

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Helena Burešová

CYKlickÁ VOLTAMETRIE JAKO DETEKČNÍ TECHNIKA VE VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRÁFII

Cyclic Voltammetry as a Detection Technique
in High Performance Liquid Chromatography

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 25. srpna 2014.

Abstrakt

Cílem předkládané diplomové práce bylo studium možnosti využití cyklické voltametrie jako detekční techniky v kapalinové chromatografii. Jako modelové látky byly použity deriváty fenothiazinu: chlorpromazin hydrochlorid, diethazin hydrochlorid a thioridazin hydrochlorid. V první části práce bylo provedeno porovnání dvou možných detektorů: tubulárního a velkoobjemového „wall-jet“ detektoru navrženého pro tuto práci. Z obou testovaných detektorů vyhověl pouze velkoobjemový „wall-jet“ detektor. Dále byly optimalizovány podmínky separace a detekce studovaných fenothiazinů na koloně RP-select B LiChrospher® 60 (250×4 mm) s cyklickou voltametrií jako detekční technikou. Nejlepší separace bylo dosaženo v mobilní fázi tvořené 0,1 mol dm⁻³ roztokem chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20). Dále byl studován vliv rychlosti průtoku mobilní fáze a polarizace elektrody na symetrii chromatografického píku a jako optimální byly nalezeny průtok mobilní fáze 0,5 ml min⁻¹ a rychlost polarizace elektrody 0,5 V s⁻¹. Za těchto optimalizovaných podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti studovaných fenothiazinů v koncentračním rozsahu 5×10⁻⁵ až 1×10⁻³ mol dm⁻³ pro chlorpromazin a 8×10⁻⁵ až 1×10⁻³ mol dm⁻³ pro diethazin a thioridazin. Vyvinutá metoda byla aplikována na stanovení studovaných fenothiazinů v léčivých přípravcích.

Klíčová slova: cyklická voltametrie, detekce, fenothiaziny, HPLC

Abstract

The aim of the thesis was to study the possibility of employment of cyclic voltammetry as a detection technique in liquid chromatography. The phenothiazine derivatives (chlorpromazine hydrochloride, diethazine hydrochloride, and thioridazine hydrochloride) were used as model compounds. Firstly, the comparison of two potential detectors (tubular detector and bulk „wall-jet“ detector) was accomplished. Only bulk „wal-jet“ detector satisfied. Next, the conditions for the separation and detection of studied phenothiazines on RP-select B LiChrospher® 60 (250×4 mm) column with cyclic voltammetry as the detection techniques were optimized. The best separation is achieved in mobile phase consisted from the solution of 0.1 mol dm⁻³ sodium perchlorate in acetonitrile-water (80:20) mixture. The effect of flow rate of mobile phase and scan rate of polarization of the electrode on the symmetry of chromatographic peak was also followed, and optimal values of 0.5 ml min⁻¹ for flow rate, and of 0.5 V s⁻¹ for scan rate, were found. Under optimized conditions the calibration dependences of studied phenothiazines were measured in the range from 5×10⁻⁵ to 1×10⁻³ mol dm⁻³ for chlorpromazine, and in the range from 8×10⁻⁵ to 1×10⁻³ mol dm⁻³ for diethazine and thioridazine. The developed method was applied to determination of studied phenothiazines in medical forms.

Key words: cyclic voltammetry, detection, HPLC, phenothiazines

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., za ochotu a trpělivost, cenné rady a předané zkušenosti. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| | Seznam použitých zkratk a symbolů | 6 |
| 1 | Cíl práce | 7 |
| 2 | Teoretická část | 8 |
| 2.1 | Detektory v průtokových metodách | 8 |
| 2.1.1 | Detektory, jejich rozdělení a vlastnosti | 8 |
| 2.1.2 | Pracovní parametry detektorů | 9 |
| 2.2 | Elektrochemické detektory v proudících kapalinách | 12 |
| 2.2.1 | Typy elektrochemických detektorů | 12 |
| 2.2.2 | Voltametrické detektory | 13 |
| 2.2.3 | Analyty detegovatelné voltametrickými detektory | 15 |
| 2.3 | Cyklická voltametrie | 16 |
| 2.3.1 | Základy metody | 16 |
| 2.3.2 | Cyklická voltametrie jako detekční technika v průtokových metodách | 17 |
| 2.4 | Fenothiaziny | 18 |
| 2.4.1 | Fyzikální a chemické vlastnosti fenothiazinů | 19 |
| 2.4.2 | Studované deriváty fenothiazinů | 20 |
| 2.4.3 | Analytické metody pro stanovení fenothiazinů | 22 |
| 3 | Experimentální část | 23 |
| 3.1 | Použité chemikálie | 23 |
| 3.2 | Použité přístroje a postup měření | 23 |
| 3.3 | Zpracování naměřených dat | 25 |
| 4 | Výsledky a diskuze | 26 |
| 4.1 | Cyklická voltametrie studovaných fenothiazinů | 26 |
| 4.2 | Porovnání detektorů pro detekci studovaných látek pomocí HPLC-CV | 28 |
| 4.2.1 | Tubulární detektor | 28 |
| 4.2.2 | Velkoobjemový „wall-jet“ detektor | 29 |
| 4.3 | Optimalizace separace studovaných látek v HPLC-CV | 32 |
| 4.3.1 | Optimalizace složení mobilní fáze | 32 |
| 4.3.2 | Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze a rychlosti polarizace elektrody na symetrii chromatografického píku | 33 |
| 4.3.3 | Separace směsí studovaných fenothiazinů | 34 |
| 4.4 | Kalibrační závislosti | 39 |
| 4.5 | Stanovení fenothiazinů metodou HPLC-CV v lékových formách | 41 |
| 5 | Závěr | 42 |
| | Literatura | 43 |

Seznam použitých zkratk a symbolů

| | |
|-------------------|---|
| a | směrnice lineární regrese |
| A | plocha elektrody [mm^2] <i>nebo</i> vzdálenost levé části píku od jeho středu v 10 % výšky píku |
| A_p | plocha chromatografického píku [A s] |
| A_s | faktor asymetrie píku |
| b | úsek lineární regrese |
| B | vzdálenost pravé části píku od jeho středu v 10 % výšky píku |
| c | molární koncentrace [mol dm^{-3}] |
| CV | koeficient variace |
| d | průměr elektrody [mm] |
| $E_{\text{amp.}}$ | potenciál amperometrické detekce [V] |
| E_p | potenciál píku [V] |
| F | průtoková rychlost mobilní fáze [ml min^{-1}] |
| h_p | výška chromatografického píku |
| I_p | proud píku [A] |
| LOD | limit detekce |
| LOQ | limit kvantifikace |
| m | hmotnost [g] |
| n | počet teoretických pater |
| N | šum detektoru |
| R | signál (odezva) detektoru <i>nebo</i> koeficient determinace |
| $R_{1,2}$ | rozlišení chromatografických píků |
| S | citlivost analytické metody |
| $s_{y/x}$ | směrodatná odchylka lineární regrese |
| t | čas [s] |
| V | objem [ml] |
| w | objemový zlomek |
| w_p | šířka chromatografického píku při základně [s] |
| $w_{1/2}$ | šířka chromatografického píku v polovině jeho výšky [s] |

1 CÍL PRÁCE

V současné době je většina reálných analytických stanovení prováděna pomocí metod, které lze souhrnně nazvat metody průtokové analýzy. Díky tomu, že vzorek je unášen tokem kapaliny jej lze v čase podrobit úpravám a reakcím (typicky v injekční průtokové analýze) nebo jeho složky separovat (typicky v kapalinové chromatografii). Jedním z hlavních prvků takového uspořádání analýzy je detektor (lat. *detegere* = odkrývat), zařízení umožňující indikovat přítomnost stanovovaného analytu v konkrétním místě toku nosné kapaliny. Kvalita detektoru, jeho schopnost reagovat na druh a koncentraci analyzované složky, je tedy jedním z klíčových faktorů ovlivňujících analytické charakteristiky takto provedeného stanovení.

Cílem této diplomové práce je studium možnosti využití cyklické voltametrie jako detekční techniky v kapalinové chromatografii. Jako modelové látky při tomto studiu byly použity deriváty fenothiazinu a bylo provedeno jejich stanovení v lékových formách.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Detektory v průtokových metodách

2.1.1 Detektory, jejich rozdělení a vlastnosti

Detektor lze charakterizovat jako zařízení, které se skládá z vlastního měřícího prvku (čidla, senzoru) reagujícího na přítomnost analytu a z příslušné instrumentace převádějící tuto reakci na signál (obvykle elektrický proud) [1, 2]. Principem detekčního měření je měření změny složení roztoku protékajícího detektorem, jeho detekční celou. V kapalinové chromatografii jsou využívány **tři možné přístupy**:

1. *Měření celkové vlastnosti*, kdy se měří změny v celkové charakteristice tekoucí kapaliny (mobilní fáze) bez přítomnosti a s přítomností analytu. Výhodou takového postupu je, že je univerzální pro jakýkoliv analyt, což však v některých případech přechází v nevýhodu (například při gradientové eluci). Nejznámějším příkladem takového detektoru je měření indexu lomu (refraktometrický detektor).
2. *Měření specifické vlastnosti vzorku*, kdy je měřena některá z vlastností vzorku nacházejícího se v toku mobilní fáze. Nejznámějším příkladem je UV detekce při nastavené vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu analytu. Do této skupiny patří i elektrochemické detektory (amperometrický či potenciometrický) s výjimkou konduktometrického detektoru, který patří spíše do první skupiny.
3. *Spojení chromatografu s externím analyzátozem* (angl. hyphenated techniques) při nichž je celá nebo část mobilní fáze zaváděna do jiného analytického zařízení a tam nezávisle analyzována. Nejznámějším případem je spojení s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS).

Ideální detektor pro kapalinovou chromatografii by měl vykazovat následující **charakteristiky** [2]:

- mít vysokou citlivost vůči analytu a předpověditelnou odezvu na něj,
- mít odezvu vůči všem látkám rozpuštěným v mobilní fázi, nebo alespoň předpověditelnou specificitu vůči nim,
- neměnit odezvu se změnou teploty a rychlostí průtoku mobilní fáze,
- mít odezvu nezávislou na (aktuálním) složení mobilní fáze,
- nepřispívat k rozšiřování píku,
- být spolehlivý a pohodlný pro použití,
- jeho odezva by měla lineárně růst s objemem analytu,
- být nedestruktivní k analytu,
- poskytovat i kvantitativní informaci ke každému píku.

Samozřejmě, že žádný z dnes používaných detektorů nevykazuje všechny výše uvedené charakteristiky, nicméně dnes nejčastěji používané detektory vykazují alespoň větší část z nich (tab. 2.1).

Tab. 2.1

Porovnání vlastností běžně používaných detektorů v HPLC (upraveno podle [3]).

| typ detektoru | ovlivnění průtokem | gradientová eluce | typická citlivost | selektivita | uplatnitelnost | složitost měření / interpretace |
|------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------------|----------------|------------------------------------|
| UV/Vis | ne | ano | ng | nízká | vysoká | nízká |
| refraktometrický | ano | ne | μg | nízká | univerzální | nízká |
| hmotnostní | ne | ano | pg | vysoká | univerzální | vysoká |
| fluorescenční | ne | ano | pg | vysoká | omezená | nízká |
| elektrochemický | ano | ne | ng–pg | vysoká | omezená | střední |

2.1.2 Pracovní parametry detektorů

Cílem analytického měření je získání dostatečných informací o analytech v co nejkratším čase a s co nejmenšími náklady. Vlastnosti odezvy, kterou detektor poskytuje, jsou určovány nejen fyzikálně-chemickým principem, na němž detektor pracuje, ale všemi složkami měřicího systému, jehož je detektor součástí (objemovou rychlostí toku mobilní fáze, teplotou, nečistotami v mobilní fázi a podobně). **Odezva detektoru** (tedy závislost měřené veličiny na čase) se potom skládá jednak z užitečného, na koncentraci analytu

závislého **signálu** a z poruch, které jsou způsobeny náhodnými nebo soustavnými vlivy v přenosovém kanálu (**šum**).

Míru ovlivnění signálu koncentrací analytu vyjadřuje **citlivost** S , definovaná jako poměr změny signálu detektoru ΔR a změny koncentrace (resp. hmotnosti) analytu Δc (Δm) v daném bodě závislosti signálu na koncentraci (hmotnosti analytu)

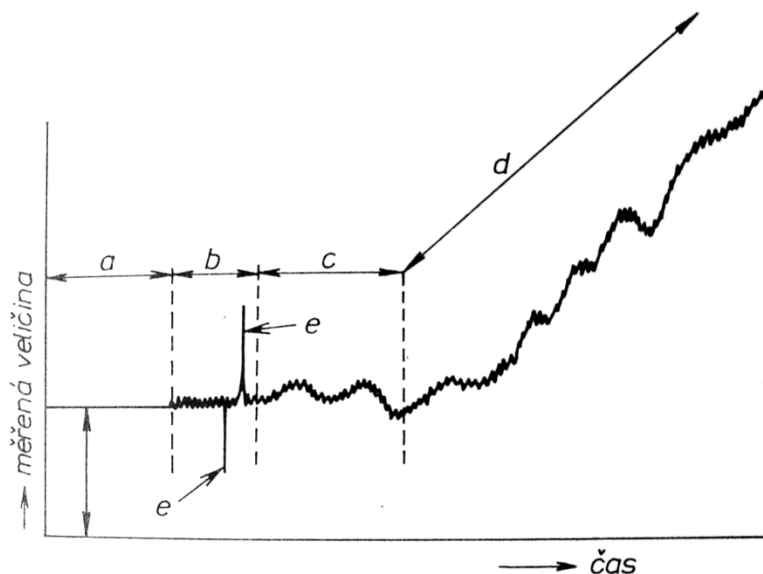
$$S = \frac{\Delta R}{\Delta c} \quad (2.1)$$

Citlivost tedy představuje směrnici kalibrační přímky v daném bodě.

