

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**Chemiluminiscenční stanovení thioridazinu,  
promethazinu a levomepromazinu metodou průtokové  
injekční analýzy**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Hradec Králové, 2007**

**GABRIELA KOLOUCHOVÁ**

### **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce RNDr. Janě Dolejšové, CSc. za pomoc, rady a odborné vedení při vypracování této práce. Děkuji i všem ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie, kteří svou pomocí přispěli k jejímu vzniku a dokončení. V neposlední řadě chci také poděkovat své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou.

## OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. ÚVOD .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2. CÍL PRÁCE.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>3. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>3.1. Fenothiazinová neuroleptika .....</b>  | <b>8</b>  |
| 3.1.1. Neuroleptika v praxi .....  | 9         |
| 3.1.2. Thioridazini hydrochloridum .....   | 10        |
| 3.1.3. Promethazini hydrochloridum .....   | 12        |
| 3.1.4. Levomepromazini hydrochloridum .....  | 12        |
| <b>3.2. Metody stanovení thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu .....</b>                        | <b>13</b> |
| 3.2.1. Lékopisné metody .....  | 13        |
| 3.2.2. Stanovení thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu metodou průtokové injekční analýzy ..... | 13        |
| <b>3.3. Průtoková injekční analýza.....</b>  | <b>20</b> |
| 3.3.1. Charakteristika metody .....  | 20        |
| 3.3.2. Základní složení systému průtokové injekční analýza .....                                       | 21        |
| 3.3.3. Výhody a praktické využití .....  | 22        |
| <b>3.4. Luminiscenční analýza .....</b>  | <b>22</b> |
| 3.4.1. Fluorimetrie .....  | 23        |
| 3.4.2. Chemiluminiscenční analýza .....  | 26        |
| <b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>4.1. Přístroje a pomůcky.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>4.2. Úprava fluorimetru pro chemiluminiscenční stanovení.....</b>                                   | <b>29</b> |
| <b>4.3. Použité chemikálie .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>4.4. Příprava roztoků.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>4.5. Popis a charakteristika základních funkcí programu .....</b>                                   | <b>33</b> |
| <b>FIA – 12.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>4.6. Měřicí průtokový systém.....</b>   | <b>33</b> |
| 4.6.1. Zapojení měřícího systému .....   | 34        |
| 4.6.2. Polohy dávkovače .....  | 35        |
| <b>4.7. Optimalizace podmínek stanovení .....</b>  | <b>35</b> |
| 4.7.1. Časové parametry systému průtokové injekční analýzy .....                                       | 36        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 4.7.2.      | Volba doby dávkování .....  | 36        |
| 4.7.3.      | Volba rychlosti čerpání roztoku.....                                      | 37        |
| 4.7.4.      | Nastavení nových časových parametrů.....                                  | 37        |
| 4.7.5.      | Volba koncentrace manganistanu draselného.....                            | 37        |
| 4.7.6.      | Volba koncentrace kyseliny sírové .....                                   | 37        |
| 4.7.7.      | Volba poměru činidel v nosném proudu.....                                 | 38        |
| 4.7.8.      | Vliv látek zvyšujících intenzitu chemiluminiscence .....                  | 38        |
| 4.7.8.1     | Vliv kyseliny mravenčí.....   | 38        |
| 4.7.8.2     | Vliv dodecylbenzensulfonátu sodného .....                                 | 38        |
| 4.7.8.3     | Vliv polyfosfátu sodného.....   | 39        |
| <b>4.8.</b> | <b>Stanovení vybraných neuroleptik.....</b>                               | <b>39</b> |
| 4.8.1.      | Stanovení thioridazinu .....  | 39        |
| 4.8.1.1     | Příprava kalibračních roztoků .....                                       | 39        |
| 4.8.1.2     | Měření kalibračních roztoků .....   | 39        |
| 4.8.1.3     | Příprava kalibračních roztoků s polyfosfátem sodným.....                  | 39        |
| 4.8.2.      | Stanovení promethazinu .....  | 40        |
| 4.8.2.1     | Příprava kalibračních roztoků .....                                       | 40        |
| 4.8.2.2     | Měření kalibračních roztoků .....   | 40        |
| 4.8.2.3     | Příprava kalibračních roztoků s polyfosfátem sodným.....                  | 40        |
| 4.8.3.      | Stanovení levomepromazinu.....  | 40        |
| 4.8.3.1     | Příprava kalibračních roztoků .....                                       | 40        |
| 4.8.3.2     | Měření kalibračních roztoků .....   | 41        |
| 4.8.3.3     | Měření kalibračních roztoků s polyfosfátem sodným.....                    | 41        |
| 4.8.4.      | Reprodukovatelnost metody .....   | 41        |
| 4.8.5.      | Stanovení thioridazinu v HVLP.....  | 42        |
| 4.8.5.1     | Stanovení thioridazinu v HVLP metodou průtokové injekční analýzy ..       | 42        |
| 4.8.5.2     | Zkouška na obsahovou stejnoměrnost .....                                  | 42        |
| 4.8.5.3     | Stanovení thioridazinu v HVLP metodou dle ČL 2002.....                    | 43        |
| 4.8.6.      | Stanovení promethazinu v HVLP .....                                       | 43        |
| 4.8.6.1     | Stanovení promethazinu v HVLP metodou průtokové injekční analýzy          | 43        |
| 4.8.6.2     | Zkouška na obsahovou stejnoměrnost .....                                  | 44        |
| 4.8.6.3     | Stanovení promethazinu v HVLP metodou dle ČL 2002 .....                   | 44        |
| 4.8.7.      | Stanovení levomepromazinu v HVLP .....                                    | 44        |
| 4.8.7.1     | Stanovení levomepromazinu v HVLP metodou průtokové injekční analýzy ..... | 44        |
| <b>5.</b>   | <b>VÝSLEDKY.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>5.1.</b> | <b>Optimalizace podmínek stanovení .....</b>                              | <b>46</b> |
| 5.1.1.      | Nastavení časových parametrů .....  | 46        |
| 5.1.2.      | Volba doby dávkování .....  | 47        |
| 5.1.3.      | Volba rychlosti čerpání roztoků.....                                      | 48        |
| 5.1.4.      | Nastavení nových časových parametrů.....                                  | 49        |
| 5.1.5.      | Volba koncentrace manganistanu draselného.....                            | 49        |
| 5.1.6.      | Volba koncentrace kyseliny sírové .....                                   | 51        |
| 5.1.7.      | Volba poměru činidel v nosném proudu.....                                 | 52        |
| 5.1.8.      | Vliv látek zvyšujících intenzitu chemiluminiscence .....                  | 53        |
| 5.1.8.1     | Vliv kyseliny mravenčí ( HCOOH ).....                                     | 53        |
| 5.1.8.2     | Vliv dodecylbenzensulfonátu sodného (DBS ).....                           | 54        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 5.1.8.3     | Vliv polyfosfátu sodného (PFS ) .....   | 55        |
| <b>5.2.</b> | <b>Stanovení obsahu thioridazinu .....</b>  | <b>56</b> |
| 5.2.1.      | Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu .....                                       | 56        |
| 5.2.2.      | Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu<br>s přídavkem polyfosfátu sodného .....    | 57        |
| <b>5.3.</b> | <b>Stanovení obsahu promethazinu .....</b>  | <b>59</b> |
| 5.3.1.      | Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu .....                                       | 59        |
| 5.3.2.      | Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu<br>s přídavkem polyfosfátu sodného .....    | 61        |
| <b>5.4.</b> | <b>Stanovení obsahu levomepromazinu .....</b>   | <b>63</b> |
| 5.4.1.      | Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu.....                                     | 63        |
| 5.4.2.      | Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu<br>s přídavkem polyfosfátu sodného ..... | 65        |
| <b>5.5.</b> | <b>Stanovení obsahu thioridazinu ve farmaceutickém přípravku .....</b>  | <b>67</b> |
| 5.5.1.      | Stanovení obsahu metodou průtokové injekční analýzy.....  | 67        |
| 5.5.2.      | Zkouška na obsahovou stejnoměrnost .....  | 68        |
| 5.5.3.      | Stanovení obsahu thioridazinu lékopisnou metodou ČL 2002 .....  | 68        |
| <b>5.6.</b> | <b>Stanovení obsahu promethazinu ve farmaceutickém přípravku .....</b>  | <b>70</b> |
| 5.6.1.      | Stanovení metodou průtokové injekční analýzy .....  | 70        |
| 5.6.2.      | Zkouška na obsahovou stejnoměrnost .....  | 71        |
| 5.6.3.      | Stanovení obsahu promethazinu lékopisnou metodou ČL 2002 .....  | 71        |
| <b>5.7.</b> | <b>Stanovení obsahu levomepromazinu ve farmaceutickém přípravku.....</b>                                      | <b>73</b> |
| 5.7.1.      | Stanovení obsahu metodou průtokové injekční analýzy.....  | 73        |
| <b>5.8.</b> | <b>Statistické vyhodnocení výsledků .....</b>   | <b>74</b> |
| 5.8.1.      | Moorův test .....   | 74        |
| 5.8.2.      | Studentův test.....   | 75        |
| <b>6.</b>   | <b>DISKUZE .....</b>  | <b>78</b> |
| <b>7.</b>   | <b>SOUHRN .....</b>   | <b>81</b> |
| <b>8.</b>   | <b>ZÁVĚR.....</b>   | <b>82</b> |
| <b>9.</b>   | <b>LITERATURA.....</b>  | <b>83</b> |

# 1. ÚVOD

Rostoucí požadavky na kontrolu chemického složení léčivých i pomocných látek neustále zvyšují nároky na množství prováděných rozborů, na zvětšování hranic koncentračních intervalů, ale i spolehlivost výsledků a rychlost analytických stanovení.

Snaha o zvýšení produktivity a spolehlivosti, především rutinních stanovení, vede ve farmaceutické analýze stále více k instrumentaci a automatizaci různých analytických metod a spojování několika analytických operací do tzv. automatických analyzátorů. Odstraňují se tak nevýhody manuálně prováděných měření, jako je velká spotřeba chemikálií, časová a manuální náročnost, zatížení výsledků hrubými experimentálními chybami, kontakt pracovníků s toxickými látkami aj.

Mezi takovéto instrumentální metody patří i průtoková injekční analýza ( dále FIA ), která je v principu, potřebném přístrojovém vybavení i praktickém provedení nejjednodušší analytickou automatizační jednotkou. Umožňuje kombinaci s mnoha analytickými technikami a ve spojení s chemiluminiscenční detekcí se vyznačuje i značnou selektivitou analýzy. Ve farmacii se FIA uplatňuje zejména při stanovení obsahu jednotlivých léčivých látek v substancích a lékových formách, kde je třeba rychlého a nenáročného stanovení poměrně malých množství účinné látky ve větším počtu vzorků.

V této diplomové práci jsem využila kombinace průtokové injekční analýzy a chemiluminiscenční detekce ke stanovení hydrochloridu thioridazinu, hydrochloridu promethazinu a hydrochloridu levomepromazinu ( dále thioridazin, promethazin a levomepromazin ). Jedná se o léčiva, která se v lékařství nejčastěji používají k léčbě závažných psychiatrických onemocnění, promethazin se používá hlavně jako antihistaminikum.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat chemiluminiscenční stanovení neuroleptika thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu za použití injekční průtokové analýzy a potom tuto metodu použít při stanovení léčiv v hromadně vyráběných léčivých přípravcích.

Princip stanovení byl založen na oxidaci léčiva na produkt, který poskytuje chemiluminiscenční záření, jež může být detekováno. Měření bylo provedeno v kapalně fázi. Jako oxidační činidlo jsem používala roztok manganistanu draselného v kyselém médiu, kyselině sírové.

Před vlastním měřením bylo nutné optimalizovat podmínky stanovení. Byly nastaveny vhodné časové parametry pracovního přístroje – doba dávkování, rychlost čerpání roztoků, které určují objem analyzovaného vzorku. Dále bylo nutné nalézt vhodnou koncentraci oxidačního činidla a kyseliny sírové a stanovit jejich optimální poměr v nosném proudu. Byl vyzkoušen i vliv některých látek zvyšujících intenzitu chemiluminiscence.

Za optimalizovaných podmínek jsem sestrojila kalibrační závislosti a poté přistoupila ke stanovení thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu ve farmaceutických přípravcích. Na závěr jsem obsah thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu stanovila srovnávací lékopisnou metodou. Výsledky obou stanovení jsem ve všech případech statisticky zhodnotila.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1. Fenothiazinová neuroleptika

Název antipsychotika je jedním z několika názvů pro označení skupiny látek používaných hlavně k léčbě schizofrenie, ale účinných i u jiných psychóz a u neklidných stavů. V Evropě se více používá název neuroleptika, protože tyto látky mají schopnost ovlivňovat některé integrační mozkové systémy.

Až do začátku 50. let 20. století neexistovaly přijatelné způsoby farmakoterapie schizofrenie. Tehdy se téměř současně objevily reserpin a chlorpromazin. Chlorpromazin byl vyvinut jako antihistaminikum a reserpin jako antihypertenzivum. Náhodná pozorování jejich zklidňujících vlastností vedla k zahájení zkoušek u psychiatrických pacientů. Úspěch chlorpromazinu vedl k zavedení četných fenothiazinových derivátů. [1]

Deriváty fenothiazinu tvoří i dnes nejdůležitější skupinu tricyklických neuroleptik. Vyznačují se společnou základní chemickou strukturou – fenothiazinovým skeletem s jednovazným substituentem v poloze 2 a bazickým řetězcem v poloze 10. Bazickou funkcí spojenou s jádrem prostřednictvím tříuhlíkatého řetězce bývá dimethylaminoskupina, substituovaný piperidinový nebo piperazinový kruh. Tato část molekuly do značné míry modifikuje její účinek kvalitativně. 3-Dimethylaminopropyl-, N-methyl-3-piperidylmethyl- a 2-(N-methyl-2-piperidyl)ethyl-deriváty se vyznačují především tlumivě neuroleptickým účinkem. Pro 3-(4-substituované piperidino)propyl- a 3-(4-substituované-1-piperazinyl)propyl-deriváty je příznačný antipsychotický neuroleptický účinek. U látek fenazinové řady (perfenazin, flufenazin) je možné získat esterifikací alkoholického hydroxyly v bazickém řetězci kyselinou heptanovou, resp. dekanovou, preparáty s dlouhodobou účinností.

Substituent v poloze 2 ovlivňuje účinnost neuroleptika po stránce kvantitativní. Srovnání v řadě promazinové, perazinové i fenazinové ukázalo, že při stejných bazických řetězcích se centrální účinek prohlubuje od látek v poloze 2 nesubstituovaných, přes chlor-, methoxy-, acyl- až k trifluormethylderivátům.

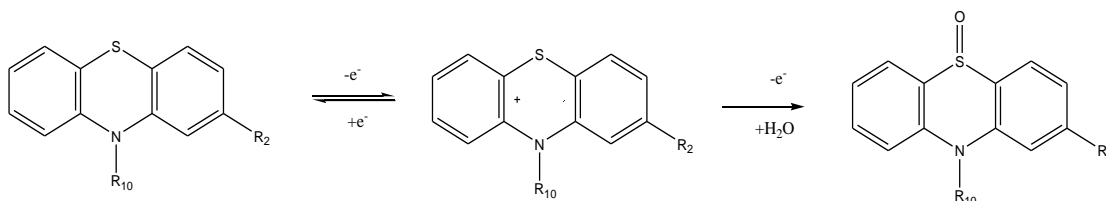
Náhradou jednoho nebo obou benzenových jader heterocykly (pyridin, pyridazin, pyrazin, thiofen) získané heteroanalogie fenothiazinových neuroleptik byly vesměs méně účinné a v praxi se neprosadily. [2]

Deriváty fenothiazinu jsou látky, které snadno podléhají oxidaci různými oxidačními činidly (např.  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). V kyselém vodném prostředí se



v prvním stupni reverzibilně oxidují za vzniku barevného radikalkationtu, který ve druhém stupni oxidace přechází ireverzibilně na bezbarvý sulfoxid. Průběh reakce závisí na kyselosti, koncentraci fenothiazinového derivátu i typu použitého oxidačního činidla.[3]

Obr. č. 1: Průběh oxidace fenothiazinových derivátů



### 3.1.1. Neuroleptika v praxi

Schizofrenie je druh psychózy, charakterizované především neporušeným vědomím, ale zřetelnou poruchou myšlení. Patogeneze je dosud neznámá. Objev antipsychotik podnítl výzkum, na jehož základě byla za nezbytnou podmínku vzniku psychotického onemocnění považována genetická predispozice. Přesvědčivý důkaz hereditární povahy schizofrenie však nebyl dosud získán.

Ze všech hypotéz je nejvíce propracována *dopaminová hypotéza* schizofrenie, která je podkladem racionálnější léčby. Není stále jasné, zda jsou poruchy při schizofrenii výsledkem nadměrné syntézy a uvolňování presynaptického dopaminu, jeho porušeného metabolismu, nebo zvýšené citlivosti postsynaptického receptoru. Jestliže by jedinou příčinou vzniku schizofrenie byly poruchy fyziologických dopaminergních funkcí, měly by mít antipsychotické léky daleko lepší léčebný efekt. Antipsychotika však mají u většiny nemocných jen částečný úspěch a u některých zcela selhávají.[ 1 ]

Antipsychotika jsou svým mechanismem účinku *antagonisté dopaminu*. Dopamin je zodpovědný za spontaneitu, iniciativitu, asertivitu v chování a za snahu po dominanci v mezilidských vztazích. Je-li jeho aktivita vystupňována, dochází pravděpodobně k agresivitě a za určitých okolností k paranoidním bludům a halucinacím. Tyto jevy jsou tzv. pozitivní příznaky schizofrenie, při kterých dochází k dopaminergní hyperaktivitě v limbickém systému. Tuto hyperaktivitu zabrzdí právě neuroleptika. Hlavním problémem je skutečnost, že při schizofrenii se zpravidla objevuje směs pozitivních a negativních příznaků ( emoční oploštělost, autismus atd. ), u kterých není blokáda dopaminergních neurotransmisí výhodná. Ještě závažnějším problémem je skutečnost, že při dlouhodobé blokádě receptoru dochází k jakési

denervační hypersenzitivě, což může usnadňovat vznik recidivy psychózy při přerušení terapie neuroleptikem.[ 4 ]

Předpokládá se, že antipsychotické působení spočívá ve schopnosti blokovat dopamin v mezolimbickém a mezofrontálním systému. Antagonizací dopaminu v nigrostriatálním systému se vysvětluje nežádoucí výskyt parkinsonismu po podávání antipsychotik.

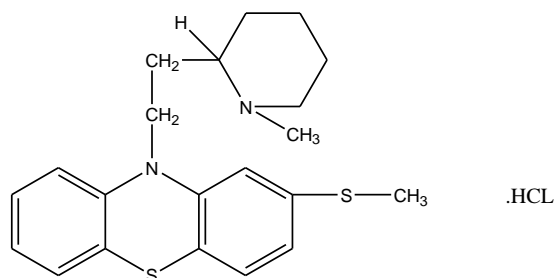
Přestože všechna účinná antipsychotika blokují D<sub>2</sub> receptory, stupeň blokady se ve vztahu k jiným účinkům na receptorech mezi jednotlivými látkami velmi liší. Chlorpromazin a thioridazin blokují α-adrenergní receptory více než D<sub>2</sub> receptory. Také blokují relativně silně serotoninové ( 5HT<sub>2</sub> ) receptory. Perfenazin zase účinkuje převážně na D<sub>2</sub> receptory.

Psychiatrické indikace: Primární indikací antipsychotik je schizofrenie, dále manická období u bipolární afektivní psychózy. Také se používají k úpravě porušeného chování u pacientů se senilní demencí Alzheimerova typu. Antipsychotika se rovněž mohou spolu s antidepresivy používat ke zvládnutí agitovanosti nebo psychózy u depresivních nemocných.

Nepsychiatrické indikace: S výjimkou thioridazinu má většina antipsychotik silný antiemetický účinek. Například prochlorperazin se používá pouze jako antiemetikum. Fenothiaziny s kratšími postranními řetězci mají výrazný tlumivý účinek na H<sub>1</sub> receptory a užívají se k léčbě svědění nebo jako sedativa v předoperační přípravě. Příkladem může být promethazin.[ 1 ]

### 3.1.2. Thioridazini hydrochloridum

10-{2-[(2RS)-1-methylpiperidin-2-yl]ethyl}-2-(methylsulfanyl)-10H-fenothiazin-  
hydrochlorid, C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 407,03



Charakteristika: Thioridazin je fenothiazinové neuroleptikum, jehož neuroleptický účinek je poněkud slabší než chlorpromazinu, velkou výhodou je minimum nežádoucích vedlejších účinků ( útlum ). Při běžném dávkování nevyvolává extrapyramidové příznaky. Má i aktivitu antianxiózní a antidepresivní. Používá se i mimo oblast psychiatrie ( psychózy, neurózy ) např. ve vnitřním lékařství a gynekologii. [ 2 ] Thioridazin v dávkách nad 300 mg denně téměř vždy působí menší změny T vlny, které se snadno upraví snížením dávky. Nadměrné dávky thioridazinu jsou spojeny se závažnějšími srdečními arytmiemi, blokádu srdečního převodu a náhlou smrtí. Není jisté, může-li thioridazin způsobit stejné poruchy i v terapeutických dávkách. Kombinace různých tricyklických antidepresiv a thioridazinu je nutno indikovat pouze s velkou obezřetností, protože může dojít k aditivnímu antimuskarinovému a chinidinovému působení.

