nedostatak tog oblika su loša svojstva kompresibilnosti. Oblik II pokazuje bolja svojstva kompresibilnosti tijekom proizvodnje tableta od oblika I, no zbog toga što je metastabilan njegova primjena u farmaceutskoj industriji je ograničena (Du i sur., 2018). Za oblik III poznato je da je nestabilan na zraku, a kristali koji su dobiveni u zatvorenom sistemu već unutar jednog sata prelaze u oblik II. Posljednjih godina sve se više radi na istraživanju uvjeta koji bi bili povoljni za stabilizaciju nestabilnog oblika III (Reiss i sur., 2018).

1.2 Ramanova spektroskopija

Vibracijska spektroskopija je grana spektroskopije koja proučava spektre koji su uzrokovani vibracijama molekula što obuhvaća infracrvenu spektroskopiju (IR) i Ramanovu spektroskopiju. Dok se IR temelji na apsorpciji svjetlosti, Ramanova spektroskopija temelji se na fenomenu neelastičnog raspršenja svjetlosti. Prilikom Ramanovog raspršenja pobudni foton ne mora imati energiju jednaku energiji vibracijskog prijelaza, kao što je slučaj kod IR-a (Smith i Dent, 2005). Stoga se kao izvor pobudnog zračenja koriste laseri iz vidljivog (Vis), bliskog infracrvenog (engl. *near-infrared*, *NIR*) i bliskog ultraljubičastog (UV) dijela elektromagnetskog spektra.

Za razliku od IR-a gdje dolazi do promjene dipolnog momenta molekule, kod Ramanove spektroskopije dolazi do promjene polarizabilnosti molekule. Interakcijom monokromatskog zračenja i tvari narušava se elektronski oblak oko jezgre i molekula kratkotrajno prelazi u nestabilno "virtualno" stanje iz kojeg se vrlo brzo vraća u osnovno stanje. Povratak u osnovno stanje može se odvijati s ili bez promjene energije raspršenog zračenja. Većina svjetlosti koja se raspršuje jednake je energije kao i pobudno zračenje i takvo raspršenje je elastično (Rayleighovo raspršenje) (Smith i Dent, 2005).

Rayleighovo raspršenje posljedica je narušavanja elektronskog oblaka oko jezgre. Međutim, ako prilikom interakcije molekule i monokromatskog zračenja dolazi do vibracije jezgre, energija se prenosi s upadnog fotona na molekulu ili s molekule na raspršeni foton. U tom slučaju energija upadnog i raspršenog zračenja su različite i rezultat je neelastično Ramanovo raspršenje. Vrlo je slabog intenziteta jer se tek jedan foton od 10^6 - 10^8 fotona neelastično raspršuje. Ramanovo raspršenje uključuje Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje. Molekula se u svom osnovnom energijskom stanju može nalaziti u osnovnom ili nekom od pobuđenih vibracijskih stanja. Ako se molekula iz svog osnovnog vibracijskog stanja pobuđuje u virtualno stanje i iz njega vraća u pobuđeno vibracijsko stanje, detektira se Stokesovo raspršenje. U tom slučaju molekula je apsorbirala dio upadnog zračenja te je energija upadnog fotona manje nego raspršenog. Anti-Stokesovo raspršenje događa se kada molekula iz pobuđenog vibracijskog stanja prelazi u virtualno stanje te pri povratku prelazi u osnovno vibracijsko stanje. Pri tome je energija raspršenog fotona veća od energije pobudnog. Stokesov pomak je puno vjerojatniji jer se pri sobnoj temperaturi molekule u većini slučajeva nalaze u svom osnovnom vibracijskom stanju (Šašić i Ozaki, 2008).



Slika 2. Dijagram energijskih prijelaza u Ramanovoj spektroskopiji (preuzeto i prilagođeno prema: Gu i suradnici, 2016)

Ramanov spektar prikazuje ovisnost intenziteta raspršene svjetlosti o valnom broju. Intenzitet Ramanovog raspršenja ovisi o nekoliko faktora, a neki od njih su valna duljina korištenog lasera, snaga lasera, promjena polarizabilnosti molekule i temperatura (Vašková, 2008).

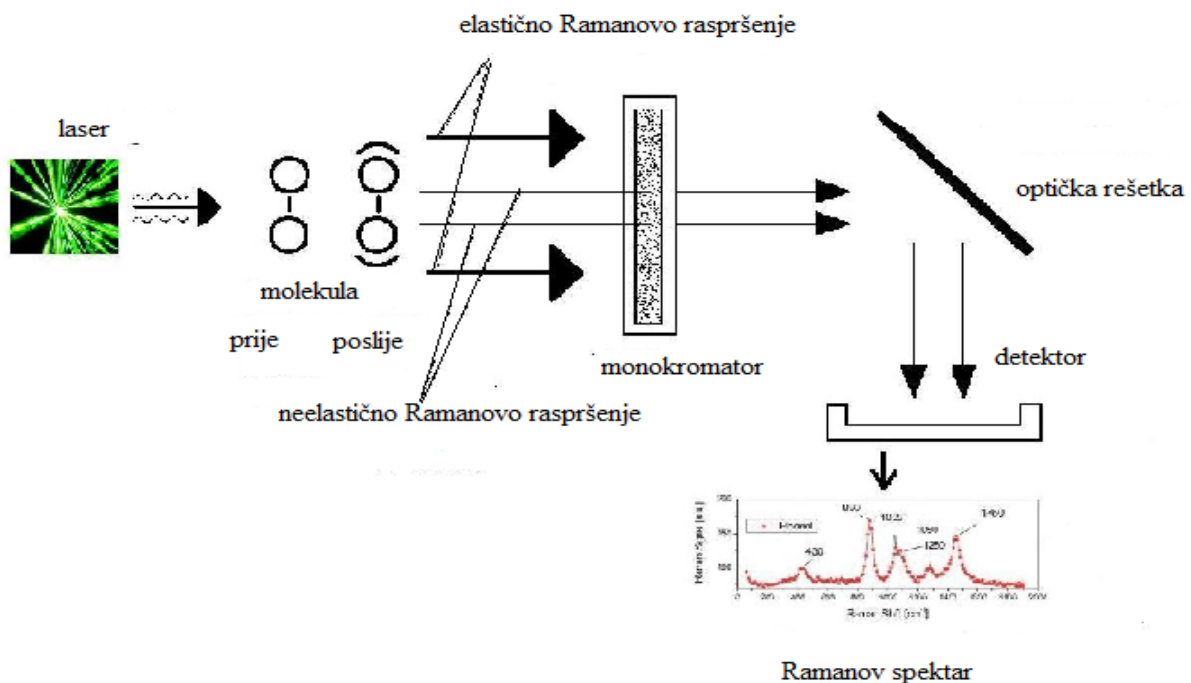
Jedno od osnovnih ograničenja uspješne primjene Ramanove spektroskopije u analizi različitih tvari je pojava fluorescencije, koja se javlja kada je energija pobudnog zračenja dovoljna da izazove prijelaz između stvarnih energijskih stanja. Povratkom molekula u osnovno stanje apsorbirana energija otpušta se u obliku svjetlosti, što u spektru može u potpunosti zasjeniti Stokesovo raspršenje. Izvor fluorescencije mogu biti nečistoće u uzorku, ali i sam analizirani spoj. Pojava fluorescencije jako ovisi o valnoj duljini odnosno energiji pobudnog zračenja, pa će laseri niže valne duljine, ali veće energije poput zelenog lasera od 532 nm uzrokovati jaču fluorescenciju u odnosu na laser od 785 nm čija je energija bliska infracrvenom području (Bell, 2008).

1.2.1 Ramanov spektrometar

Glavni dijelovi Ramanovog spektrometra su :

- 1) laser kao izvor monokromatskog zračenja između 450-800 nm, NIR laser ne izaziva fluorescenciju
- 2) monokromator ili filter koji zadržava elastično raspršene zrake
- 3) optička rešetka ili prizma koja rasipa Ramanovo zračenje do detektora
- 4) detektor

Uzorak se izloži laserskom svjetlu, molekula vibrira, monokromator ili filter uklanja intenzivno Rayleighovo raspršenje, optička rešetka raspršuje svjetlost na detektor koji prikazuje spektar. Kao detektor najčešće se koristi CCD (engl. *charge coupled device*) uređaj zato što je izuzetno osjetljiv i zbog toga prikladan za detektiranje ionako slabog Ramanovog signala (Smith i Dent, 2005).