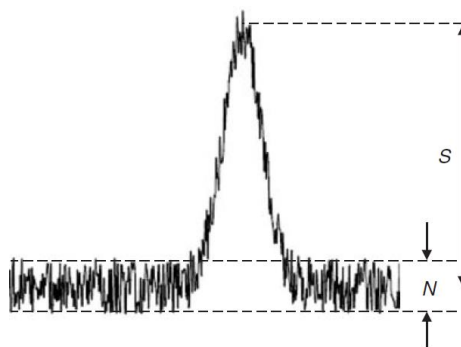
Odezvu detektoru ovlivňuje dále **šum**, neboli část měřené veličiny, která neobsahuje informaci. Odezva detektoru bez přítomnosti analytu se pak nazývá pozadí (základní linie) a skládá se z řady příspěvků (obr. 2.1):

- konstantní složka daná zejména odezvou mobilní fáze a nečistot v ní obsažených,
- vysokofrekvenční šum způsobený především síťovým kmitočtem,
- nízkofrekvenční šum daný obvykle konstrukcí detektoru,
- dlouhodobá nestabilita zvyšující signál (tzv. drift) způsobená například kolísáním teploty,
- pulsy („spiky“) způsobené poruchami v síťovém napětí, bublinkami v kapalině apod.

Je samozřejmě žádoucí, aby šum detektoru byl co nejnižší, a tedy poměr signálu a šumu co nejvyšší.



Obr. 2.1 Složky šumu: a = konstantní složka, b = a + vysokofrekvenční šum, c = a + b + nízkofrekvenční šum, d = a + b + c + drift, e = spiky (převzato z [1]).



Obr. 2.2 Měření chromatografického signálu (S) a šumu (N) pro konkrétní pík (převzato z [2]).

Poměr signálu a šumu (S/N) je důležitou charakteristikou každého píku. Měření velikosti obou veličin je znázorněno na obr. 2.2. Příspěvek poměru S/N k přesnosti měření lze vyjádřit výpočtem **koeficientu variace**

$$CV = \frac{50}{S/N} \quad (2.2)$$

hodnota koeficientu je ekvivalentní relativní směrodatné odchylce měření vyjádřené v procentech.

Pomocí poměru signálu a šumu jsou definovány i dvě důležité charakteristiky stanovení a to **mez detekce** ($LOD = \text{limit of detection}$), odpovídající koncentraci, při níž je signál analytu statisticky významně odlišný od šumu, a **mez stanovitelnosti** (LOQ , limit of quantification), tedy koncentrace, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Podle uzance pro separační metody lze obě meze vypočítat ze vztahů

$$LOD = \frac{3N}{a} \quad (2.3)$$

$$LOQ = \frac{10N}{a} \quad (2.4)$$

kde a je směrnice kalibrační přímky. Limit detekce pak odpovídá asi $CV \approx 16\%$ a limit kvantifikace $CV \approx 5\%$. Je patrné, že čím větší bude poměr S/N tím nižší budou hodnoty obou mezí. Alternativním přístupem pro získání těchto charakteristik je využití parametrů lineární regrese kalibrační závislosti

$$LOD = \frac{3s_{y/x} + b}{a} \quad (2.5)$$

$$LOQ = \frac{10s_{y/x} + b}{a} \quad (2.6)$$

kde $s_{y/x}$ je směrodatná odchylka lineární regrese, b hodnota úseku vytčeného na ose y a a směrnice lineární regrese.

Další důležitou charakteristikou detektoru je **charakter závislosti signálu** na koncentraci (hmotnosti) analytu $S = f(c)$, resp. $S = f(m)$, která má velkou důležitost pro spolehlivost měření. Tato závislost může obecně nabývat i značně komplikovaných tvarů (logaritmický, exponenciální, aj.), ideální je samozřejmě lineární charakter této závislosti, pokud možno v co největším rozsahu koncentrací (hmotností). Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v efluentu dm/dV (neboli dc/dt) nezávisle na přívodu složky do detektoru a pro vztah mezi odezvou detektoru R a koncentrací platí obecná rovnice

$$R = Sc^x \quad (2.7)$$

kde S je citlivost a x udává charakter závislosti. Pro x v intervalu $\langle 0,98, 1,02 \rangle$ se závislost považuje za lineární (lze snadno zjistit vynesáním $\log R$ proti $\log c$). Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky v efluentu dm/dt do detektoru a příslušný vztah je obdobou vztahu (2.7).

2.2 Elektrochemické detektory v proudících kapalinách

2.2.1 Typy elektrochemických detektorů

Elektrochemické detektory využívají k detekci analytu měření určitou elektrickou veličinu (elektrodový potenciál, proud, odpor, kapacita) vyvolanou průchodem látky vhodně konstruovanou průtokovou celou detektoru. Změna měřené veličiny je úměrná látkovému množství detekované složky [1, 3]. Jako další proměnná veličina se zaznamenává čas.

Konduktometrické a vysokofrekvenčních impedančních detektory jsou určeny pro měření celkových vlastností roztoku proudícího detektorem.

Ostatní elektrochemické detektory jsou založeny na elektrochemické reakci obecného redoxního systému $\text{Ox} + n e^- \rightleftharpoons \text{Red}$. Pokud je při měření elektrochemický článek v termodynamicky rovnovážném stavu (faradický proud je nulový) jedná se o potenciometrii, je-li naopak článek v kinetickém stavu a na elektrodách dochází ke konverzi analytu, jedná se o elektrolýzu (faradický proud není nulový). U elektrolytických metod se tak uplatňují čtyři závislé proměnné veličiny: potenciál elektrody, proud, koncentrace elektroaktivní látky a čas. Podle podmínek měření se elektrolytické metody rozdělují na metody potenciostatické, kdy se měří při konstantním potenciálu pracovní elektrody, a metody amperostatické, kdy se naopak měří za konstantního proudu.

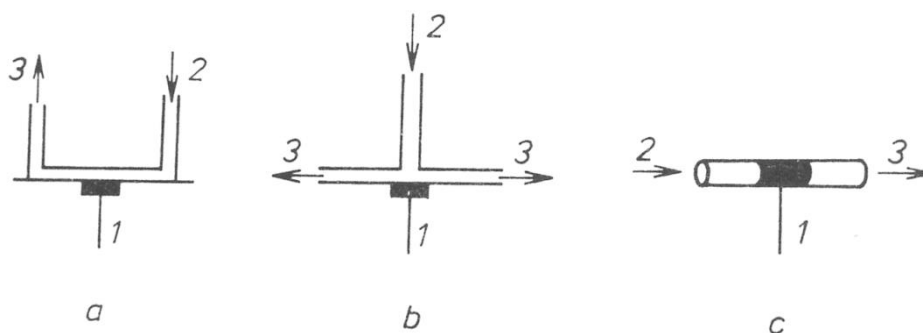
2.2.2 Voltametrické detektory

Ve všech průtokových metodách se jako detekční technika (vedle vodivostní detekce) z elektroanalytických metod používá nejčastěji voltametrie, resp. amperometrie, a coloumetrie [1–3]. Je to proto, že všechny elektrolytické detektory dosahují vysoké citlivosti a jsou srovnatelné s citlivostí fluorimetrických detektorů, navíc dosahují dobré přesnosti, rychlé odezvy a správnosti měření. Hlavními omezeními těchto metod jsou:

- Nosná kapalina (mobilní fáze) musí mít alespoň minimální elektrickou vodivost a poskytovat konstantní a zároveň co nejmenší elektrický signál. To vylučuje použití nepolárních kapalin, ale i v případě použití směsných rozpouštědel je obvykle nutné do mobilní fáze přidávat základní elektrolyt.
- Konstantní a reprodukovatelná aktivita povrchu elektrod se jen obtížně udržuje, často dochází k pasivačním jevům na elektrodách. Nicméně, tok čisté mobilní fáze značně napomáhá odstraňování produktů elektrodové reakce.
- Signál je ovlivňován teplotou a v různém rozsahu i rychlostí toku mobilní fáze.

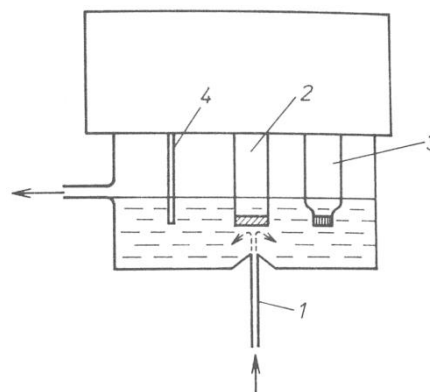
Voltametrické (amperometrické) detektory tedy měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné nebo oxidovatelné látky průtokovou celou detektoru. Klíčovým je tedy výběr vhodného materiálu pracovní elektrody, aby jeho potenciálové okno vyhovovalo pro daný analyt; používají se především tuhé elektrody zhotovené ze skelného uhlíku, grafitových vláken, zlata, platiny, mědi či jiného kovu. Dále je třeba vybrat či zkonstruovat vhodnou měřící celu. Mobilní fáze povrch pracovní elektrody omývá a elektrochemická reakce probíhá pouze ve velmi tenké vrstvě (oxidačně-redukční reakci na povrchu elektrody podléhá méně než 10 % přítomného analytu), proto má konstrukce měrných cel

několik technických řešení [3]. Nejčastěji se jedná o tři typy detektorů (obr. 2.3) tenkovrstvý (thin-layer), cela „wall-jet“ a tubulární.



Obr. 2.3 Uspořádání běžných voltametrických detektorů: (a) tenkovrstvá cela, (b) cela „wall-jet“, (c) tubulární detektor; (1) pracovní elektroda, (2) vstup eluátu, (3) výstup eluátu (převzato z [1]).

Výroba a provoz miniaturizovaných detekčních cel je někdy spojena se značnými problémy, zejména pokud jde o čištění povrchu pracovní elektrody. To lze obejít použitím „wall-jet“ cely o velkém objemu (obr. 2.4), v níž je makroskopická (běžná voltametrická) elektroda umístěna v přepadovém rezervoáru spolu s referenční a pomocnou elektrodou [4]. V přepadovém rezervoáru je mobilní fáze (základní elektrolyt), který zajišťuje vodivé spojení elektrod. Tryska (vývod z HPLC kolony) je umístěna proti pracovní elektrodě, přičemž bylo zjištěno, že paprsek tryskající kapaliny zůstává intaktní i při vzdálenostech mezi tryskou a elektrodou větších než 10 mm (doporučuje se okolo 5 mm, aby naopak nebyl rušen hmotový transport analytu k elektrodě).



Obr. 2.4 Cela typu „wall-jet“ s velkým objemem: (1) tryska (vývod z HPLC kolony), (2) pracovní disková elektroda, (3) referenční elektroda, (4) pomocná elektroda (převzato z [1]).

2.2.3 Analyty detegovatelné voltametrickými detektory

Elektrochemická detekce byla použita již v klasické kolonové chromatografii v 50. letech 20. století, kdy pro ni Kemula použil název chromatopolarografie. Dnes patří elektrochemické (voltametrické) detektory ke standardně dostupným detektorům pro HPLC. Oblast detegovatelných látek je velmi široká, jde prakticky o jakoukoliv látku, kterou lze oxidovat nebo redukovat; kromě anorganických látek je to široké spektrum látek organických. S výhodou lze sledovat tyto látky i ve vzorcích se složitými maticemi (klinické vzorky). Výběr potenciálu detekce je obvykle kompromisem mezi citlivostí, stabilitou signálu a selektivitou založenou na faktu, že se zvýšením potenciálu detekce dojde ke zvýšení odezvy, ale současně dojde ke zvýšení šumu a driftu základní linie a snížení selektivity.

Příklady stanovovaných látek jsou uvedeny v tab. 2.2; detailní vhléd podávají monografie [1, 3], nejnovější publikace shrnuje přehledné review [5].