Smrtelné otravy antipsychotiky jsou vzácné. Výjimku tvoří otravy mesoridazinem a thioridazinem. Hlavním příznakem je u nich ospalost, která se prohlubuje až do kómatu a je přerušena občasnými obdobími agitace. Letální účinky jsou podmíněny komorovými arytmiemi. Thioridazin je jediné antipsychotikum, které působí depozita v sítnici. Postižení pacienti obvykle udávají hnědavé vidění. Maximální denní dávka byla omezena na 800 mg, aby se pravděpodobnost vzniku této komplikace snížila. [ 1 ]

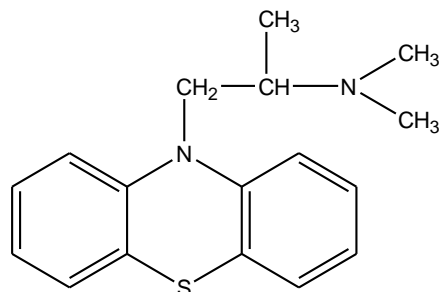
Popis a vlastnosti: Báze taje při 72 – 74 °C. Thioridaziniumchlorid tvoří bílé krystalky tající při 158 – 160 °C. [ 2 ]

Rozpustnost: Je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96 % a prakticky nerozpustný v etheru. [ 5 ]

### 3.1.3. Promethazini hydrochloridum

Je to (2RS)-1-(10H-fenothiazin-10-yl)-N,N-dimethylpropan-2-amin-hydrochlorid,

$C_{17}H_{21}ClN_2S$ ,  $M_r = 320,88$



.HCl

Charakteristika: Promethazin je jedním z neúčinnějších antihistaminik. Kromě antihistaminového účinku však působí též analgeticky, sedativně a hypnoticky. Používá se při alergických onemocněních, dále při parkinsonismu a poruchách spánku. Má také antiemetické účinky.

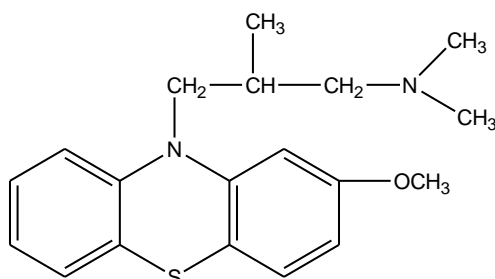
Popis a vlastnosti: Báze promethazinu krystaluje ve dvou modifikacích. Stálá modifikace taje při 70 – 71 °C, nestálá modifikace při 67 °C. Promethaziniumchlorid je bezbarvý mikrokrystalický prášek hořké chuti, tající při 230 – 232 °C. Na vzduchu se barví modře.

Rozpustnost: Velmi snadno se rozpouští ve vodě, dobře v ethanolu a chloroformu, je prakticky nerozpustný v diethyletheru a acetonu. [ 2 ]

### 3.1.4. Levomepromazini hydrochloridum

(2R)-3-(2-methoxy-10H-fenothiazin-10-yl)-N,N,2-trimethylpropan-1-amin-

hydrochlorid,  $C_{19}H_{25}ClN_2OS$ ,  $M_r = 364,93$



.HCl

Charakteristika: Levomepromazin má až dvakrát výraznější neuroleptický účinek než chlorpromazin, výrazněji se projevuje sedativní a analgetická složka účinku a rovněž působení antianxiózní a antidepressivní. Vyvolává značnou somnolenci, čehož se využívá při léčbě nespavosti. V nízkých dávkách se uplatňuje jako antineurotikum. [ 2 ]

Popis a vlastnosti: Bílý nebo velmi slabě nažloutlý krystalický prášek, slabě hygroskopický, na světle a vzduchu je nestálý. Vyskytuje ve dvou formách; jedna taje při asi 142 °C, druhá při asi 162 °C.

Rozpustnost: . Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.[ 5 ]

### **3.2. Metody stanovení thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu**

#### **3.2.1. Lékopisné metody**

V českém lékopise 2002 ( ČL 2002 ) je uveden článek nazvaný Thioridazini hydrochloridum. Stanovení obsahu dle ČL 2002: 0,300 g se rozpustí ve směsi 10 ml kyseliny octové bezvodé R a 60,0 ml acetanhydridu R a titruje se kyselinou chloristou 0,1 mol / l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. 1 ml kyseliny chloristé 0,1 mol / l odpovídá 40,70 mg sloučeniny  $C_{22}H_{27}ClN_2S_2$ . [ 5 ]

V ČL 2002 je dále uveden článek nazvaný Promethazini hydrochloridum. Stanovení obsahu dle ČL 2002: 0,250 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol / l VS a 50 ml lihu 96 % R a titruje se hydroxidem sodným 0,1 mol / l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body. 1 ml hydroxidu sodného 0,1 mol / l VS odpovídá 32,09 mg  $C_{17}H_{21}ClN_2S$ . [ 5 ]

V ČL 2002 je uveden článek nazvaný Levomepromazini hydrochloridum. Stanovení obsahu dle ČL 2002: 0,300 g se rozpustí v 5 ml vody R, přidá se 50 ml propan-2-olu a titruje se hydroxidem sodným 0,1 mol / l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. 1 ml hydroxidu sodného 0,1 mol / l VS odpovídá 36,49 mg sloučeniny  $C_{19}H_{25}ClN_2OS$ . [ 5 ]

#### **3.2.2. Stanovení thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu metodou průtokové injekční analýzy**

Bylo publikováno několik prací, které se zabývají FIA metodou stanovení feno-thiazinových derivátů s využitím chemiluminiscenční detekce.

Cepaz, Silva, Perez-Bendito využili ve své práci ke stanovení fenothiazinů (acepromazinu, propiopromazinu, promazinu, thioridazinu, trimeprazinu a chlorpromazinu) peroxyoxalátový systém – systém bis ( 2,4,6-trichlorfenyl )oxalát – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pracovní roztok byl připraven smísením maximálně 915,0 μl standardního roztoku obsahujícího 20,0 pmol-200,0 nmol fenothiazinu, 65,0 μl vodného 33 % roztoku peroxidu vodíku a 20,0 μl 0,05 mol / l pufru o pH=9 a zředěn na objem 1,0 ml acetonem. Reakce byla zahájena kontinuálním přidavkem 0,05 mol / l bis ( 2,4,6-trichlorfenyl )oxalátu ( 6,5 ml /min ). S ohledem na emisní pozadí byl sledován vliv pH, obsahu vody a koncentrace činidel na maximální reakční rychlost acepromazinu. Rozsah linearit kalibračních křivek byl dosažen přes tři řády, detekční limit byl v řádu pmol. Relativní směrodatná odchylka ( n=11 ) byla od 1,0-3,75 %. Metodou bylo dosaženo 90 analýz za hodinu. Metoda byla použita pro stanovení acepromazinu v koňské plazmě s návratností 94,4-102 %. [ 6 ]

Kojlo, Michalowski a Wolyniec vypracovali metodu chemiluminiscenčního stanovení thioridazinu ve farmaceutických přípravcích FIA metodou. Jako potenciální činidla pro chemiluminiscenční stanovení pomocí oxidace fenothiazinových derivátů byl testován peroxid vodíku, manganistan draselný, dichroman draselný, hexakynoželezitan draselný a síran ceřičitý. Ale pouze s manganistanem draselným v kyselém prostředí bylo dosahováno uspokojivých výsledků. Celkem 13 různých fenothiazinových derivátů produkuje luminiscenci různé intenzity v závislosti na oxidaci. Detekční limit je  $12 \cdot 10^{-6}$  mol / l . Může být stanoveno až 110 vzorků za hodinu. [ 7 ]

Sultan, Hassan a Abulkibash popisují novou, specifickou a vysoce citlivou průtokovou injekční metodu pro stanovení promethazinu hydrochloridu za použití peristaltické a injekční pumpy. Tato metoda je založena na produkci chemiluminiscenčního záření, které je výsledkem oxidační reakce s manganistanem draselným v prostředí kyseliny sírové. Optimální chemické podmínky byly: koncentrace manganistanu draselného  $2,1519 \cdot 10^{-4}$  mol / l v 0,01 mol / l kyselině sírové při rychlosti peristaltické pumpy 45 ml / s a injekční pumpy 40 ml / s. Metoda byla vytvořena tak, aby byla aplikovatelná v koncentračním rozmezí promethazinu hydrochloridu od  $1,558 \cdot 10^{-5}$  do  $1,8697 \cdot 10^{-3}$  mol / l. [ 8 ]

Také Xue, He, Feng a Lu využili ve své práci ke stanovení promethazinu hydrochloridu průtokovou injekční analýzu s chemiluminiscenční detekcí. Při této metodě byl roztok vzorku injikován do systému, kde byl smíchán s proudem 0,3 % glyoxalu, následovala reakce s proudem 0,5 mM  $\text{KMnO}_4$  a 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a chemiluminiscenční detekce. Kalibrační křivka pro hydrochlorid promethazinu byla lineární v oblasti od 0,1-6  $\mu\text{M}$  a detekční limit byl 35 nM. Relativní směrodatná odchylka byla 2,3-2,7 %. Metoda byla aplikovaná u injekčních roztoků a tablet. Výsledky byly shodné s výsledky, které byly získány metodou publikovanou v Čínském lékopise. [ 9 ]

Aly, Alarfaj, Alwarthan popsali ve své práci FIA metodu stanovení fenothiazinů flufenazinu ( I ), levomepromazinu ( II ) a trimeprazinu ( III ) v biologických tekutinách s využitím chemiluminiscence. Vzorek rozdrcených tablet obsahující přibližně 20 mg léčiva byl extrahován 60,0 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol / l. 3,0 ml moči nebo alkalické plazmy byly extrahovány 20,0 ml směsi heptan / isoamyl alkoholu ( 197 : 3 ). Organická část byla odpařena dosucha a rozpuštěna v kyselině chlorovodíkové 0,1 mol / l. Pro stanovení I a II byly extrakty zředěny na objem 100,0 ml přidavkem 70,0  $\mu\text{g}$  / ml rhodamidu-B. 200,0  $\mu\text{l}$  připraveného roztoku bylo nadávkováno do nosného proudu kyseliny chloristé 2,0 mol / l ( 3,65 ml / min ), který byl následně smíchán s proudem  $\text{Ce}^{4+}$  ( 3,65 ml / min ) v kyselině sírové 50,0 mmol / l. Koncentrace  $\text{Ce}^{4+}$  byla 10,0 mmol / l (I), 5,0 mmol / l (II) a 1,0 mmol / l (III). Kalibrační křivky byly lineární v rozsahu 0,5 – 90,0  $\mu\text{g}$  / ml (I) a 0,1 – 6,5  $\mu\text{g}$  / ml pro II a III. Detekční limit byl 0,01  $\mu\text{g}$  / ml (I) a 0,1  $\mu\text{g}$  / ml pro II a III. Metodou bylo dosaženo více než 129 analýz za hodinu. Průměrná návratnost léčiv byla vyšší než 86,7 %. [ 10 ]

#### Další metody FIA stanovení:

Spektrofotometrické stanovení thioridazinu a chlorpromazinu ve farmaceutických přípravcích. 204  $\mu\text{l}$  roztoku 0,5 M HCl bylo injikováno do proudu vody ( 0,8 ml / min ). 285  $\mu\text{l}$  vzorku fenothiazinu bylo injikováno do paralelního proudu vody ( 1,3 ml / min ). Proudů byly přiváděny na pevnou fázi reaktoru obaleného  $\text{FePO}_4$  a uzavřeného v pryskyřici, přístroj byl zahřán na teplotu 42°C. Kalibrační křivka byla lineární pro 250-400  $\mu\text{g}$  / ml thioridazinu hydrochloridu při 636 nm a 250-500  $\mu\text{g}$  / ml chlorpromazinu hydrochloridu při 526 nm. Relativní směrodatná odchylka u thioridazinu byla 2,8 % a u chlorpromazinu 3,4 %. [ 11 ]

Spektrofotometrické stanovení thioridazinu za využití reaktoru s pevnou fází obsahující  $\text{PbO}_2$  upevněném na polymeru ( polyester pryskyřice, poměr  $\text{PbO}_2$  / pryskyřice byl 3 : 1 ). Ke stanovení byl použit roztok thioridazinu v 0,1 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Ten společně s nosným proudem protéká reaktorem, kde je  $\text{PbO}_2$  thioridazinem redukován. Následuje reakce uvolněných  $\text{Pb}(\text{II})$  s proudem činidla 2  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}(\text{II})$  a 4  $\mu\text{M}$  EDTA v reakční cívce ( 15 cm dlouhé ), kde se uvolní  $\text{Mn}(\text{II})$ , které katalyzují reakci 14 mM jodistanu a 1 mM diethylanilinu v pufru  $\text{H}_3\text{PO}_4$  /  $\text{NaOH}$  o pH 7 v další reakční cívce dlouhé 528,5 cm. Detekce je při 470 nm. Kalibrační křivka je lineární v oblasti 0,25-5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Relativní směrodatná odchylka (  $n=40$  ) činí 1,3 %. Takto může být stanoveno 39 vzorků za hodinu. [ 12 ]

Spektrofotometrické stanovení thioridazinu za využití reaktoru s pevnou fází obsahující arzenitan ceřičitý ( částice velké 150-200  $\mu\text{m}$  ). Dávky ( 433,8  $\mu\text{l}$  ) standardního roztoku thioridazinu byly smíchány s roztokem 0,5 M  $\text{HCl}$  a vzniklá směs byla injikována do proudu vody o rychlosti 3,23 ml / min. Směs byla dále vedena na pevnou fází reaktoru a absorbance modrého produktu byla měřena při 630 nm. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 5-140  $\mu\text{g} / \text{ml}$  a relativní směrodatná odchylka (  $n=66$  ) byla 2,2 % pro 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Metodou bylo dosaženo 74 analýz za hodinu. Metoda byla použita k analýze tří farmaceutických preparátů s relativní chybou 1,6-2,7 %. Byl také prověřen vliv sacharózy, laktozy a ethanolu na analýzu. Pouze ethanol o stejné koncentraci jako thioridazin má významný vliv na analýzu. [ 13 ]

Spektrofotometrické stanovení 10 – 250  $\mu\text{g} / \text{ml}$  fenothiazinových derivátů (chlorpromazinu, promethazinu, promazinu, methotrimeprazinu, thioproperazinu, fluphenazinu, trifluoperazinu a thioridazinu).Roztoky ( 200  $\mu\text{l}$  ) farmaceutických preparátů obsahujících fenothiazin byly vedeny rychlostí 2,4 ml / min do systému automatické průtokové injekční analýzy s roztokem 2,74 mM  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  a 10 M  $\text{HClO}_4$  jako oxidačního činidla a vody jako nosiče. Vzniklé produkty byly vedeny do spektrofotometru nastaveného na maximální vlnovou délku jednotlivých drog. Metodou bylo dosaženo až 120 analýz za hodinu. [ 14 ]

Spektroelektroanalytická metoda pro stanovení promethazinu hydrochloridu je založena na detekci in situ barevných kationaktivních radikálů vytvořených během elektrooxidace na zlaté elektrodě v prostředí 0,1 mol / l kyseliny sírové. Tato metoda nabízí mnoho výhod jako je jednoduchost, rychlost, selektivita a citlivost. Byla



zkoumána možnost stanovení promethazinu hydrochloridu jak v čisté formě tak ve farmaceutických přípravcích pomocí amperometrie a absorpční fotometrie. Amperometrický signál může být použit ke stanovení promethazinu v jednoduchých preparátech ( Fenegan ), fotometrický signál se může stát rozhodujícím jestliže jsou v preparátu obsaženy i další elektroaktivní látky, např. dipyron ( Lisador ). U Feneganu jsou výsledky této metody shodné s výsledky oficiální metody doporučené v Britském lékopise. Stanovení touto oficiální metodou u Lisadoru je rušeno přítomností dipyronu. [ 15 ]

FIA stanovení promethazinu za použití dvou ionto-selektivních elektrod jako detektoru. Tetrafenylborat promethazinu ( 40 mg ) byl rozpuštěn ve 2 g 2-nitrophenyl-octyl-etheru ( NPOE, pro typ A ISE ) nebo ve 2 g bis ( 2-ethylhexyl )sebacatu ( BEHS, pro typ B ISE ). Dávky ( 0,4 ml ) každého snímaného materiálu byly imobilizovány v 6 ml tetrahydrofuranu obsahujícího 180 mg PVC. Dávky standardního roztoku promethazinu byly vstříknuty do nosného proudu ( 6 ml / min ) 0,01 M fosfátového pufru o pH 6 nebo 0,01 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Obě ISE vykazovaly lineární odezvu ke koncentracím promethazinu od 0,5 μM do 0,1 mM s detekčním limitem 0,2 μM. V 0,01 M fosfátovém pufru o pH 6 typ B ISE vykazoval menší detekční limit a reprodukovatelnost než typ A. Výsledky souhlasily s výsledky získanými metodou USP. [ 16 ]

Nepřímé potenciometrické stanovení chlorpromazinu oxidací na pevné fázi. Reaktor byl připraven smísením 25 g PbO<sub>2</sub> s 15 g Al-100 polyesterového pryskyřičného roztoku a 0,5 ml methyl-ethyl ketonu jako katalyzátoru. Hmota byla poté redukována do malých kuliček a inkorporována do PTFE tuby ( 16 cm × 0,1 mm ). Roztok vzorku (250,0 μl) byl aspirován do proudu 0,075 mol / l KNO<sub>3</sub> ( 1,9 ml / min ). Při průchodu reaktorem došlo k chemické reakci, při které se do nosného proudu uvolnily ionty Pb<sup>2+</sup>, které byly následně detekovány. Kalibrační křivka chlorpromazinu byla lineární v rozsahu 0,01-2,0 μg / ml, relativní směrodatná odchylka ( n=22 ) pro 1,0 μg / ml byla 1,4 %. Metodou bylo dosaženo 20 analýz za hodinu. Metoda byla použita pro stanovení chlorpromazinu v injekčních přípravcích. Vhodnost metody pro další fenothiaziny byla ověřena na promazinu a promethazinu. Kalibrační křivky dosahovaly linearity od 0,01 do 1,0 μg / ml. [ 17 ]

Stanovení promethazinu hydrochloridu turbidimetrickou metodou. Droga byla extrahována z tablet vodou a dávka ( 91,8  $\mu$ l ) byla injikována do nosného proudu (0,97 ml / min), který se skládal ze směsi 1,16 mM modrého bromofenolu a 86 mM KCl, který byl nastavena pH 1,2 pomocí HCl. Reakční spirála byla zhotovena z teflonových trubiček a zákal byl změřen při 650 nm. Kalibrační křivka byla lineární od 25 do 197 ppm promethazinu s variačním koeficientem 1,3 %. [ 18 ]

Spektrofotometrické stanovení promethazinu hydrochloridu za použití FIA metody s reaktorem s pevnou fází obsahující arsenitan ceřičitý. Detekce je založená na oxidaci Ce ( IV ) se sledováním přechodného červeného zbarvení při 514 nm. Kalibrační křivka byla lineární od 5 do 400  $\mu$ g / ml promethazinu hydrochloridu a variační koeficient byl 0,5 % ( n=40 ). Detekční limity by mohly být zlepšeny fluorimetrickou detekcí a metoda může být použita při kvalitativní kontrole farmaceutických preparátů. [ 19 ]

Fluorimetrické stanovení fenothiazinových derivátů fotooxidací v průtokovém injekčním systému. Standardní roztok fenothiazinových derivátů ve vodě nebo v ethanolu byl aspirován do vodného nosného proudu. Po ozáření v PTFE reaktoru (0,5mm) 254 nm rtuťovou lampou byla změřena fotochemicky indukovaná fluorescence. Kalibrační křivky dosahovaly linearitu přes tři řády, detekční limit byl 13,0 ng / ml. [20]

Spektrofotometrické stanovení promethazinu hydrochloridu. Vzorek byl rozpuštěn v 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a roztok byl injikován do nosného proudu ( 4 ml / min ) 0,303 mM Ce ( IV ) v 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance vzniklého zbarvení byla změřena při 514 nm. Kalibrační křivka byla lineární od 10,3 do 51,3 ppm promethazinu. Variační koeficient ( n=40 ) byl 1,2 % pro 35 ppm promethazin. Tato metoda byla použita pro stanovení promethazinu v preparátech. [21]

Současné průtokové injekční stanovení chlorpromazinu a promethazinu fotochemickou reakcí. Chlorpromazin a promethazin byly současně stanoveny pomocí UV záření. Metoda byla založena na rozdílu pH média, kde se konala fotochemická konverze chlorpromazinu a promethazinu na fluorescenční produkt. Bylo stanoveno 30-40 vzorků za hodinu. Variační koeficient byl od 2-4 %. Metoda byla použita ke

stanovení chlorpromazinu a promethazinu ve farmaceutických preparátech, výsledky souhlasily s očekávanými hodnotami. [ 22 ]