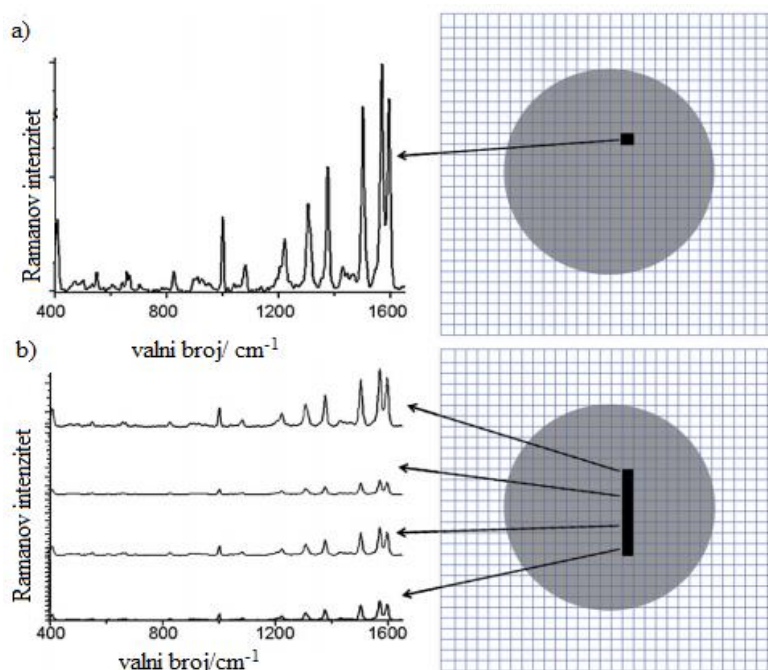
Slika 3. Shematski prikaz Ramanovog spektrometra

(preuzeto i prilagođeno prema Vaškova, 2011)

1.2.2 Ramanovo mapiranje

Kombinacijom Ramanovog spektrometra i optičkog mikroskopa s pomičnim postoljem moguće je provoditi tehniku Ramanovog mapiranja. Ramanovo mapiranje uključuje prikupljanje podataka koji su dobiveni snimanjem spektara u različitim točkama uzorka. Pomično postolje omogućava kretanje uzorka, a laserska zraka se usmjerava kroz objektiv, dolazi do površine uzorka i u točno određenoj točki uzrokuje pobudu molekula (engl. *point mapping*). Ozračena površina uzorka ovisi o valnoj duljini korištenog lasera te o numeričkoj aperturi (NA) objektiva. Dobiveno raspršeno zračenje usmjerava se natrag kroz objektiv, prolazi kroz monokromator koji zadržava Rayleighovo raspršenje, zatim kroz optičku rešetku koja rasipa zračenje prema CCD detektoru te se u konačnici dobiva spektar. Tako se snimaju spektri u svakoj pojedinoj točki (Gordon i Mcgoverin, 2010).

Proces snimanja spektara od točke do točke vremenski je dugotrajan pa se primjenjuje i tzv. linijsko mapiranje (engl. *linear scan mapping*). Kod linijskog mapiranja laserska zraka osvjetljava liniju na površini uzorka te se istovremeno snimi više spektara. Nedostatak takve vrste mapiranja je lošija prostorna rezolucija (engl. *spatial resolution*). Analizom dobivenih spektara u zadanom softveru dobivaju se podaci koji se koriste za izradu detaljne kemijske mape. Informacije dobivene tom tehnikom koriste se za određivanje homogenosti uzorka (Mitsutake i sur., 2009).



Slika 4. Shematski prikaz mapiranja površine uzorka; a) *point mapping* b) *linear scan mapping* (preuzeto i prilagođeno prema Gordon i Mcgoverin, 2010)

1.2.3 Primjena Ramanove spektroskopije

Ramanova spektroskopija primjenjuje se za razjašnjenje strukture farmaceutskih tvari analizom funkcionalnih grupa, 'fingerprint' identifikaciju lijekova uz IR spektroskopiju, određivanje polimornih oblika ljekovitih tvari, kvantitativnu analizu farmaceutskih tvari u složenom matriksu ljekovitog oblika, procesnoj kontroli u proizvodnji lijekova, analizi peptidnih farmaceutika (Smith i Dent, 2005) i dr.

U kvantitativnoj analizi postoje dva široka pristupa analize podataka: univarijatni i multivarijatni. Univarijatni pristup obradi podataka zasniva se na mjerenju bilo visine ili površine pikova API-ja od interesa. Zatim se konstruira kalibracijski pravac pomoću kojeg se izračunava sastav ispitivanog uzorka. Ova metoda se koristi zato što je brza i jednostavna, no ne uzima u obzir sve spektralne podatke. U novije vrijeme sve se više koristi multivarijatni pristup obradi podataka koje koristi puno složenije statističke analize promatranjem više varijabli (Bell, 2008).

1.3 Validacija analitičke metode

Kako bi se utvrdila prikladnost analitičke metode za određenu primjenu potrebno je provesti validaciju analitičkog postupka. Glavni cilj validacije analitičkog postupka je osigurati pouzdanost i točnost analitičkih podataka koji su dobiveni pod propisanim uvjetima. Prema zahtjevima GMP i GLP postupci validacije analitičkog postupka postali su obavezni. Metoda se validira prije uvođenja nove metode u uporabu, kada se promijene uvjeti zbog kojih se metoda validira te ako se sama metoda promijeni. Prihvaćene analitičke značajke koje se određuju u postupku validacije analitičke metode su: specifičnost /selektivnost, linearnost, preciznost (ponovljivost, srednja preciznost, obnovljivost), točnost, granica kvantifikacije, granica detekcije i robusnost (otpornost). Bitno je napomenuti da odabir parametara koji će se koristiti ovisi o namjeni analitičke metode. Ako se ispituju granične vrijednosti onečišćenja određuje se specifičnost/selektivnost te granica dokazivanja, dok se u postupcima određivanja sadržaja ispituje točnost, preciznost, specifičnost/selektivnost, linearnost te radno područje (Nigović i sur., 2014).

1.3.1 Preciznost

Preciznost pokazuje slaganje između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje može se iskazati kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost izražava podudaranje rezultata dobivenih u uvjetima koji uključuju jedan laboratorij, istog analitičara te istu aparaturu u kratkom razdoblju. Srednja preciznost prikazuje odstupanje rezultata koji su dobiveni unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz očekivane promjene nekih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti, kolone, reagensi iz različitih boca i različitih dobavljača). Odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima iskazuje se kao obnovljivost. Potrebno je izvršiti najmanje 5-6 određivanja za 2-3 različite koncentracije kako bi se dobili valjani rezultati.

Preciznost se najčešće izražava kao relativno standardno odstupanje (engl. *relative standard deviation*, RSD, %), a izračunava se prema formuli:

$$RSD = \frac{SD}{\chi} \times 100 ,$$

gdje je *SD* standardno odstupanje (engl. *standard deviation*), a χ srednja vrijednost dobivenih rezultata. Ispituje se kroz najmanje pet do šest određivanja uz primjenu dvije do tri različite koncentracije (Nigović i sur., 2014).

1.3.2 Specifičnost/selektivnost

Specifičnost /selektivnost svojstvo je metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit. U praksi je to vrlo rijetko pa češće govorimo o selektivnosti metode. Metoda kojom se može određivati više komponenata istodobno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom (Lazarić, 2012). Ispitivanja selektivnosti analitičkih metoda za određivanje sadržaja ili ispitivanje čistoće provode se dodavanjem onečišćenja ili pomoćnih tvari čistoj ljekovitoj tvari, koja se zatim analizira (Nigović i sur., 2014).

1.3.3 Linearnost

Linearnost je određena kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. U praksi se linearnost određuje mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije analita (preporučuje se najmanje pet koncentracijskih razina uz tri ponavljanja). Procjenjuje se matematički i grafički (Lazarić, 2012). Grafičkim prikazom ovisnosti signala o koncentraciji analita dobiva se kalibracijska krivulja. Matematički se preko linearne regresije izrazi jednadžba pravca ($y = ax + b$) kalibracijske krivulje i izračuna koeficijent korelacije (k). Za koeficijent korelacije uobičajeno se postavlja kriterij $k \geq 0,99$ (Nigović i sur., 2014).

1.3.4 Točnost

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Za određivanje točnosti metode potrebno je provesti najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije koje se nalaze u radnom području metode. Odstupanje od stvarne vrijednosti najčešće se izražava kao analitički prinos (engl. *recovery*).

$$R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} \times 100 ,$$

gdje je \bar{X} srednja izmjerena vrijednost, a \hat{X} stvarna vrijednost analita u uzorku. Točnost se određuje u radnom području metode nakon ispitivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti (Nigović i sur., 2014).

1.3.5 Radno područje

Radno područje je raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita (granice su uključene) u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost. Za određivanje tog parametra nije potrebno provoditi zasebne eksperimente, nego se zaključci izvode iz parametra linearnosti (Lazarić, 2012).

1.3.6 Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima metode. Granica određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode.

Određuju se razrjeđenjem ispitivane otopine i predstavlja omjer signala i šuma (LOD=3:1 ili 2:1, a LOQ=10:1) ili iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca.