Tab. 2.2

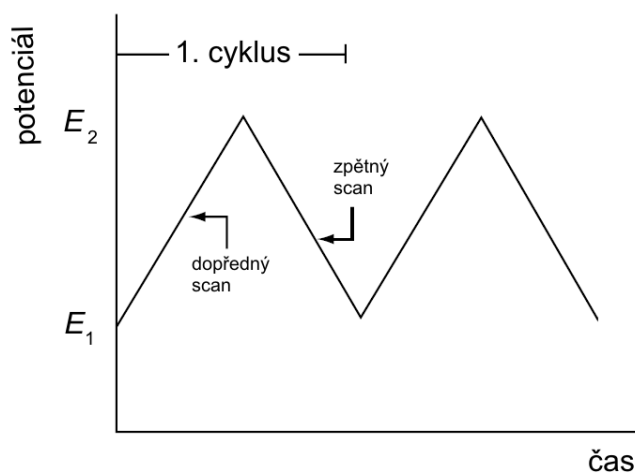
Příklady organických látek detegovatelných voltametrickými detektory

| látky oxidovatelné | látky redukovatelné |
|---------------------------|----------------------------|
| fenoly | ketony |
| oximy | aldehydy |
| merkaptany | oximy |
| peroxydy | konjugované kyseliny |
| hydroperoxydy | konjugované estery |
| aromatické aminy, diaminy | konjugované nitrily |
| puriny | aromatické halogenderiváty |
| heterocykly | nitrosloučeniny |
| | heterocykly |

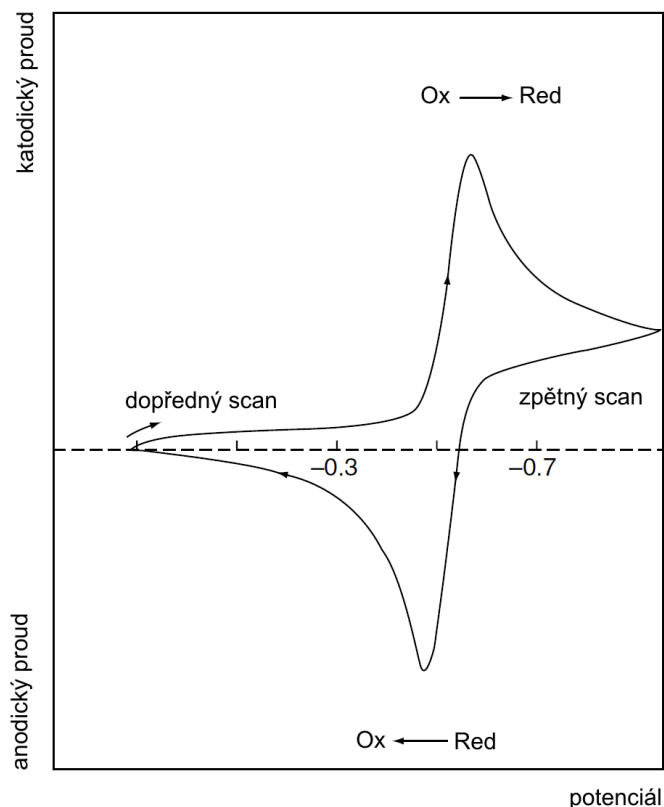
2.3 Cyklická voltametrie

2.3.1 Základy metody

Cyklická voltametrie je elektrochemická metoda, využívaná zejména pro získávání kvalitativních informací o elektrochemických reakcích, protože z průběhu cyklických voltamogramů je možné usuzovat na mechanismus elektrochemických reakcí [6]. Při této metodě je na pracovní elektrodu vkládán potenciál trojúhelníkového průběhu s různou rychlostí změny (rychlost polarizace) od zvoleného počátečního potenciálu E_1 přes vrcholový potenciál E_2 až zpět do konečného potenciálu E_1 (obr. 2.5). Získaná odezva, tzv. cyklický voltamogram (závislost proudu protékajícího elektrodou na vloženém potenciálu) je složitá, časově závislá funkce velkého počtu chemických a fyzikálních parametrů. Naměřené cyklické voltamogramy (obr. 2.6) obsahují jeden nebo více píků, přičemž poloha píku je dána redoxními vlastnostmi látky a jeho výška (resp. proudová odezva) souvisí s rychlostí vkládání potenciálu a koncentrací látky přítomné v elektrochemické cele. Průběh cyklického voltamogramu lze analyzovat řadou matematických rovnic, resp. výpočetních přístupů.



Obr. 2.5 Potenciálový program při metodě cyklické voltametrie (převzato a upraveno z [6]).



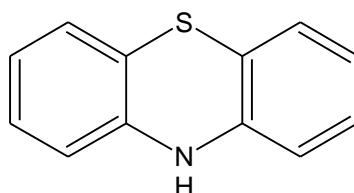
Obr. 2.6 Příklad cyklického voltamogramu pro reversibilní systém (převzato a upraveno z [6]).

2.3.2 Cyklická voltametrie jako detekční technika v průtokových metodách

První práci o použití cyklické voltametrie jako detekční techniky v průtokové injekční analýze publikoval Thøgersen a kol. [7], kteří ji spojili s injekční průtokovou analýzou a pomocí statické rtuťové kapkové elektrody studovali závislost získaného signálu pro šřavelan železitý na průtokové rychlosti a rychlosti polarizace elektrody. Při malých rychlostech polarizace elektrody byly získávány pouze hydrodynamické voltamogramy, které však při vyšších rychlostech polarizace elektrody ($> 1 \text{ V s}^{-1}$) přecházely v cyklické voltamogramy. Následně tuto metodu aplikoval i na organické látky Cañete a kol. [8]. Výhodou tohoto uspořádání je především velká flexibilita FIA techniky a poměrně široká diagnostická schopnost cyklické voltametrie. Oproti amperometrické detekci je předností cyklické voltametrie především využití širšího potenciálového okna, možnost rozlišení reversibilních resp. ireversibilních systémů a snížení pasivace elektrody. Výsledný záznam (označovaný někdy jako chromatovoltamogram [9]) pak v trojrozměrném uspořádání znázorňuje závislost proudu na vloženém potenciálu pro jednotlivé časy od zahájení měření a je tak velmi podobný odezvě, kterou lze získat se spektrofotometrickým

detektorem s diodovým polem [8]. Jako pracovních elektrod se při tomto druhu detekce využívá především zlatých a platinových mikroelektrod [10]. Získaná data jsou případně upravována např. Fourierovskou transformací (označováno jako fast Fourier transform continuous cyclic voltammetry), což vede ke snížení detekčních limitů na pikomolární hladinu, zvýšení rychlosti analýzy a odstranění nutnosti odstraňování rozpuštěného kyslíku z roztoků [11–13]. Přehled látek, které mohou být touto metodou stanoveny, podává review [14]. Použití cyklické voltametrie jako detekční techniky v HPLC nebylo v literatuře popsáno.

2.4 Fenothiaziny



Obr. 2.7 Molekulová struktura fenothiazinu

Fenothiaziny (obr. 2.7) jsou synteticky připravené tricyklické heterocyklické sloučeniny s atomem síry a dusíku v polohách 5 a 10. Z velké části jsou využívány pro své medicínské aplikace, ale také jsou studovány v souvislosti s návrhy galvanických a solárních článků fotosenzibilizátorů. Poprvé byl fenothiazin syntetizován A. Bernthsenem v roce 1883, jeho anthelmintické vlastnosti byly zjištěny roku 1938 (cit. [15, 16]). Až dosud bylo syntetizováno a farmakologicky testováno více než sto derivátů fenothiazinu [17]. Vzhledem k jejich relativně nízké toxicitě, vysoké fyziologické aktivitě a rozmanitému farmakologickému účinku jsou široce používány jako psychofarmaka, antihistaminika, antiparkinsonika. Jejich nejdůležitější vlastností je zejména antidepresivní účinek. Také jsou členy neuroleptik a antialergeních léků. Když jsou substituovány v poloze 10, jde o antihistaminika a antiparkinsonika, v případě, že jsou substituovány v poloze 2 a 10 patří do skupiny neuroleptik. Některé deriváty fenothiazinů jsou používány jako redox indikátory, ty jsou substituovány v polohách 3 a 7 (například methylenová modř) [18]. Nejčastější nežádoucí účinky při léčbě fenothiaziny jsou útlum, závrať, rozmazané vidění, nevolnost, zvracení, průjem nebo zácpa, gastrointestinální poruchy, sucho v ústech, překrvení nosní sliznice a poruchy krve.

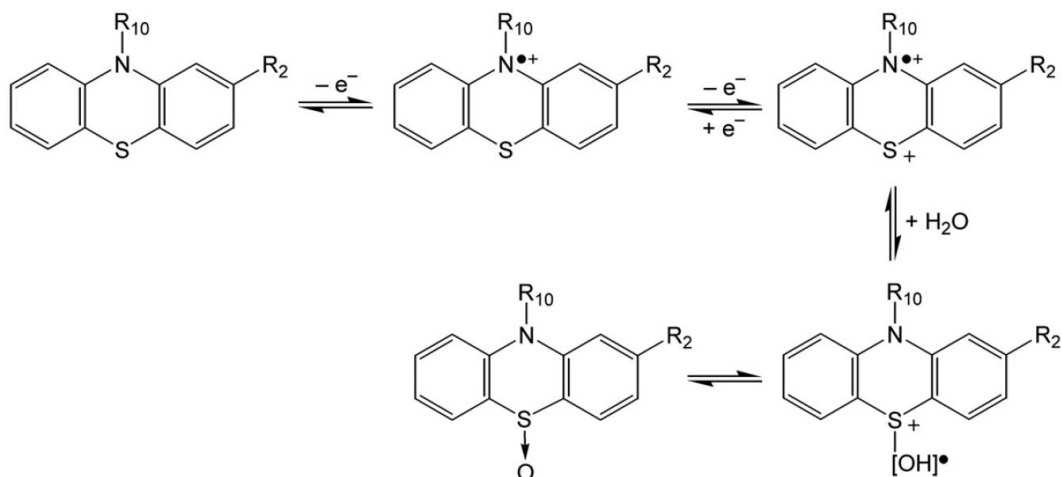
2.4.1 Fyzikální a chemické vlastnosti fenothiazinů

Deriváty fenothiazinu se mohou vyskytovat ve formě volných bází a jejich solí jako hydrochloridy, maleáty, tartráty a dimethylsulfonáty. Ve formě volných bází vykazují podobu žluté olejové kapaliny, nerozpustné ve vodě. Soli fenothiazinů jsou naopak bílé krystalické látky velice dobře rozpustné ve vodě, zředěné kyselině chlorovodíkové a organických rozpouštědlech. Závisí však na druhu a typu substituentů: soli fenothiazinů s alifatickým postranním řetězcem v poloze 10 (jako jsou chlorpromazin, diethazin a promazan) vykazují velice dobrou rozpustnost ve vodě, zředěné kyselině chlorovodíkové, ethanolu, chloroformu a mírně horší rozpustnost v acetonu. Zavedením heterocyklického substituentu do této pozice na fenothiazinu naopak způsobuje snížení rozpustnosti ve vodě.

Soli fenothiazinů disociují a reagují jako velmi slabé kyseliny, $pK_a \approx 9$. Za přítomnosti kationtové povrchově aktivní látky jsou tyto hodnoty pak posunuty k nižším hodnotám, $pK_a \approx 7$ (cit. [19]), protože kationtové micely mohou na svém povrchu vázat elektrostatickými interakcemi OH^- ionty, které se zde koncentrují a tím napomáhají disociaci vázaných slabých kyselin.

Fenothiazin vykazuje teplotní stabilitu do 100 °C. Substituce zvyšuje tepelnou stabilitu sloučeniny, která pak taje v teplotním rozsahu 150–250 °C.

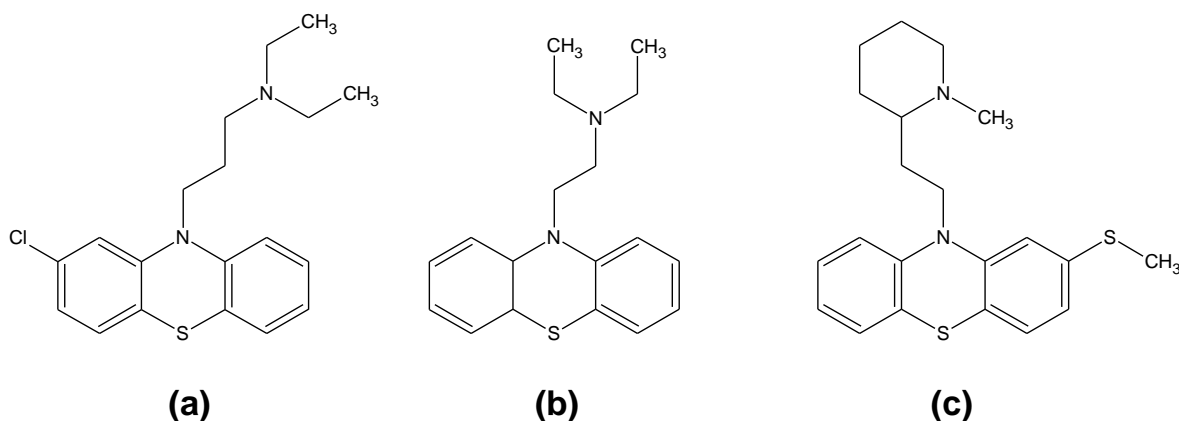
Nejdůležitější chemickou vlastností derivátů fenothiazinů je jejich schopnost se oxidovat ať již chemickými oxidačními činidly [20], elektrochemicky [21, 22], enzymaticky [23] nebo fotochemicky [24, 25]. Vznikají tak stabilní barevné radikály s dlouhou dobou života. Nejpravděpodobnější detailní mechanismus oxidace derivátů fenothiazinů je znázorněn na obr. 2.8. V prvním kroku je molekula oxidována na barevný volný radikál. Tato reakce je reverzibilní. Radikál-kationt je stabilní v silně kyselém prostředí, jeho existence byla prokázána EPR spektrometrií. Ve druhém kroku je radikál-kationt ireverzibilně oxidován (ztrátou dalšího elektronu) a je vytvořen fenothiazinový iont. Tento iont je v důsledku toho snadno hydrolyzován, což vede k produkci bezbarvého sulfoxidu. Rychlost prvního reakčního kroku závisí na druhu oxidačního činidla, kyselosti roztoku, teplotě a typech fenothiazinových derivátů. Předpokládá se, že rychlost druhého kroku silně závisí na rychlosti následné hydrolyzy. Typy substituentů a jejich poloha na molekule fenothiazinu ovlivňuje stabilitu radikál-kationtu, který je stabilní pouze v silně koncentrovaném (2–10 mol dm⁻³) roztoku silné kyseliny [26].



Obr. 2.8 Reakční schéma oxidace derivátů fenothiazinu (převzato z [27]).

Oxidace derivátů fenothiazinu probíhají při relativně nízkých redox potenciálech. Elektrochemická oxidace derivátů fenothiazinu závisí na polaritě a kyselosti reakčního prostředí a přítomnosti substituentů v polohách 2 a 10 na molekule fenothiazinů [28, 29].

2.4.2 Studované deriváty fenothiazinu



Obr. 2.9 Molekulová struktura (a) chlorpromazinu, (b) diethazinu, (c) thioridazinu.

V této diplomové práci byly studovány tři vybrané deriváty fenothiazinu: chlorpromazin, diethazin a thioridazin (obr. 2.9).