Spektrofotometrické stanovení fenothiazinových neuroleptik ve farmaceutických přípravcích s využitím 0,4 % roztoku vanadičnanu amonného ve zředěné kyselině sírové. Pro chlorpromazin, promethazin, trimeprazin a perfenazin byla koncentrace kyseliny 0,5; 1,5; 0,6 a 0,5 M a detekce byla při 526; 515; 510 a 525 nm. Variační koeficient ( n=7 ) byl  $\leq 0,5$  %. Metodou bylo dosaženo 129-150 analýz za hodinu. Výsledky byly porovnávány s oficiálními lékopisnými metodami. [ 23 ]

Průtoková injekční fluorimetrická analýza některých aminophenothiazinů založená na fotooxidaci. Vodný trifluoperazin o pH 6 ( 300  $\mu$ l ) byl injikován do proudu vody, který procházel 200 cm dlouhou PTFE trubicí obklopenou UV lampou a fluorescence trifluoperazinu indukovaná fotooxidací byla změřena při 424 nm. Kalibrační křivka byla lineární od 0,5 – 480  $\mu$ g / ml. Relativní směrodatná odchylka byla 3,2 % ( n=6 ). Detekční limit byl 0,06  $\mu$ g /ml trifluoperazinu. Metoda byla dále použita ke stanovení ethoperazinu, levomepromazinu a thioproperazinu v moči a kromě ethoperazinu i ve farmaceutických přípravcích. [ 24]

Spektrofotometrické stanovení 5,0 – 250,0  $\mu$ g / ml fenothiazinových derivátů (prochlorperazinu, thioridazinu, levomepromazinu, perfenazinu, trifluoperazinu a flufenazinu) za využití reaktoru s MnO<sub>2</sub> ( 50 mm  $\times$  1,2 mm ) a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 mol / l jako nosného proudu ( 0,6 ml / min ). Objem vzorku injikovaný do systému byl 100,0  $\mu$ l, relativní směrodatná odchylka ( n = 10 ) pro prochlorperazin maleát o koncentraci 75,0  $\mu$ g / ml byla 1,2 %. Metodou bylo dosaženo 50 analýz za hodinu. Metoda byla použita pro stanovení léčiv v tabletách, výsledky pak porovnány s lékopisným spektrofotometrickým stanovením. [ 25 ]

Fotochemické – spektrofluorimetrické stanovení fenothiazinových sloučenin s využitím průtokových metod. Vzorek fenothiazinu byl po aspiraci do nosného proudu průtokového systému ozářen 254 nm radiací a intenzita fluorescence produktu změřena při 373 nm ( excitace při 253 nm ). Vodný roztok chlorpromazinu (I) a promethazinu (II) a roztok perfenazinu (III) v 5,0 mmol / l kyselině chlorovodíkové byl injikován do 1,0 mmol / l kyseliny chlorovodíkové (I,III), 1,0 mmol / l hydroxidu sodného (II) jako nosného proudu. Detekční limit byl 20,0 (I), 50,0 (II) a 20,0 (III) ng / ml a kalibrační

křivky lineární do 2,0-3,0 mg / ml. Relativní směrodatná odchylka ( n = 11 ) pro koncentraci léčiva 1,0 mg / ml byla 2 %. [ 26 ]

#### Příklady dalších metod stanovení thioridazinu:

Kvantitativní stanovení 48 antidepressiv a antipsychotik pomocí HPLC. [ 43 ]

HPLC rozlišení enantiomerů thioridazinu z farmaceutických drog. [ 44 ]

Stanovení strukturálně podobných fenothiazinů pomocí kapilární elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie. [ 45 ]

#### Příklady dalších metod stanovení promethazinu:

Stanovení promethazinu ve farmaceutických drogách s využitím potenciometrie.

Detekční limit se nacházel v oblasti  $10^{-7}$  M. [ 46 ]

Stanovení promethazinu hydrochloridu s využitím chemometrické optimalizace a metody SIA. Detekční limit byl  $7,032 \times 10^{-5}$  mol / l. [ 47 ]

Stanovení fenothiazinových derivátů pomocí tenkovrstevné chromatografie kombinovanou s densitometrií. [ 48 ]

#### Příklady dalších metod stanovení levomepromazinu:

Současné stanovení levomepromazinu a klozapinu a jejich hlavních metabolitů v lidské plasmě pomocí HPLC-UV metody. [ 49 ]

### **3.3. Průtoková injekční analýza**

#### **3.3.1. Charakteristika metody**

Průtoková injekční analýza je kinetická metoda analýzy, částečně nebo úplně automatizovaná, založená na kombinaci injikování přesného objemu roztoku vzorku, kontrolované disperzi a plném dodržování experimentálních podmínek. To vše zaručuje vysokou reprodukovatelnost výsledků, i když je mísení vzorku a činidla neúplné, chemická reakce nedosahuje rovnováhy a získaný signál je nestacionární.

Při nejjednodušším provedení průtokové injekční analýzy se do proudu činidla injikuje přesný objem vzorku. Během pohybu v kapiláře dochází k jejich vzájemnému

mísení a chemické reakci. Reakční produkt se měří v průtokovém detektoru, jehož signál je registrován zapisovačem nebo počítačem ve formě piků. Jejich výška je přímo úměrná koncentraci analytu. Při nejběžnějším způsobu provedení se však vzorek nedávkuje přímo do proudu činidla, ale do nosného proudu ( voda, pufr ), který se pak kontinuálně mísí s proudem činidla, respektive činidel.

Pro průtokovou injekční analýzu může být použita každá chemická reakce, která je dostatečně citlivá a jejíž produkt je detekovatelný instrumentálními analytickými metodami, např. enzymatické, redoxní, katalytické reakce, tvorba komplexů a barviv aj. Jednotlivé analytické operace potřebné k tomu, aby byl vzorek převeden do stavu vhodného k detekci a kvantifikaci ( např. redukce, extrakce, dialýza aj. ), se provádějí kontinuálně přímo v průtokovém systému.

Roztok injikovaný do nosného proudu je otevřený systém, probíhá zde látková i energetická výměna. Na rozdíl od segmentované kontinuální průtokové analýzy není nutné dosáhnout chemické rovnováhy. Je dostačující, proběhne-li chemická reakce např. jen z 50 % a reakční produkt nemusí být stabilní. Základním předpokladem stanovení však je, aby byly zachovány konstantní experimentální podmínky.

Převedení známého způsobu manuálního stanovení dané látky na techniku průtokové injekční analýzy je vždy nutné experimentálně ověřit a jednotlivé parametry ovlivňující takovéto stanovení optimalizovat. Obvykle se jedná o optimalizaci objemu dávkovaného vzorku, průtokových rychlostí, délky reakčních cívek, koncentrací činidel.

### **3.3.2. Základní složení systému průtokové injekční analýzy**

Základní vybavení pro FIA se skládá z čerpadla, dávkovacího injektoru, reakčních cívek, mísícího bloku, detektoru a zapisovače.

Na ČERPADLA je kladen základní požadavek bezpulzního, konstantního toku nosných proudů a činidel. Nejčastěji se využívají vícekanálová peristaltická čerpadla. Pohyb vzorku a roztoků činidel probíhá v trubicích a reakčních cívkách, které jsou vyrobené obvykle z teflonu nebo polyethylenu. Volbou délky a průměru reakčních cívek, volbou průtokové rychlosti a objemu dávkovaného vzorku můžeme ovlivnit disperzi, tj. stupeň zředění vzorku a poměr, ve kterém se vzorek mísí s nosným proudem.

INJEKTOR ( dávkovač ) musí umožňovat rychlé a přesné nadávkování vzorku do systému, aniž by se porušil tok nosného proudu. Nejčastěji se používají injektory na

principu otočného kohoutu. Ovládají se ručně, elektronicky nebo pneumaticky s automatickým odběrem vzorku ze zásobníku.

Na DETEKTORY se kladou požadavky rychlé odezvy při použití malých objemů vzorku ( desítky až stovky mikrolitů ). Jejich výběr je závislý na použité chemické reakci a reakčním produktu. Nejčastěji jsou využívány detekční metody optické a elektrochemické. Z optických metod detekce se využívá spektrofotometrie, fluorimetrie, chemiluminiscence, atomová absorpční spektrometrie a atomová emisní spektrometrie s plazmovým hořákem. K používaným elektrochemickým detektorům patří voltametrické, amperometrické a polarografické detektory i použití iontově selektivních elektrod. Lze využít i detektory umožňující stanovení pomocí enzymů. Enzymy mohou být volné nebo mohou být zakotveny v enzymových reaktorech přímo řazených do průtokového systému.

### **3.3.3. Výhody a praktické využití**

Průtoková injekční analýza je jedna z velmi výkonných a všestranných technik (60 – 120 analýz za hodinu, různé detektory) sloužící především k automatizaci chemických analýz. Průtoková injekční analýza je obecně přesnější a spolehlivější než manuální provedení analýz, spotřeba činidel pak výrazně nižší. Vyloučením manuálních operací, včetně subjektivity pracovníka, a zajištěním konstantních experimentálních podmínek je u této metody dosaženo vysoké reprodukovatelnosti výsledků. Výsledek lze obvykle odečíst 30-60 sekund od nástřiku roztoku vzorku, limitujícím faktorem je pouze vlastní příprava vzorku. Měření probíhá v uzavřeném systému, takže nedochází ke kontaminaci vzorku ani expozici osob toxickými látkami.

Prakticky se FIA využívá pro rychlé a přesné stanovení většího počtu vzorků. Začíná se používat v různých odvětvích: potravinářství, zemědělství ( např. stanovení dusitanů ve vodě a půdě ) a také ve zdravotnictví. Ve farmacii se uplatňuje především při stanovení jednotlivých léčivých látek v substancích a lékových formách, při stanovení obsahové stejnoměrnosti, při sledování disolučního procesu pevných lékových forem, při zjišťování vazebnosti léčiv na bílkoviny. [ 27 ]

### **3.4. Luminiscenční analýza**

Pojem luminiscenční analýza zahrnuje všechny analytické metody, které využívají k důkazu nebo stanovení látek jejich schopnost vydávat za určitých podmínek luminiscenci ( světélkování ) neboli studené záření, popř. které jsou schopny vyvolat

tento jev v jiných látkách. Látky s luminiscenčními vlastnostmi se nazývají svítivé látky neboli luminofory.

Ke vzniku luminiscence je třeba, aby látka nejprve absorbovala energii a její atomy nebo molekuly přešly na vyšší kvantové elektronové hladiny. Získanou energii pak látka opět může za příznivých okolností vyzářit jako luminiscenci.

Podle příčin, jež vyvolávají luminiscenční záření, se rozeznává:

Fotoluminiscence – podnětjena absorpcí elektromagnetického záření

Chemiluminiscence – vyvolána energií chemických reakcí; vzniká-li v živých organismech, nazývá se bioluminiscence

Termoluminiscence – vzniká působením tepelné energie, obvykle při teplotách nižších než asi 500 °C

Elektroluminiscence – záření látek v elektrickém poli

Jiné druhy luminiscence ( triboluminiscence, sonoluminiscence atd. ) zatím nemají v analytické chemii praktické použití. Farmacie je jedním z prvních oborů, v němž byla luminiscenční analýza použita pro praktické účely v širším měřítku. [ 28 ]

### 3.4.1. Fluorimetrie

Fotoluminiscenční záření vysílají molekuly excitované ultrafialovým nebo viditelným zářením při návratu do energeticky nižšího stavu. Při fotoluminiscenci látka nejdříve absorbuje elektromagnetické záření = *primární záření*. Molekuly se dostávají do excitovaného stavu a při přechodu do stabilnějšího stavu o nižší energii uvolňují energii ve formě emise záření = *sekundární záření*. Emitované záření má menší energii, počítanou na foton, než primární ( budící ) záření a tedy delší vlnovou délku.

Rozeznáváme dva typy fotoluminiscence:

❖ Fluorescenci – látka emituje sekundární záření pouze po dobu působení primárního záření (  $10^{-8} - 10^{-5}$  s )

❖ Fosfoescenci – látka emituje sekundární záření ještě nějakou dobu i když primární záření přestalo působit (  $10^{-2}$  s až několik dní )

Fluorescenci charakterizují dvě spektra:

❖ Excitační spektrum – vyjadřuje závislost emisního signálu tj. intenzity fluorescence na vlnové délce primárního záření s konstantní intenzitou

❖ Emisní spektrum – udává závislost intenzity fluorescence na vlnové délce sekundárního záření při konstantních podmínkách primárního záření

U zředěných roztoků je intenzita fluorescence úměrná koncentraci stanovované látky.

$$I_F = I_0 \cdot K \cdot \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

$I_F$  – intenzita chemiluminiscence

$I_0$  – intenzita primárního záření

$K$  – konstanta pro daný systém a zařízení

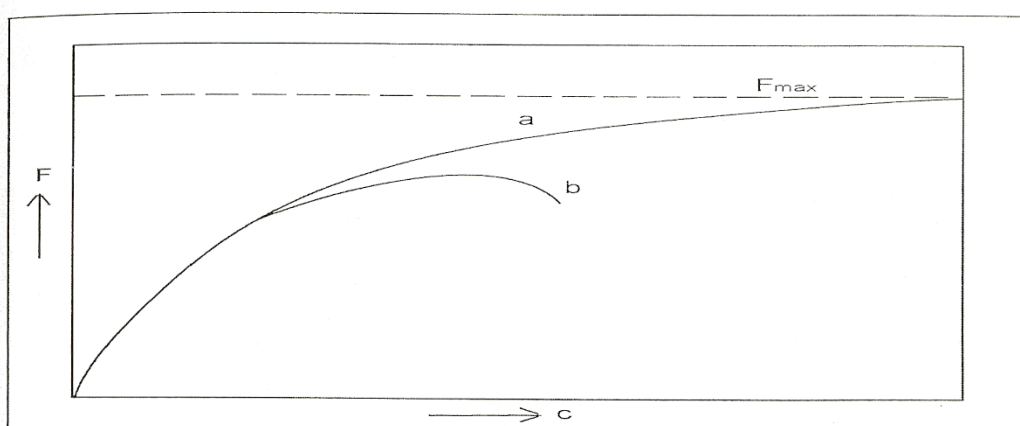
$\varepsilon$  - molární absorpční koeficient

$l$  – délka vrstvy, kyvety [ cm ]

$c$  – koncentrace roztoku [ mol·l<sup>-1</sup> ]

Je-li hodnota součinu  $\varepsilon \cdot c \cdot l$  v rovnici (1) menší než  $10^{-2}$ , je intenzita fluorescence prakticky lineárně úměrná koncentraci fluoreskující látky. Při větších koncentracích znázorňuje tuto závislost křivka a ( obr. 2 ). Ta se asymptoticky blíží určité maximální hodnotě intenzity fluorescence  $F_{max}$ . Tak je tomu ovšem v ideálním případě. Poněvadž s rostoucí koncentrací svítivé látky se výtěžek fluorescence snižuje, dosahuje křivka při určité optimální koncentraci maxima a pak klesá – křivka b.

Obr. č. 2: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci fluoreskující látky



a – teoretická závislost, b – skutečná závislost, F – intenzita fluorescence,

c – koncentrace



## Fluorescence organických sloučenin

Fluorescence vzniká u látek s molekulovou strukturou, která je schopna pohltit kvantum záření. Se zvětšující se absorpcí se zvyšuje pravděpodobnost fluorescence látky.

Největší počet organických látek tvoří cyklické aromatické nebo heteroaromatické sloučeniny s konjugovaným systémem dvojných vazeb, které mají planární, nepohyblivou molekulu a často jsou schopny existovat v tautomerních nebo izomerních formách. Jsou to např. uhlovodíky jako naftalen, anthracen, benzpyren, dále akridin a velký počet akridinových, azinových, oxazinových a jiných barviv (fluorescein, rhodaminy, atd.).

Větší počet kondenzovaných kruhů a chromoforů v molekule aromatické sloučeniny vede k posunu zbarvení fluorescence do červené oblasti.

Elektrononorové substituenty ( -OH, -OR, -NH<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ) mají obecně sklon zvyšovat výtěžek fluorescence, protože zvětšují pravděpodobnost přechodu mezi nejnižším excitovaným stavem a stavem základním (  $\pi \rightarrow \pi^*$  ).

Substituenty, u nichž je absorpce provázána přechodem  $n \rightarrow \pi$ , (elektronakceptorové skupiny -CHO, -COOH, -SO<sub>3</sub>, -CN, -NO<sub>2</sub>), zhašejí fluorescenci.

## Výhody a využití fluorimetrie

Fluorimetrie se vyznačuje oproti spektrálním metodám větší citlivostí ( $10^{-9} - 10^{-12}$  g) a selektivitou, která je dána tím, že jen omezený počet látek vykazuje fluorescenci, a že vedle vlnové délky emise je volitelná i vlnová délka excitačního záření.

Ve farmacii se fluorescence se využívá např. ke stanovení tetracyklínů, vitamínů B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, E, chininu, steroidních hormonů aj. [ 29 ]

## Příklady stanovení chemických látek metodou FIA s fluorimetrickou detekcí:

- Clenbuterol – po deprivatizaci primární aminoskupiny o-ftalylaldehydem za přítomnosti 2-merkptoethanolu s detekčním limitem 0,06  $\mu\text{g} / \text{ml}$  a lineární částí kalibrační křivky od 0,2 do 5,0  $\mu\text{g} / \text{ml}$  [ 30 ]
- Warfarin – stanovován při 393 nm ( excitační záření 312 nm ) s lineární částí kalibrační křivky od 50,0 ng / ml do 5,0  $\mu\text{g} / \text{ml}$  [ 31 ]
- Bumetanid – stanovován při 370 nm ( excitační záření 314 nm ) s lineární částí kalibrační křivky od 0,05 do 10,0  $\mu\text{g} / \text{ml}$  [ 32 ]

### 3.4.2. Chemiluminiscenční analýza

Chemiluminiscence je definována jako produkce elektromagnetického záření (UV, VIS, IČ) při chemické reakci. Tento úkaz lze pozorovat u reakcí, jež poskytují elektronově excitované intermediáty nebo produkty, které lumineskují nebo předávají svou energii jiné molekule, schopné luminiscence.

#### Mechanismus chemiluminiscence:

Chemická reakce může produkovat záření *přímou chemiluminiscencí* nebo tzv. *chemi-excitací*.

- a) Přímá chemiluminiscence – odehrává se ve dvou krocích, podle následujícího schématu:  
Excitační reakce:  $A + B \rightarrow C^*$   
De-excitační reakce:  $C^* \rightarrow C + h\nu$
- b) Chemi-excitace: energie excitované molekuly  $C^*$  je přenesena na sloučeninu F, která je následně touto energií excitována:  
Přenos energie:  $C^* + F \rightarrow C + F^*$   
De-excitační reakce:  $F^* \rightarrow F + h\nu$

Molekula F je fluorofor, který může být excitován také absorpcí záření. Zde by se jednalo o fotoluminiscenci.

#### Požadavky na chemiluminiscenční látky a jejich vlastnosti

Počet látek poskytujících přímou chemiluminiscenci je omezen, proto tato stanovení často vyžadují derivatizační procesy. Jestliže molekula není schopna účastnit se chemiluminogenní reakce, může být převedena na jinou látku s těmito vlastnostmi. Jinou alternativou je konverze molekuly na fluorofór, který pak může být "chemi-excitován".

#### Požadavky na analyticky využitelnou chemiluminiscenci:

- a) Molekula musí být schopna přijmout energii uvolněnou z reakce a výkonnost tohoto systému musí být dostatečně vysoká.
- b)  $C^*$  by měla být schopna vydávat luminiscenci za podmínek reakce a její intenzita by opět měla být dostatečně vysoká. Druhou možností je

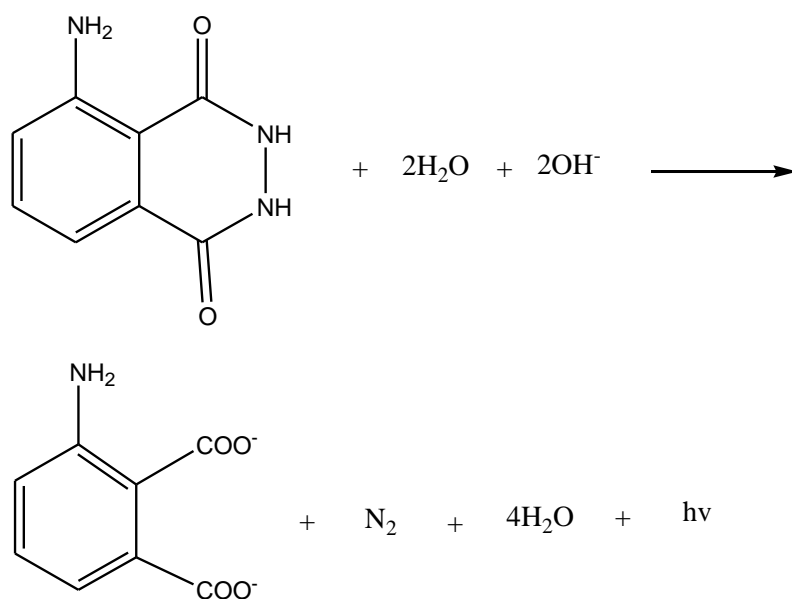
přítomnost vhodné akceptorové molekuly F schopné chemi-excitace s následnou emisí záření.

