

Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect / Andriy B. Vishnikin, Mohammed K.E.A. Al-Shwaiyat, Galina A. Petrushina, Ludmila P. Tsiganok, [Vasil Andruch](#), Yaroslav R. Bazel, Hana Sklenářová, Petr Solich // Talanta. – 2012. – Vol. 96, 15 July. – P. 230-235. – Режим доступу :

Високочутливе послідовне визначення п-амінофенолу в композиціях парацетамолу з 18-молібдодифосфат гетерополіаніоном на основі усунення ефекту Шлірена

Introduction

p-Aminophenol (PAP) can exist as either a synthetic intermediate in pharmaceutical preparations or as a primary hydrolytic degradation product of paracetamol. PAP is considered to be an impurity in paracetamol. It is a substance of modest toxicity, able to cause nephrotoxicity and having teratogenic effects. PAP is limited to a low level (50 ppm or 0.005% (w/w)) as a drug substance by Pharmacopoeias in Europe, the United States, Great Britain and Germany using a manual colorimetric limit test. The limit for PAP is broadened to 1000 ppm or 0.1% (w/w) for tablet product monographs, which mention the use of an automated and less sensitive HPLC method. At such a low level pharmacopoeial HPLC assay was not applicable due to matrix interference. A fast, automated assay was necessary for routine analysis. Determination of PAP is frequently used as a step in many methods based on the determination of paracetamol by its hydrolysis to PAP [1], [2].

Various methods have been reported for the determination of PAP, including HPLC [3], capillary electrophoresis [4], spectrophotometry [5], fluorimetry [6] and electrochemical techniques [7], [8]. Flow methods have been recognized as being potentially more sensitive and faster for the determination of PAP than HPLC analysis and other techniques [9].

FIA/SIA methods are characterized by high sensitivity, which under certain conditions can be significantly higher than that achieved with the relevant batch methods. In order to achieve low limits of detection, special attention should be paid to those factors that determine the signal-to-noise ratio. One such important factor is the Schlieren effect, which limits the sensitivity and affects the signal-to-noise ratio while impairing the reproducibility of spectrophotometric measurements [10].

The Schlieren effect is the result of light inflections caused by the formation of optical artifacts, such as when a mirror or a lens is within the flowing reaction area. The perfect mixing of a sample with reagents and carrier solvents usually cannot be achieved in flow analysis. Gradients of concentrations or sudden changes in local concentrations – that is, a difference in the refraction index along the monitored zones – lead to deflections of light that alter the intensity of the transmitted beam.

Depending on the mixing conditions [10], the Schlieren effect can consist of two primary components. The first one is associated with the formation of stable liquid lenses – cylindrical layers having different refractive indices – under a laminar flow regime. The lenses increase or decrease the measured signal by focusing

light onto or from the detector. The sequence of a positive peak followed by a negative peak, sometimes interchanged in places, is superimposed on the basic recorded output signal, thus distorting it. This component can be reproduced quite easily. The other component appears under poor mixing conditions and leads to the occurrence of a variety of transient mirrors within the flowing sample, thus leading to a noisy recorded signal and a decrease in reproducibility.

Various strategies have been proposed for the elimination of the Schlieren effect, including dual-wavelength treatment of the signal [10], matching the refraction indices of the carrier and sample solutions [11], reversed flow [12], a nested loop [13] and the introduction of large sample volumes [14].

When the dual-wavelength method is employed, the intensities of two selected monochromatic beams are measured simultaneously using separate detectors, and real-time subtraction of the wavelength-independent noise is obtained. The transmitted light is measured at two different wavelengths: one at which the product absorbs light and another outside the product's absorbance spectrum, where only the Schlieren effect is observed. Nevertheless, this methodology requires the generally complex handling of additional data and measurements at another wavelength, which together have the effect of complicating the analysis. The Schlieren effect is wavelength sensitive and noisy, thus leading to both systematic and random errors. To compensate for the Schlieren effect when using this methodology, a diode-array or CCD spectrophotometer is required, and while this method is preferable to

analyzing samples having a high concentration of the analyte or other substances, the matching of the refractive index of the carrier with that of the sample and/or reagent solutions is potentially beneficial when highly concentrated carrier or reagent solutions have to be used.