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a},$$

gdje je σ standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, odnosno ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca, ili standardno odstupanje y odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

1.3.7 Izdržljivost/otpornost

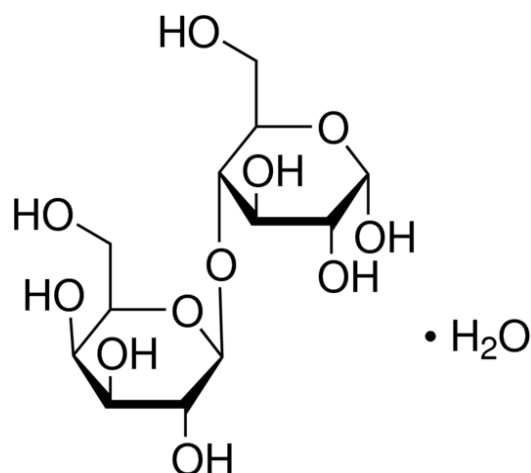
Izdržljivost/otpornost (engl. *robustness*) analitičke metode se određuje kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode. Ispitivanje robusnosti provodi se kako bi se odredilo kako male promjene radnih uvjeta i provedbe metode utječu na rezultat analize. Važan su dio razvoja metode jer pomažu otkriti optimalne uvjete izvedbe metode te upućuju na to što treba nadzirati. Tijekom eksperimenta mijenjaju se radni uvjeti unutar stvarnih granica i prati kvantitativna promjena rezultata (Lazarić, 2012).

1.4 Punila kao pomoćne tvari

Punila ili konstituenti su indiferentne tvari koje omogućuju izradu tableta praktične veličine kako za komprimiranje tako i za primjenu. Punila čine do 90% ukupne mase ljekovitog pripravka, a kako bi proces izrade ljekovitog pripravka bio uspješan nužna su dobra svojstva tečenja i kompresibilnosti punila. Nadalje, vrlo važno je da su kemijski i fizički indiferentna, stabilna te probavljiva. Odabir punila ovisi o svrsi primjene, a pritom je najvažnija njegova topljivost koja utječe na oslobađanje ljekovite tvari iz pripravka (Senjković, 1994).

1.4.1 Laktoza

Laktoza je disaharid sastavljen od jednostavnih šećera D-galaktoze i D-glukoze međusobno povezanih 1,4- β -glikozidnom vezom. Postoji u dva izomerna oblika, α i β (Polski i sur., 2014). Laktoza u čvrstom stanju može biti u kristaliničnom ili amorfnom obliku. Kristalinična laktoza može postojati u više različitih oblika, a najpoznatiji su α -laktoza monohidrat i β -laktoza (anhidridna laktoza). Najčešći način dobivanja laktoze je kristalizacija iz otopine na temperaturi nižoj od 93,5 °C te se tako dobiva α -laktoza monohidrat koja ima dobre osobine tečenja, ali slabije je kompresibilnosti (Senjković, 1994) Iz tog razloga se ne koristi u postupcima direktnog komprimiranja, nego češće u postupcima vlažne granulacije.



Slika 5. Kemijska struktura α -laktoze monohidrat
(preuzeto s www.sigmaaldrich.com, pristupljeno 01.09.2020.)

β -laktoza ima poboljšanu kompresibilnost, no slabija svojstva tečenja, a zbog toga što je bezvodna (anhidridna) prikladna je za lijekove koji hidroliziraju). Ova vrsta laktoze koristi se uglavnom kao vezivo-punilo za proizvodnju tableta postupcima direktnog komprimiranja. Laktoza dobivena sušenjem raspršivanjem („*spray-dried lactose*“) smjesa je mikrokristalinične α -monohidrat laktoze i amorfnih sferičnih agregata (Senjković, 1994.). Zbog poboljšanih svojstva kliznosti i kompresibilnosti jedno je od najčešće korištenih punila u postupku direktnog komprimiranja. Niska cijena, laka dostupnost, niska higroskopnost, dobra fizička i kemijska stabilnost te topljivost u vodi čine laktozu jednu od najčešće korištenih punila u pripravi lijekova (Ilić i sur., 2009).

1.4.2 Škrob

Ovisno o izvorima, škrob može biti kukuruzni, rižin ili pšenični. U proizvodnji lijekova koristi se kao punilo, vezivo ili sredstvo za raspadanje. Komercijalno dostupan škrob sadrži 12-14% vlage, no ipak stabilizira higroskopne lijekove. Smatra se da osigurava ravnotežu vlage koja štiti higroskopne tvari od sebe samih. Primjena prirodnog oblika škroba ograničena je zbog slabih svojstva tečenja i nedostatne kompresibilnosti. Kao punilo koristi se najčešće parcijalno hidrolizirani škrob koji se dobiva termički ili kemijsko uzrokovanim pucanjem škrobnih granula. Za razliku od prirodnog oblika škroba koji nije kompresibilan te ima slaba svojstva tečenja, kod parcijalno hidroliziranog škroba znatno je poboljšana kompresibilnost. Najčešći oblik modificiranog škroba koji se koristi je preželatinirani škrob poznat pod nazivom „Starch 1500“ te pokazuje dobra svojstva tečenja, vezanja i kompresibilnosti (Senjković, 1994).

1.4.3 Mikrokristalinična celuloza (MCC)

Celuloza je polisaharid koji se sastoji od molekula glukoze povezanih β - glikozidnom vezom. Ne primjenjuje se kao punilo zbog netopljivosti u vodi i mogućnosti adsorpcije djelatne tvari. Mikrokristalinična celuloza (MCC) dobiva se kiselom hidrolizom α -celuloze, zatim se filtrira, a na kraju se hidrolizirana celuloza suši raspršivanjem. Ovim postupkom vlaknasta struktura celuloze prevedena je u porozne čestice širokog raspona veličina (Senjković, 1994). S obzirom na veličinu čestica, poroznost i svojstva tečenja postoje različite modifikacija MCC, a najpoznatije su Avicel (komercijalni naziv) PH 101 i PH 102. MCC je prema mnogim

znanstvenim radovima najkorištenija pomoćna tvar u postupku direktnog komprimiranja, a služi kao čvrsto vezivo, sredstvo za raspadanje, punilo, lubrikant, antiadheziv (Chaerunisaa i suradnici, 2019).

1.4.4 Dikalcij fosfat dihidrat (DCPD)

U proizvodnji lijekova kao punila koriste se i anorganske soli kalcija od kojih najčešće dikalcij fosfat dihidrat. Na tržištu je poznat pod nazivom Emcompress ili Di-Tab. Karakteriziraju ga dobra svojstva tečenja i kompresibilnosti te visoka fizička i kemijska stabilnost (Senjković, 1994). Dikalcij fosfat dihidrat je ujedno i prvi ekscipijens za direktno komprimiranje dostupan na tržištu. Primarno se koristi kao punilo i vezivo u postupcima direktnog komprimiranja gdje aktivna tvar zauzima manje od 40 do 50% ukupne težine tablete (Liebermann i sur., 1989). Nadalje, kalcijev fosfat dihidrat zahtjeva visok postotak lubrikanta (najčešće magnezijev stearat u formulaciji) (Rowe i sur., 2009).

1.4.5 Magnezijev stearat

Magnezijev stearat je magnezijeva sol stearinske kiseline koja se nalazi u mnogim namirnicama. Najčešće je korišten lubrikant u farmaceutskoj industriji i to u masenom udjelu između 0,25% i 5%. Lubrikanti smanjuju trenje između mase granulata i dijelova tabletnog stroja (Rowe i sur., 2009). Tijekom dugog miješanja sposoban je stvoriti filmove na ostalim pomoćnim tvarima što dovodi do produljenog vremena oslobađanja lijeka, smanjenja tvrdoće tablete i povećanja vremena raspada (Uzunović i Vranić, 2007).

1.4.6 Talk

Talk je hidratizirani magnezijev silikat kemijske formule $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$. Građen je od silikatnih slojeva koji su povezani slabim Van der Waalsovima silama zbog čega je izrazito mekan (Jadhav i sur., 2013). Talk se široko koristio u oralnim dozirnim oblicima kao punilo i lubrikant, no danas je njegova primjena u te svrhe puno rjeđa (Rowe i sur., 2009). Međutim, talk i dalje pronalazi svoju primjenu u proizvodnji farmaceutskih pripravaka kao antiadheziv. Uloga antiadheziva je sprječavanje prijanjanja granulata na dijelove tabletnog stroja (Senjković, 1994). U novije vrijeme koristi se često kao sredstvo za usporavanje otapanja u pripravcima za kontrolirano otpuštanje te kao tvar za oblaganje peleta s produljenim oslobađanjem (Rowe i sur., 2009).

1.4.7 Aerosil

Aerosil je upareni koloidni silicijev dioksid koji pronalazi široku primjenu u farmaceutskoj industriji primarno kao glidant, zatim kao adsorbens i punilo (Mahadlek i Phaechamud, 2012). Glidanti su tvari koje reguliraju tečenje mase u tabletnom stroju i smanjuju trenje (Senjković, 1994). Njegova mala veličina čestica, a velika specifična površina daju mu poželjne karakteristike protočnosti zbog čega se koristi za poboljšanje protoka praškaste/granulirane smjese u koncentracijama između 0,1 do 1% (Rowe i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Paracetamol (acetaminofen) je danas u svijetu jedan od najčešće korištenih OTC lijekova. Koristi se za liječenje blage do umjerene boli i povišene tjelesne temperature, a nalazi se i u kombiniranim pripravcima za liječenje simptoma prehlade i gripe. Iako poznat kao jako siguran lijek, zbog visoke dostupnosti i široke primjene, postao je jedan od vodećih uzroka smrti među lijekovima zbog slučajnog ili namjernog predoziranja. Paracetamol je radi svog hepatotoksičnog djelovanja vodeći uzrok akutnog zatajenja jetre u SAD-u (Yoon i sur, 2016.).