- c) Energie potřebná k excitaci by měla být dodána pokud možno v jednom kroku a to i u vícestupňových reakcí, protože k excitaci musí dojít okamžitě.
- d) Reakcí se musí vyprodukovat alespoň  $44 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , protože energie požadovaná u chemiluminogenních reakcí leží mezi 44 až  $71 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

#### Příklady chemiluminiscence v analýze léčiv:

Mezi nejznámější chemiluminiscenční reakce ve vodné fázi patří oxidace luminolu peroxidem vodíku v zásaditém prostředí ( průběh reakce znázorňuje obr. 3 ). Emisní spektrum se shoduje se spektrem dianiontu kyseliny 3-aminoftalové, která je produktem chemiluminiscenční reakce. Tato reakce může být využita pro stanovení všech sloučenin nebo iontů, které katalyzují reakci nebo mění působení katalyzátoru nebo produkují peroxid vodíku. Deriváty luminolu jsou velmi často využívány jako konjugační látky k převedení nechemiluminogenních látek na sloučeniny poskytující chemiluminiscenci reakcí s peroxidem vodíku.

Obr. č. 3: Oxidace luminolu peroxidem vodíku v zásaditém prostředí



Kromě peroxidu vodíku lze v analýze léčiv i jiná oxidační činidla:  $\text{KMnO}_4$  v kyselém prostředí,  $\text{Ce}^{4+}$  v kyselém prostředí,  $\text{KIO}_4$  v zásaditém prostředí, N-bromsukcimid v zásaditém prostředí aj. [ 28 ]

Příklady stanovení chemických látek pomocí metody FIA s chemiluminiscenční detekcí:

- Paracetamol – pomocí 2,5 mM luminolu, 5,0  $\mu\text{M}$   $\text{KMnO}_4$  a fosfátového pufru (pH=12) s detekčním limitem 10,0 nM a lineární částí kalibrační křivky od 25,0 nM do 0,25  $\mu\text{M}$ . [ 33 ]
- Iproniazid – po oxidaci látky  $\text{Ce}^{4+}$  v prostředí kyseliny sírové s lineární částí kalibrační křivky od 0,1 do 4,0 ppm. [ 34 ]
- Dipyridamol – pomocí 50,0 M  $\text{KMnO}_4$  v 2,0 M kyselině sírové s detekčním limitem 58,0 ng / ml a lineární částí kalibrační křivky od 0,2 do 80,0  $\mu\text{g}$  / ml. [35]
- Pyrogallol – pomocí 0,1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  v 0,1 M NaOH s detekčním limitem 2,6 pmol a lineární částí kalibrační křivky od 0,2 do 5  $\mu\text{M}$ . [ 36 ]
- Prokain, benzokain, tetrakain – pomocí 0,5 mM  $\text{KMnO}_4$  v 2,3 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  s využitím různých látek zvyšujících intenzitu CL. Detekční limity byly 0,1-0,3  $\mu\text{g}$  / ml a kalibrační křivky byly lineární od 0,2 – 0,5 do 25 – 50  $\mu\text{g}$  / ml. [ 37 ]
- Flufenamová, mefenamová kyselina – pomocí tris( 2,2'-bipyridyl )ruthenia<sup>II</sup> a síranu ceričitého s detekčním limitem 3,6 nM a 0,21  $\mu\text{M}$  a lineární částí kalibrační křivky 0,07 – 6 a 0,05 – 6  $\mu\text{g}$  / ml. [ 38 ]

Některá sympatomimetika – pomocí  $\text{KMnO}_4$  v kyselině mravenčí s lineárními částmi kalibračních křivek 0,2 – 9  $\mu\text{g}$  / ml, 0,2 – 12,5  $\mu\text{g}$  / ml a 0,025 – 1,25  $\mu\text{g}$  / ml. [ 39 ]

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

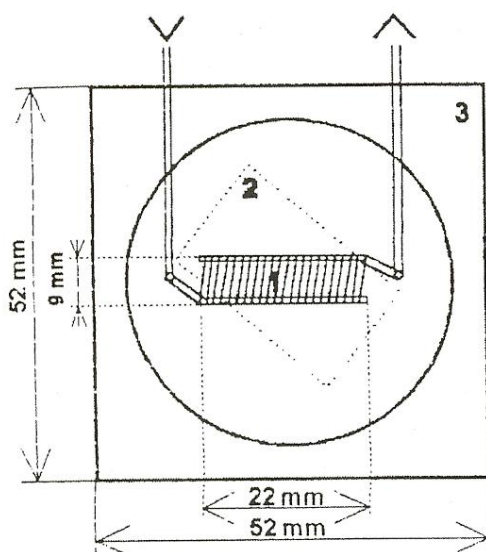
### 4.1. *Přístroje a pomůcky*

1. Počítač PC 386 DX / 40
2. Řídící jednotka ( Univerzita Athény )
3. Peristaltická pumpa Minipuls 3 ( fa Gilson )
4. Elektricky ovládaný injektor ( fa Watrex, Praha )
5. Fluorimetr s průtokovým detektorem Spektra Physics 970 L.C. upravený pro chemiluminiscenční stanovení ( USA )
6. Průtokové hadičky ( materiál Tygon, vnitřní průměr 0,23 mm )
7. Analytické váhy MP 2004 ( fa Sartorius )
8. Ultrazvuková lázeň Sonorex, typ RK 100
9. Membránové filtry Synpor č.4, velikost pórů 0,85  $\mu\text{m}$
10. Filtrační zařízení připojené na vodní vývěvu ( dílny FaF UK, Hradec Králové )
11. Elektromagnetická míchačka MM 2A ( Laboratorní přístroje, Praha )
12. Acidimetr 333 ( Druopta, Praha )
13. Skleněná a kalomelová elektroda

### 4.2. *Úprava fluorimetru pro chemiluminiscenční stanovení*

Při analytickém stanovení jsem používala průtokový fluorimetr Spektra Physics FS 970 L.C., který byl pro chemiluminiscenční detekci upraven zakrytím filtru primárního zdroje záření a dále záměnou původní průtokové kyvety o objemu 8,0  $\mu\text{l}$  za chemiluminiscenční modul z plexiskla, kopírující tvar sekundárního filtru. Jeho součástí je planární zrcátko a cívka z průhledné, ohebné, polyesterové hadičky o vnitřním průměru 0,5 mm a délce 250 mm. To odpovídá 13 závitům o průměru 9 mm a 100 mm dlouhému přívodu.

Obr. č. 4: Chemiluminiscenční modul



1. Průtoková cívka
2. Planární zrcátko
3. Tělo chemiluminiscenčního modulu (plexisklo)

#### 4.3. Použité chemikálie

1. Manganistan draselný čistý,  $\text{KMnO}_4$ , Balex, Pardubice – Rosice nad Labem
2. Kyselina sírová,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\rho = 1,84 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , Spolana s. r. o., Neratovice
3. Thioridazin hydrochlorid,  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{S}_2 \cdot \text{HCl}$ , Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
4. Promethazin hydrochlorid,  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{S}$ , Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
5. Levomepromazin hydrochlorid,  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{OS}$ , Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
6. Kyselina mravenčí 85 – 87 %,  $\text{HCCOH}$ , Lachema s. r. o., Brno
7. Dodecylbenzensulfonát sodný,  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NaO}_3\text{S}$ , Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
8. Polyfosfát sodný,  $(\text{NaPO}_3)_{13-18} \cdot \text{Na}_4\text{O}_2$ , Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
9. Kyselina chloristá 0,0948 M VS,  $\text{HClO}_4$ , Lachema s. r. o., Brno
10. Kyselina chlorovodíková 0,0980 M VS,  $\text{HCl}$ , Lachema s. r. o., Brno
11. Hydroxid sodný,  $\text{NaOH}$ , Spolana s.r.o., Neratovice

12. Fenolftalein RS, Lachema s. r. o., Brno
13. Kyselina octová bezvodá R 98,0 %,  $C_2H_4O_2$ , Penta, Chrudim
14. Anhydrid kyseliny octové čistý,  $C_4H_6O_3$ , Lachema s. r. o., Brno
15. Ethanol denaturovaný methanolem, Kavona s.r.o., Pardubice
16. Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd., 50 × 25 mg, Léčiva, Národní podnik Praha
17. Prothazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd., 20 × 25 mg, Rodleben Pharma GmbH, SRN
18. Tisercin<sup>®</sup> 25 mg inj, 10 × 1 ml ( 25 mg v 1 ml ), Egis Pharmaceuticals Ltd., Maďarsko

#### 4.4. Příprava roztoků

K přípravě všech vodných roztoků jsem používala vysoce čistou deionizovanou vodu, připravenou na Katedře analytické chemie systémem Millipore Milli-Q RG. Všechny roztoky používané pro průtokovou injekční analýzu byly přefiltrovány přes membránové filtry Synpor č.4 (velikost pórů 0,85  $\mu$ m). Zásobní roztoky jsem skladovala v chladu a temnu. Pracovní roztoky jsem si před měřením připravovala čerstvé.

1. Zásobní roztok manganistanu draselného,  $M_r ( KMnO_4 ) = 158,03 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 
  - a)  $c ( KMnO_4 ) = 0,1 \text{ M}$  – navážku 7,9015 g jsem rozpustila a doplnila destilovanou vodou na objem 500,0 ml.
  - b)  $c ( KMnO_4 ) = 3,0 \text{ mM}$  – do 100,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 3,0 ml zásobního roztoku  $KMnO_4$  o koncentraci 0,1 M a doplnila destilovanou vodou po rysku.
2. Zásobní roztok kyseliny sírové,  $M_r ( H_2SO_4 ) = 98,08 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 
  - a)  $c ( H_2SO_4 ) = 2,5 \text{ M}$  – objem 34,8 ml 96 %  $H_2SO_4$  jsem převedla do asi 150 ml destilované vody a doplnila v 250,0 ml odměrné baňce destilovanou vodou po rysku.
  - b)  $c ( H_2SO_4 ) = 0,25 \text{ M}$  – do 500,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 50,0 ml zásobního roztoku  $H_2SO_4$  o koncentraci 2,5 M a doplnila destilovanou vodou po rysku.
3. Zásobní roztok kyseliny mravenčí,  $M_r ( HCOOH ) = 46,03 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 
  - a)  $c ( HCOOH ) = 1,0 \text{ M}$  – objem 3,85 ml jsem doplnila ve 100,0 ml odměrné baňce destilovanou vodou po rysku.

4. Zásobní roztok dodecylbenzensulfonátu sodného,  $M_r ( C_{18}H_{29}NaO_3S ) = 348,48 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- a)  $c ( C_{18}H_{29}NaO_3S ) = 50,0 \text{ mM}$  – navážku 1,7424 g jsem rozpustila v destilované vodě a doplnila ve 100,0 ml odměrné baňce destilovanou vodou po rysku.
5. Zásobní roztok polyfosfátu sodného,  $M_r [ ( NaPO_3 )_{13-18} \cdot Na_4O_2 ] = 1642,42 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- a)  $c [ ( NaPO_3 )_{13-18} \cdot Na_4O_2 ] = 0,25 \text{ M}$  – navážku 102,65 g jsem rozpustila v destilované vodě a doplnila v 250,0 ml odměrné baňce destilovanou vodou po rysku.
6. Zásobní roztok hydrochloridu thioridazinu,  $M_r ( C_{21}H_{26}N_2S_2 \cdot HCl ) = 407 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- a)  $c ( C_{21}H_{26}N_2S_2 \cdot HCl ) = 2,5 \text{ mM}$  – navážku 0,1018 g jsem rozpustila v destilované vodě a doplnila ve 100,0 ml odměrné baňce destilovanou vodou po rysku.
- b)  $c ( C_{21}H_{26}N_2S_2 \cdot HCl ) = 0,25 \text{ mM}$  – do 100,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 10,0 ml zásobního roztoku  $C_{21}H_{26}N_2S_2 \cdot HCl$  o koncentraci 2,5 mM a doplnila destilovanou vodou po rysku.
7. Zásobní roztok hydrochloridu promethazinu,  $M_r ( C_{17}H_{21}ClN_2S ) = 320,88 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- a)  $c ( C_{17}H_{21}ClN_2S ) = 0,25 \text{ mM}$  – navážku 0,0080 g jsem rozpustila v destilované vodě a doplnila ve 100,0 ml odměrné baňce destilovanou vodou po rysku.
8. Zásobní roztok hydrochloridu levomepromazinu,  $M_r ( C_{19}H_{25}ClN_2OS ) = 364,93 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- a)  $c ( C_{19}H_{25}ClN_2OS ) = 0,25 \text{ mM}$  – navážku 0,0091 g jsem rozpustila v destilované vodě a doplnila ve 100,0 ml odměrné baňce destilovanou vodou po rysku.
9. Odměrný roztok kyseliny chlorovodíkové,  $M_r ( HCl ) = 36,45 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- a)  $c ( HCl ) = 0,01 \text{ M}$  – do 100,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 10,0 ml zásobního roztoku HCl o koncentraci 0,1 M a doplnila destilovanou vodou po rysku.
10. Odměrný roztok hydroxidu sodného,  $M_r ( NaOH ) = 40,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$



- a)  $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ M}$  – 4,2 g NaOH R jsem rozpustila v 1000,0 ml odměrné baňce v destilované vodě a doplnila destilovanou vodou po rysku.

#### **4.5. Popis a charakteristika základních funkcí programu**

##### **FIA – 12**

Tento program byl specificky vytvořen pro řízení a kontrolu základních částí systému FIA. Program a řídicí jednotka byly vytvořeny a sestaveny profesorem Constantinosem Efstathiou, Laboratoř analytické chemie athénské univerzity v Řecku, za spolupráce asistenta Christoforose Polydorou. Počítačový program byl napsán v Turbo Pascalu 6,0 ( Borland Inc. ) a slouží k řízení FIA systému a k vyhodnocení naměřených hodnot.

Program umožňuje:

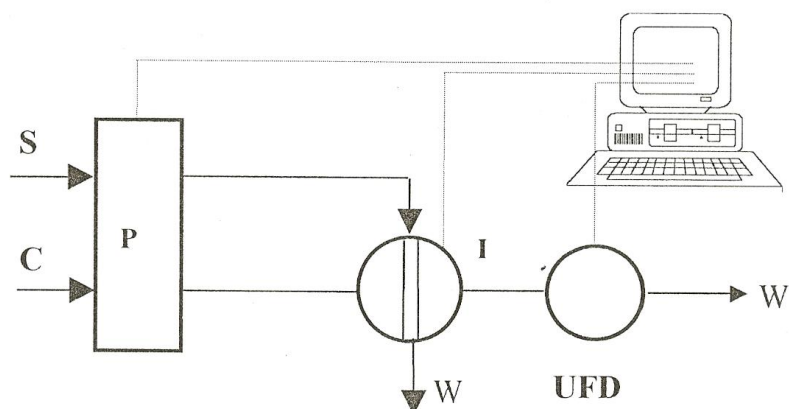
1. Nastavení časových parametrů systému
2. Grafické znázornění píku na obrazovce, včetně uložení do paměti a vytištění výsledků
3. Zaznamenání výstupního signálu detektoru a výpočet výšky a plochy píku

#### **4.6. Měřicí průtokový systém**

Měřicí systém se skládá ze samostatné peristaltické pumpy, jejíž motor a průtoková rychlost je kontrolována programem, injekčního ventilu s dvěma programem nastavitelnými polohami a detektoru monitorujícího koncentraci chemických látek ve formě analogového signálu úměrného koncentraci. Celý systém je koordinován řídicí jednotkou přes počítač.

Nosný proud a roztok vzorku jsou do systému nasávány peristaltickou pumpou. Určené množství vzorku je dávkováno pomocí dávkovacího kohoutu injektoru, otočením do polohy INJECT. Ve smyčce dochází k promísení nadávkovaného vzorku s nosným proudem. Intenzita chemiluminiscence je měřena v průtokové kyvetě (cívce), pro tento účel upraveného detektoru, a zaznamenávána ve formě píků počítačem. Výška píku je přímo úměrná intenzitě chemiluminiscence a tedy i koncentraci stanovované látky ve vzorku. Sestava umožňuje i vytištění naměřených údajů tiskárnou. Průtokový systém znázorňuje schéma na obrázku č. 5.

Obr. č. 5 : Schéma zapojení FIA systému



Popis obrázku č. 5:

S – vzorek

C - nosný proud

P – peristaltická pumpa

I – injektor

W – odpad

UFD – upravený fluorimetrický detektor

#### 4.6.1. Zapojení měřícího systému

Po přípravě roztoku vzorku a nosného proudu jsem mohla přistoupit k zapojení FIA-analyzátoru v tomto pořadí:

1. Fluorimetr – nastavení vhodného napětí a rozsahu stupnice, resp. citlivosti detektoru (  $\mu\text{A}$  )
2. Peristaltická pumpa
3. Počítač
4. Injektor
5. Řídící jednotka

Po spuštění programu FIA.12 a nastavení vhodných časových parametrů jsem přistoupila k vlastnímu měření. Časové parametry byly zvoleny tak, aby oxidační produkt vznikající po smíchání nosného proudu se vzorkem byl po změření intenzity chemiluminiscence z průtokového systému vymyt a pík poklesl na nulovou linii. Teprve

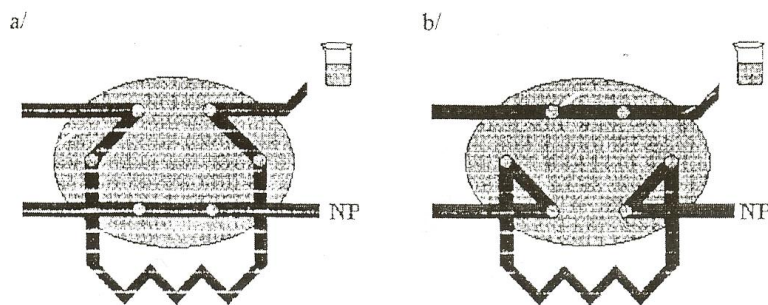
potom byl nadávkován další vzorek. Při měření bylo nutné měnit dle intenzity chemiluminiscence rozsah, resp. citlivost měření. Podle výšky píku a nastaveného rozsahu stupnice detektoru pak byla vypočítána intenzita chemiluminiscence, která je přímo úměrná výšce píku. Výška píku zaznamenaná na počítači v digitální formě je v podstatě rovna procentuální části z nastaveného rozsahu stupnice detektoru. Je-li například rozsah stupnice upraveného fluorimetru  $0,1 \mu\text{A}$  a výška píku 63,2, pak  $0,1 \mu\text{A}$  představuje 100 % a intenzita chemiluminiscence je rovna 63,2 % z  $0,1 \mu\text{A}$ . Po přepočtu pak vychází intenzita chemiluminiscence  $0,0632 \mu\text{A}$ , tj. 63,2 nA.

#### 4.6.2. Polohy dávkovače

V první fázi je injektor nastaven tak, že je smyčka vymývána pouze nosným proudem, zatímco vzorek odchází do odpadu druhou cestou, poloha SAMPLING.

Po otočení injektoru do druhé polohy dochází k propojení smyčky s přívodem vzorku, poloha INJECT. Návratem dávkovače do původní polohy je vzorek vymyt ze smyčky nosným proudem.

Obr. č. 6: Polohy injektoru: a) INJECT, b) SAMPLING



#### 4.7. Optimalizace podmínek stanovení

Cílem optimalizace bylo nalézt vhodné podmínky pro chemiluminiscenční stanovení thioridazinu metodou FIA. Stanovení bylo založeno na oxidaci thioridazinu manganistanem draselným v prostředí kyseliny sírové.

Optimalizovány byly:

- Časové parametry systému FIA
- Doba dávkování
- Rychlost čerpání roztoků do systému
- Koncentrace manganistanu draselného v nosném proudě

- Koncentrace kyseliny sírové v nosném proudu
- Poměr činidel v nosném proudu
- Látka zvyšující intenzitu chemiluminiscence

Měření bylo provedeno za těchto konstantních podmínek:

- Napětí na upraveném fluorimetru: 596 V
- Rozsah stupnice detektoru: 1,0 – 0,01  $\mu\text{A}$
- Dávkovací objem vzorku: 200,0  $\mu\text{A}$

Při optimalizaci byly použity:

- Pracovní roztok thioridazinu: 0,2 mM
- Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1:9  
(koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a koncentrace  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,225 M)

Příprava pracovního roztoku: Do 100,0 ml odměrné baňky jsem kvantitativně převedla navážku thioridazinu 0,0081 g, rozpustila v destilované vodě a doplnila destilovanou vodou po rysku.

Příprava nosného proudu: Do 250,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 25,0 ml zásobního roztoku  $\text{KMnO}_4$  o koncentraci 3,0 mM a doplnila 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Při měření bylo provedeno vždy pět nástriků vzorku, z výšky píků jsem pak vypočítala průměrnou hodnotu.

#### **4.7.1. Časové parametry systému průtokové injekční analýzy**

Při hledání optimálních časových parametrů systému FIA jsem vycházela z diplomové práce Markéty Andrlové.[ 41 ] Na základě výsledků měření jsem zvolila časové parametry, které jsem po dobu dalšího měření zachovávala konstantní.