Chlorpromazin, systematicky 3-(2-chlorfenothiazin-10-yl)-*N,N*-dimethylpropan-1-amin, je nejdůležitější sloučeninou ve velké skupině fenothiazinových léků [30]. Byl objeven na počátku roku 1950 a od roku 1954 se začal používat k léčbě schizofrenie.

Původně byl vyvinut jako antihistaminikum proti alergiím. Vykazuje významné adrenolytické, anticholinergní, hypotenzní, spasmolytické, hypotermické, anestetické, antiemetické a antihistaminické účinky. Významně tlumí centrální nervový systém a zvyšuje účinek hypnotik a narkotik. Používá se zejména v psychiatrii k léčbě schizofrenie, stavů psychomotorického neklidu, halucinací, některých úzkostí a obsedantních neuróz.

Terapeuticky používaný chlorpromazin hydrochlorid je bílý nebo krémově bílý prášek, citlivý na světlo (fotooxidace). Je dobře rozpustný ve vodě, ethanolu a chloroformu. Disociační konstanta $pK_a = 9,3$, rozdělovací koeficient $\log P = 3,4$.

Chlorpromazin hydrochlorid může být podáván intravenózně a perorálně. Při perorálním podání je dobře absorbován (ale podléhá first-pass efektu v játrech a střevní stěně, biologická dostupnost je asi 20–30 %), maximální plasmatické koncentrace je dosaženo za 2–4 hodiny. Je metabolizován v játrech, za vzniku sulfoxidů, dále byla zjištěna *N*-demethylace, hydroxylace a *N*-oxidace. Ve druhé fázi biotransformace byla zjištěna konjugace s kyselinou glukuronovou. Biologický poločas je 7–120 hodin. Vylučování je především do moči (až 70 % podané dávky), částečně i do žluče. Chlorpromazin má velký distribuční objem (asi 21 litrů) a prochází i hematoencefalickou bariérou, proto jsou jeho metabolity vylučovány i po mnoha měsících od podání. Terapeuticky se denní dávka pohybuje v rozmezí 75 až 1000 mg chlorpromazin hydrochloridu.

Diethazin, systematicky *N,N*-diethyl-10*H*-fenthiazin-10-ethanamin, vykazuje významný parasymptolytický (anticholinergní) účinek. Nemá příliš významné sedativní, antihistaminické a hypotermické účinky. Používá se k léčbě všech typů Parkinsonova syndromu a to zejména v případech s významným třesem [30]. Terapeuticky používaný diethazin hydrochlorid je bílý nebo slabě krémově zbarvený krystalický prášek. Dávkování se pohybuje v rozmezí 150 až 1500 mg denně.

Thioridazin, systematicky 10-[2-(1-methylpiperidin-2-yl)ethyl]-2-methylsulfanyl-fenthiazin byl dříve široce používán při léčbě schizofrenie a psychózy [30]. Vzhledem k obavám z kardiotoxicity a retinopatie při vysokých dávkách byl tento lék stažen z prodeje v mnoha zemích. V některých zemích není běžně předepisovaný, je vyhrazen pouze pro pacienty, kteří nereagují na jiná antipsychotika nebo kvůli kontraindikacím je nemohou užívat.

Terapeuticky používaný thioridazin hydrochlorid je bílý nebo krémově bílý prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, ethanolu a chloroformu. Disociační konstanta $pK_a = 9,5$, rozdělovací koeficient $\log P = 5,90$.

Thioridazin je při orálním podání velmi snadno absorbován, v plasmě se silně váže na plasmatické bílkoviny (až 99 % z přítomné dávky). Je metabolizován zejména sulfoxidací v játrech a exkretován žlučí do stolice (90 % podané dávky), menší podíl je vyloučen do moči. Biologický poločas je 10–36 h. Denní dávky se pohybují mezi 50 až 300 mg thioridazin hydrochloridu.

2.4.3 Analytické metody pro stanovení fenothiazinů

Stanovení derivátů fenothiazinu je důležité pro zajištění kvality ve farmaceutickém průmyslu a pro získání optimálních terapeutických koncentrací v tělních tekutinách, aby se minimalizovalo riziko toxicity. Z tohoto důvodu je důležité mít k dispozici jednoduché a citlivé metody pro stanovení těchto látek.

Lékopisnými metodami jsou nejčastěji titrace kyselinou chloristou v prostředí bezvodé octové kyseliny s potenciometrickou detekcí [31] nebo spektrofotometrie v UV oblasti [32]. První metoda je časově náročná a u druhé je třeba certifikovaný referenční standard. Pro stanovení fenothiazinů ať již v substanci nebo v lékových formách byla vyvinuta celá řada metod, které jsou přehledně podány v review [33, 34]. Z průtokových metod analýzy zaslouží zmínku zejména FIA stanovení, jichž byla vypracována celá řada, včetně málo obvyklého stanovení titrací v micelárním prostředí nebo v prostředí nevodném [19] nebo po fotochemické či elektrochemické oxidaci [27]. Byla rovněž vypracována celá řada HPLC stanovení s nejrůznějšími typy detekce (diode-array UV spektrofotometrický, hmotnostní spektrometr, elektrochemické detektory [35, 36]), obvykle na reverzní fázi s mobilními fázemi voda-methanol [37] nebo voda-acetonitril [38, 39].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Jako studované látky byly použity chlorpromazin hydrochlorid $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich), diethazin hydrochlorid ČSL 4 (Léčiva, ČR) a thioridazin hydrochlorid $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich).

Ostatní použité chemikálie byly: acetonitril Chromasolv[®] for HPLC (Sigma-Aldrich), dusičnan sodný Ph.Eur. 5 (Fluka) a chloristan sodný bezvodý HPLC grade (Fluka).

Použitými vzorky lékových forem byly:

- Plegomazin[®], 100 mg chlorpromazin hydrochloridu v dražé (Egis, Maďarsko),
- Deparkin[®], 50 mg diethazin hydrochloridu v dražé (Léčiva, ČR),
- Thioridazin[®], 25 mg thioridazin hydrochloridu v dražé (Léčiva, ČR).

3.2 Použité přístroje a postup měření

Elektrochemická měření byla realizována pomocí potenciostatu/galvanostatu EZstat-Pro (NuVant Systems, USA), řízeném softwarem EZware. Cyklická voltametrie byla měřena v elektrochemické cele pro nevodnou elektrochemii o vnitřním objemu 10 ml [40]. Pracovní elektrodou byla platinová disková elektroda ($d = 2$ mm, $A = 3,14$ mm²) firmy Radiometer Copenhagen (Dánsko). Referenční elektrodou byla Pleskovova elektroda (Ag/0,01 mol dm⁻³ AgNO₃/1 mol dm⁻³ NaClO₄ v acetonitrilu), oddělená od měřeného roztoku meziprostorem s náplní 0,5 mol dm⁻³ NaClO₄ v acetonitrilu. Pomocnou elektrodou byl platinový plíšek.

Kapalinová chromatografie byla měřena na aparatuře sestávající z lineárního vysokotlakého čerpadla HP5001 (Laboratorní přístroje, ČR), šesticestného dávkovacího ventilu Rheodyne s dávkovací smyčkou objemu 20 μ l a kolony s reverzně vázanou fází RP-select B LiChrospher[®] 60 (250 \times 4 mm, 5 μ m částice). Mobilní fáze byla tvořena 0,1 mol dm⁻³ roztokem chloristanu sodného v acetonitrilu míšeného s 0,1 mol dm⁻³

roztokem chloristanu sodného v destilované vodě v různých poměrech. Měření probíhala za laboratorní teploty 20 ± 1 °C.

K detekci v HPLC aparatuře byly použity dva detektory:

- Tubulární detektor podle Cvačky a kol. [41], jehož elektroda byla tvořena platinovou trubičkou délky 15 mm a vnitřního průměru 150 μm , tomu odpovídá objem takto vytvořené cely 265 nl, aktivní plocha elektrody 0,71 mm^2 . Detektor, umístěný na vývodu z HPLC kolony zasahoval do voltametrické nádoby [40], byl pomocí mobilní fáze vodivě spojen s referenční Pleskovovou elektrodou a pomocnou platinovou elektrodou.
- Velkoobjemový „wall-jet“ detektor (obr. 3.1) navržený pro tuto diplomovou práci byl vyroben ve sklářské dílně Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Detektor je modifikací cely pro voltametrii v nevodném prostředí [40], v níž je proti vývodu z HPLC kolony umístěna ve vzdálenosti asi 3 mm disková platinová elektroda ($d = 2$ mm, $A = 3,14$ mm^2) firmy Radiometer Copenhagen (Dánsko) jako pracovní elektroda. Referenční elektrodou byla Pleskovova elektroda a pomocnou elektrodou platinový plíšek. Stálá hladina mobilní fáze v cele je udržována pomocí přepadu.



Obr. 3.1 Velkoobjemový „wall-jet“ detektor pro detekci pomocí cyklické voltametrie: (1) vývod z HPLC kolony, (2) pracovní platinová disková elektroda, (3) meziprostor, (4) referenční Pleskovova elektroda, (5) pomocná platinová elektroda, (6) přepad.

Spektrofotometrická měření byla realizována v křemenných kyvetách s optickou dráhou 1 cm na jednopaprskovém spektrofotometru Hewlett-Packard 8453 s diodovým polem.

3.3 Zpracování naměřených dat

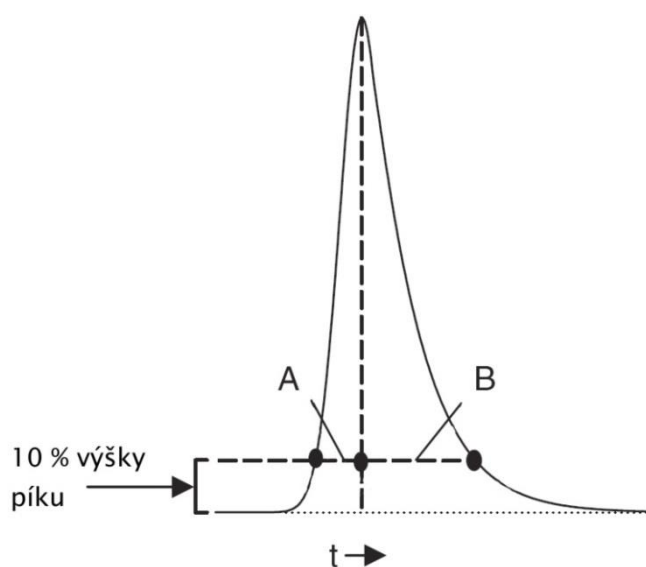
Naměřená data byla zpracována na hladině významnosti 95 % běžnými statistickými postupy [42]. Všechna prezentovaná data jsou mediány alespoň tří měření. Ke zpracování dat byly použity software Microsoft Office Excel 2007 a Origin 8.5 Professional (Microcal Software, USA).

Z dat získaných při elektrochemické detekci v HPLC měření byly vytvořeny buď trojdimenzionální chromatovoltamogramy (čas-potenciál-proud) nebo byly z těchto dat extrahovány pouze dvojdimenzionální amperometrické chromatogramy (čas-proud) při zvoleném potenciálu.

Tvar chromatografických píků byl hodnocen pomocí **faktoru asymetrie** A_s (cit. [43]) počítaného ze vztahu

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (3.1)$$

kde A , resp. B , jsou vzdálenosti levé, resp. pravé, části píku od jeho středu, měřené v 10 % výšky píku (obr. 3.2).



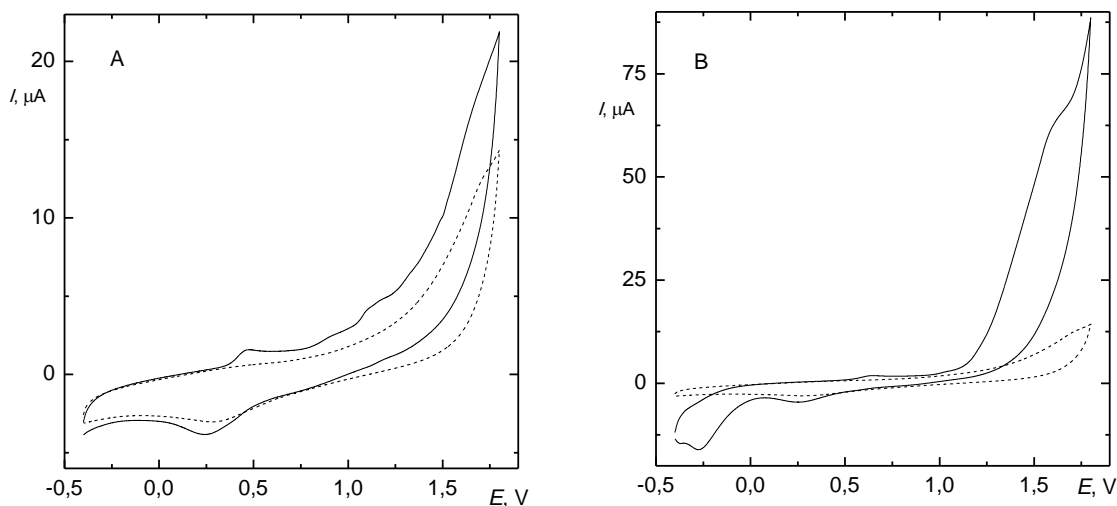
Obr. 3.2 Měření vzdálenosti levé, resp. pravé, části píku od jeho středu pro stanovení faktoru asymetrie píku podle vztahu (3.1). (Převzato a upraveno podle [43].)