Jedan od parametara zahtjeva kakvoće lijekova kojima analizirani lijek mora odgovarati je količina (sadržaj) djelatne tvari u proizvodu. U tu svrhu najčešće se koriste kromatografske metode kao što je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*- HPLC) i plinska kromatografija. Glavna ograničenja kromatografskih metoda su dugotrajnost i potrebna prethodna obrada uzorka koja može dovesti do uništenja samog uzorka. Iz tog razloga, sve se više radi na razvoju novih brzih i jednostavnih analitičkih metoda za kvantitativno određivanje aktivnih tvari u farmaceutskom obliku (Borio i sur., 2012.).

Svrha ovog diplomskog rada je razviti i validirati brzu i jednostavnu metodu za određivanje paracetamola u tabletama primjenom disperzivne Ramanove spektroskopije. Prvi je cilj ovog rada provesti preliminarnu analizu uzoraka smjese paracetamola i svakog od sedam dostupnih punila snimanjem laserima 532 nm i 785 nm. Analizom dobivenih spektara i pomoću koeficijenata regresijskog pravca, odabire se punilo i laser koji pokazuju najbolje rezultate. Drugi je cilj provesti optimizaciju metode za određivanje paracetamola korištenjem odabranog punila i lasera ispitivanjem validacijskih parametara. Kao validacijski parametri ispitivani su: linearnost, homogenost, preciznost, granica dokazivanja i granica određivanja. Naposljetku, primjenom validirane metode pouzdano odrediti udio paracetamola u komercijalno dostupnim tabletama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Korištene kemikalije

- Standard paracetamola (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Laktoza monohidrat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Škrob (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Mikrokristalinična celuloza (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Kalcijev fosfat dihidrat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Magnezijev stearat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Talk (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Aerosil (Merck, Darmstadt, Njemačka)

3.1.2 Laboratorijski pribor i posude

- Tarionik s pistilom
- Metalna špatula
- Aluminijska folija
- Metalna pinceta
- Ručna preša za pripremu diskova (Specac, Velika Britanija)

3.1.3 Radni instrumenti

Za određivanje mase uzoraka korištena je analitička vaga Mettler Toledo XA105DU (Slika 6), maksimalnog kapaciteta 120 g i mogućnosti očitavanja 0,01 mg.



Slika 6. Analitička vaga Mettler Toledo XA105DU

Ramanovi spektri snimljeni su pomoću Ramanovog disperzivnog spektrometra SENTERRA tvrtke Bruker u konfiguraciji s mikroskopom Olympus s objektivima za povećanje 20, 50 i 100X (Slika 7). Kao izvori zračenja za pobudu uzoraka korištena su dva lasera: Nd:YAG laser valne duljine 532 nm te diodni laser (AlGaAs) valne duljine 785 nm. Za detekciju raspršenog zračenja korišten je CCD uređaj (*charge-coupled device*) hlađen Peltierovim elementom.

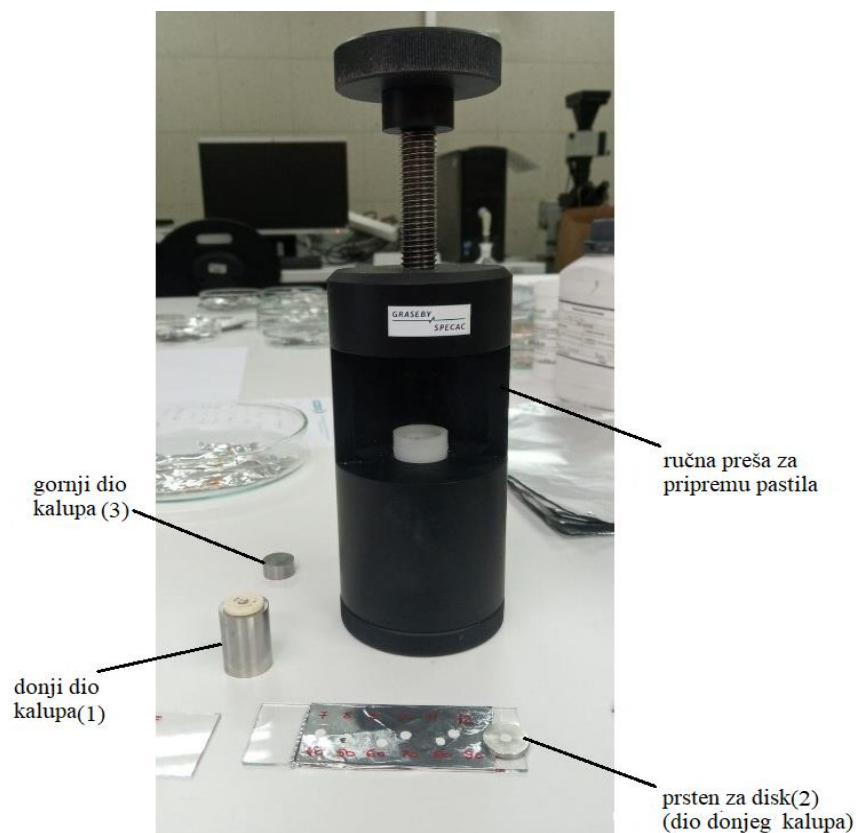


Slika 7. Ramanov disperzivni spektrometar SENTERRA u konfiguraciji s Olympus mikroskopom.

3.2 Metode

3.2.1 Priprema uzoraka za Ramanovu analizu

Potrebna masa standarda paracetamola za svaki uzorak izvaže se na analitičkoj vagi te se prašak kvantitativno prenese s aluminijske folije u tarionik. Nakon toga se u tarionik doda i izvagana masa punila. Sadržaj u tarioniku miješa se pistilom dok se ne dobije homogena smjesa. Smjesa, koja je zaostala na stijenci tarionika, sastruže se pomoću metalne špatule.



Slika 8. Preša za izradu diskova

Od tako pripremljene smjese izvaže se masa smjese od 2,00 mg koja je potrebna za prešanje. Sastavi se donji dio kalupa (1) za izradu diskova i u prsten za disk (2) se kvantitativno prenese izvagani prašak. Kad je sav prašak dodan, njegova površina se poravnava. Donji dio kalupa na kojem se nalazi prašak stavi se u prešu te se na njega doda gornji dio kalupa (3) (Slika 8). Nakon toga se glavni vijak preše rotira za 3 puna okretaja pri čemu dolazi do prešanja uzorka u oblik diska promjera 7 milimetara.

Uzorak se ostavi u preši 30 sekundi kako bi disk bio što kompaktniji. Vijak se otpusti i disk se pomoću pincete odvoji od prstena te se stavlja na mikroskopsko stakalce. Tako pripremljen uzorak spreman je za Ramanovu analizu.



Slika 9. Uzorak za mjerenje

3.2.2 Princip metode

Prije analize Ramanovim spektrometrom pripremljeni diskovi stavljeni su na mikroskopsko stakalce obloženo aluminijskom folijom s ciljem sprečavanja utjecaja podloge na spektre. Kako bi se umanjile posljedice eventualne nehomogenosti uzoraka sva mjerenja provedena su tehnikom kemijskog mapiranja površine uzoraka na 100 položaja s korakom od 100 μm , što je činilo pravokutnu mrežu točaka veličine 1x1 mm. Kao izvori zračenja za pobudu uzoraka korišteni su laseri valne duljine 532 nm snage 5 mW i 785 nm snage 25 mW. Prilikom snimanja spektara korišten je objektiv s povećanjem 20x (NA 0,4) što je u jednoj točki rezultiralo ozračenom površinom od oko 0,5 μm^2 za laser 532 nm, odnosno 1,1 μm^2 za laser 785 nm. Preostali uvjeti snimanja bili su isti za oba lasera: razlučivanje 9–15 cm^{-1} , rešetka 400a, pukotina 50x1000 μm i spektralno područje 4400-100 cm^{-1} . Spektar svakog pojedinačnog položaja rezultat je 5 snimaka uz vrijeme prikupljanja od 1 s, dok je krajnji spektar svakog uzorka koji je korišten za interpretaciju rezultata izračunat kao prosjek svih 100 izvornih spektara. Uprosječivanje izvornih Ramanovih spektara kao i određivanje površine odabrane vrpce paracetamola provedeno je programskim paketom OPUS 7.0.

3.2.3 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel 2016, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i Prism GraphPad (Graph pad Software, Inc., San Diego, SAD, www.graphpad.com). Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je t-test. Svi doneseni zaključci u radu provedeni su uz razinu pouzdanosti od 95 %.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Preliminarna ispitivanja

Preliminarna ispitivanja uzoraka paracetamola i odabranih punila mjerenjem pomoću oba lasera provedena su kako bi se izabralo najbolje punilo i laser za daljnju validaciju metode. Odabir najboljeg punila i lasera za određivanje validacijskih parametara proveden je analizom dobivenih spektara i uspoređivanjem koeficijenata korelacije baždarnog pravca. do pojave fluorescencije.