#### **4.7.2. Volba doby dávkování**

Cílem tohoto měření bylo nalézt nejvhodnější dobu dávkování roztoku vzorku do systému, tj. určit nejvhodnější dobu, po kterou bude kohout dávkovače v poloze INJECT. Doba dávkování ovlivňuje objem vzorku, který bude analyzován. Příliš krátká doba nestačí k nadávkování dostatečného množství vzorku, při příliš dlouhé době dávkování pak dochází k neefektivnímu plýtvání s roztoky a snižuje se frekvence

analýz. Při měření jsem testovala dobu dávkování od 2 do 7 sekund. Hledala jsem optimální poměr intenzity chemiluminiscence a délky trvání jednoho cyklu.

#### **4.7.3. Volba rychlosti čerpání roztoku**

Při tomto měření byl zkoumán vliv rychlosti čerpání roztoků vzorku a nosného proudu na intenzitu chemiluminiscence. Zkoumala jsem závislost intenzity chemiluminiscence na 20 až 50 % (0,37 – 0,93 ml/min.) rychlosti pumpy. Měření probíhalo za optimalizované doby dávkování, ostatní parametry zůstaly nezměněny.

#### **4.7.4. Nastavení nových časových parametrů**

Pro optimální rychlost peristaltické pumpy a dobu dávkování jsem upravila časové parametry systému FIA, které jsem zachovávala po dobu dalšího měření konstantní.

#### **4.7.5. Volba koncentrace manganistanu draselného**

V této části pokusu jsem se snažila nalézt vhodnou koncentraci  $\text{KMnO}_4$  v nosném proudu. Ta musí být dostatečná pro oxidaci vzorku a zároveň co nejméně pohlcovat chemiluminiscenční záření. Sledovala jsem vliv koncentrace činidla na intenzitu chemiluminiscence i reprodukovatelnost měření. Při volbě optimální koncentrace  $\text{KMnO}_4$  byl použit 0,2 mM roztok thioridazinu.

Příprava nosného proudu: Do 100,0 ml odměrných baněk jsem odpipetovala 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 5,0 ml; 6,0 ml; 7,0 ml a 10,0 ml zásobního roztoku  $\text{KMnO}_4$  o koncentraci 0,1 M a doplnila destilovanou vodou po rysku. Byly tak získány roztoky  $\text{KMnO}_4$  o koncentraci od 1,0 mM do 10,0 mM. Z těchto roztoků jsem odpipetovala vždy 5,0 ml a doplnila na objem 50,0 ml 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Takto jsem získala sadu nosných proudů o koncentraci  $\text{KMnO}_4$  0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 a 1,0 mM.

#### **4.7.6. Volba koncentrace kyseliny sírové**

K optimalizaci koncentrace  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v nosném proudu byl použit pracovní roztok thioridazinu o koncentraci 0,2 mM. Při měření jsem zkoumala vliv koncentrace kyseliny sírové na intenzitu chemiluminiscence, kvalitu píku i reprodukovatelnost měření.

Příprava roztoků  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : Do 50,0 ml odměrných baněk jsem odpipetovala 0,5 ml; 1,0 ml; 2,0 ml; 5,0 ml; 10,0 ml a 15,0 ml zásobního roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o koncentraci 2,5 M a doplnila destilovanou vodou po rysku. Tímto způsobem jsem získala sadu roztoků  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o koncentraci 0,025 M; 0,05 M; 0,1 M; 0,25 M; 0,50 M a 0,75 M.

Příprava nosného proudu: Do 50,0 ml odměrných baněk jsem odpipetovala vždy 5,0 ml 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  a doplnila  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o příslušné koncentraci, tak jsem získala sadu nosných proudů o koncentraci  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,023 M; 0,045 M; 0,090 M; 0,225 M; 0,450 M; 0,675 M.

#### **4.7.7. Volba poměru činidel v nosném proudu**

Při tomto měření jsem hledala nejvhodnější poměr  $\text{KMnO}_4$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v nosném proudu. Optimalizace poměru obou činidel byla provedena s pracovním roztokem thioridazinu o koncentraci 0,2 mM.

Příprava nosného proudu: Do 25,0 ml odměrných baněk jsem odpipetovala 2,5 ml; 5,0 ml; 7,5 ml; 10,0 ml; 12,5 ml 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  a doplnila 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  po rysku.

#### **4.7.8. Vliv látek zvyšujících intenzitu chemiluminiscence**

##### **4.7.8.1 Vliv kyseliny mravenčí**

Cílem tohoto úkolu bylo zjistit, zda bude mít kyselina mravenčí vliv na intenzitu chemiluminiscence thioridazinu. Zvýšení intenzity chemiluminiscence jsem porovnávala se slepou řadou roztoků kyseliny mravenčí, kde byl thioridazin nahrazen destilovanou vodou.

Příprava roztoku vzorku: Do 25,0 ml odměrných baněk jsem postupně odpipetovala 2,5 ml; 5,0 ml; 7,5 ml a 10,0 ml zásobního roztoku kyseliny mravenčí o koncentraci 1,0 M. Tak byla získána sada roztoků  $\text{HCOOH}$  o koncentraci 0,1 – 0,4 M. Do každé baňky jsem přidala 2,5 ml 2,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 2,0 ml zásobního roztoku thioridazinu o koncentraci 2,5 mM.

Příprava nosného proudu: Do 250,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 25,0 ml zásobního roztoku  $\text{KMnO}_4$  o koncentraci 3,0 mM a doplnila 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  po rysku.

##### **4.7.8.2 Vliv dodecylbenzensulfonátu sodného**

Při tomto měření jsem zjišťovala, zda ovlivní přídavek tenzidu dodecylbenzensulfonátu sodného intenzitu chemiluminiscence thioridazinu. Při měření byl použit stejný nosný proud jako v případě kyseliny mravenčí. Opět bylo provedeno porovnání se slepou řadou, kde byl thioridazin nahrazen destilovanou vodou.

Příprava roztoků vzorku: Do 25,0 ml odměrných baněk jsem postupně odpipetovala 0,5 ml; 2,5 ml a 5,0 ml zásobního roztoku dodecylbenzensulfonátu sodného o koncentraci 50,0 mM. Poté jsem do každé odměrné baňky přidala 2,5 ml 2,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2,0 ml

zásobního roztoku thioridazinu o koncentraci 2,5 mM a doplnila destilovanou vodou po rysku.

#### **4.7.8.3 Vliv polyfosfátu sodného**

Při tomto měření jsem zjišťovala, zda přídavek polyfosfátu sodného zvyšuje intenzitu chemiluminiscence thioridazinu a může být použit při jeho stanovení FIA metodou. Při měření byl použit stejný nosný proud jako v předešlých dvou případech. Opět bylo provedeno porovnání se slepou řadou, kde byl thioridazin nahrazen destilovanou vodou.

Příprava roztoků vzorku: Do 25,0 ml odměrných baněk jsem odpipetovala 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 5,0 ml; 6,0 ml; 7,0 ml; 8,0 ml a 10,0 ml zásobního roztoku PFS o koncentraci 0,25 M. Do každé baňky jsem přidala 2,5 ml 2,5 M  $H_2SO_4$  a 2,0 ml zásobního roztoku thioridazinu o koncentraci 2,5 mM a doplnila destilovanou vodou po rysku. Získala jsem tak sadu koncentrací polyfosfátu sodného od 10,0 mM do 100,0 mM.

### **4.8. Stanovení vybraných neuroleptik**

#### **4.8.1. Stanovení thioridazinu**

##### **4.8.1.1 Příprava kalibračních roztoků**

Do 25,0 ml odměrných baněk jsem postupně odpipetovala 3,0 ml; 5,0 ml; 7,0 ml; 9,0 ml; 10,0 ml; 13,0 ml; 15,0 ml; 17,0ml; 19,0 ml; 20,0 ml a 22,0 ml zásobního roztoku thioridazinu o koncentraci 0,25 mM. Do všech odměrných baněk jsem přidala 2,5 ml zásobního roztoku kyseliny sírové o koncentraci 2,5 M a doplnila destilovanou vodou po rysku, tak byla získána sada roztoků o koncentraci  $H_2SO_4$  0,25 M.

##### **4.8.1.2 Měření kalibračních roztoků**

Pro měření kalibračních závislostí ( závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu ) a stanovení thioridazinu jsem použila stejný průtokový systém jako při optimalizačních měřeních. Měření probíhala za optimalizovaných podmínek. Získané hodnoty jsem vyhodnotila a zpracovala do grafů v programu Microsoft Office Excel 2003.

##### **4.8.1.3 Příprava kalibračních roztoků s polyfosfátem sodným**

Do 25,0 ml odměrných baněk jsem odpipetovala 0,5 ml; 1,0 ml; 3,0 ml; 5,0 ml; 7,0 ml a 10,0 ml ml zásobního roztoku thioridazinu o koncentraci 0,25 mM. Do všech

baněk jsem přidala 2,5 ml 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 8,0 ml zásobního roztoku PFS o koncentraci 0,25 M a doplnila destilovanou vodou po rysku, tak byla získána sada roztoků o koncentraci PFS 0,08 M.

Příprava nosného proudu: Do 250,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 25,0 ml zásobního roztoku KMnO<sub>4</sub> o koncentraci 3,0 mM a doplnila 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> po rysku.

## **4.8.2. Stanovení promethazinu**

### **4.8.2.1 Příprava kalibračních roztoků**

Do 25,0 ml odměrných baněk jsem postupně odpipetovala 7,0 ml; 10,0 ml; 15,0 ml; 19,0 ml; 20,0 ml a 22,0 ml zásobního roztoku promethazinu o koncentraci 0,25 mM. Do všech odměrných baněk jsem přidala 2,5 ml zásobního roztoku kyseliny sírové o koncentraci 2,5 M a doplnila destilovanou vodou po rysku.

### **4.8.2.2 Měření kalibračních roztoků**

Pro měření kalibračních závislostí ( závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu ) a stanovení promethazinu jsem použila stejný průtokový systém jako při optimalizačních měřeních. Měření probíhala za optimalizovaných podmínek. Získané hodnoty jsem vyhodnotila a zpracovala do grafů v programu Microsoft Office Excel 2003.

### **4.8.2.3 Příprava kalibračních roztoků s polyfosfátem sodným**

Do 25,0 ml odměrných baněk jsem odpipetovala 0,5 ml; 1,0 ml; 3,0 ml; 5,0 ml; 7,0 ml a 10,0 ml zásobního roztoku promethazinu o koncentraci 0,25 mM. Dále jsem do všech odměrných baněk přidala 2,5 ml 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 8,0 ml zásobního roztoku PFS o koncentraci 0,25 M a doplnila destilovanou vodou po rysku.

Příprava nosného proudu: : Do 250,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 25,0 ml zásobního roztoku KMnO<sub>4</sub> o koncentraci 3,0 mM a doplnila 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> po rysku.

## **4.8.3. Stanovení levomepromazinu**

### **4.8.3.1 Příprava kalibračních roztoků**

Do 25,0 ml odměrných baněk jsem postupně odpipetovala 7,0 ml; 10,0 ml; 15,0 ml; 19,0 ml; 20,0 ml a 22,0 ml zásobního roztoku levomepromazinu o koncentraci 0,25 mM. Do všech odměrných baněk jsem přidala 2,5 ml zásobního roztoku kyseliny sírové o koncentraci 2,5 M a doplnila destilovanou vodou po rysku.



#### 4.8.3.2 Měření kalibračních roztoků

Pro měření kalibračních závislostí ( závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu ) a stanovení levomepromazinu jsem použila stejný průtokový systém jako při optimalizačních měřeních. Měření probíhala za optimalizovaných podmínek. Získané hodnoty jsem vyhodnotila a zpracovala do grafů v programu MS Excel 2003.

#### 4.8.3.3 Měření kalibračních roztoků s polyfosfátem sodným

Do 25,0 ml odměrných baněk jsem postupně odpipetovala 1,0 ml; 3,0 ml; 5,0 ml; 7,0 ml a 10,0 ml zásobního roztoku levomepromazinu o koncentraci 0,25 mM. Do všech baněk jsem přidala 2,5 ml 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 8,0 ml zásobního roztoku PFS o koncentraci 0,25 M a doplnila destilovanou vodou po rysku.

Příprava nosného proudu: Do 250,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 25,0 ml zásobního roztoku KMnO<sub>4</sub> o koncentraci 3,0 mM a doplnila destilovanou vodou po rysku.

#### 4.8.4. Reprodukovatelnost metody

Při proměňování kalibračních křivek metodou FIA byla stanovována reprodukovatelnost měření, která je vyjádřena pomocí směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky. Ty byly vypočítány z měření vzorku o zvolené koncentraci v rámci kalibrační křivky podle níže uvedených vzorců. [40]

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$s_{r\%} = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \% \quad (3)$$

kde:

- $x_i - \bar{x}$       absolutní odchylka jednotlivých výsledků od aritmetického průměru
- n              počet měření
- s              odhad směrodatné odchylky
- $s_{r\%}$           relativní směrodatná odchylka

#### **4.8.5. Stanovení thioridazinu v HVLP**

##### **4.8.5.1 Stanovení thioridazinu v HVLP metodou průtokové injekční analýzy**

S využitím metody FIA jsem stanovovala thioridazin v přípravku Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd., 50 tbl. × 25 mg. Stanovení probíhalo za optimalizovaných podmínek. Ke stanovení obsahu thioridazinu v HVLP jsem použila kalibrační křivku s přídatkem 8,0 ml PFS o koncentraci 0,25 M v rozsahu koncentrací 10,0 – 100,0 μM. Koncentrace vzorku byla zvolena přibližně v polovině rozsahu koncentrací kalibrační křivky. Obsah jsem stanovovala v pěti navážkách tablet.

Srovnání validity stanovení bylo provedeno lékopisnou metodou ČL 2002.

##### Úprava vzorku:

Zvážila jsem dvacet tablet a určila průměrnou hmotnost jedné tablety (0,2318 g). Poté jsem tablety rozdrtila v třence a navážila jsem množství přibližně odpovídající průměrné hmotnosti tablety. Navážku jsem přenesla do 100,0 ml odměrné baňky, přidala jsem asi 50 ml destilované vody a asi dvacet minut jsem nechala rozpouštět na ultrazvukové lázni. Po rozpuštění jsem doplnila objem destilovanou vodou po rysku a obsah baňky důkladně protřepala. Roztok ( suspenzi ) jsem přefiltrovala membránovou filtrací za podtlaku přes filtrační papír Synpor č. 4. Pro každý vzorek byl použit vždy nový filtr. Do 25,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 2,0 ml filtrátu, přidala jsem 2,5 ml 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 8,0 ml zásobního roztoku polyfosfátu sodného o koncentraci 0,25 M. Obsah baňky jsem doplnila destilovanou vodou po rysku. Předpokládaná koncentrace vzorku byla 49 μM ( výpočet vychází ze vzorce  $c = m/M \cdot V$ , ve výpočtu bylo zohledněno příslušné zředění ). Měření bylo provedeno s pěti navážkami.

##### **4.8.5.2 Zkouška na obsahovou stejnoměrnost**

Zkouška byla provedena podle ČL 2002. Ke zkoušce bylo použito deset tablet přípravku Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd., 50 × 25 mg. U každé tablety byl stanoven obsah účinné látky. Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako v případě stanovení obsahu tablet, ale s tím rozdílem, že jsem tablety nedrtila, ale přímo rozpouštěla v destilované vodě. Vypočítala jsem odchylky jednotlivých obsahů od průměrného obsahu účinné látky a zjistila jsem, zda se pohybují v povoleném rozmezí.

Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže obsah účinné látky v každé jednotce leží v rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu. Přípravek nevyhovuje zkoušce, jestliže

více než jeden jednotlivý obsah účinné látky je mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu účinné látky. Jestliže jeden jednotlivý obsah účinné látky je mimo rozmezí 85 % až 115 % a žádný není mimo rozmezí 75 % až 125 %, stanoví se obsah účinné látky ve dvaceti jiných, náhodně vybraných jednotkách. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže jeden jednotlivý obsah účinné látky ze třiceti jednotek je mimo rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu a žádný neleží mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu účinné látky.[ 5 ]

#### **4.8.5.3 Stanovení thioridazinu v HVLP metodou dle ČL 2002**

V českém lékopise 2002 je uveden článek Thioridazini hydrochloridum. Lékopisnou metodou pro jeho stanovení je acidimetrická titrace v nevodném prostředí odměrným roztokem kyseliny chloristé za potenciometrické indikace ekvivalenčního bodu.

0,300 g se rozpustí ve směsi 10 ml kyseliny octové bezvodé R a 60,0 ml acetanhydridu R a titruje se kyselinou chloristou 0,1 mol / l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. 1 ml kyseliny chloristé 0,1 mol / l VS odpovídá 40,70 mg sloučeniny  $C_{22}H_{27}ClN_2S_2$ .

Stanovení bylo provedeno s přípravkem Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd., 50 × 25 mg. Do kádinky jsem navázila prášek z rozdrčených tablet v množství odpovídajícím 0,300 g thioridazinu ( 2,6973 g ) a upravila podle návodu. Stanovení jsem provedla se třemi navážkami.

#### **4.8.6. Stanovení promethazinu v HVLP**

##### **4.8.6.1 Stanovení promethazinu v HVLP metodou průtokové injekční analýzy**

S využitím metody FIA jsem stanovovala promethazin v přípravku Prothazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd., 20 × 25 mg. Stanovení probíhalo za stejných podmínek jako v případě thioridazinu. Ke stanovení obsahu promethazinu v HVLP jsem použila kalibrační křivku s přídatkem 8,0 ml zásobního roztoku PFS o koncentraci 0,25 M v rozsahu koncentrací 5,0 – 100,0  $\mu$ M.

Úprava vzorku: Prothazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd., 20 × 25 mg

Zvážila jsem dvacet tablet a určila jsem průměrnou hmotnost jedné tablety (0,0611 g). Postupovala jsem stejně jako v případě thioridazinu, předpokládaná koncentrace vzorku byla 62,0  $\mu$ M. Měření bylo opět provedeno s pěti navážkami.

#### 4.8.6.2 Zkouška na obsahovou stejnoměrnost

Zkouška byla provedena podle ČL 2002. Ke zkoušce bylo použito deset tablet přípravku Prothazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd., 20 × 25 mg. Postup stanovení byl opět stejný jako v případě thioridazinu.

#### 4.8.6.3 Stanovení promethazinu v HVLP metodou dle ČL 2002

V českém lékopise je uveden článek Promethazini hydrochloridum. Lékopisnou metodou pro jeho stanovení je acidobazická titrace halogenidové soli slabé baze odměrným roztokem hydroxidu sodného za potenciometrické indikace ekvivalenčního bodu. Spotřeba odměrného roztoku se odečte mezi dvěma inflexními body.

0,250 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol / l VS a 50 ml lihu 96 % R a titruje se hydroxidem sodným 0,1 mol / l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. 1 ml hydroxidu sodného 0,1 mol / l VS odpovídá 32,09 mg C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>S

Stanovení bylo provedeno s přípravkem Prothazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd., 20 × 25 mg. Do kádinky jsem navázila prášek z rozdrcených tablet v množství odpovídajícím 0,250 g promethazinu ( 0,5171 g ) a upravila podle návodu. Stanovení jsem provedla se třemi navážkami.

#### 4.8.7. Stanovení levomepromazinu v HVLP

##### 4.8.7.1 Stanovení levomepromazinu v HVLP metodou průtokové injekční analýzy

S využitím metody FIA jsem stanovovala levomepromazin v přípravku: Tisercin<sup>®</sup> inj., 10 × 1 ml ( 25 mg v 1 ml ). Stanovení probíhalo v optimalizovaných podmínkách. Ke stanovení obsahu levomepromazinu v HVLP jsem použila kalibrační křivku s přídatkem 8,0 ml zásobního roztoku PFS o koncentraci 0,25 M v rozsahu koncentrací 10,0 – 100,0 μM. Koncentrace vzorku byla zvolena přibližně v polovině rozsahu koncentrací kalibrační křivky. Obsah jsem stanovovala s pěti vzorky injekčního přípravku.