4 Výsledky a diskuze

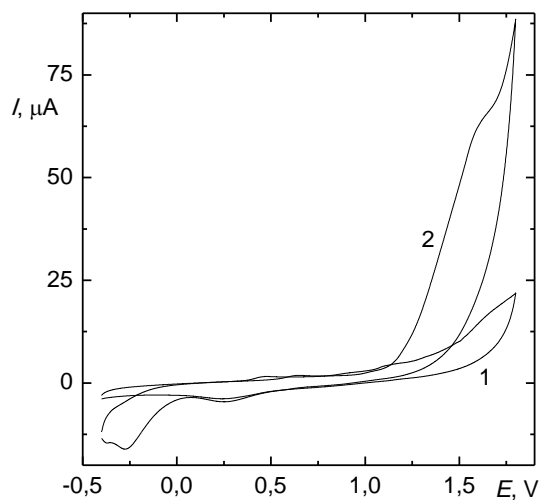
4.1 Cyklická voltametrie studovaných fenothiazinů

Pro ověření průběhu elektrochemické oxidace studovaných derivátů fenothiazinu popsaných v literatuře [28] byly nejprve proměřeny cyklické voltamogramy chlorpromazinu a thioridazinu v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ chloristanu sodného v acetonitrilu při rychlostech polarizace elektrody $0,01, 0,10, 1,00, 5,00$ a $10,00 \text{ V s}^{-1}$.

Naměřené parametry cyklických voltamogramů se shodovaly s literárními údaji. Na obr. 4.1 jsou znázorněny vybrané cyklické voltamogramy chlorpromazinu a thioridazinu při rychlosti polarizace elektrody 100 mV s^{-1} . Je patrné, že potenciály jednotlivých katodických i anodických píků obou látek se liší (obr. 4.2), z čehož vyplývá, že při detegování těchto látek v průtoku bude při použití pouze amperometrické detekce pro jednotlivé látky při stejném potenciálu vloženém na detektor různá citlivost. Pokud bude jako detekční technika v průtokové analýze použita cyklická voltametrie, bude možné vybrat pro každou analyzovanou látku vhodný potenciál, při němž bude mít látka co největší citlivost (tj. po měření lze změnit parametry detektoru).



Obr. 4.1 Cyklické voltamogramy (A) chlorpromazinu a (B) thioridazinu v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ chloristanu sodného v acetonitrilu (čárkovaná čára). Podmínky měření: $c(\text{chlorpromazin, resp. thioridazin}) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $A = 3,142 \text{ mm}^2$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, E vs. $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.



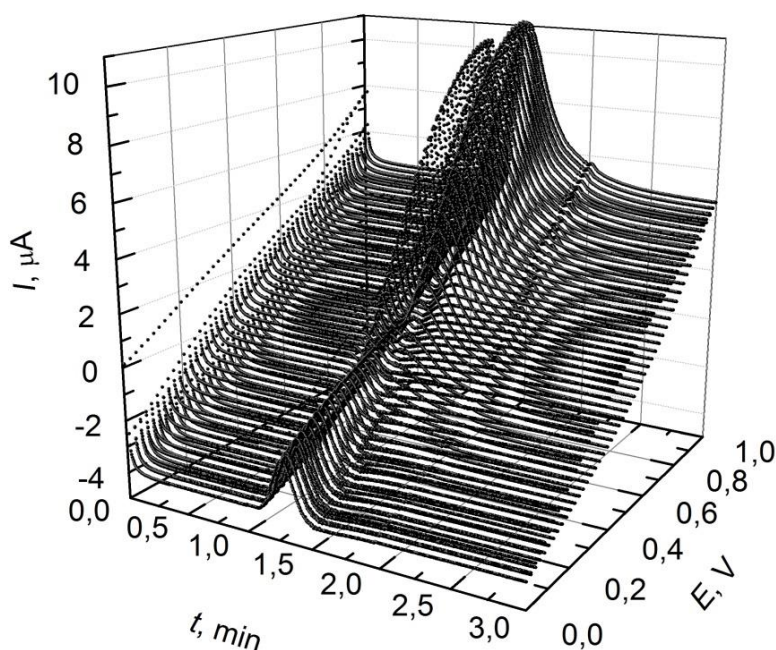
Obr. 4.2 Porovnání cyklických voltamogramů (1) chlorpromazinu a (2) thioridazinu v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ chloristanu sodného v acetonitrilu. Podmínky měření: $c(\text{chlorpromazin, resp. thioridazin}) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $A = 3,142 \text{ mm}^2$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, E vs. $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.

4.2 Porovnání detektorů pro detekci studovaných látek pomocí HPLC-CV

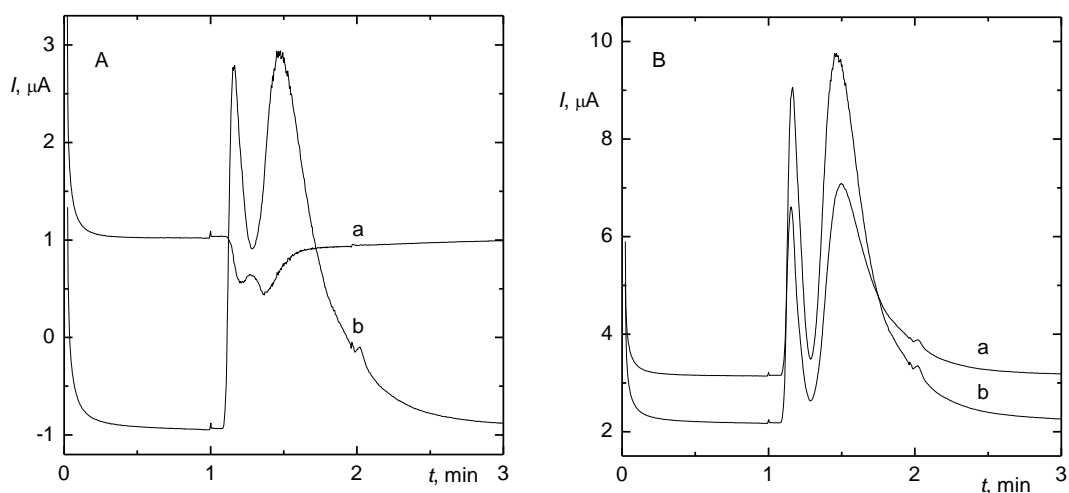
4.2.1 Tubulární detektor

Jako první byla studována možnost detekce HPLC-CV pomocí tubulárního detektoru. Pro jeho testování byla použita HPLC aparatura bez zapojené kolony. Jako mobilní fáze byl použit $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ roztok chloristanu sodného v acetonitrilu o průtokové rychlosti $0,1 \text{ ml min}^{-1}$. Do mobilní fáze byl dávkován $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ roztok chlorpromazinu hydrochloridu v acetonitrilu. Chromatovoltamogramy byly snímány při rychlostech polarizace $0,5, 2,0$ a $8,0 \text{ V s}^{-1}$.

Příklad získaného chromatovoltamogramu je zobrazen na obr. 4.3. Při všech studovaných rychlostech polarizace bylo pozorováno, že pík analytu se štěpil na dva píky, což je podrobněji pro vybrané potenciály demonstrováno na obr. 4.4. Tento jev se nepodařilo odstranit ani při dalších experimentech, při nichž byly měněny rychlosti toku mobilní fáze i polarizace elektrody. Tubulární detektor se tedy ukázal jako nevhodný pro detekci HPLC-CV.



Obr. 4.3 Chromatovoltamogram chlorpromazinu ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) naměřený v HPLC aparatuře bez zapojené kolony na tubulárním detektoru. Podmínky měření: mobilní fáze $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ chloristan sodný v acetonitrilu, $F = 0,1 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.

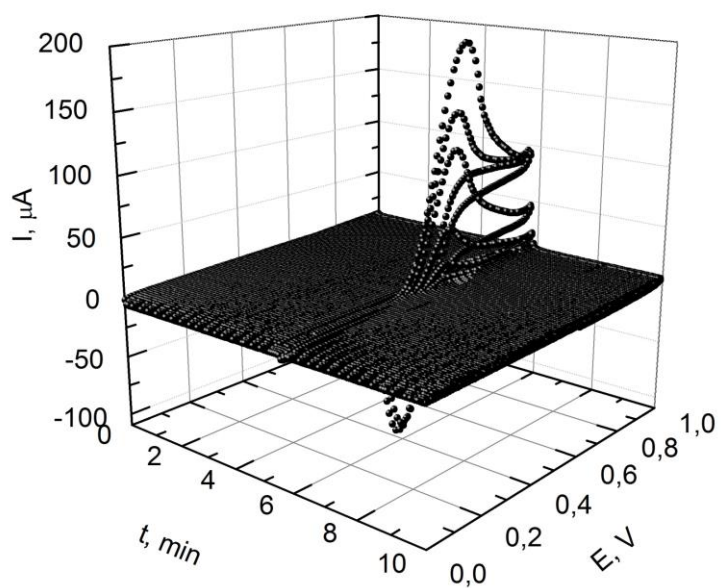


Obr. 4.4 Amperometrický záznam při potenciálu (A) $E_{amp.} = 0,5 \text{ V}$ a (B) $E_{amp.} = 0,8 \text{ V}$, vytvořený z dat chromatovoltamogramu chlorpromazinu ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) naměřeného v HPLC aparatuře bez zapojené kolony na tubulárním detektoru. Křivka (a) znázorňuje anodický (dopředný) sken a křivka (b) znázorňuje katodický (zpětný) sken. Podmínky měření: mobilní fáze $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ chloristan sodný v acetonitrilu, $F = 0,1 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.

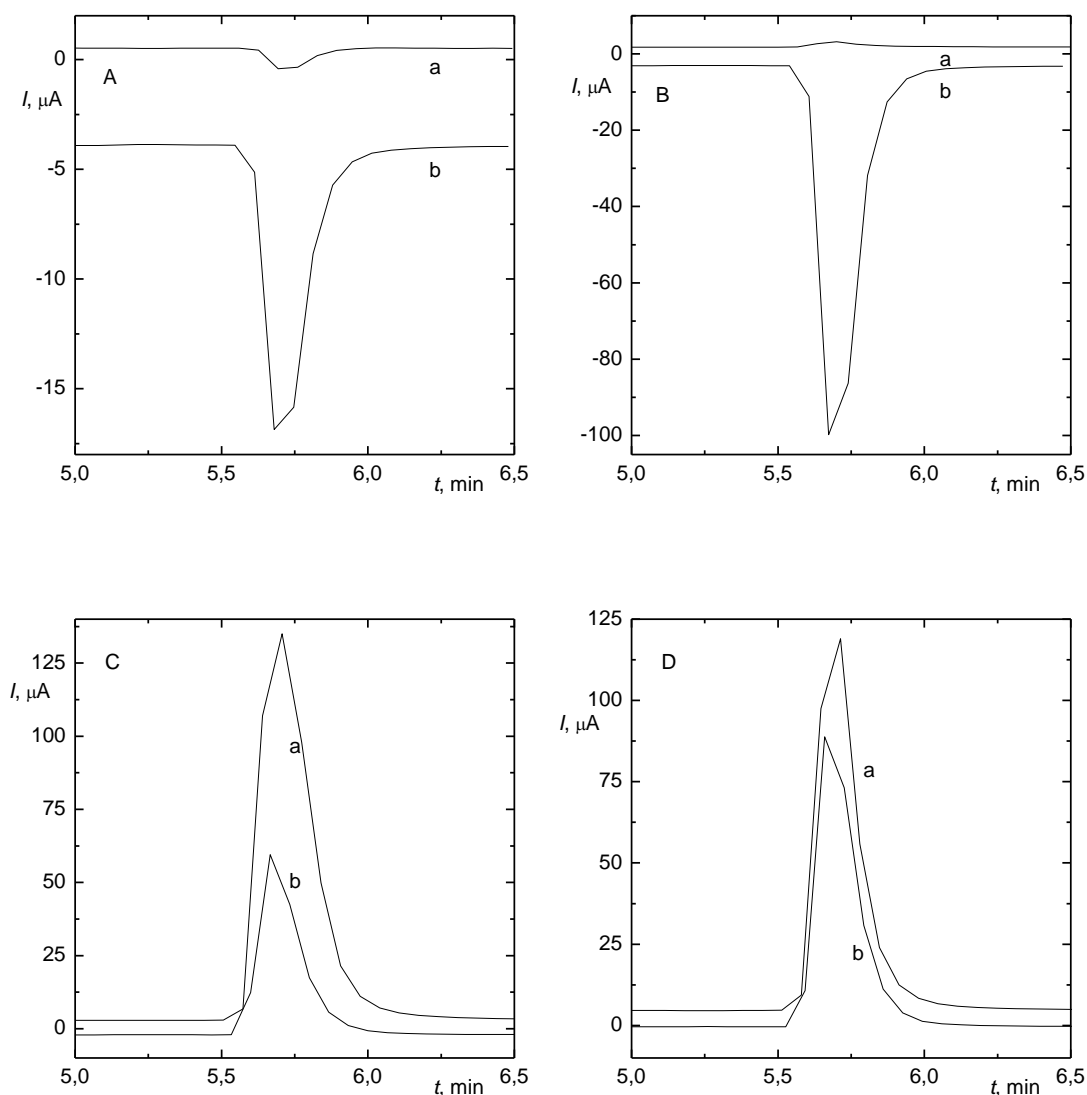
4.2.2 Velkoobjemový „wall-jet“ detektor

Na základě literatury [1, 40] byl pro tuto diplomovou práci navržen a zkonstruován velkoobjemový „wall-jet“ detektor. Pro testování možnosti jeho použití v HPLC-CV byla nejprve použita HPLC aparatura se zapojenou kolonou. Jako mobilní fáze byl použit $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ roztok chloristanu sodného v acetonitrilu o průtokové rychlosti $0,1 \text{ ml min}^{-1}$. Do mobilní fáze byl dávkován $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ roztok chlorpromazinu hydrochloridu v acetonitrilu. Chromatovoltamogramy byly snímány při rychlostech polarizace $0,5, 2,0$ a $8,0 \text{ V s}^{-1}$.