4.1.1 Priprema uzoraka

Količina prašaka standarda paracetamola i punila korištenih za pripremu uzoraka za preliminarna ispitivanja prikazani su u Tablici 1. Punila korištena u preliminarnim ispitivanjima su laktoza, škrob, mikrokristalinična celuloza, dikalcij fosfat dihidrat, magnezijev stearat, talk i aerosil. Ukupno je pripremljeno 91 uzoraka (13 različitih koncentracija \times 7 punila) koji su analizirani s 2 različita lasera (532 nm i 785 nm).

Tablica 1. Masa paracetamola i punila u pojedinom uzorku

| uzorak | paracetamol (masa/mg) | punilo (masa/mg) | paracetamol (%) |
|--------|-----------------------|------------------|------------------|
| 1 | 0,00 | 10,00 | 0 |
| 2 | 0,30 | 9,70 | 3 |
| 3 | 0,50 | 9,50 | 5 |
| 4 | 1,00 | 9,00 | 10 |
| 5 | 2,00 | 8,00 | 20 |
| 6 | 3,00 | 7,00 | 30 |
| 7 | 4,00 | 6,00 | 40 |
| 8 | 5,00 | 5,00 | 50 |
| 9 | 6,00 | 4,00 | 60 |
| 10 | 7,00 | 3,00 | 70 |
| 11 | 8,00 | 2,00 | 80 |
| 12 | 9,00 | 1,00 | 90 |
| 13 | 10,00 | 0,00 | 100 |

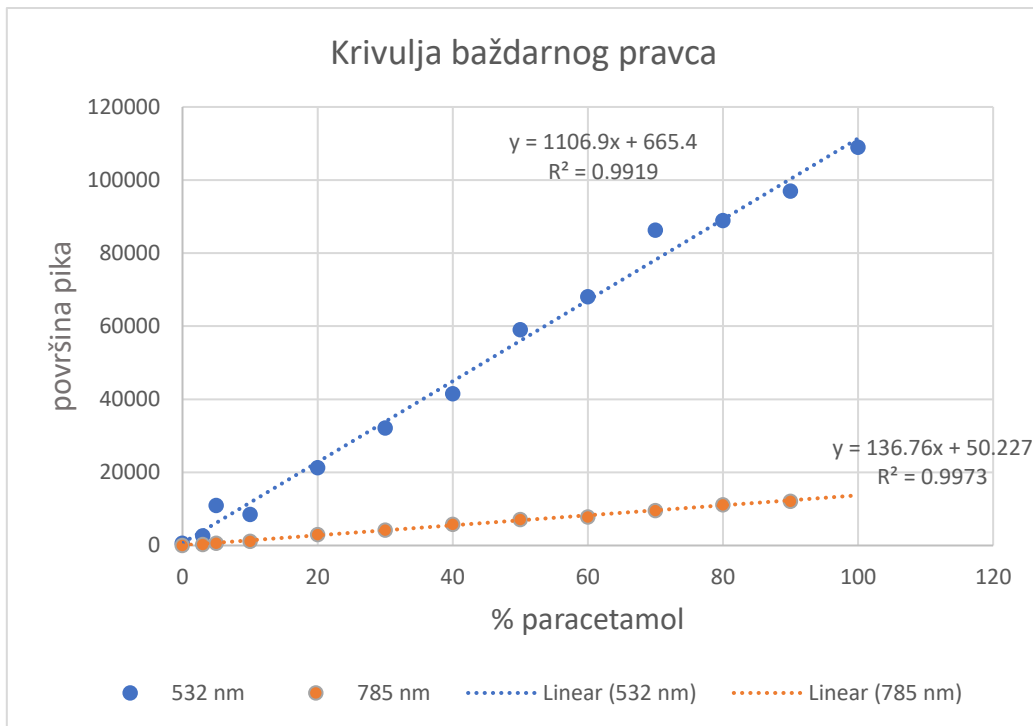
4.1.2 Rezultati

Preliminarnim testovima dobiveni su rezultati prikazani Tablicom 2.

Tablica 2. Prikaz rezultata preliminarnih ispitivanja

| punilo | jednadžba baždarnog pravca (532 nm) | koeficijent korelacije (532 nm) | jednadžba baždarnog pravca (785 nm) | koeficijent korelacije (785nm) |
|---------------------------|--|--|--|---------------------------------------|
| laktoza | $y = 1106.9x + 665.4$ | $R^2 = 0.9919$ | $y = 136.76x + 50.227$ | $R^2 = 0.9973$ |
| škrob | $y = 960.26x - 1717.3$ | $R^2 = 0.975$ | $y = 136.44x - 125.98$ | $R^2 = 0.9657$ |
| MCC | $y = 934.79x - 3176.5$ | $R^2 = 0.9529$ | $y = 147.66x - 901.38$ | $R^2 = 0.9385$ |
| DCCP | $y = 1012.6x + 7243.4$ | $R^2 = 0.9497$ | $y = 140.19x + 684.41$ | $R^2 = 0.9553$ |
| magnezijev stearat | $y = 658.02x - 8653.7$ | $R^2 = 0.6498$ | $y = 112.82x - 1476.3$ | $R^2 = 0.6944$ |
| talk | $y = 1158.4x - 1905.1$ | $R^2 = 0.9603$ | $y = 168.79x - 728.34$ | $R^2 = 0.9693$ |
| aerosil | $y = 904.15x - 2241.3$ | $R^2 = 0.8853$ | $y = 141.36x - 645.23$ | $R^2 = 0.8102$ |

Usporedbom spektara paracetamola i laktoze vidljivo je da ne dolazi do preklapanja pikova istih te da je moguće određivanje paracetamola u prisutnosti laktoze. Nadalje, koeficijent korelacije baždarnog pravca za uzorak smjese paracetamola i laktoze je najbolje odgovara zahtjevima ($R^2 \geq 0,99$). Iz tih razloga se za daljnje ispitivanje odabire laktoza kao punilo. Snimanjem pomoću lasera 532 nm i 785 nm ne dolazi do fluorescencije i odabiru se oba lasera za daljnje provođenje analize.



Slika 10. Graf ovisnosti površine pika paracetamola o udjelu paracetamola u uzorku

4.2 Validacija analitičke metode

Metoda je validirana ispitivanjem parametara validacije: linearnost, homogenost, preciznost (ponovljivost i srednja preciznost), granica dokazivanja i granica određivanja.

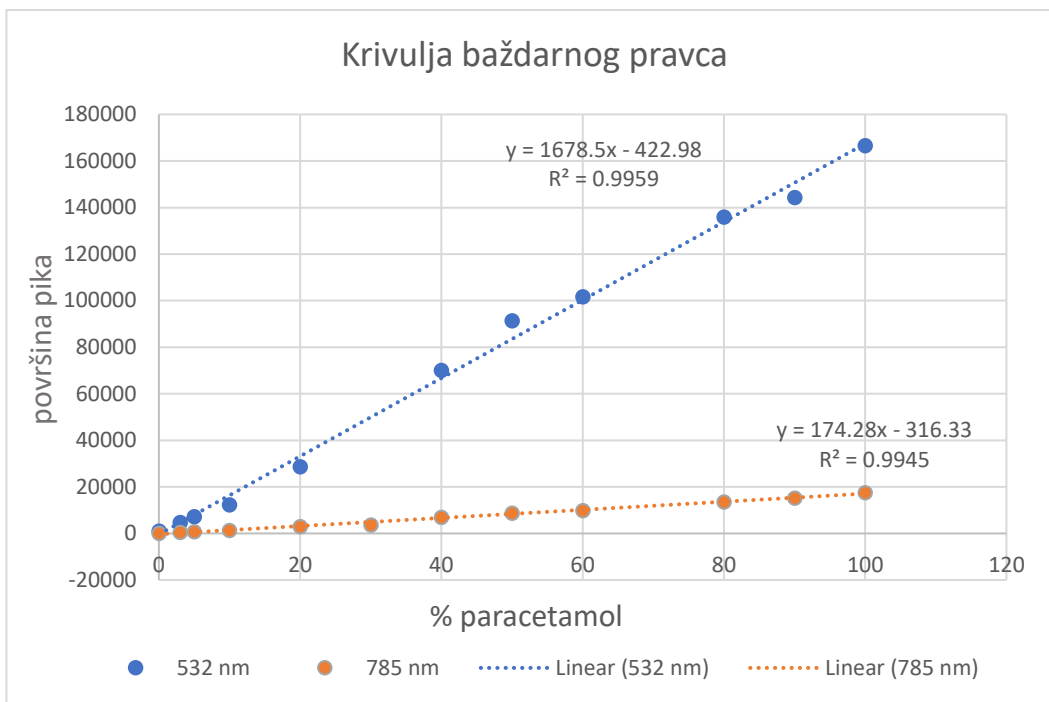
4.2.1 Linearnost

Za ispitivanje linearnosti pripremi se novi set uzoraka, a od ukupne mase izvaže se 2,00 mg za pripremu diskova. Količine paracetamola i laktoze u svakom uzorku prikazane su u tablici 3. Linearnost se ispitivala provođenjem 3 mjerenja za 13 različitih omjera paracetamola i laktoze u uzorku.