Úprava vzorku: Tisercin<sup>®</sup> inj., 10 × 1 ml ( 25 mg v 1 ml )

Do 50,0 ml odměrné baňky jsem odpipetovala 0,2 ml přípravku a doplnila destilovanou vodou po rysku. Obsah baňky jsem důkladně protřepala. Získala jsem tak roztok levomepromazinu o předpokládané koncentraci 0,27 mM. Poté jsem do 25,0 ml odměrné baňky odpipetovala 5,0 ml 0,27 mM roztoku levomepromazinu, přidala jsem 2,5 ml 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 8,0 ml zásobního roztoku polyfosfátu sodného o koncentraci

0,25 M. Obsah baňky jsem doplnila destilovanou vodou po rysku. Předpokládaná koncentrace vzorku byla 54,8  $\mu\text{M}$ . Měření bylo provedeno s pěti vzorky.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. *Optimalizace podmínek stanovení*

#### 5.1.1. Nastavení časových parametrů

Na základě předchozích měření bylo použito toto konstantní nastavení časových parametrů systému FIA:

Overall period: 33 s (celková doba jednoho cyklu)

Baseline pointer 1:6 s (čas začátku odečítání nulové linie)

Baseline pointer 2:8 s ( čas ukončení odečítání nulové linie )

Integration pointer 1:9 s ( čas začátku integrace píku )

Integration pointer 2:29 s ( čas ukončení integrace píku )

Normal pump speed: 30 % (0,56 ml/min.) ( rychlost čerpání roztoků )

Washing pump speed: 100 % (1,85 ml/min.)( rychlost čerpání roztoků v době mezi ukončením integrace a začátkem nového píku )

Měření bylo prováděno za těchto konstantních podmínek:

Napětí na upraveném fluorimetru: 596 V

Rozsah stupnice detektoru: 1,0 – 0,01  $\mu\text{A}$

Dávkovací objem vzorku: 200,0  $\mu\text{l}$

Průtoková rychlost: 0,48  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Dosažený počet analýz: 109 analýz / hodinu

Pracovní roztok: 0,2 mM thioridazin

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1:9

( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,225 M )

### 5.1.2. Volba doby dávkování

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,05  $\mu\text{A}$

Rychlost pumpy: 30% ( 0,48 ml/min )

Vzorek: 0,2 mM thioridazin

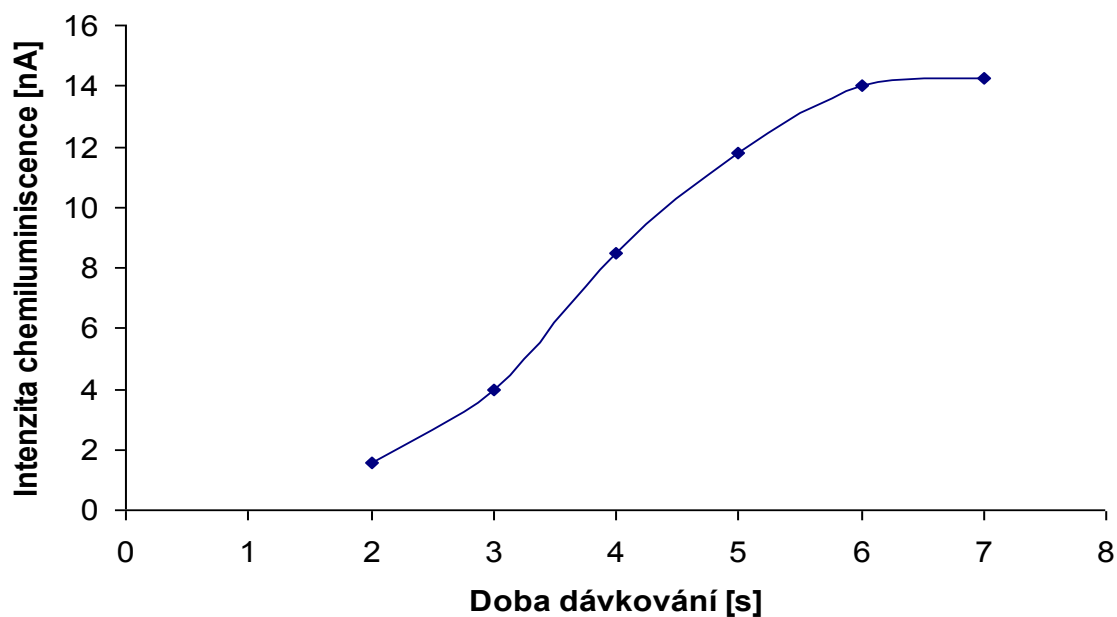
Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
v poměru 1 : 9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
0,225 M )

V tabulce č. 1 jsou uvedeny průměrné hodnoty z pěti měření.

Tab. č. 1: Volba doby dávkování

| Doba dávkování [ s ] | Výška píku [ % ] | Rozsah citlivosti [ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence [ nA ] |
|----------------------|------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 2                    | 3,184            | 0,05                                | 1,592                              |
| 3                    | 7,9025           | 0,05                                | 3,95                               |
| 4                    | 16,95            | 0,05                                | 8,48                               |
| 5                    | 23,575           | 0,05                                | 11,79                              |
| 6                    | 28,02            | 0,05                                | 14,01                              |
| 7                    | 28,5             | 0,05                                | 14,25                              |

Graf č. 1: Závislost intenzity chemiluminiscence na době dávkování



### 5.1.3. Volba rychlosti čerpání roztoků

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,05  $\mu\text{A}$

Doba dávkování: 5 s

Vzorek: 0,2 mM thioridazin

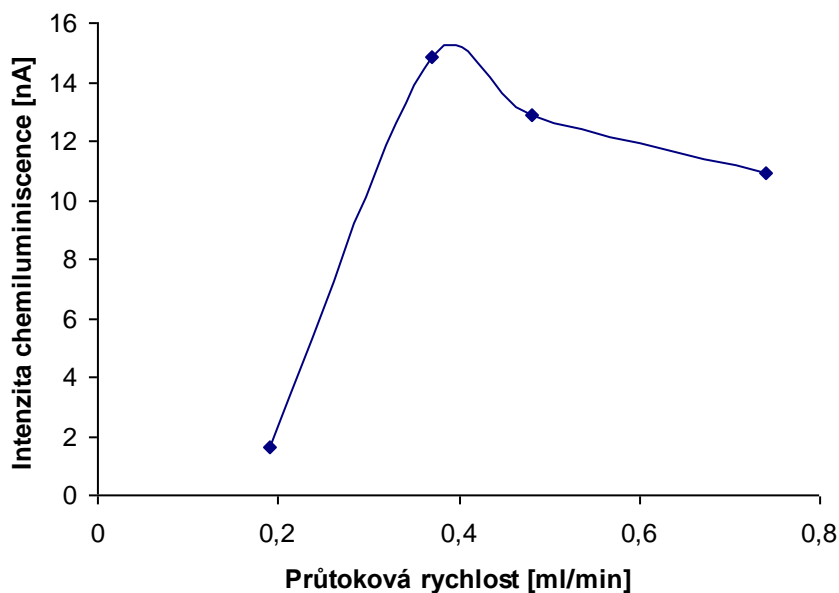
Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
v poměru 1 : 9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
0,225 M )

V tabulce č.2 jsou opět uvedeny průměrné hodnoty z pěti měření.

Tab. č.2: Volba rychlosti čerpání roztoků

| Rychlost pumpy<br>[ % ] | Průtoková rychlost<br>[ ml/min ] | Výška píku<br>[ % ] | Rozsah citlivosti<br>[ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence<br>[ nA ] |
|-------------------------|----------------------------------|---------------------|--|---------------------------------------|
| 10                      | 0,19                             | 3,23                | 0,05                                   | 1,61                                  |
| 20                      | 0,37                             | 29,64               | 0,05                                   | 14,82                                 |
| 30                      | 0,48                             | 25,8                | 0,05                                   | 12,9                                  |
| 40                      | 0,74                             | 21,83               | 0,05                                   | 10,92                                 |

Graf č.2: Závislost intenzity chemiluminiscence na průtokové rychlosti





#### 5.1.4. Nastavení nových časových parametrů

Pro rychlost peristaltické pumpy 20 % a dobu dávkování 5 s jsem zjistila odpovídající časové parametry, které jsem pak zachovávala po dobu dalšího měření konstantní.

Overall period: 30 s

Baseline pointers: 2 – 8 s

Integration pointers: 10 – 29 s

Průtoková rychlost: 0,37 ml.min<sup>-1</sup>

Za těchto podmínek lze metodou dosáhnout až 120 analýz za hodinu.

#### 5.1.5. Volba koncentrace manganistanu draselného

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,05  $\mu$ A

Vzorek: 0,2 mM thioridazin

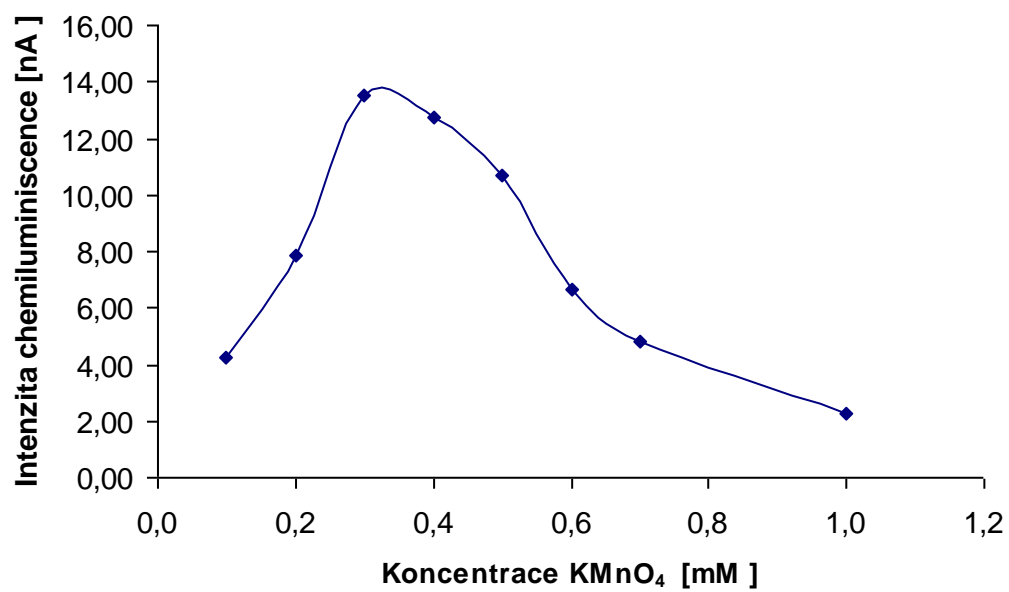
Nosný proud: 1,0 – 10,0 mM KMnO<sub>4</sub> zředěný 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v poměru 1 : 9 ( koncentrace KMnO<sub>4</sub> je tedy 0,1 – 1,0 mM a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,225 M )

Výsledky měření shrnuje tabulka a graf č.3.

Tab.č.3: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci KMnO<sub>4</sub> v nosném proudu

| Koncentrace KMnO <sub>4</sub><br>[ mM ] | Výška píku<br>[ % ] | Rozsah citlivosti<br>[ $\mu$ A ] | Intenzita chemiluminiscence<br>[ nA ] |
|---|---------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| 0,1                                     | 8,52                | 0,05                             | 0,06                                  |
| 0,2                                     | 15,66               | 0,05                             | 7,83                                  |
| 0,3                                     | 27,00               | 0,05                             | 13,50                                 |
| 0,4                                     | 25,42               | 0,05                             | 12,71                                 |
| 0,5                                     | 21,40               | 0,05                             | 10,70                                 |
| 0,6                                     | 13,38               | 0,05                             | 6,69                                  |
| 0,7                                     | 9,57                | 0,05                             | 4,79                                  |
| 1,0                                     | 4,60                | 0,05                             | 2,30                                  |

Graf č. 3: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci  $\text{KMnO}_4$  v nosném proudu



### 5.1.6. Volba koncentrace kyseliny sírové

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,05  $\mu$ A

Vzorek: 0,2 mM thioridazin

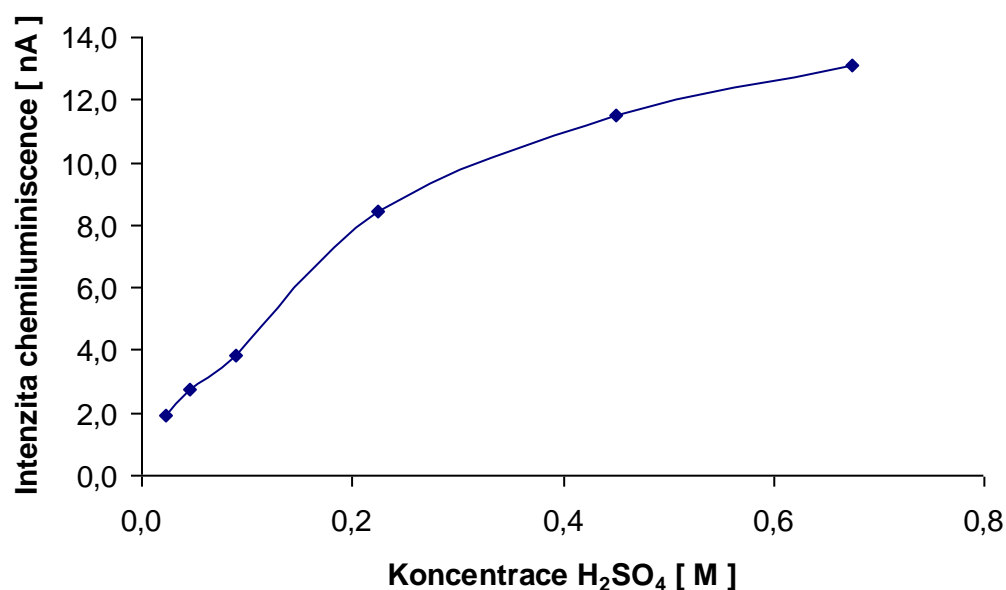
Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o příslušné koncentraci (0,025 M; 0,05 M; 01 M; 025 M; 0,50 M; 0,75 M) v poměru 1 : 9, koncentrace  $\text{H}_2\text{SO}_4$  je tedy 0,023 – 0,675 M.

Závislost intenzity chemiluminiscence na zvyšující se koncentraci  $\text{H}_2\text{SO}_4$  shrnuje tabulka a graf č.4.

Tab. č. 4: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v nosném proudu

| Koncentrace $\text{H}_2\text{SO}_4$ [ M ] | Výška píku [ % ] | Rozsah citlivosti [ $\mu$ A ] | Intenzita chemiluminiscence [ nA ] |
|---|------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 0,023                                     | 3,82             | 0,05                          | 1,91                               |
| 0,045                                     | 5,52             | 0,05                          | 2,76                               |
| 0,090                                     | 7,65             | 0,05                          | 3,83                               |
| 0,225                                     | 16,85            | 0,05                          | 8,43                               |
| 0,450                                     | 23,00            | 0,05                          | 11,50                              |
| 0,675                                     | 26,16            | 0,05                          | 13,08                              |

Graf č.4: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v nosném proudu



### 5.1.7. Volba poměru činidel v nosném proudu

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,05  $\mu\text{A}$

Vzorek: 0,2 mM thioridazin

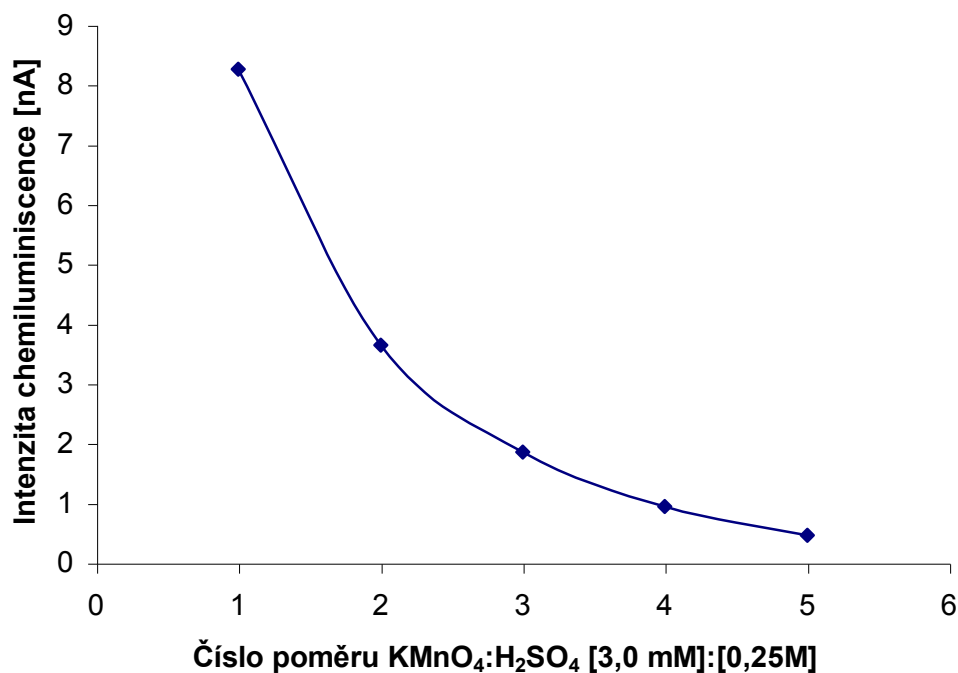
Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
v poměru 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5

V tabulce č.5 jsou uvedeny průměrné hodnoty z pěti měření.

Tabulka č.5: Volba poměru činidel v nosném proudu

| Číslo poměru | $\text{KMnO}_4:\text{H}_2\text{SO}_4$<br>[ 3,0 mM ]:[ 0,25 M ] | Výška píku<br>[ % ] | Rozsah citlivosti<br>[ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence<br>[ nA ] |
|--------------|--|---------------------|--|---------------------------------------|
| 1            | 1:9  | 16,52               | 0,05                                   | 8,26                                  |
| 2            | 2:8  | 7,28                | 0,05                                   | 3,64                                  |
| 3            | 3:7  | 3,70                | 0,05                                   | 1,85                                  |
| 4            | 4:6  | 1,88                | 0,05                                   | 0,94                                  |
| 5            | 5:5  | 0,05                | 0,05                                   | 0,46                                  |

Graf č. 5: Závislost intenzity chemiluminiscence na poměru činidel v nosném proudu



## 5.1.8. Vliv látek zvyšujících intenzitu chemiluminiscence

### 5.1.8.1 Vliv kyseliny mravenčí (HCOOH)

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,05  $\mu$ A

Vzorek: 0,2 mM thioridazin, 0,1 – 0,4 M HCOOH

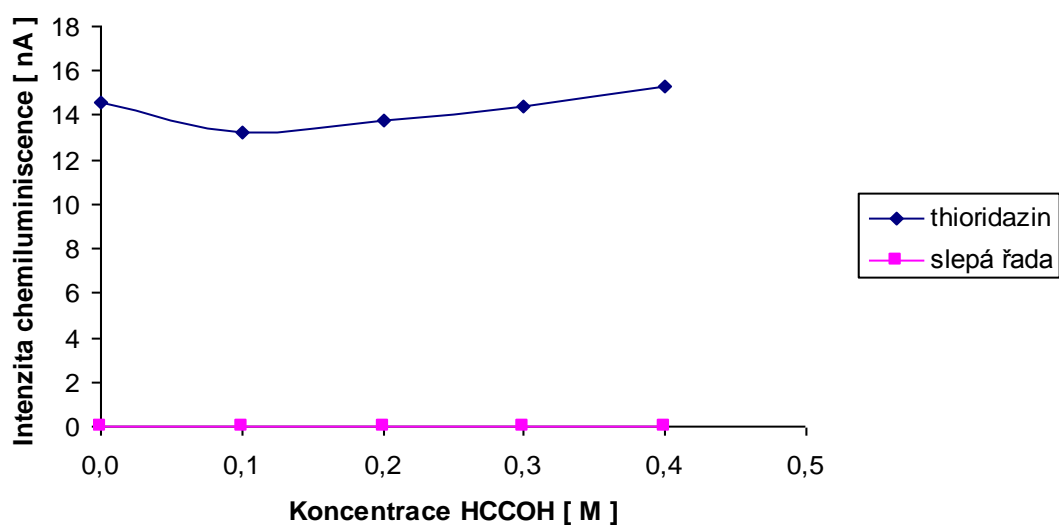
Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
v poměru 1:9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
0,225 M )

Výsledky shrnuje tabulka a graf č. 6.

Tab. č. 6: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci HCOOH

| Koncentrace HCOOH [ M ] | Výška píku [ % ] | Rozsah citlivosti [ $\mu$ A ] | Intenzita chemiluminiscence [ nA ] |
|-------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 0,0                     | 29,08            | 0,05                          | 14,54                              |
| 0,1                     | 26,42            | 0,05                          | 13,21                              |
| 0,2                     | 27,48            | 0,05                          | 13,74                              |
| 0,3                     | 28,84            | 0,05                          | 14,42                              |
| 0,4                     | 30,66            | 0,05                          | 15,33                              |

Graf č. 6: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci HCOOH



### 5.1.8.2 Vliv dodecylbenzensulfonátu sodného (DBS )

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,05  $\mu$ A

Vzorek: 0,2 mM thioridazin, 1,0 – 10,0 mM DBS

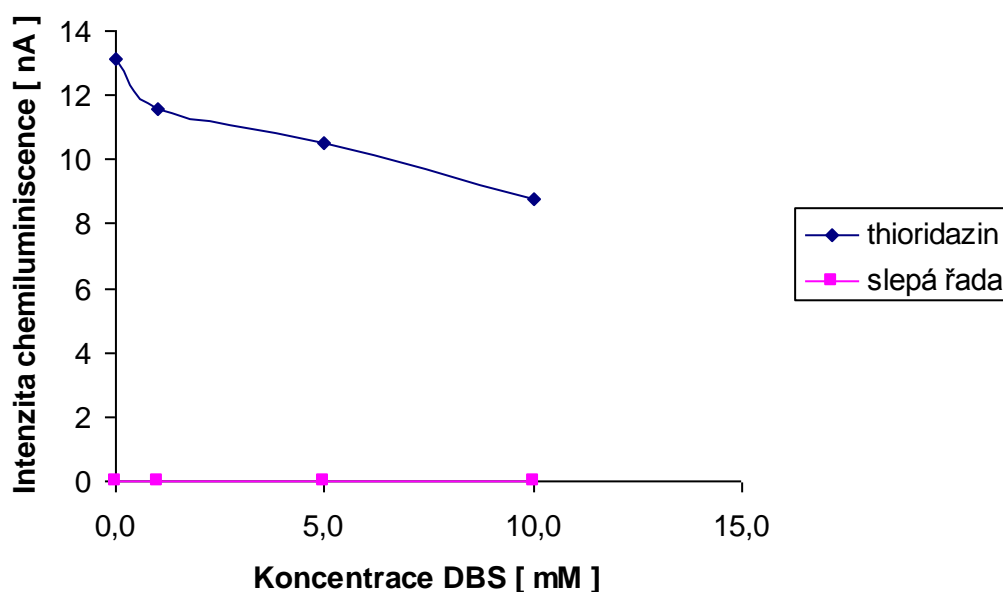
Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
v poměru 1:9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
0,225 M )

Vliv přidavku DBS na intenzitu chemiluminiscence shrnuje tabulka č. 7, ve které jsou zaznamenány průměrné hodnoty z pěti měření.