Příklad získaného chromatovoltamogramu je znázorněn na obr. 4.5, příslušné amperometrické záznamy vytvořené z dat chromatovoltamogramu jsou uvedeny na obr. 4.6. Je patrné, že výška chromatografického píku je závislá na potenciálu, při němž byl získán, a lze tak efektivně ovlivnit citlivost daného stanovení.



Obr. 4.5 Chromatovoltamogram chlorpromazinu naměřený v HPLC aparatuře na velkoobjemovém „wall-jet“ detektoru. Podmínky měření: dávkováno 20 μl chlorpromazinu o koncentraci $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ v acetonitrilu, mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného v acetonitrilu, kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250 \times 4 mm, 5 μm částice), $F = 0,1 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.



Obr. 4.6 Amperometrický záznam při potenciálu (A) $E_{\text{amp.}} = 0,2 \text{ V}$, (B) $E_{\text{amp.}} = 0,4 \text{ V}$, (C) $E_{\text{amp.}} = 0,6 \text{ V}$ a (D) $E_{\text{amp.}} = 0,8 \text{ V}$ vytvořené z dat chromatovoltamogramu chlorpromazinu ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) naměřeného v HPLC aparatuře na velkoobjemovém „wall-jet“ detektoru. Křivka (a) znázorňuje anodický (dopředný) sken a křivka (b) znázorňuje katodický (zpětný) sken. Podmínky měření: dávkováno 20 μl chlorpromazinu o koncentraci $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ v acetonitrilu, mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného v acetonitrilu, kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250 \times 4 mm, 5 μm částice), $F = 0,1 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. Ag/0.01 mol dm^{-3} AgNO₃/1 mol dm^{-3} NaClO₄.

4.3 Optimalizace separace studovaných látek v HPLC-CV

Pro všechna další měření byla používána HPLC aparatura se zařazenou kolonou RP-select B LiChrospher® 60 a velkoobjemovým „wall-jet“ detektorem.

4.3.1 Optimalizace složení mobilní fáze

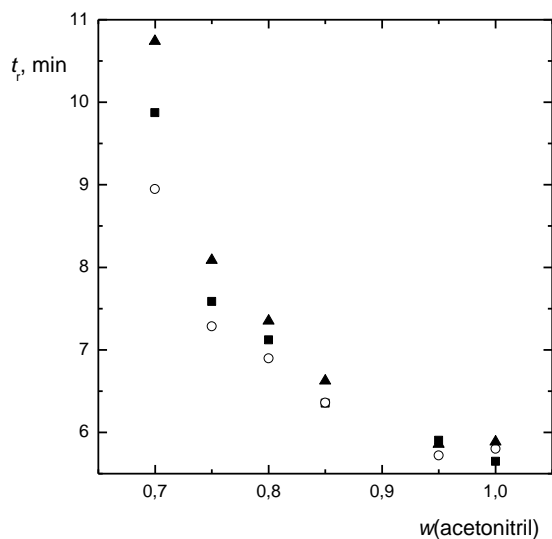
Byl studován vliv složení mobilní fáze (0,1 mol dm⁻³ roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda) na retenční čas jednotlivých studovaných derivátů fenothiazinu pro následující obsahy organické složky: 100 %, 95 %, 85 %, 80 %, 75 % a 70 %. Zjištěné retenční časy pro jednotlivé deriváty jsou uvedeny v tab. 4.1, graficky je závislost retenčního času na složení mobilní fáze uvedena na obr. 4.7.

Z naměřených hodnot je patrné, že dostatečně rozdílných retenčních časů studovaných fenothiazinů bylo dosaženo při obsahu acetonitrilu v mobilní fázi rovnému 80 %. Tato mobilní fáze byla používána i pro další měření.

Tab. 4.1

Retenční časy studovaných derivátů fenothiazinu v HPLC-CV v závislosti na obsahu organické složky (acetonitrilu) v mobilní fázi 0,1 mol dm⁻³ roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda. Podmínky měření: dávkováno 20 µl roztoku fenothiazinu o koncentraci 1×10⁻⁴ mol dm⁻³ v acetonitrilu na kolonu RP-select B LiChrospher® 60 (250×4 mm, 5 µm částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. Ag/-0.01 mol dm⁻³ AgNO₃/1 mol dm⁻³ NaClO₄.

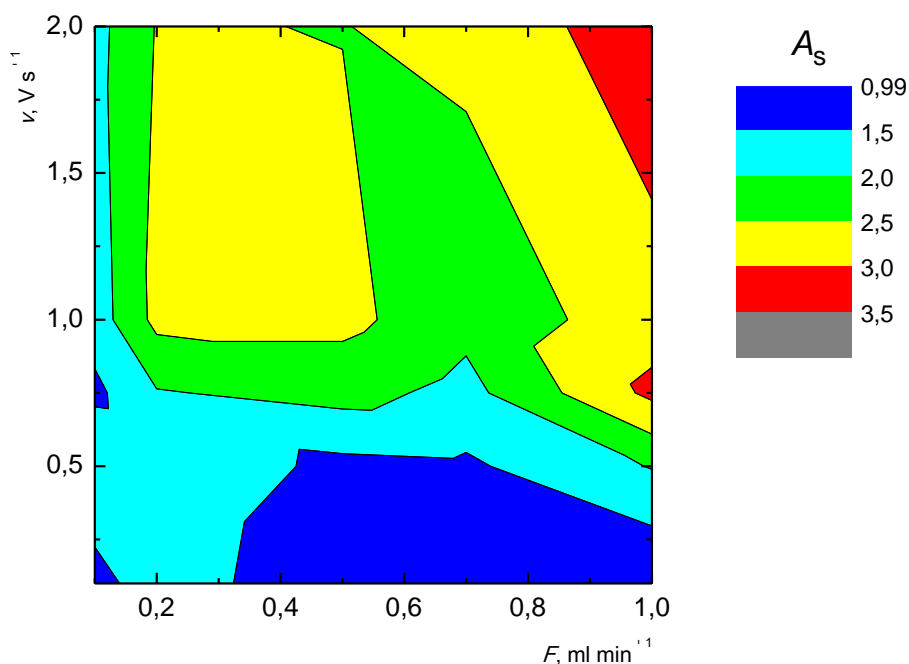
| w(acetonitril) | t_r , min | | |
|----------------|---------------|-----------|-------------|
| | chlorpromazin | diethazin | thioridazin |
| 1,00 | 5,65 | 5,80 | 5,88 |
| 0,95 | 5,90 | 5,72 | 5,86 |
| 0,85 | 6,35 | 6,36 | 6,63 |
| 0,80 | 7,12 | 6,90 | 7,35 |
| 0,75 | 7,59 | 7,29 | 8,08 |
| 0,70 | 9,87 | 8,95 | 10,74 |



Obr. 4.7 Závislost retenčního času (■) chlorpromazinu, (○) diethazinu a (▲) thioridazinu v HPLC-CV na obsahu organické složky (acetonitrilu) v mobilní fázi $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda. Podmínky měření: dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku fenothiazinu o koncentraci $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ v acetonitrilu na kolonu RP-select B LiChrospher® 60 ($250 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.

4.3.2 Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze a rychlosti polarizace elektrody na symetrii chromatografického píku

Byl studován vliv rychlosti mobilní fáze a rychlosti polarizace elektrody (tj. rychlosti záznamu cyklického voltamogramu) na symetrii chromatografického píku. Průtoková rychlost mobilní fáze byla testována na hladinách $0,1$, $0,2$, $0,5$, $0,7$ a $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, rychlost polarizace elektrody byla testována na hladinách $0,10$, $0,50$, $0,75$, $1,00$ a $2,00 \text{ V s}^{-1}$. Pro každé měření byly vypočítány faktory asymetrie chromatografického píku podle vztahu (3.1). Graficky je vliv testovaných parametrů na asymetrii píku znázorněn na obr. 4.8.



Obr. 4.8 Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze a rychlosti polarizace elektrody na faktor asymetrie chromatografického píku pro chlorpromazin v HPLC-CV. Podmínky měření: dávkovaný objem 20 μl roztoku chlorpromazinu o koncentraci $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ v acetonitrilu, mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250 \times 4 mm, 5 μm částice), E vs. Ag/0.01 mol dm^{-3} AgNO₃/1 mol dm^{-3} NaClO₄. Amperometrické záznamy odečteny při potenciálu 0,700 V.

Ze získaných dat je patrné, že se větší symetrii vykazovaly píky naměřené při vyšších průtokových rychlostech a nižší rychlosti polarizace elektrody. Jako vhodné hodnoty pro kalibrační měření byl proto zvolen průtok 0,5 ml min^{-1} a rychlost polarizace elektrody 0,5 V s^{-1} .

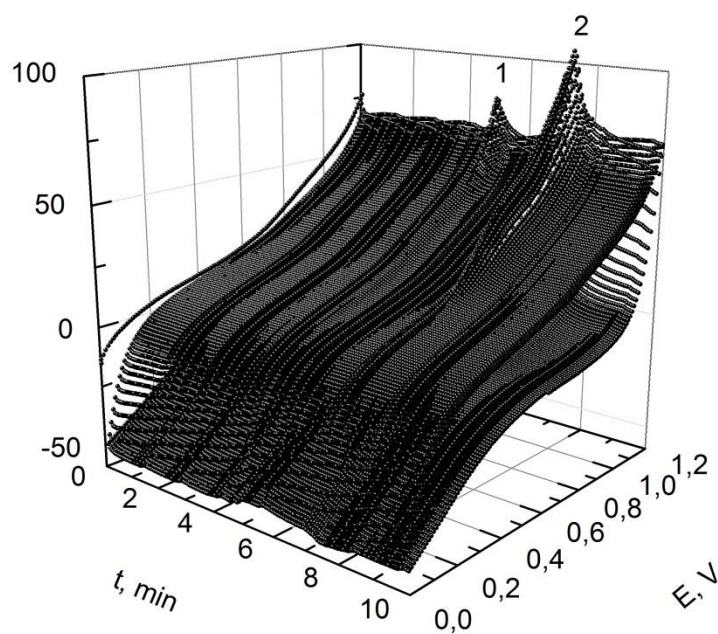
4.3.3 Separace směsí studovaných fenothiazinů

Za výše optimalizovaných podmínek byla v mobilní fázi s 80 % acetonitrilu studována separace směsí studovaných fenothiazinů, separovány byly vždy dva deriváty. Zjištěné a vypočítané chromatografické parametry jsou uvedeny v tab. 4.2. Pro ilustraci je na obr. 4.9 zobrazen získaný chromatovoltamogram pro směs diethazin a thioridazin, příslušné amperometrické záznamy vytvořené z dat chromatovoltamogramu jsou uvedeny na obr. 4.10.

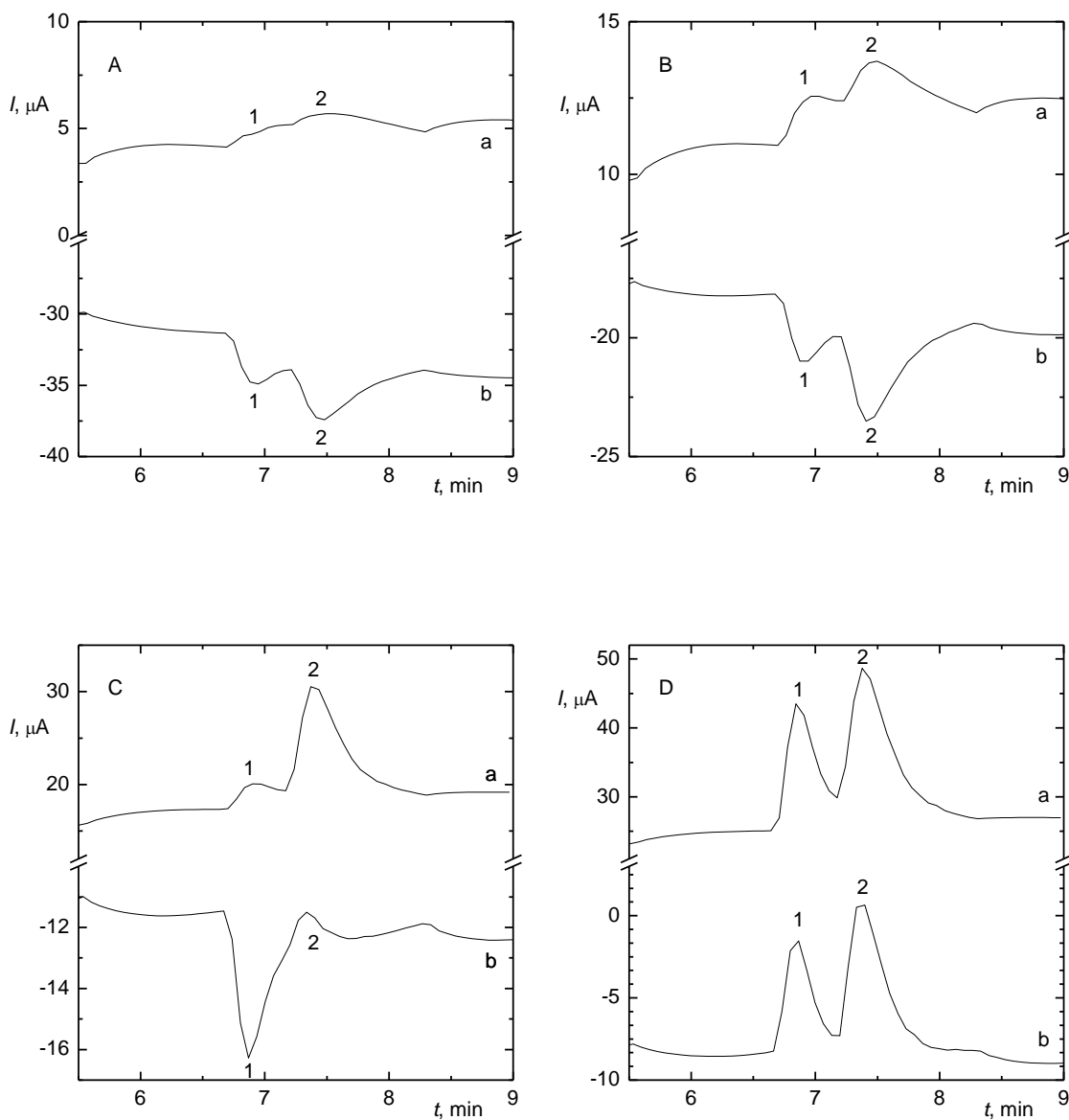
Tab. 4.2

Chromatografické parametry separace směsí fenothiazinů. Podmínky měření: dávkováno 20 μl směsi dvou fenothiazinů o koncentraci $5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ v acetonitrilu, mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250 \times 4 mm, 5 μm částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. Ag/0.01 $\text{mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.