This paper presents a highly sensitive, precise and automated method using Sequential Injection (SI) analysis to assay quantitatively low levels of the p-aminophenol in paracetamol formulations as degradation product. A solution containing PAP and paracetamol is injected into a buffer carrier stream and merged on-line with 18-molybdodiphosphate heteropoly complex (18-MPC) reagent to form a specific blue derivative which is subsequently detected spectrophotometrically at 820 nm. The procedure has been optimized mainly with respect to measurement sensitivity. A new strategy based on the careful matching of the refractive index of the reagent solution with that of the carrier and sample solutions has been proposed to reduce the Schlieren effect that occurs in the flow system used due to high concentrations of acetate buffer and 18-MPC reagent below the required level.

Section snippets

Reagents

All reagents used were of analytical-reagent grade and distilled water was used throughout. The p-aminophenol was obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). The PAP stock solution was prepared daily by dissolving the appropriate amount of the drug in 0.05 mol L⁻¹ HCl solution to reach a final concentration of 0.01 mol L⁻¹. This solution was then stored in a refrigerator. Before

being used it was diluted to the desired concentration by adding 20 mL of acetate buffer and adjusting the volume to 100 mL

Color reaction of 18-MPC with PAP

18-MPC has several chemical properties which markedly distinguish it among other heteropoly anions used for the determination of reducing agents. These are its comparatively high oxidation potential, its rapid rate of reaction with the reducing agents and the strong coloration of the reduced forms. It can be easily obtained in its pure form.

The influence of the solution pH on the formation of the heteropoly blue produced during the reaction of PAP and 18-MPC was investigated (Fig. 2). At $\text{pH} > 5.0$

Conclusions

A new approach enabling a decrease in the Schlieren effect to below the required level has been proposed. It is based on the leveling off of the refraction indices of the liquids mixed in the flow system by careful matching of the reagent concentration and buffer solution components. The use of this approach to remove the Schlieren effect successfully led to an improvement in the sensitivity of PAP determination with 18-MPC in acetate buffer medium by one order of magnitude. A range of other

вступ

p-амінофенол (PAP) може існувати або як синтетичний проміжний продукт у фармацевтичних препаратах, або як первинний продукт гідролітичного розкладання парацетамолу. PAP вважається домішкою парацетамолу. Це речовина помірної

токсичності, здатна викликати нефротоксичність і мати тератогенну дію. PAR обмежується низьким рівнем (50 ppm або 0,005% (w/w)) як лікарська речовина фармакопеями в Європі, Сполучених Штатах, Великобританії та Німеччині за допомогою ручного колориметричного граничного тесту. Обмеження для PAR розширено до 1000 ppm або 0,1% (w/w) для монографій таблеток, де згадується використання автоматизованого та менш чутливого методу HPLC. На такому низькому рівні фармакопейний аналіз ВЕРХ був незастосовним через взаємодію матриці. Для звичайного аналізу був необхідний швидкий автоматизований аналіз. Визначення PAR часто використовується як етап багатьох методів, заснованих на визначенні парацетамолу шляхом його гідролізу до PAR [1], [2]. Повідомлялося про різні методи визначення PAR, включаючи ВЕРХ [3], капілярний електрофорез [4], спектрофотометрію [5], флуориметрію [6] та електрохімічні методи [7], [8]. Було визнано, що проточні методи є потенційно більш чутливими та швидшими для визначення PAR, ніж аналіз ВЕРХ та інші методи [9]. Методи FIA/SIA характеризуються високою чутливістю, яка за певних умов може бути значно вищою, ніж досягнута відповідними пакетними методами. Щоб досягти низьких меж виявлення, слід звернути особливу увагу на ті фактори, які визначають відношення сигнал/шум. Одним з таких важливих факторів є ефект Шлірена, який обмежує чутливість і впливає на відношення сигнал/шум, одночасно погіршуючи відтворюваність спектрофотометричних вимірювань [10].

Ефект Шлірена є результатом перегинів світла, викликаних утворенням оптичних артефактів, наприклад, коли дзеркало або лінза знаходяться в зоні реакції потоку. Ідеального змішування зразка з реагентами та розчинниками-носіями зазвичай неможливо досягти в аналізі потоку. Градієнти концентрацій або раптові зміни локальних концентрацій, тобто різниця в показниках заломлення вздовж контрольованих зон, призводять до відхилень світла, що змінює інтенсивність променя, що проходить.

Залежно від умов змішування [10] ефект Шлірена може складатися з двох основних компонентів.

Перший пов'язаний з утворенням стійких рідинних лінз – циліндричних шарів з різними показниками заломлення – в ламінарному режимі течії. Лінзи збільшують або зменшують вимірюваний сигнал, фокусуючи світло на детекторі або від нього.