Tab. č. 7: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci DBS

| Koncentrace DBS [ mM ] | Výška píku [ % ] | Rozsah citlivosti [ $\mu$ A ] | Intenzita chemiluminiscence [ nA ] |
|------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 0,0                    | 26,30            | 0,05                          | 13,15                              |
| 1,0                    | 23,14            | 0,05                          | 11,57                              |
| 5,0                    | 21,08            | 0,05                          | 10,54                              |
| 10,0                   | 17,50            | 0,05                          | 8,75                               |

Graf č. 7: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci DBS



### 5.1.8.3 Vliv polyfosfátu sodného (PFS)

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,05 – 0,2  $\mu\text{A}$

Vzorek: 0,2 mM thioridazin, 10,0 – 100,0 mM PFS

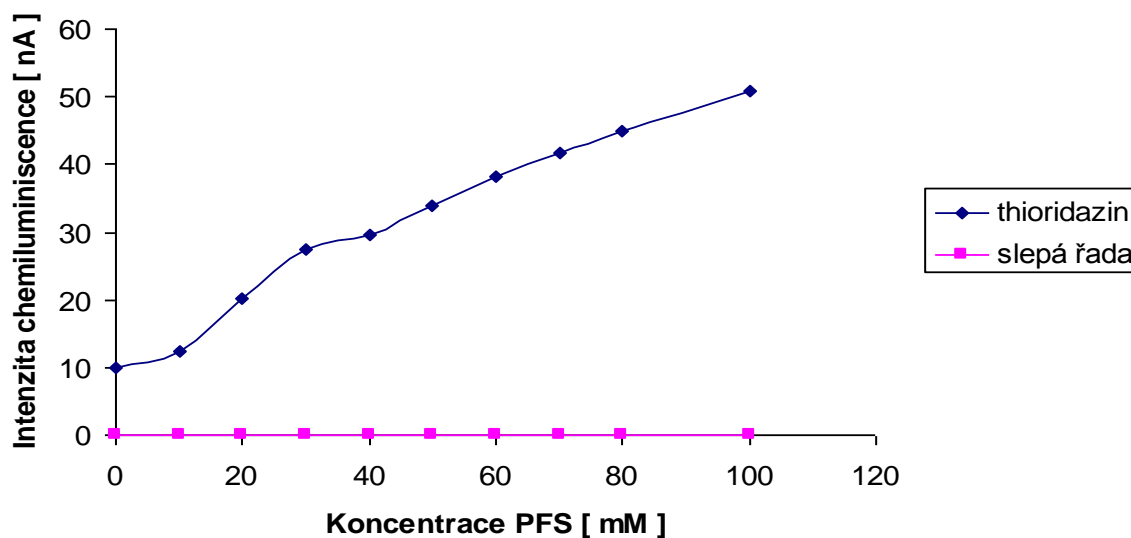
Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
v poměru 1:9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
0,225 M )

Výsledky měření shrnuje tabulka č. 8, ve které jsou uvedeny průměrné hodnoty z pěti měření.

Tab. č. 8: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci PFS

| Koncentrace PFS [ mM ] | Výška píku [ % ] | Rozsah citlivosti [ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence [ nA ] |
|------------------------|------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 0,0                    | 20,16            | 0,05                                | 10,08                              |
| 10,0                   | 24,62            | 0,05                                | 12,31                              |
| 20,0                   | 40,58            | 0,05                                | 20,29                              |
| 30,0                   | 54,68            | 0,05                                | 27,34                              |
| 40,0                   | 29,60            | 0,10                                | 29,60                              |
| 50,0                   | 17,00            | 0,20                                | 34,00                              |
| 60,0                   | 19,08            | 0,20                                | 38,16                              |
| 70,0                   | 20,84            | 0,20                                | 41,68                              |
| 80,0                   | 22,44            | 0,20                                | 44,88                              |
| 100,0                  | 25,48            | 0,20                                | 50,96                              |

Graf č. 8: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci PFS



## 5.2. Stanovení obsahu thioridazinu

### 5.2.1. Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,01 -0,05  $\mu\text{A}$

Dávkovaný objem vzorku: 200,0  $\mu\text{l}$

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$

v poměru 1:9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$

0,225 ) Při měření nebyly použity zesilovače

chemiluminiscence.

Výsledky shrnuje tabulka č. 9, ve které jsou uvedeny průměrné hodnoty z pěti měření.

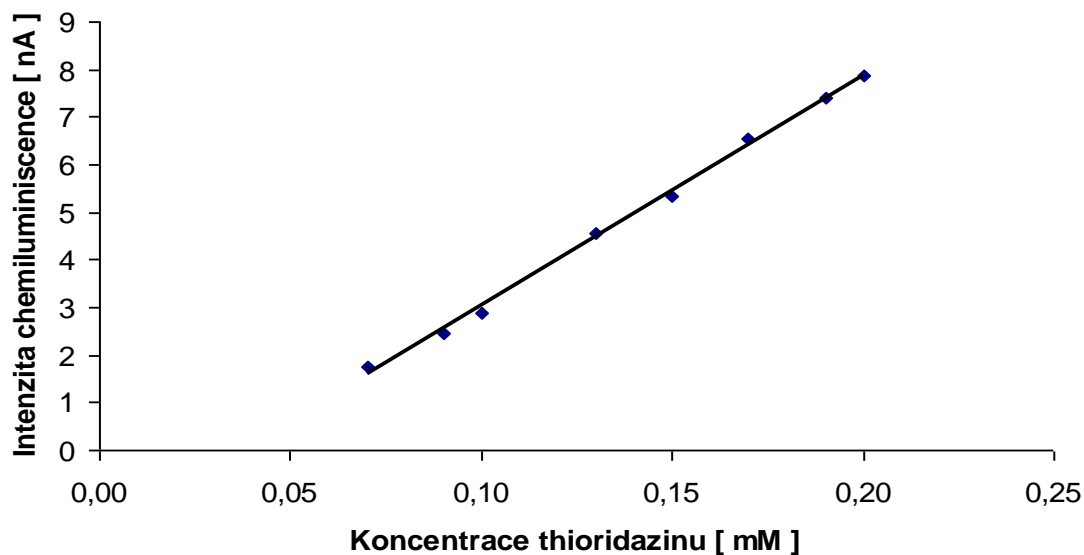
Tab. č. 9: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu

| Koncentrace thioridazinu<br>[ mM ] | Výška píku<br>[ % ] | Rozsah citlivosti<br>[ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence<br>[ nA ] |
|------------------------------------|---------------------|--|---------------------------------------|
| 0,07                               | 8,77                | 0,02                                   | 1,75                                  |
| 0,09                               | 12,24               | 0,02                                   | 2,45                                  |
| 0,10                               | 28,94               | 0,01                                   | 2,89                                  |
| 0,13                               | 22,84               | 0,02                                   | 4,57                                  |
| 0,15                               | 26,66               | 0,02                                   | 5,33                                  |
| 0,17                               | 13,10               | 0,05                                   | 6,55                                  |
| 0,19                               | 14,78               | 0,05                                   | 7,39                                  |
| 0,20                               | 15,72               | 0,05                                   | 7,86                                  |

Z pěti měření vzorku o koncentraci 0,13 mM a 0,20 mM jsem vypočítala relativní směrodatnou odchylku, která vyjadřuje reprodukovatelnost výsledků měření kalibrační křivky. Pro thioridazin 0,13 mM  $s_r = 1,78$  , pro thioridazin 0,20 mM  $s_r = 1,91$ .



Graf č. 9: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu v rozsahu koncentrací 0,07 – 0,20 mM



Statistické hodnocení kalibrační křivky:

Rovnice  $I_{CL} = 48,395 \cdot c(\text{mM}) - 1,8055$

Korelační koeficient  $r = 0,9987$

Směrnice  $k = 48,395$

Úsek na ose y  $q = 1,8055$

### 5.2.2. Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu s přidavkem polyfosfátu sodného

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,02 – 0,05  $\mu\text{A}$

Dávkovaný objem vzorku: 200,0  $\mu\text{l}$

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1:9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,225 M )

Při měření byl použit stálý přídavek 8,0 ml zásobního roztoku 0,25 M PFS (koncentrace ve vzorku je tedy 80,0 mM) .

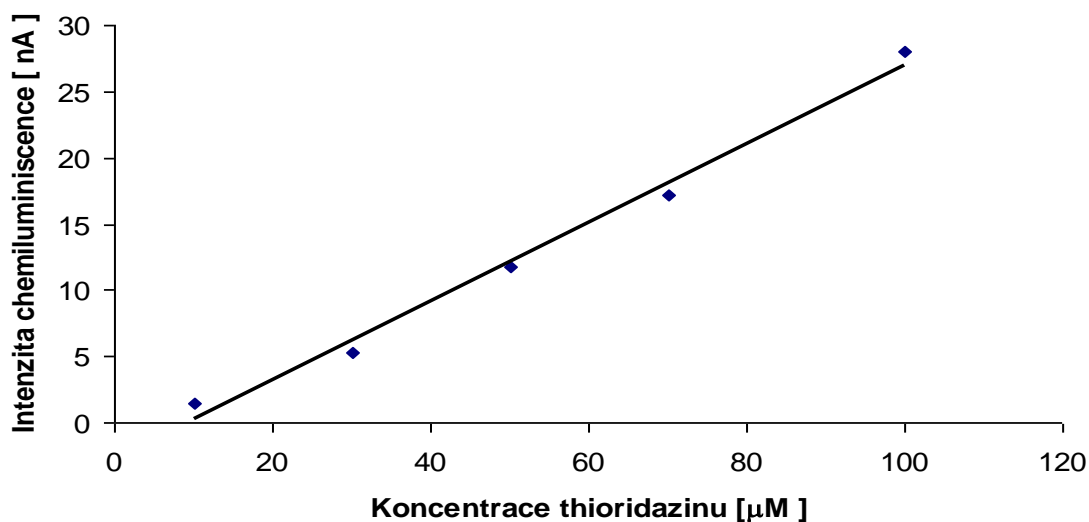
Výsledky měření shrnuje tabulka a graf č. 10.

Tab. č. 10: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu s přidavkem PFS

| Koncentrace thioridazinu [ $\mu\text{M}$ ] | Výška píku [ % ] | Rozsah citlivosti [ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence [ nA ] |
|--|------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 10,00                                      | 7,25             | 0,02                                | 1,45                               |
| 30,00                                      | 26,36            | 0,02                                | 5,27                               |
| 50,00                                      | 23,42            | 0,05                                | 11,71                              |
| 70,00                                      | 34,34            | 0,05                                | 17,17                              |
| 100,00                                     | 55,94            | 0,05                                | 27,97                              |

Z deseti nástřiků vzorku o koncentraci 50,0  $\mu\text{M}$  jsem vypočítala směrodatnou odchylku a relativní směrodatnou odchylku, která vyjadřuje reprodukovatelnost výsledků měření kalibrační křivky.

Graf č. 10: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu s přidavkem PFS



Statistické hodnocení kalibrační křivky thioridazinu s PFS:

|                      |   |
|----------------------|---|
| rovnice              | $I_{CL} = 0,2841 \cdot c(\mu\text{M}) - 1,7827$ |
| korelační koeficient | $r = 0,9951$                                    |
| směrnice             | $k = 0,2841$                                    |
| úsek na ose y        | $q = 1,7827$                                    |

směrodatná odchylka  $s = 0,68$

relativní směrodatná odchylka  $s_r = 2,95$

Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci thioridazinu by se dala v rozsahu koncentrací 10,0 – 100,0  $\mu\text{M}$  považovat za lineární. Tuto kalibrační křivku jsem použila pro stanovení thioridazinu v HVLP ( Thioridazin<sup>®</sup> tbl. obd., 50  $\times$  25 mg ).

### 5.3. Stanovení obsahu promethazinu

#### 5.3.1. Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,02 – 0,05  $\mu\text{A}$

Dávkovaný objem vzorku: 200,0  $\mu\text{l}$

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1:9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  je 0,225 M )

Při měření nebyly použity zesilovače chemiluminiscence.

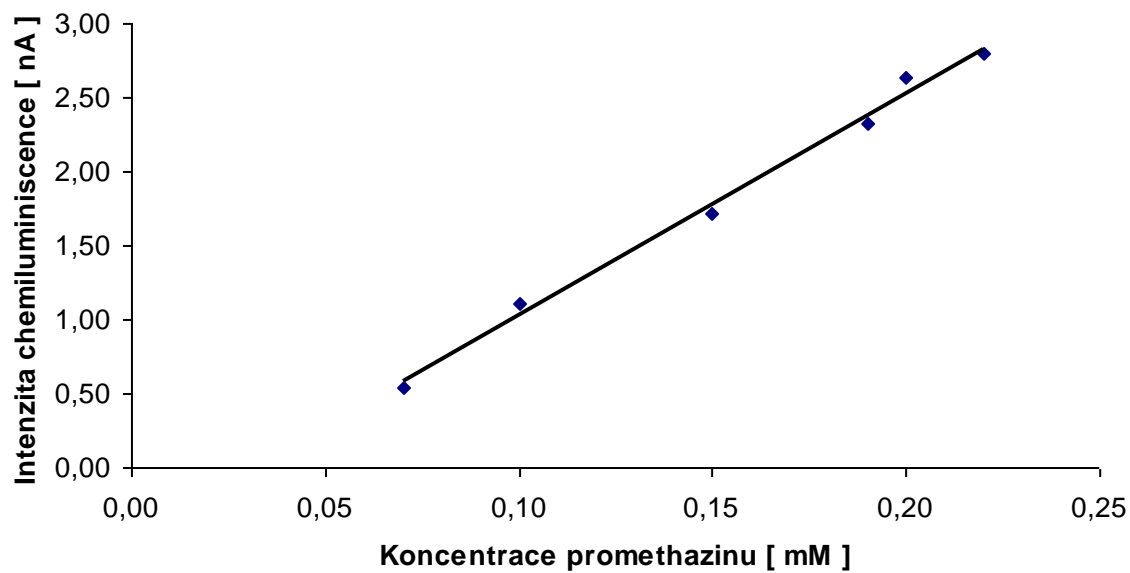
Výsledky shrnuje tabulka č. 11, ve které jsou uvedeny průměrné hodnoty z pěti měření.

Tab. č. 11: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu

| Koncentrace promethazinu<br>[ mM ] | Výška píku<br>[ % ] | Rozsah citlivosti<br>[ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence<br>[ nA ] |
|------------------------------------|---------------------|--|---------------------------------------|
| 0,10                               | 2,22                | 0,05                                   | 1,11                                  |
| 0,15                               | 8,54                | 0,02                                   | 1,71                                  |
| 0,19                               | 11,62               | 0,02                                   | 2,32                                  |
| 0,20                               | 5,28                | 0,05                                   | 2,64                                  |
| 0,22                               | 13,98               | 0,02                                   | 2,80                                  |

Z pěti nástřiků vzorku o koncentraci 0,10 mM a 0,20 mM jsem vypočítala relativní směrodatnou odchylku, která vyjadřuje reprodukovatelnost výsledků měření kalibrační křivky. Pro promethazin 0,10 mM  $s_r = 1,87\%$  , pro promethazin 0,20 mM  $s_r = 2,10\%$  .

Graf č. 11: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu



Statistické hodnocení kalibrační křivky:

Rovnice  $I_{CL} = 15,014 \cdot c(\text{mM}) - 0,4738$

Korelační koeficient  $r = 0,9963$

Směrnice  $k = 15,014$

Úsek na ose y  $q = 0,4738$

### 5.3.2. Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu s přidavkem polyfosfátu sodného

Podmínky při stanovení: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,01 – 0,05  $\mu\text{A}$

Dávkovaný objem vzorku: 200,0  $\mu\text{l}$

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1:9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  je 0,225 M )

Při měření byl použit stálý přídavek 8,0 ml zásobního roztoku 0,25 M PFS (koncentrace ve vzorku je 80,0 mM).

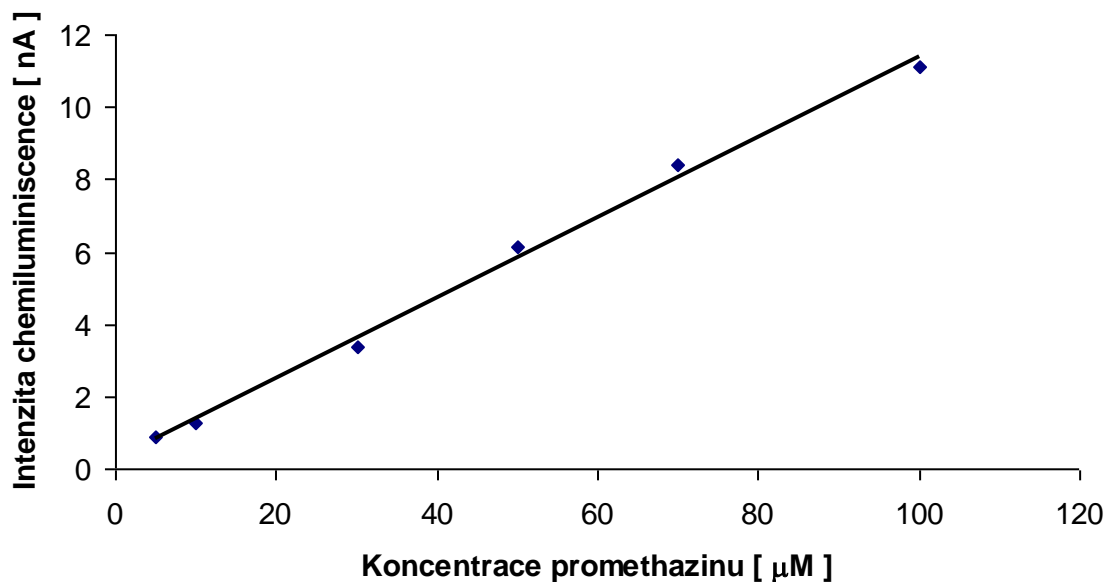
Výsledky měření shrnuje tabulka a graf č. 12.

Tab. č. 12: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu s přidavkem PFS

| Koncentrace promethazinu<br>[ $\mu\text{M}$ ] | Výška píku<br>[ % ] | Rozsah citlivosti<br>[ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence<br>[ nA ] |
|---|---------------------|--|---------------------------------------|
| 5,0   | 8,59                | 0,01                                   | 0,86                                  |
| 10,0  | 6,23                | 0,02                                   | 1,25                                  |
| 30,0  | 6,70                | 0,05                                   | 3,35                                  |
| 50,0  | 12,24               | 0,05                                   | 6,12                                  |
| 70,0  | 16,82               | 0,05                                   | 8,41                                  |
| 100,0   | 22,24               | 0,05                                   | 11,12                                 |

Z deseti nástřiků vzorku o koncentraci 50,0  $\mu\text{M}$  jsem vypočítala směrodatnou odchylku a relativní směrodatnou odchylku, která vyjadřuje reprodukovatelnost výsledků měření kalibrační křivky.

Graf č. 12: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu s přidavkem PFS



Statistické hodnocení kalibrační křivky promethazinu s PFS:

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Rovnice                       | $I_{CL} = 0,1116 \cdot c(\mu\text{M}) + 0,2565$ |
| Korelační koeficient          | $r = 0,9978$                                    |
| Směrnice                      | $k = 0,1116$                                    |
| Úsek na ose y                 | $q = 0,2565$                                    |
| Směrodatná odchylka           | $s = 0,30$                                      |
| Relativní směrodatná odchylka | $s_r = 2,45 \%$                                 |

Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci promethazinu by se dala v rozsahu koncentrací 5,0 – 100,0 µM považovat za lineární. Tuto kalibrační křivku jsem použila pro stanovení promethazinu v HVLP ( Prothazin<sup>®</sup> tbl. obd., 20 × 25 mg ).

## 5.4. Stanovení obsahu levomepromazinu

### 5.4.1. Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,05 – 0,1  $\mu\text{A}$

Dávkovaný objem vzorku: 200,0  $\mu\text{l}$

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1 : 9 (koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,225 M)

Při měření nebyly použity zesilovače chemiluminiscence.