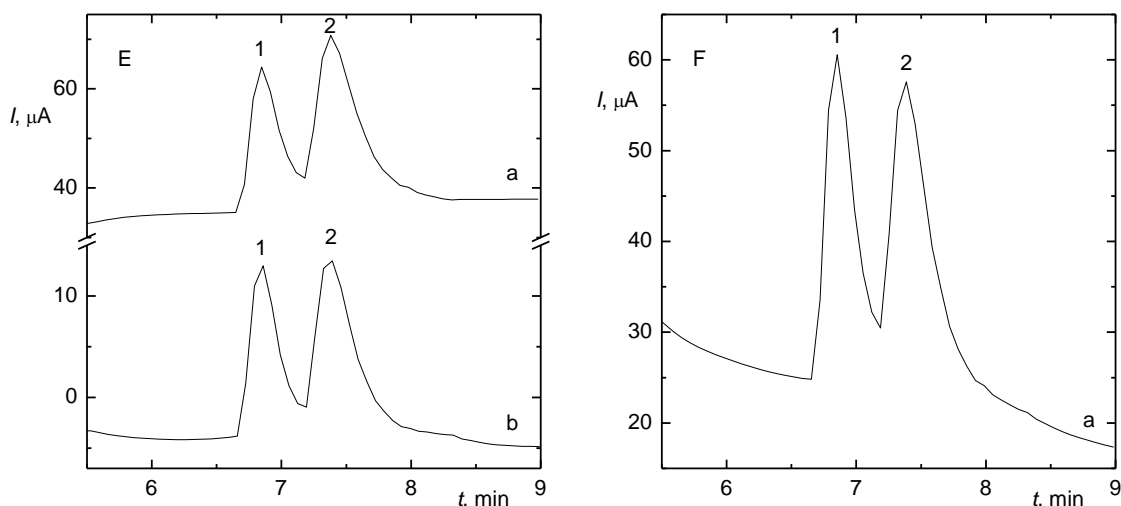
| směs | látka | $E_{\text{amp.}}, \text{V}$ | t_r, s | w_p, s | n | $R_{1,2}$ |
|-----------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------|-----------|
| chlorpromazin + dietazin | chlorpromazin | 0,880 | 430,7 | 80 | 464 | 0,40 |
| | diethazin | | 410,7 | 20 | 6746 | |
| chlorpromazin + thioridazin | chlorpromazin | 0,810 | 426,5 | 16 | 11370 | 0,29 |
| | thioridazin | | 438,5 | 68 | 665 | |
| diethazin + thioridazin | diethazin | 0,810 | 410,5 | 32 | 2633 | 0,73 |
| | thioridazin | | 442,5 | 56 | 999 | |



Obr. 4.9 Chromatovoltamogram směsi (1) diethazinu a (2) thioridazinu ($c(\text{diethazin, resp. thioridazin}) = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) naměřený v HPLC-CV. Podmínky měření: dávkovaný objem 20 μl , mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250 \times 4 mm, 5 μm částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,6 \text{ V s}^{-1}$, E vs. Ag/0.01 $\text{mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.

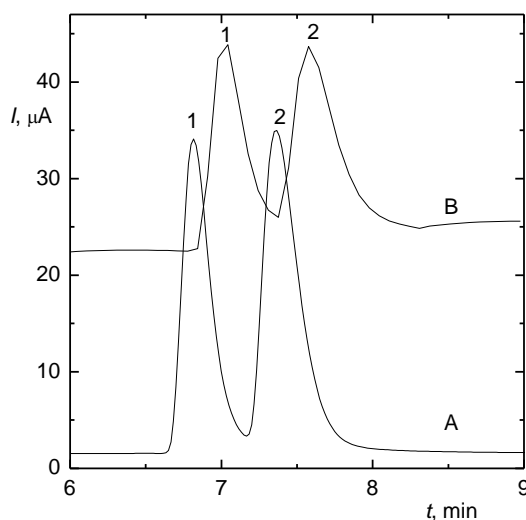


Obr. 4.10a Amperometrický záznam při potenciálu (A) $E_{amp.} = 0,2 \text{ V}$, (B) $E_{amp.} = 0,4 \text{ V}$, (C) $E_{amp.} = 0,6 \text{ V}$, (D) $E_{amp.} = 0,8 \text{ V}$ vytvořený z dat chromatovoltamogramu směsi (1) diethazinu a (2) thioridazinu ($c(\text{diethazin, resp. thioridazin}) = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) naměřený v HPLC-CV. Křivka (a) znázorňuje anodický (dopředný) sken a křivka (b) znázorňuje katodický (zpětný) sken. Podmínky měření: dávkovaný objem $20 \mu\text{l}$, mobilní fáze $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 ($250 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $\nu = 0,6 \text{ V s}^{-1}$, E vs. $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.



Obr. 4.10b Amperometrický záznam při potenciálu (E) $E_{\text{amp.}} = 1,0 \text{ V}$ a (F) $E_{\text{amp.}} = 1,2 \text{ V}$ vytvořený z dat chromatovoltamogramu směsi (1) diethazinu a (2) thioridazinu ($c(\text{diethazin, resp. thioridazin}) = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) naměřený v HPLC-CV. Křivka (a) znázorňuje anodický (dopředný) sken a křivka (b) znázorňuje katodický (zpětný) sken. Podmínky měření: dávkovaný objem $20 \mu\text{l}$, mobilní fáze $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 ($250 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,6 \text{ V s}^{-1}$, E vs. $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$.

Pro směs diethazin a thioridazin byl kromě chromatovoltamogramu pro porovnání zaznamenán i klasický amperometrický záznam při potenciálu $0,878 \text{ V}$. Na obr. 4.11 je uvedeno porovnání klasického amperometrického záznamu s amperometrickým záznamem vytvořených z dat chromatovoltamogramu směsi diethazinu a thioridazinu rovněž při potenciálu $0,878 \text{ V}$. Oba amperometrické záznamy byly vyhodnoceny a vypočítány chromatografické charakteristiky příslušných píků. Jak plyne z tab. 4.3, klasická amperometrická detekce poskytuje vyšší píky (a tedy píky s větší plochou) oproti záznamu získanému HPLC-CV, výsledné stanovení je tedy citlivější. Na druhou stranu se píky získané z HPLC-CV vyznačují větší symetričností, větším počtem teoretických pater (při stejné použité koloně) a lepším rozlišením píků.



Obr. 4.11 Porovnání (A) amperometrické detekce při potenciálu $E_{amp.} = 0,878$ V s (B) amperometrickým záznamem při potenciálu $E_{amp.} = 0,878$ V vytvořeném z dat chromatovoltamogramu směsi (1) diethazinu a (2) thioridazinu. Podmínky měření: $c(\text{diethazin, resp. thioridazin}) = 5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} , dávkovaný objem 20 μl , mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250 \times 4 mm, 5 μm částice), $F = 0,5$ ml min^{-1} , $v = 0,6$ V s^{-1} , E vs. Ag/0.01 mol dm^{-3} AgNO_3 /1 mol dm^{-3} NaClO_4 .

Tab. 4.3

Chromatografické parametry separace směsi diethazinu a thioridazinu detegované amperometicky a HPLC-CV při potenciálu 0,878 V. Podmínky měření: $c(\text{diethazin, resp. thioridazin}) = 5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} , dávkovaný objem 20 μl , mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250 \times 4 mm, 5 μm částice), $F = 0,5$ ml min^{-1} , $v = 0,6$ V s^{-1} , E vs. Ag/0.01 mol dm^{-3} AgNO_3 /1 mol dm^{-3} NaClO_4 .

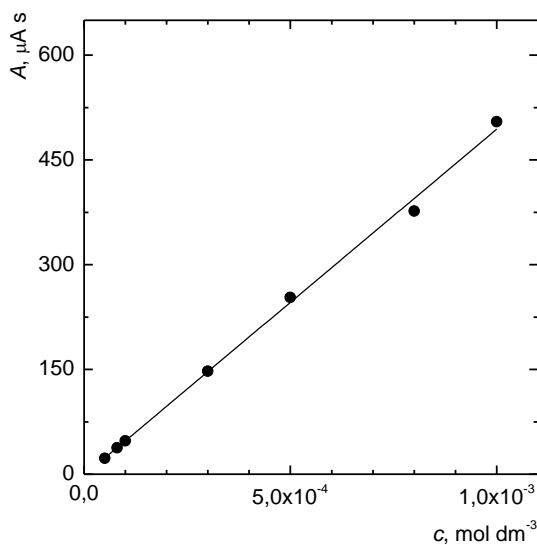
| detekce | látka | t_r , s | w_p , s | A_p , $\mu\text{A s}$ | h_p , μA | A_s | n | $R_{1,2}$ |
|--------------|-------------|-----------|-----------|-------------------------|-----------------------|-------|------|-----------|
| amperometrie | diethazin | 408,0 | 28,8 | 402,4 | 31,7 | 1,90 | 3182 | 0,930 |
| | thioridazin | 442,2 | 42,0 | 515,0 | 31,9 | 2,82 | 1772 | |
| CV | diethazin | 422,4 | 28,2 | 290,6 | 20,0 | 1,33 | 3645 | 0,941 |
| | thioridazin | 450,0 | 40,2 | 332,0 | 17,9 | 2,33 | 2067 | |

4.4 Kalibrační závislosti

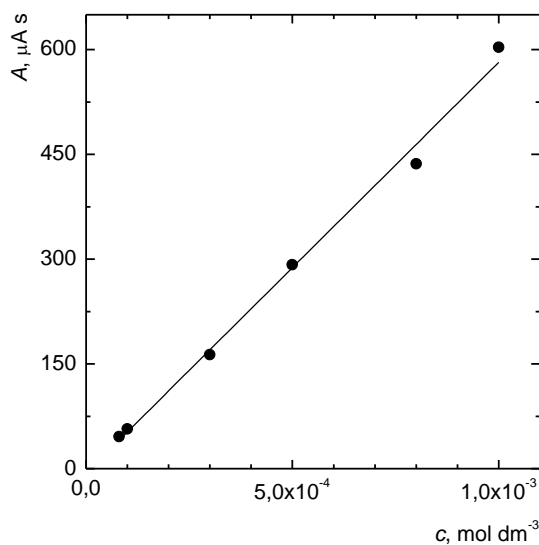
Z optimalizačních experimentů byl pro změření kalibračních přímek zvolen průtok mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ a rychlost polarizace elektrody $0,5 \text{ V s}^{-1}$. Kalibrační závislosti byly měřeny v koncentračním rozmezí $5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pro chlorpromazin a 8×10^{-5} až $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pro diethazin a thioridazin. Z naměřených HPLC-CV chromatovoltamogramů jednotlivých fenothiazinů byly vytvořeny amperometrické záznamy, odečteny plochy píků a sestrojeny kalibrační závislosti (obr. 4.12–4.14), které popisuje rovnice přímky

$$A_p [\mu\text{A s}] = a c [\text{mol dm}^{-3}] + b [\mu\text{A s}] \quad (4.1)$$

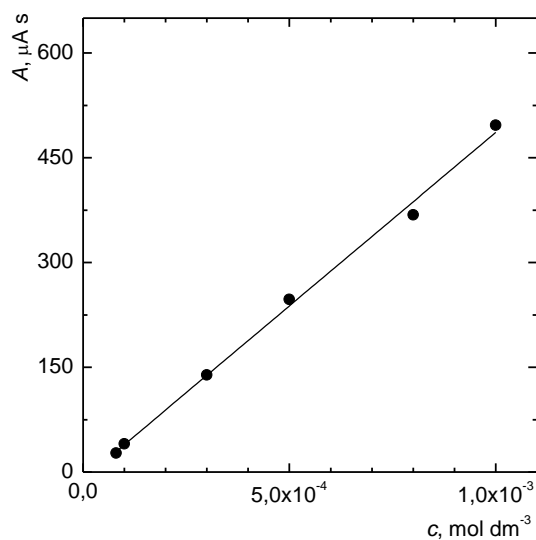
Získané parametry kalibračních přímek a vypočítané limity kvantifikace podle vztahu (2.6) jsou uvedeny v tab. 4.4.



Obr. 4.12 Kalibrační závislost pro stanovení chlorpromazinu hydrochloridu v HPLC-CV. Podmínky měření: dávkovaný objem $20 \mu\text{l}$, mobilní fáze $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250×4 mm, $5 \mu\text{m}$ částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$, $E_{\text{amp.}} = 0,800 \text{ V}$.