Tablica 1: Masa paracetamola i punila u pojedinom uzorku za ispitivanje linearnosti

| uzorak | paracetamol (masa/mg) | laktoza (masa/mg) |
|--------|-----------------------|-------------------|
| 1 | 0,00 | 10,00 |
| 2 | 0,30 | 9,70 |
| 3 | 0,50 | 9,50 |
| 4 | 1,00 | 9,00 |
| 5 | 2,00 | 8,00 |
| 6 | 3,00 | 7,00 |
| 7 | 4,00 | 6,00 |
| 8 | 5,00 | 5,00 |
| 9 | 6,00 | 4,00 |
| 10 | 7,00 | 3,00 |
| 11 | 8,00 | 2,00 |
| 12 | 9,00 | 1,00 |
| 13 | 10,00 | 0,00 |

Iz rezultata mjerenja dobije se graf ovisnosti analitičkog signala o postotku paracetamola u uzorku, odnosno kalibracijska krivulja. Linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca. Slika 10 prikazuje rezultate :



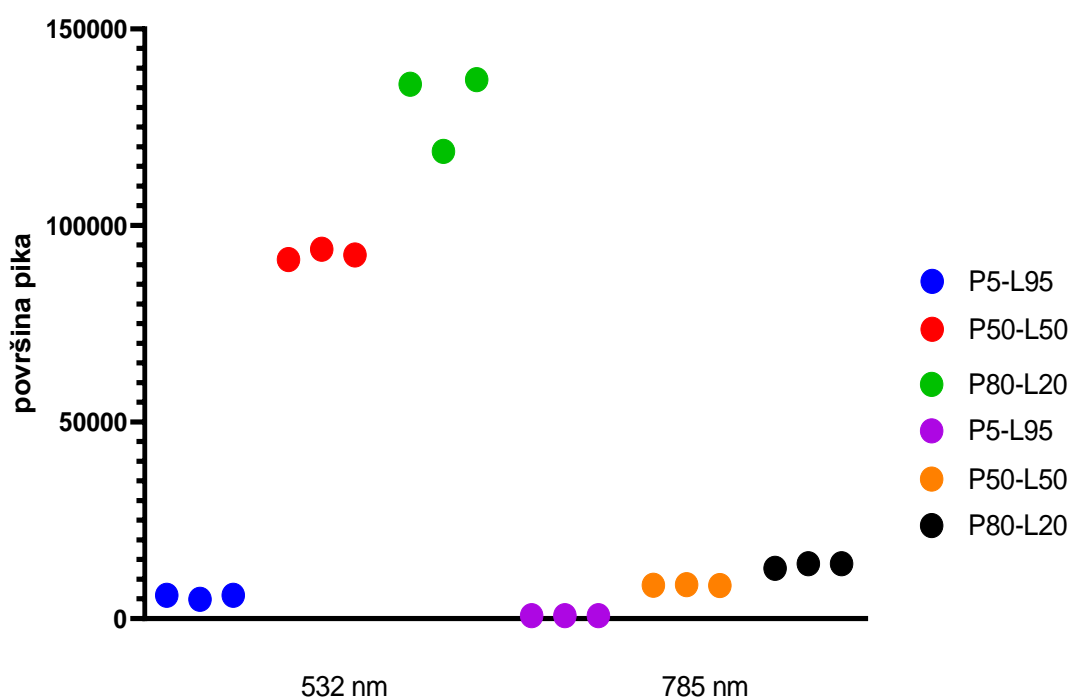
Slika 11. Graf ovisnosti površine pika paracetamola o udjelu paracetamola u uzorku

Koeficijent korelacije regresijskog pravca za laser 532 nm iznosi 0,9959, a za laser 785 nm 0,9945. Na temelju dobivenih vrijednosti ($R^2 \geq 0,99$) može se zaključiti da je metoda linearna i pogodna za određivanje paracetamola u uzorcima.

4.2.2 Homogenost

Homogenost uzorka ispituje se određivanjem površine pikova aktivne tvari snimanjem na različitim mjestima na uzorku. Dobivene vrijednosti se zatim uspoređuju.

Homogenost uzorka smjese paracetamola i laktoze ispitana je snimanjem površine uzorka na 3 različita mjesta. Za određivanje homogenosti korišteni su uzorci koji su već pripremljeni za određivanje linearnosti (uzorci s 5, 50 i 80% paracetamola). Slika 12 prikazuje rezultate dobivene mjerenjem površine pika paracetamola u 3 različita položaja na uzorku.



Slika 12. Prikaz površine pika paracetamola u 3 različite točke uzorka

Rezultati dobiveni za određivanje homogenosti uzorka su zadovoljavajući i nema većih odstupanja čak niti kod manjih koncentracija što znači da je metoda pogodna za utvrđivanje raspodjele paracetamola u uzorcima.

Kod uzorka s 80% paracetamola prisutno je vidljivo odstupanje što može biti posljedica pogreške analitičara prilikom pripreme uzorka.

4.2.3 Preciznost

Preciznost se ispitivala provođenjem 3 mjerenja za 3 različita omjera paracetamola i laktoze s oba lasera (532 i 785 nm). Kada se mjerenje provodi unutar istog dana tada se preciznost izražava kao ponovljivost, a ponovljivost između dana naziva se srednja preciznost. Izražava se vrijednostima kao što su SD i RSD. Ponovljivost u danu za svaki laser prikazana je u Tablicama 3 i 4. Ponovljivost mjerenja iz dana u dan prikazana je u Tablici 5 i 6.

Tablica 3. Ponovljivost u danu (laser 532 nm)

| Paracetamol (%) | 5 | 50 | 80 |
|--------------------|----------|-----------|------------|
| 1. mjerenje | 5225,448 | 86185,275 | 143606,274 |
| 2. mjerenje | 5152,268 | 87787,290 | 146848,935 |
| 3. mjerenje | 5332,466 | 88354,354 | 147737,569 |
| Srednja vrijednost | 5236,727 | 87442,306 | 146064,259 |
| SD | 90,627 | 1124,938 | 2174,554 |
| RSD | 1,731 | 1,286 | 1,487 |

Tablica 4. Ponovljivost u danu (785 nm)

| Paracetamol (%) | 5 | 50 | 80 |
|--------------------|---------|----------|-----------|
| 1. mjerenje | 436,666 | 7205,135 | 13105,579 |
| 2. mjerenje | 432,856 | 7135,892 | 13186,994 |
| 3. mjerenje | 426,532 | 7142,119 | 13164,625 |
| Srednja vrijednost | 432,018 | 7161,049 | 13152,399 |
| SD | 5,119 | 38,307 | 42,062 |
| RSD | 1,185 | 0,535 | 0,320 |

Iz dobivenih vrijednosti RSD za ponovljivost u danu može se zaključiti da je metoda precizna (RSD <2%) te se metoda može koristiti za određivanje paracetamola u uzorcima.

Tablica 5: Ponovljivost iz dana u dan (532 nm)

| Paracetamol (%) | 5 | 50 | 80 |
|--------------------|----------|-----------|------------|
| 1.dan | 5225,448 | 86185,275 | 143606,274 |
| 2.dan | 5096,363 | 87298,150 | 145607,349 |
| 3.dan | 4750,186 | 89006,146 | 155129,127 |
| Srednja vrijednost | 5023,999 | 87496,524 | 148114,250 |
| SD | 245,756 | 1420,860 | 6156,903 |
| RSD | 4,892 | 1,624 | 4,159 |

Tablica 6: Ponovljivost iz dana u dan (785 nm)

| Paracetamol (%) | 5 | 50 | 80 |
|--------------------|---------|----------|-------------|
| 1.dan | 436,666 | 7205,135 | 13105,579 |
| 2.dan | 504,162 | 7694,908 | 12980,258 |
| 3.dan | 369,347 | 8718,735 | 14945,494 |
| Srednja vrijednost | 436,725 | 7872,926 | 13677,11033 |
| SD | 67,408 | 772,343 | 1100,238239 |
| RSD | 15,435 | 9,810 | 8,044 |

Iz dobivenih vrijednosti RSD za srednju preciznost može se zaključiti da je metoda precizna te se može koristiti za određivanje paracetamola u uzorcima.

Uočeno je veće odstupanje kod udjela paracetamola od 5%. Odstupanje može biti posljedica pogreške analitičara tijekom pripreme uzorka zbog čega dolazi do nehomogenosti uzorka.

4.2.4 Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) se određuju prema formulama:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a},$$

gdje je σ standardno odstupanje y odsječka regresijskog pravca, a a je nagib pravca (Nigović i sur., 2014). Rezultati određivanja za oba lasera prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. LOD i LOQ za laser 532 i 785 nm

| | 532 nm | 785 nm |
|--|---------------|---------------|
| standardno odstupanje (σ) | 1963,069 | 131,484 |
| nagib pravca (a) | 1678,505 | 173,254 |
| LOD (%) | 3,860 | 2,504 |
| LOQ (%) | 11,700 | 7,589 |

4.3 Primjena metode na realne uzorke

Validiranom metodom određen je udio paracetamola u realnim uzorcima. Analiza je provedena na 4 različita uzorka od kojih su uzorak 1 i 2 kombinirani pripravci s paracetamolom, a uzorak 3 i 4 sadrže samo paracetamol kao aktivnu tvar. Uzorci su u obliku tableta, a snimljeni su na 2 različita načina: kao cijele tablete i tablete smrvljene u tarioniku.