Послідовність позитивного піку, за яким слідує негативний пік, іноді змінений місцями, накладається на основний записаний вихідний сигнал, спотворюючи його таким чином. Цей компонент можна досить легко відтворити. Інший компонент з'являється за поганих умов змішування та призводить до появи різноманітних перехідних дзеркал у зразку, що тече, що призводить до шумного записаного сигналу та зниження відтворюваності.

Були запропоновані різні стратегії для усунення ефекту Шлірена, включаючи двохвильову обробку сигналу [10], узгодження показників заломлення носія та зразків розчинів [11], зворотний потік [12], вкладену петлю [13].] та впровадження великих обсягів вибірки [14].

Коли використовується метод подвійної довжини хвилі, інтенсивність двох вибраних монохроматичних пучків вимірюється одночасно за допомогою окремих детекторів, і в реальному часі виходить віднімання незалежного від довжини хвилі шуму. Світло, що проходить, вимірюється на двох різних довжинах хвилі: одна, на якій продукт поглинає світло, і інша поза спектром поглинання продукту, де спостерігається лише ефект Шлірена. Тим не менш, ця методологія вимагає, як правило, складної обробки додаткових даних і вимірювань на іншій довжині хвилі, що разом ускладнює аналіз. Ефект Шлірена є чутливим до довжини хвилі та має шум, що призводить як до систематичних, так і до випадкових помилок. Для компенсації ефекту Шлірена при використанні цієї методології необхідний спектрофотометр з діодною матрицею або ПЗЗ-спектрометром, і хоча цей метод є кращим для аналізу зразків з високою концентрацією аналіту або інших речовин, відповідність показника заломлення носія разом із зразком та/або розчинами реагентів є потенційно корисним, коли необхідно використовувати висококонцентровані розчини носія або реагенту.

У цьому документі представлено високочутливий, точний та автоматизований метод із застосуванням аналізу послідовного введення (SI) для кількісного аналізу низьких рівнів *p*-амінофенолу в композиціях парацетамолу як продукту розпаду. Розчин, що містить PAR і парацетамол, вводять у потік буферного носія та змішують у режимі реального часу з реагентом 18-молібдодифосфатного гетерополікомплексу (18-MPC) для утворення специфічної синьої похідної, яка згодом виявляється

спектрофотометрично при 820 нм. Процедуру було оптимізовано в основному щодо чутливості вимірювання. Було запропоновано нову стратегію, засновану на ретельному узгодженні показника заломлення розчину реагенту з показником заломлення носія та розчинів зразків, щоб зменшити ефект Шлірена, який виникає в проточній системі, що використовується через високі концентрації ацетатного буфера та 18-МРС. реагенту нижче необхідного рівня.

Фрагменти розділів

Реагенти

Усі використані реагенти були аналітично-реагентної якості, а дистильована вода використовувалася скрізь. р-амінофенол був отриманий від Sigma (Сент-Луїс, Міссурі, США). Основний розчин PAF готували щодня шляхом розчинення відповідної кількості препарату в $0,05 \text{ моль л}^{-1}$ розчину HCl для досягнення кінцевої концентрації $0,01 \text{ моль л}^{-1}$. Потім цей розчин зберігали в холодильнику. Перед використанням його розбавляли до бажаної концентрації шляхом додавання 20 мл ацетатного буфера та доведення об'єму до 100 мл.

Кольорова реакція 18-МПК з ПАП

18-МРС має кілька хімічних властивостей, які помітно виділяють його серед інших гетерополіаніонів, що використовуються для визначення відновників. Це його порівняно високий потенціал окислення, швидка швидкість реакції з відновниками та сильне забарвлення відновлених форм. Його легко отримати в чистому вигляді.

Досліджено вплив рН розчину на утворення гетерополісинього, що утворюється під час реакції ПАП та 18-МПК (рис. 2). При $\text{pH} > 5,0$

Висновки

Запропоновано новий підхід, що дозволяє знизити ефект Шлірена нижче необхідного рівня. Він заснований на вирівнюванні показників заломлення рідин, що змішуються в проточній системі, шляхом ретельного підбору концентрації реагенту і компонентів буферного розчину. Використання цього підходу для усунення ефекту Шлірена успішно призвело до підвищення чутливості визначення PAF з 18-МРС в ацетатному буферному середовищі на один порядок. Ряд ін