Obr. 4.13 Kalibrační závislost pro stanovení diethazinu hydrochloridu v HPLC-CV. Podmínky měření: dávkovaný objem 20 μl , mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250×4 mm, 5 μm částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. Ag/0.01 mol dm^{-3} AgNO₃/1 mol dm^{-3} NaClO₄, $E_{\text{amp.}} = 0,800 \text{ V}$.



Obr. 4.14 Kalibrační závislost pro stanovení thioridazin hydrochloridu v HPLC-CV. Podmínky měření: dávkovaný objem 20 μl , mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250×4 mm, 5 μm částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. Ag/0.01 mol dm^{-3} AgNO₃/1 mol dm^{-3} NaClO₄, $E_{\text{amp.}} = 0,800 \text{ V}$.

Tab. 4.4

Směrnice, úseky, koeficienty determinace kalibračních závislostí pro stanovení studovaných fenothiazinů v HPLC-CV a vypočítané hodnoty limitů detekce a limitů kvantifikace. Podmínky měření: dávkovaný objem 20 μl , mobilní fáze 0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20), kolona RP-select B LiChrospher® 60 (250×4 mm, 5 μm částice), $F = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$, E vs. Ag/0.01 mol dm^{-3} AgNO_3 /1 mol dm^{-3} NaClO_4 , $E_{\text{amp.}} = 0,800 \text{ V}$.

| látka | $a, 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^{-3} \mu\text{A s}$ | $b, \mu\text{A s}$ | r^2 | $s_{y/x}$ | $LOD, 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ | $LOQ, 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ |
|---------------|---|--------------------|--------|-----------|------------------------------------|------------------------------------|
| chlorpromazin | 5,0 | -2 | 0,9972 | 9,89 | 5,5 | 1,94 |
| diethazin | 4,9 | -6 | 0,9946 | 18,25 | 10,0 | 3,60 |
| thioridazin | 5,0 | -10 | 0,9969 | 11,68 | 5,0 | 2,14 |

4.5 Stanovení fenothiazinů metodou HPLC-CV v lékových formách

Nalezené podmínky měření a změřené kalibrační závislosti byly aplikovány na stanovení fenothiazinů v reálných vzorcích lékových forem. Odvážená tableta lékové formy byla pomocí ultrazvuku rozpuštěna ve 100 ml mobilní fáze (0,1 mol dm^{-3} roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20)) a po vhodném naředění byl roztok dávkován do HPLC-CV. Ze získaných chromatovoltamogramů byly postupem a za podmínek popsaných v kap. (4.4) odečteny plochy chromatografických píků, které byly vyhodnoceny pomocí příslušné kalibrační přímky a přepočítány na obsah fenothiazinu v tabletě. Jako referenční stanovení bylo použito spektrofotometrické stanovení podle lékopisu [31].

Výsledky obou stanovení jsou uvedeny v tab. 4.5. Z tabulky je patrné, že stanovení metodou HPLC-CV je sice pravdivé (tedy správné), ale méně precizní (přesné) než lékopisné stanovení spektrofotometrické.

Tab. 4.5.

Deklarovaný obsah fenothiazinů v analyzovaných lékových formách a nalezený obsah fenothiazinů pomocí HPLC-CV a spektrofotometrického stanovení.

| látka | léková forma | nalezeno (mg/tableta) | |
|-------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | | HPLC-CV | spektrofotometricky |
| chlorpromazin.HCl | Plegomazin®, 100 mg | 94 ± 15 | 99,40 ± 0,48 |
| diethazin.HCl | Deparkin®, 50 | 37 ± 17 | 49,95 ± 0,11 |
| thioridazin.HCl | Thioridazin®, 25 | 23 ± 4 | 24,75 ± 0,07 |

5 Závěr

V této diplomové práci byla studována možnost využití cyklické voltametrie jako detekční techniky v kapalinové chromatografii. Jako modelových látek bylo využito derivátů fenothiazinu (chlorpromazin hydrochlorid, diethazin hydrochlorid a thioridazin hydrochlorid).

V první části práce bylo provedeno porovnání dvou možných detektorů: tubulárního a velkoobjemového „wall-jet“ detektoru navrženého pro tuto práci. U tubulárního detektoru bylo pozorováno štěpení analytického signálu (chromatografického píku), vyhovující se tedy ukázal pouze velkoobjemový „wall-jet“ detektor.

V další části práce byly optimalizovány podmínky separace a detekce studovaných fenothiazinů na koloně RP-select B LiChrospher® 60 (250×4 mm) s cyklickou voltametří jako detekční technikou. Byl studován vliv složení mobilní fáze (0,1 mol dm⁻³ roztok chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda) na retenční čas jednotlivých studovaných derivátů fenothiazinu pro následující obsahy organické složky: 100 %, 95 %, 85 %, 80 %, 75 % a 70 %. Nejlepší separace bylo dosaženo v mobilní fázi tvořené 0,1 mol dm⁻³ roztokem chloristanu sodného ve směsi acetonitril-voda (80:20). Dále byl studován vliv rychlosti průtoku mobilní fáze a polarizace elektrody na symetrii chromatografického píku. Jako nejvýhodnější hodnoty byly nalezeny: průtok mobilní fáze 0,5 ml min⁻¹ a rychlost polarizace elektrody 0,5 V s⁻¹. Za těchto optimalizovaných podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti studovaných fenothiazinů v koncentračním rozsahu 5×10⁻⁵ až 1×10⁻³ mol dm⁻³ pro chlorpromazin a 8×10⁻⁵ až 1×10⁻³ mol dm⁻³ pro diethazin a thioridazin. Byly stanoveny parametry kalibračních přímek a vypočítány limity kvantifikace a limity detekce.

V poslední části diplomové práce byla vyvinutá metoda HPLC-CV aplikována na stanovení studovaných fenothiazinů v léčivých přípravcích.

Literatura

- [1] Štulík K., Pacáková V.: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. Praha, SNTL 1989.
- [2] Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd Ed. Wiley 2010.
- [3] Flanagan R.J., Perrett D., Whelpton R.: *Electrochemical Detection in HPLC. Analysis of Drugs and Poisons*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry 2005.
- [4] H. Gunasingham H., Tay B.T., Ang, K.P., Koh L.L.: Electrochemical detection of polynuclear aromatic hydrocarbons following reversed-phase gradient high-performance liquid chromatography using a large-volume wall-jet detector. *J. Chromatogr. A* **285** (1984), 103–114.
- [5] Trojanowicz M.: Recent developments in electrochemical flow detections. A review. Part II. Liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **688** (2011), 8–35.
- [6] Wang J.: *Analytical Electrochemistry*. 3rd Ed. New York, Wiley 2006.
- [7] Thøgersen N., Janata J., Růžička J.: Flow injection analysis and cyclic voltammetry. *Anal. Chem.* **55** (1983), 1986–1988.
- [8] Cañete F., Ríos A., Luque de Castro M.D., Válcárel M.: Flow injection cyclic voltammetry. *Anal. Chim. Acta* **211** (1988), 287–292.
- [9] Tait R.J., Bury P.C., Finnin B.C., Reed B.L., Bond A.M.: Achievement of the analytically ideal steady-state response at a microelectrode-based scanning electrochemical detector under flow injection analysis and normal-phase chromatography conditions. *Anal. Chem.* **65** (1993), 3252–3257.
- [10] Baranski A.S., Norouzi P.: Voltammetric detection of surface active compounds at Au and Pt ultramicroelectrodes in lowing solutions. *Can. J. Chem.* **75** (1997), 1736–1749.
- [11] Baranski A.S., Norouzi P., Nelson L.J.: New voltammetric detection of proteins and amino acids utilizing electrosorption processes at gold ultra microelectrodes. *Proc. Electrochem. Soc.* **9** (1996), 41–52.

- [12] Ganjali M.R., Norouzi P., Ghorbani M., Sepehri A.: Fourier transforms cyclic voltammetric technique for monitoring ultratrace amounts of salbutamol at gold ultra microelectrode in flowing solutions. *Talanta* **66** (2005), 1225–1233.
- [13] Norouzi P., G. R. Nabi Bidhendi G.R., Ganjali M.R., Sepehri A., Ghorbani M.: Sub-second accumulation and stripping for pico-level monitoring of amikacin sulphate by fast Fourier transform cyclic voltammetry at a gold microelectrode in flow-injection systems. *Microchim. Acta* **152** (2005), 123.
- [14] Siangproh W., Leesutthipornchai W., Dungchai W., Chailapakul O.: Electrochemical detection for flow-based system. A review. *J. Flow Injection Anal.* **26** (2009), 5–25.
- [15] Melichar B., Čelandík M., Palát K., Kňazko L., Nováček L., Sova J.: *Chemická léčiva*. Praha, Avicenum 1972.
- [16] *Phenothiazines and 1,4-Benzothiazines. Chemical and Biomedical Aspects*. R.R. Gupta (Ed.), Amsterdam, Elsevier 1988.
- [17] Ohlow M.J., Moosmann B.: Foundation review. Phenothiazines: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discovery Today* **16** (2011), 119–131.
- [18] Karpińska J., Starczewska B., Puzanowska-Tarasiewicz H.: Analytical properties of 2- and 10-disubstituted phenothiazine derivatives. *Anal. Sci.* **12** (1996), 161–170.
- [19] Němcová I., Nesměrāk K., Rychlovský P., Koutníková J.: FIA titrations of phenothiazine derivatives in aqueous micellar and non-aqueous media. *Talanta* **65** (2005), 632–637.
- [20] Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuzmicka L., Karpinska J., Mielech-Lukasiewicz K.: Efficient oxidizing agents for determination of 2,10-disubstituted phenothiazines. *Anal. Sci.* **21** (2005), 1149–1153.
- [21] Ni Y., Wang L., Kokot S.: Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta* **439** (2001), 159–168.
- [22] Zhang Z.Q., Chen Z.G., Yang Z.G., Zhang H.: Adsorptive voltammetric determination of chlorpromazine in the presence of Triton X-100. *Microchem. J.* **53** (1996), 282–289.
- [23] Piette L.H., Bulov G., Yamazaki I.: Electron-paramagnetic-resonance studies of the chlorpromazine free radical formed during enzymatic oxidation by peroxidase-hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **88** (1964), 120–129.

- [24] Nascentes C.C., Cardenas S., Gallego M., Valcarcel M.: Continuous photometric method for the screening of human urines for phenothiazines. *Anal. Chim. Acta.* **462** (2002), 275–281.
- [25] B. Laassis B., Aaron J.J., Mahedero M.C.: Photochemically induced fluorescence determination of biomedically important phenothiazines in aqueous media at different pH values. *Anal. Chim. Acta* **290** (1994), 27–33.
- [26] Jelinek I., Nemcova I., Rychlovsky P.: Effects of salts on the stability of the cationic radical of phenothiazine-derivatives. *Talanta* **38** (1991), 1309–1313.
- [27] Nesměrák K., Červený V., Hraníček J., Rychlovský P.: A spectrofluorimetric determination of phenothiazine derivatives after their photooxidation or chemical or electrochemical oxidation in a flow injection arrangement. *Microchem. J.* **106** (2013), 226–232.
- [28] Zimova N., Nemeč I., Ehlova M., Waissner K.: A study of the electrochemical oxidation of phenothiazine derivatives in an acetonitrile medium III. The effect of the structure of the substituent in position-10 on the voltammetric behavior of phenothiazine derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **55** (1990), 63–71.
- [29] Kojlo A., Karpinska J., Kuzmicka L., Misiuk W., Puzanowska-Tarasiewicz H., Tarasiewicz M.: Analytical study of the reaction of phenothiazines with some oxidants, metal ions, and organic substances (review article). *J. Trace Microprobe Tech.* **19** (2001), 45–70.
- [30] *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Vol. 6. Nervous System Agents.* 6th Ed. D.J. Abraham (Ed.). Wiley 2003.
- [31] *British Pharmacopoeia 2009.* London, The Stationary Office 2009.
- [32] *United States Pharmacopoeia 30.* The United States Pharmacopoeial Convention 2006.
- [33] Madej K., Koscielniak P.: Review of analytical methods for identification and determination of PHEs and tricyclic antidepressants. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **38** (2008), 50–66.
- [34] Hefnawy M.M.: Analysis of certain tranquilizers in biological fluids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27** (2002), 661–678.
- [35] Bagli M., Rao M.L., Höflich G.: Quantification of chlorprothixene, levomepromazine and promethazine in human serum using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* **657** (1994), 141–148.

- [36] Ivandini T.A., Sarada B.V., Terashima C., Rao T. N., Tryk D.A., Ishiguro H., Kubota Y., Fujishima A.: Electrochemical detection of tricyclic antidepressant drugs by HPLC using highly boron-doped diamond electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **521** (2002), 117–126.
- [37] Song Q., Putcha L.: Quantitation of promethazine and metabolites in urine samples using on-line solid-phase extraction and column-switching. *J. Chromatogr. B* **763** (2001), 9–20.
- [38] Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., Simó-Alfonso E.F., García-Alvarez-Coque M.C.: Optimised procedures for the reversed-phase liquid chromatographic analysis of formulations containing tricyclic antidepressants. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32** (2003), 71–84.
- [39] Karpinska J., Starczewska B.: Simultaneous LC determination of some antidepressants combined with neuroleptics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29** (2002), 519–525.
- [40] Němec I., Kies H. L., Němcová I.: Kinetic data on the oxidation of the cobalt(II)-bipyridyl complex by copper(II) and iron(III) perchlorates in anhydrous acetonitrile. *Anal. Chim. Acta* **49** (1970), 541–555.
- [41] Cvačka J., Opekar F., Barek J., Zima J.: An amperometric detector with a platinum tubular electrode for high performance liquid chromatography. *Electroanalysis* **12** (2000), 39–43.
- [42] Miller J. N., Miller J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6th Edition. Harlow, Pearson 2010.
- [43] Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd Ed. Wiley 2010.