Iz dobivenih vrijednosti površine pikova paracetamola za oba lasera izračunati su udjeli paracetamola u analiziranim uzorcima. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 8.

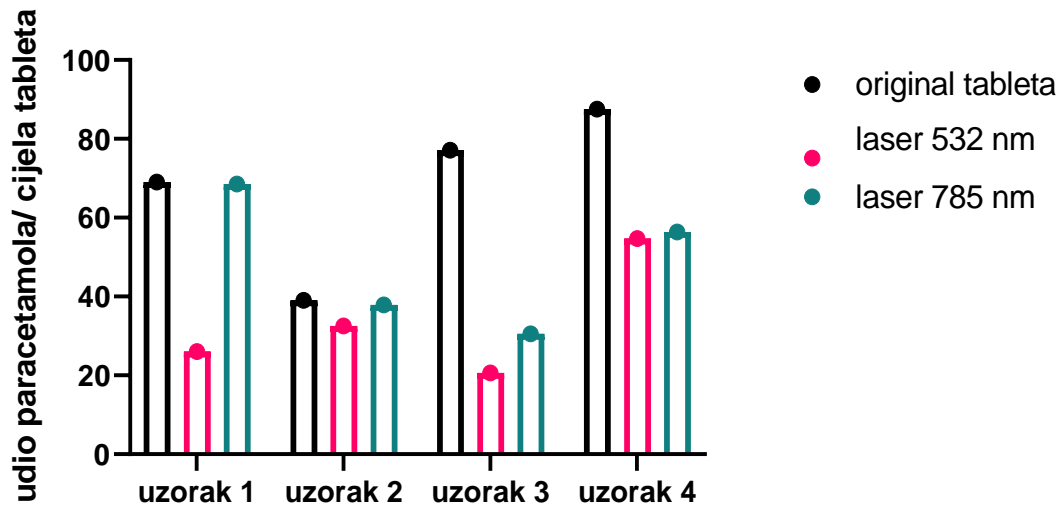
Tablica 8. Prikaz teorijskih i izmjerenih udjela paracetamola u cijelim i smrvljenim tabletama

| | masa uzorka (tablete)/mg | % paracetamola u uzorku (teorijski) | izmjereni % paracetamola | |
|----------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|
| | | | 532 nm | 785 nm |
| uzorak 1 | 724,5 | 69,013 | 26,0* | 68,5* |
| | | | 51,6** | 74,0** |
| uzorak 2 | 640,9 | 39,008 | 32,5* | 37,9* |
| | | | 52,6** | 50,9** |
| uzorak 3 | 648,0 | 77,160 | 20,6* | 30,5* |
| | | | 89,2** | 81,7** |
| uzorak 4 | 571,3 | 87,520 | 54,7* | 56,4* |
| | | | 88,0** | 72,8** |

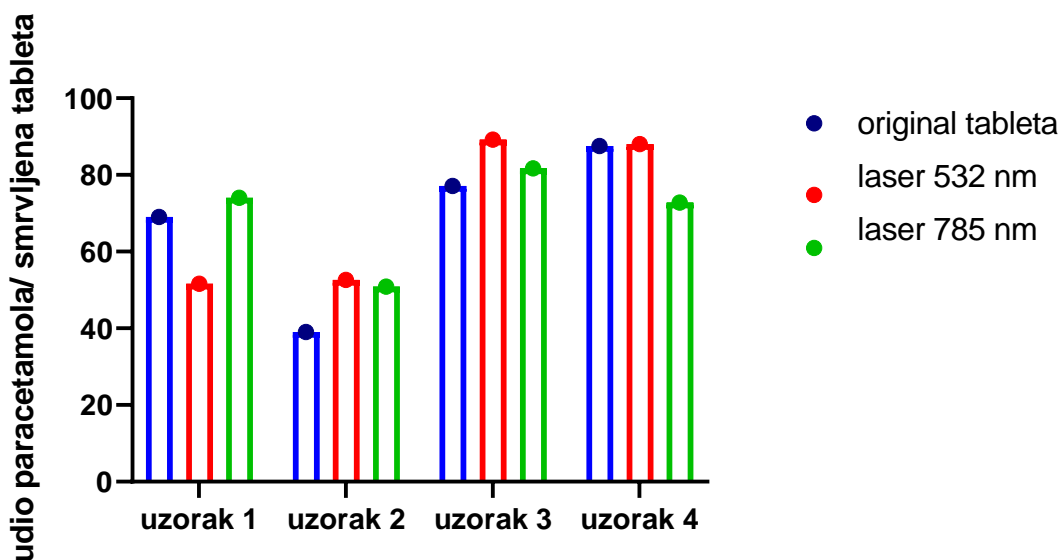
*cijela tableta

**usitnjena tableta

Slika 13 i 14 prikazuju usporedbu teorijskog i izmjerenog udjela paracetamola u tabletama snimanjem cijele i smrvljene tablete s laserom 532 i 785 nm.



Slika 13. Usporedba teorijskog i izmjerenog udjela paracetamola snimanjem cijele tablete



Slika 24. Usporedba teorijskog i izmjerenog udjela paracetamola snimanjem smrvljene tablete

Usporedbom dobivenih udjela snimanjem s oba lasera dobivena je statistički značajna razlika kod cijelih tableta, dok kod usitnjenih tableta nema statistički značajne razlike. Nadalje, uzorci 1 i 2 pokazuju veća odstupanja što se može pripisati njihovom kompleksnijem sastavu (moguća interferencija zbog pikova ostalih API-ja), dok kod uzoraka 3 i 4 u kojima je prisutan samo paracetamol kao aktivna komponenta nema većih odstupanja. U daljnjim istraživanjima će se primijeniti kemometrijski pristup analizi podataka radi bolje kvantifikacije paracetamola u uzorcima.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Ramanova spektroskopija je brza i jednostavna spektroskopska metoda (kratko vrijeme analize i moguća analiza bez prethodne obrade uzorka (moguće analiziranje cijele tablete). Odabir lasera vrlo je bitan zbog moguće fluorescencije.
- Način pripreme uzoraka (homogeniziranje, prešanje) uvelike utječe na rezultate analize iz čega proizlazi da je poželjno da tijekom cijele analize analitičar bude isti, kao i uvjeti i način pripreme uzoraka.
- Ramanova metoda pogodna je za određivanje homogenosti uzorka.
- Disperzivna Ramanova spektroskopija prikladna je za kvalitativno određivanje aktivnih tvari, a za kvantitativno određivanje potrebne su kompleksnije analize podataka (kao što je kemometrijska analiza).

6. LITERATURA

- [1] Ainurofiq A, Dinda KE, Pangestika MW, Himawati U, Warthani WD, Sipahutar YT. The effect of polymorphism on active pharmaceutical ingredient: A review. *Int J Res Pharm Sci*, 2020, 11, 1621-1630.
- [2] Bebenista MJ, Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm*, 2014, 71, 11-23.
- [3] Bell SEJ. Quantitative Analysis of Solid Dosage Formulations by Raman Spectroscopy. U: *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*. Šašić S, urednik, New Jersey, Wiley and Sons, 2008, str. 42-47.
- [4] Chaerunisaa AY, Sriwidodo S, Abdassah M, Microcrystalline Cellulose as Pharmaceutical Excipient. U: *Pharmaceutical Formulation Design - Recent Practices*. Ahmad U, Akhtar J, urednici, London, IntechOpen, 2020, str. 41-54
- [5] Du JJ, Lai F, Varadi L, Williams PA, Groundwater PW, Platts JA, Hibbs DE, Overgaard J. Monoclinic Paracetamol vs. Paracetamol-4,4'-Bipyridine Co-Crystal; What is the difference? A charge Density Study. *Crystals*, 2018, 8, 46.
- [6] Gordona KC, McGoverinb CM. Raman mapping of pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 2011, 417, 151– 162.
- [7] Gu Z, Chen W, Du L, Zou J, Long Z. Analysis of Methyl Ethyl Ketone Dissolved in Transformer Oil Using Laser Raman Spectroscopy. 2016 IEEE International Conference on High Voltage Engineering and Application (ICHVE), Chengdu, 2016, 1-4.
- [8] Jadhav NR, Paradkar AR, Salunkhe NH, Karade RS, Mane GG. Talc: A versatile pharmaceutical excipient, *World J Pharm Pharm Sci*, 2013, 2, 4639-4660.
- [9] Ilic I, Kása P, Dreu R, Pintye-Hódi K, Srčić S. The compressibility and compactibility of different types of lactose. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2009, 35, 1271–1280.
- [10] Lazarić K. Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, *Svijet po mjeri* 1, 2012, 61-64.
- [11] Lieberman HA, Lachman L, Schwart JB. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, M. Dekker Inc, 1989, str. 101
- [12] Mahadlek J, Phaechamud T. Role of Colloidal Silicon Dioxide in Eudragit In-situ FormingGel, *Adv Mat Res*, 2012, 146-149, 581-582.
- [13] Matanović Mimica S. Farmakokinetika i farmakodinamika analgetika. *Medicus*, 2014, 23, 31-46.
- [14] Mitsutake H, Poppia RJ, Breitzkreitz MC. Raman Imaging Spectroscopy: History, Fundamentals and Current Scenario of the Technique, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2019, 30, 2243-2258.
- [15] Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. *Analitika lijekova – Praktikum: Validacija analitičkog postupka*. Zagreb, Farmaceutsko biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, 135-137.
- [16] Reiss CA, Mechelen JB, Goubitzc K, Peschar R. Reassessment of paracetamol orthorhombic Form III and determination of a novel low temperature monoclinic Form III-m from powder diffraction data. *Acta Crystallogr C Struct Chem*, 2018, 74, 392-399.
- [17] Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London, Pharmaceutical Press, 2009, str. 96-97, 185-188, 404-406, 728-731.

- [18] Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 48-155.
- [19] Smith E, Dent G. Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach, Wiley and Sons, Chichester, 2005, str. 1-7, 23-31, 163-165.
- [20] Šašić S, Ozaki Y. Introduction to Raman spectroscopy. U: U: Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy. Šašić S, urednik, New Jersey, Wiley and Sons, 2008, str. 1-7.
- [21] Uzunović A, Vranić E. Effect of magnesium stearate concentration on dissolution properties of ranitidine hydrochloride coated tablets, *Bosn J Basic Med Sci*, 2007, 7, 279-283.
- [22] Vašková H. A powerful tool for material identification: Raman spectroscopy, *Int J Math Model Meth Appl Sci*, 2011, 5, 1205-1212.
- [23] Zrilić M, Bukovina G, Rešić A. Koliko poznajemo paracetamol? Terapijsko djelovanje i otrovanje. HPPŠ XXXIV, Split, 2017, 241-246.
- [24] Yoon E, Babar A, Choudhary, Kutner, Pysopoulos N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *J Clin Transl Hepatol*, 2016, 4, 131-142.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Paracetamol (acetaminofen) je danas u svijetu jedan od najčešće korištenih OTC lijekova. Koristi se za liječenje blage do umjerene boli i povišene tjelesne temperature, a nalazi se i u kombiniranim pripravcima za liječenje simptoma prehlade i gripe. Iako poznat kao jako siguran lijek, zbog visoke dostupnosti i široke primjene, postao je jedan od vodećih uzroka smrti među lijekovima zbog slučajnog ili namjernog predoziranja. Paracetamol je radi svog hepatotoksičnog djelovanja vodeći uzrok akutnog zatajenja jetre u SAD-u.

Cilj rada bio je razviti i validirati metodu za određivanje paracetamola u tabletama primjenom Ramanove spektroskopije te primjenom validirane metode odrediti udio paracetamola u uzorcima tableta. Prije validacije metode, bilo je potrebno provesti preliminarna ispitivanja, kojima se odabralo najbolje punilo te najbolji laser za ispitivanje validacijskih parametara.

Preliminarnim ispitivanjima, kao najbolje punilo, odabrana je laktoza. Kod validacije analitičke metode ispitivani su parametri: linearnost, homogenost, preciznost (ponovljivost i srednja preciznost) te granica određivanja i dokazivanja. Rezultati provedenih validacijskih mjerenja za sve parametre uglavnom su se nalazili unutar postavljenih granica. Određena odstupanja mogu se objasniti pogreškom analitičara prilikom pripreve uzorka. Primjenom validirane metode na realne uzorke, dobivene su vrijednosti udjela paracetamola u uzorcima tableta i uspoređene s deklariranim. U daljnjim istraživanjima primijenit će se kemometrijski pristup analizi podataka radi bolje kvantifikacije paracetamola u uzorcima.

Paracetamol (acetaminophen) is one of the most widely used OTC drugs in the world today. It is used to treat mild to moderate pain and fever, and it is also found in combined preparations to treat cold and flu symptoms. Although known as a very safe drug, highly available and widely applicable, it has become one of the leading causes of death when drugs are concerned, due to accidental or intentional overdose. Paracetamol is the leading cause of acute liver failure in the United States because of its hepatotoxic effects.

The aim of this study was to develop and validate a method for determination of paracetamol in tablets, using Raman spectroscopy and to use this validated method to determine the proportion of paracetamol in tablet samples. Prior to the validation of the method, it was necessary to conduct preliminary tests to select the best filler and the best laser for testing validation parameters.

Preliminary test showed that lactose was the best filler. During the validation of the analytical method, following parameters were examined: linearity, homogeneity, precision (repeatability and intermediate precision) and the limit of determination and quantification. The results of the validation measurements, performed for all parameters, were generally within the set limits. Certain deviations can be explained by the analyst's error in preparing the sample. By applying the validated method to real samples, paracetamol content in tablet samples was obtained and compared to the theoretical ones. In further research, a chemometric approach to data analysis will be applied in order to improve quantification of paracetamol in the samples.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC
DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitičku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

RAZVOJ I VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE PARACETAMOLA U TABLETAMA PRIMJENOM RAMANOVE SPEKTROSKOPIJE

Petra Ivanjko

SAŽETAK

Paracetamol (acetaminofen) je danas u svijetu jedan od najčešće korištenih OTC lijekova. Koristi se za liječenje blage do umjerene boli i povišene tjelesne temperature, a nalazi se i u kombiniranim pripravcima za liječenje simptoma prehlade i gripe. Iako poznat kao jako siguran lijek, zbog visoke dostupnosti i široke primjene, postao je jedan od vodećih uzroka smrti među lijekovima zbog slučajnog ili namjernog predoziranja. Paracetamol je radi svog hepatotoksičnog djelovanja vodeći uzrok akutnog zatajenja jetre u SAD-u. Cilj rada bio je razviti i validirati metodu za određivanje paracetamola u tabletama primjenom Ramanove spektroskopije te primjenom validirane metode odrediti udio paracetamola u uzorcima tableta. Prije validacije metode, bilo je potrebno provesti preliminarna ispitivanja, kojima se odabralo najbolje punilo te najbolji laser za ispitivanje validacijskih parametara. Preliminarnim ispitivanjima, kao najbolje punilo, odabrana je laktoza. Kod validacije analitičke metode ispitivani su parametri: linearnost, homogenost, preciznost (ponovljivost i intermedijarna preciznost) te granica određivanja i dokazivanja. Rezultati provedenih validacijskih mjerenja za sve parametre uglavnom su se nalazili unutar postavljenih granica. Određena odstupanja mogu se objasniti pogreškom analitičara prilikom pripreme uzorka. Primjenom validirane metode na realne uzorke, dobivene su vrijednosti udjela paracetamola u uzorcima tableta i uspoređene s deklariranim. U daljnjim istraživanjima primijenit će se kemometrijski pristup analizi podataka radi bolje kvantifikacije paracetamola u uzorcima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 37 stranica, 14 grafičkih prikaza, 8 tablica i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ramanova spektroskopija, paracetamol, validacija analitičke metode

Mentor: **Doc. dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Komentor: **Dr. sc. Ivana Bačić, dipl. ing.**, Glavni vještak za požare i eksplozije, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić"

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: listopad 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Analytical chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR DETERMINING OF PARACETAMOL IN TABLETS USING RAMAN SPECTROSCOPY

Petra Ivanjko

SUMMARY

Paracetamol (acetaminophen) is one of the most widely used OTC drugs in the world today. It is used to treat mild to moderate pain and fever, and it is also found in combined preparations to treat cold and flu symptoms. Although known as a very safe drug, highly available and widely applicable, it has become one of the leading causes of death when drugs are concerned, due to accidental or intentional overdose. Paracetamol is the leading cause of acute liver failure in the United States because of its hepatotoxic effects. The aim of this study was to develop and validate a method for determination of paracetamol in tablets, using Raman spectroscopy and to use this validated method to determine the proportion of paracetamol in tablet samples. Prior to the validation of the method, it was necessary to conduct preliminary tests to select the best filler and the best laser for testing validation parameters. Preliminary test showed that lactose was the best filler. During the validation of the analytical method, following parameters were examined: linearity, homogeneity, precision (repeatability and intermediate precision) and the limit of determination and quantification. The results of the validation measurements, performed for all parameters, were generally within the set limits. Certain deviations can be explained by the analyst's error in preparing the sample. By applying the validated method to real samples, paracetamol content in tablet samples was obtained and compared to the theoretical ones. In further research, a chemometric approach to data analysis will be applied in order to improve quantification of paracetamol in the samples.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 37 pages, 14 figures, 8 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Raman spectroscopy, paracetamol, validation

Mentor: **Jasna Jablan, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Ivana Bačić, Ph.D.**, *Chief Expert for Fire and Explosions, Forensic Science Centre „Ivan Vučetić“*

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D., *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Zovko Končić, Ph.D., *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: October 2020.