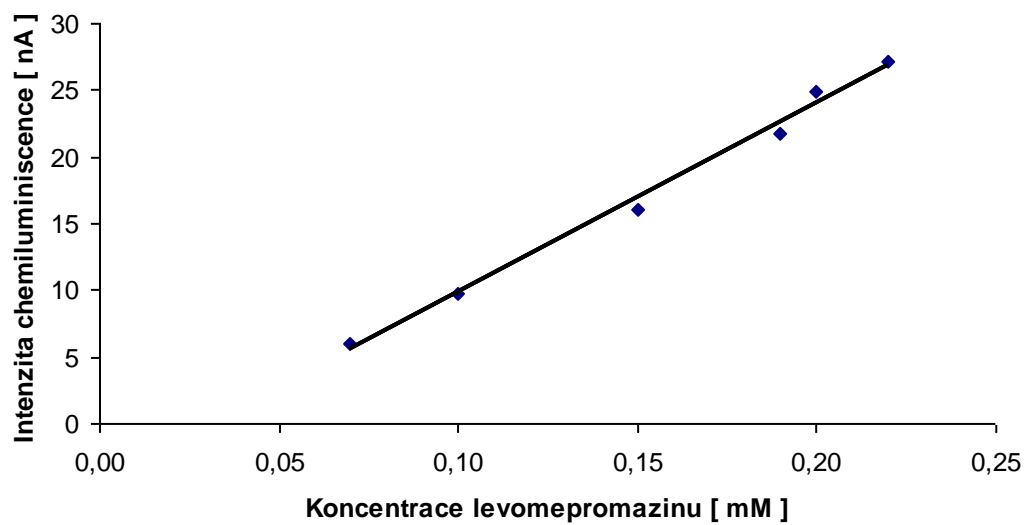
Výsledky shrnuje tabulka č. 13, ve které jsou uvedeny průměrné hodnoty z pěti měření.

Tab. č. 13: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu

| Koncentrace levomepromazinu [mM] | Výška píku [%] | Rozsah citlivosti [ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence [nA] |
|----------------------------------|----------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 0,07                             | 11,96          | 0,05                                | 5,98                             |
| 0,10                             | 19,56          | 0,05                                | 9,78                             |
| 0,15                             | 32,20          | 0,05                                | 16,10                            |
| 0,19                             | 43,40          | 0,05                                | 21,70                            |
| 0,20                             | 24,90          | 0,10                                | 24,90                            |
| 0,22                             | 27,10          | 0,10                                | 27,10                            |

Z pěti nástřiků vzorku o koncentraci 0,10 mM a 0,20 mM jsem vypočítala relativní směrodatnou odchylku, která vyjadřuje reprodukovatelnost výsledků měření kalibrační křivky. Pro levomepromazin 0,10 mM  $s_r = 1,10 \%$ , pro levomepromazin 0,20 mM  $s_r = 1,93 \%$ .

Graf č. 13: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu.



Statistické hodnocení kalibrační křivky:

Rovnice  $I_{CL}(\text{nA}) = 141,68 \cdot c(\text{mM}) - 4,3669$

Korelační koeficient  $r = 0,9965$

Směrnice  $k = 141,68$

Úsek na ose y  $q = 4,3669$



### 5.4.2. Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu s přidavkem polyfosfátu sodného

Podmínky při testování: Napětí na fluorimetru: 596 V

Rozsah detektoru: 0,02 – 0,1  $\mu\text{A}$

Dávkovaný objem vzorku: 200,0  $\mu\text{l}$

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
v poměru 1 : 9

( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,225 M )

Při měření byl použit stálý přidavek 8,0 ml zásobního roztoku  
0,25 M PFS (koncentrace ve vzorku tedy je 80,0 mM).

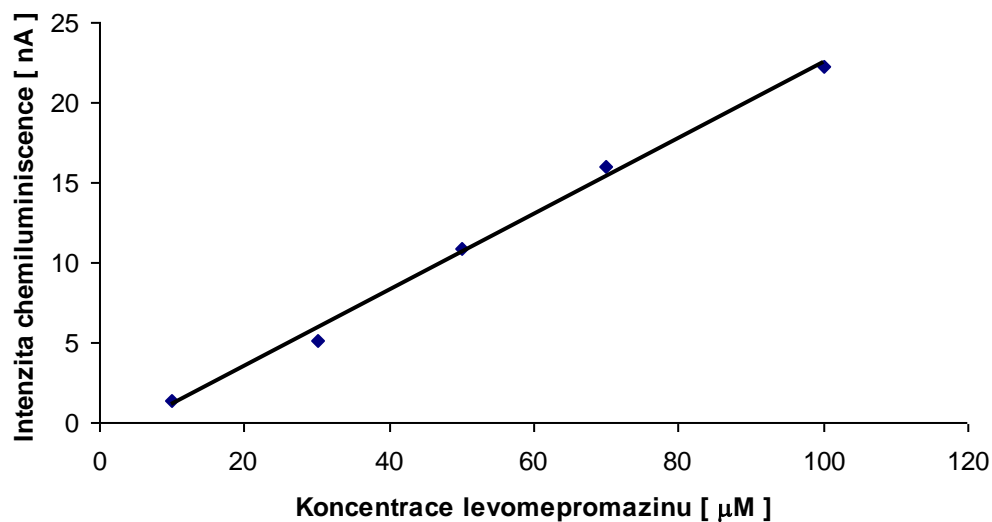
Výsledky měření shrnuje tabulka a graf č. 14.

Tab. č. 14: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu s přidavkem PFS

| Koncentrace levomepromazinu<br>[ $\mu\text{M}$ ] | Výška píku<br>[ % ] | Rozsah citlivosti<br>[ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence<br>[ nA ] |
|--|---------------------|--|---------------------------------------|
| 10,0   | 6,75                | 0,02                                   | 1,35                                  |
| 30,0   | 25,50               | 0,02                                   | 5,10                                  |
| 50,0   | 21,78               | 0,05                                   | 10,89                                 |
| 70,0   | 31,92               | 0,05                                   | 15,96                                 |
| 100,0  | 22,20               | 0,10                                   | 22,20                                 |

Z deseti nástřiků vzorku o koncentraci 50,0  $\mu\text{M}$  jsem vypočítala směrodatnou a relativní směrodatnou odchylku, která vyjadřuje reprodukovatelnost výsledků měření kalibrační křivky.

Graf č. 14: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu s přídavkem PFS



Statistické hodnocení kalibrační křivky levomepromazinu s PFS:

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Rovnice                       | $I_{CL}(\text{nA}) = 0,2382 \cdot c (\mu\text{M}) - 1,2841$ |
| Korelační koeficient          | $r = 0,9979$  |
| Směrnice                      | $k = 0,2382$  |
| Úsek na ose y                 | $q = 1,2841$  |
| Směrodatná odchylka           | $s = 0,35$  |
| Relativní směrodatná odchylka | $s_r = 1,61 \%$   |

Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci levomepromazinu by se dala v rozsahu koncentrací 10,0 – 100,0 µM považovat za lineární. Tuto kalibrační křivku jsem použila pro stanovení levomepromazinu v HVL (Tisercin<sup>®</sup> inj., 10 × 1 ml / 25 mg).

## 5.5. Stanovení obsahu thioridazinu ve farmaceutickém přípravku

### 5.5.1. Stanovení obsahu metodou průtokové injekční analýzy

Podmínky při stanovení: Napětí na fluorimetru: 596

Rozsah detektoru:

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1:9 (koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,225 M)

Při měření byl použit stálý přídavek 8,0 ml zásobního roztoku 0,25 M PFS (koncentrace ve vzorku tedy je 80,0 mM).

Tab. č. 15: Stanovení obsahu thioridazinu v tabletách metodou FIA

| Měření č.                     | Navážka [g] | Výška píku [%] | Rozsah citlivosti [ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita CL [nA] | Nalezená koncentrace [ $\mu\text{M}$ ] | Obsah [%] | Obsah [mg] |
|-------------------------------|-------------|----------------|-------------------------------------|-------------------|--|-----------|------------|
| 1                             | 0,2317      | 26,93          | 0,05                                | 13,47             | 53,69                                  | 109,57    | 27,39      |
| 2                             | 0,2317      | 24,95          | 0,05                                | 12,48             | 50,20                                  | 102,45    | 25,61      |
| 3                             | 0,2318      | 26,35          | 0,05                                | 13,18             | 52,67                                  | 107,49    | 26,87      |
| 4                             | 0,2317      | 26,05          | 0,05                                | 13,03             | 52,14                                  | 106,41    | 26,60      |
| 5                             | 0,2318      | 25,86          | 0,05                                | 12,93             | 51,79                                  | 105,69    | 26,42      |
| Průměrný obsah                |             |                |                                     |                   |  | 106,32    | 26,58      |
| Směrodatná odchylka           |             |                |                                     |                   |  | 2,34      | 0,58       |
| Relativní směrodatná odchylka |             |                |                                     |                   |  | 2,20      | 2,20       |

Na základě srovnání nalezené a předpokládané koncentrace jsem vypočítala obsah účinné látky v tabletě.

### 5.5.2. Zkouška na obsahovou stejnoměrnost metodou FIA

Tab. č. 16: Zkouška na obsahovou stejnoměrnost

| Tableta č.            | Výška píku [ % ] | Rozsah citlivosti [ $\mu$ A ] | Intenzita chemiluminiscence [ nA ] | Obsah [ mg ] | Odchylka od průměru [ % ] |
|-----------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------|---------------------------|
| 1                     | 26,30            | 0,05                          | 13,15                              | 26,82        | 107,27                    |
| 2                     | 26,15            | 0,05                          | 13,08                              | 26,69        | 106,78                    |
| 3                     | 24,96            | 0,05                          | 12,48                              | 25,61        | 102,45                    |
| 4                     | 26,15            | 0,05                          | 13,08                              | 26,69        | 106,78                    |
| 5                     | 26,32            | 0,05                          | 13,16                              | 26,84        | 107,35                    |
| 6                     | 25,96            | 0,05                          | 12,98                              | 26,51        | 106,04                    |
| 7                     | 26,05            | 0,05                          | 13,03                              | 26,60        | 106,41                    |
| 8                     | 25,95            | 0,05                          | 12,98                              | 26,51        | 106,04                    |
| 9                     | 25,86            | 0,05                          | 12,93                              | 26,42        | 105,69                    |
| 10                    | 25,86            | 0,05                          | 12,93                              | 26,42        | 105,69                    |
| Průměrný obsah [ mg ] |                  |                               |                                    | 26,51        | 106,05                    |

Na základě srovnání nalezené a předpokládané koncentrace jsem vypočítala obsah účinné látky v tabletě. Přípravek Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. vyhovuje zkoušce na obsahovou stejnoměrnost podle ČL 2002.

### 5.5.3. Stanovení obsahu thioridazinu lékopisnou metodou ČL 2002

Stanovení bylo provedeno s přípravkem Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg tbl. obd. Do kádinky jsem navážila prášek z rozdrčených tablet v množství odpovídajícím 0,300 g thioridazinu ( 2,6973 g ). Stanovení jsem provedla se třemi navážkami. Ke stanovení jsem použila standardizovaný odměrný roztok kyseliny chloristé 0,1 mol / l z katedry analytické chemie. Faktor tohoto odměrného roztoku je 0,9480.

Výpočet % obsahu:

$$\%(thioridazin) = \frac{V \cdot f \cdot H_e \cdot 100}{nav} \quad (4)$$

Kde :

$H_e$  .....hmotnostní ekvivalent [ml/mg]

f.....faktor odměrného roztoku

V.....objem odměrného roztoku [ml]

nav.....navážka [mg]

Tab. č. 17: Stanovení obsahu thioridazinu v tabletách metodou ČL 2002

| Navážka<br>[ g ] | Spotřeba odměrného<br>roztoku<br>[ ml ] | Obsah thioridazinu<br>v navážce<br>[ % ] | Obsah thioridazinu<br>v navážce<br>[ mg ] | Obsah<br>thioridazinu<br>v tabletě<br>[ % ] |
|------------------|---|--|---|---|
| 2,6973           | 8,00                                    | 11,44                                    | 308,57                                    | 106,16                                      |
| 2,6974           | 8,00                                    | 11,44                                    | 308,67                                    | 106,20                                      |
| 2,6977           | 8,10                                    | 11,58                                    | 312,53                                    | 107,52                                      |
| Průměrný obsah   |   |  |   | 106,63                                      |

Pomocí výše uvedeného vzorce jsem vypočítala obsah thioridazinu v navážce v % a po vynásobení navážkou jsem zjistila obsah thioridazinu v navážce v mg. Teoretický obsah thioridazinu jsem určila z průměrné hmotnosti tablety (0,2320 g odpovídá 25 mg thioridazinu), tu jsem vztáhla na navážku a získala jsem obsah v mg odpovídající 100%. Pomocí této hodnoty jsem vypočítala obsah thioridazinu v tabletě v %. Obsah předepsaný lékopisem ČL 2002 je 99,0 % - 101,0 %.

## 5.6. Stanovení obsahu promethazinu ve farmaceutickém přípravku

### 5.6.1. Stanovení metodou průtokové injekční analýzy

Podmínky při stanovení: Napětí na fluorimetru: 596

Rozsah detektoru: 0,05  $\mu\text{A}$

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1:9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,225 M )

Při měření byl použit stálý přídavek 8,0 ml zásobního roztoku 0,25 M PFS (koncentrace ve vzorku tedy je 80,0 mM).

Tab. č. 18: Stanovení obsahu promethazinu v tabletách metodou FIA

| Měření č.                     | Navážka [g] | Výška píku [%] | Rozsah citlivosti [ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita CL [nA] | Nalezená koncentrace [ $\mu\text{M}$ ] | Obsah [%] | Obsah [mg] |
|-------------------------------|-------------|----------------|-------------------------------------|-------------------|--|-----------|------------|
| 1                             | 0,0611      | 13,92          | 0,05                                | 6,96              | 60,07                                  | 96,89     | 24,22      |
| 2                             | 0,0611      | 14,10          | 0,05                                | 7,05              | 60,87                                  | 98,18     | 24,54      |
| 3                             | 0,0611      | 14,12          | 0,05                                | 7,06              | 60,96                                  | 98,32     | 24,58      |
| 4                             | 0,0612      | 14,21          | 0,05                                | 7,11              | 61,37                                  | 98,98     | 24,75      |
| 5                             | 0,0611      | 13,67          | 0,05                                | 6,84              | 58,99                                  | 95,15     | 23,79      |
| Průměrný obsah                |             |                |                                     |                   |  | 97,50     | 24,38      |
| Směrodatná odchylka           |             |                |                                     |                   |  | 1,03      | 0,34       |
| Relativní směrodatná odchylka |             |                |                                     |                   |  | 1,06      | 1,39       |

Na základě srovnání nalezené a předpokládané koncentrace jsem vypočítala obsah účinné látky v tabletě

### 5.6.2. Zkouška na obsahovou stejnoměrnost metodou FIA

Tab. č. 19: Zkouška na obsahovou stejnoměrnost

| Tableta č.            | Výška píku [ % ] | Rozsah citlivosti [ $\mu$ A ] | Intenzita chemiluminiscence [ nA ] | Obsah [ mg ] | Odchylka od průměru [ % ] |
|-----------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------|---------------------------|
| 1                     | 12,30            | 0,05                          | 6,15                               | 21,29        | 85,18                     |
| 2                     | 14,18            | 0,05                          | 7,09                               | 24,69        | 98,76                     |
| 3                     | 14,26            | 0,05                          | 7,13                               | 24,83        | 99,34                     |
| 4                     | 14,56            | 0,05                          | 7,28                               | 25,38        | 101,51                    |
| 5                     | 13,74            | 0,05                          | 6,87                               | 23,90        | 95,58                     |
| 6                     | 14,18            | 0,05                          | 7,09                               | 24,69        | 98,76                     |
| 7                     | 14,20            | 0,05                          | 7,10                               | 24,73        | 98,91                     |
| 8                     | 13,96            | 0,05                          | 6,98                               | 24,29        | 97,17                     |
| 9                     | 14,12            | 0,05                          | 7,06                               | 24,58        | 98,33                     |
| 10                    | 14,20            | 0,05                          | 7,10                               | 24,73        | 98,91                     |
| Průměrný obsah [ mg ] |                  |                               |                                    | 24,31        |                           |

Na základě srovnání nalezené a předpokládané koncentrace jsem vypočítala obsah účinné látky v tabletě. Přípravek Prothazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. vyhovuje zkoušce na obsahovou stejnoměrnost podle ČL 2002.

### 5.6.3. Stanovení obsahu promethazinu lékopisnou metodou ČL 2002

Stanovení bylo provedeno s přípravkem Prothazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl.obd., 20 × 25 mg. Do kádinky jsem navážila prášek z rozdrčených tablet v množství odpovídajícím 0,250 g promethazinu ( 0,5171 g ). Stanovení jsem provedla se třemi navážkami. Ke stanovení jsem použila standardizovaný odměrný roztok kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol / l VS z katedry analytické chemie, jejíž faktor byl 0,9801. Bylo nutné provést standardizaci odměrného roztoku hydroxidu sodného.

#### Standardizace hydroxidu sodného 0,1 mol / l VS:

20,0 ml hydroxidu sodného se titruje kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol / l VS za použití 0,5 ml fenolftaleinu RS jako indikátoru z fialového zbarvení do odbarvení. Výsledky shrnuje tabulka č. 20.

Tab. č. 20: Standardizace odměrného roztoku NaOH 0,1 mol / l VS

| Spotřeba odměrného roztoku<br>[ ml ] | Vypočtená koncentrace<br>[ mol / l ] |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 20,60                                | 0,1009                               |
| 20,70                                | 0,1014                               |
| 20,70                                | 0,1014                               |

$$c(A) \cdot V(A) = c(B) \cdot V(B) \quad (5)$$

Stanovená koncentrace NaOH: 0,1012 mol / l

Výpočet % obsahu:

$$\%(\text{promethazin}) = \frac{V(\text{ml}) \cdot f \cdot H_e \cdot 100}{\text{nav}} \quad (4)$$

Tab. č. 21: Stanovení obsahu promethazinu v tabletách metodou ČL 2002

| Navážka<br>[ g ] | Spotřeba odměrného<br>roztoku<br>[ ml ] | Obsah<br>promethazinu<br>v navážce<br>[ % ] | Obsah<br>promethazinu<br>v navážce<br>[ mg ] | Obsah<br>promethazinu<br>[ % ] |
|------------------|---|---|--|--------------------------------|
| 0,5171           | 6,38                                    | 40,07                                       | 210,5  | 99,49                          |
| 0,5170           | 6,37                                    | 40,01                                       | 206,85                                       | 98,14                          |
| 0,5171           | 6,36                                    | 39,94                                       | 206,53                                       | 97,97                          |
| Průměrný obsah   |   |   |  | 98,53                          |

Výpočet byl proveden jako v případě thioridazinu. Obsah promethazinu předepsaný lékopisem ČL 2002 je 99,0 % - 101,0 %.



## 5.7. Stanovení obsahu levomepromazinu ve farmaceutickém přípravku

### 5.7.1. Stanovení obsahu metodou průtokové injekční analýzy

Podmínky při stanovení: Napětí na fluorimetru: 596

Rozsah detektoru: 0,1  $\mu\text{A}$

Nosný proud: 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  zředěný 0,25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1:9 ( koncentrace  $\text{KMnO}_4$  je tedy 0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,225 M )

Při měření byl použit stálý přídavek 8,0 ml zásobního roztoku 0,25 M PFS.

Tab. č. 22: Stanovení obsahu levomepromazinu v injekcích metodou FIA

| Měření č.                           | Výška píku [ % ] | Rozsah citlivosti [ $\mu\text{A}$ ] | Intenzita chemiluminiscence [ nA ] | Nalezená koncentrace [ $\mu\text{M}$ ] |
|-------------------------------------|------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| 1                                   | 47,70            | 0,1                                 | 47,70                              | 205,64                                 |
| 2                                   | 50,60            | 0,1                                 | 50,60                              | 217,82                                 |
| 3                                   | 50,70            | 0,1                                 | 50,70                              | 218,24                                 |
| 4                                   | 49,02            | 0,1                                 | 49,02                              | 211,18                                 |
| 5                                   | 51,56            | 0,1                                 | 50,60                              | 217,82                                 |
| Průměrná koncentrace                |                  |                                     |                                    | 214,14                                 |
| Směrodatná odchylka                 |                  |                                     |                                    | 5,00                                   |
| Relativní směrodatná odchylka [ % ] |                  |                                     |                                    | 2,33                                   |

Při stanovení levomepromazinu v přípravku Tisercin<sup>®</sup> inj. metodou FIA zvyšuje intenzitu chemiluminiscence levomepromazinu obsažená antioxidační přísada kyselina askorbová. Protože nebyla k dispozici podniková norma, nemohl být obsah levomepromazinu v tomto přípravku stanoven.

## 5.8. Statistické vyhodnocení výsledků

V této kapitole jsem statisticky porovnávala výsledky stanovení obsahu thioridazinu, levomepromazinu a promethazinu získané pomocí lékopisné metody ČL 2002, tedy titrace s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence, a pomocí průtokové injekční analýzy s chemiluminiscenční detekcí. Zjišťovala jsem, zda rozdíl mezi oběma metodami je nebo není statisticky významný. [ 47 ]

### 5.8.1. Moorův test

Shodnost výsledků získaných dvěma různými analytickými metodami při nestejném počtu paralelních měření byla testována za použití rozpětí  $R_A$  a  $R_B$  Moorovým testem. Testuje se tak, že hodnoty vypočteného kritéria  $U$  jsou porovnány s kritickou hodnotou  $U_\alpha$ , která je tabelována.

$$n_A \neq n_B$$

A – potenciometrické stanovení dle ČL 2002

B – stanovení pomocí FIA

$n_A$  – počet paralelních stanovení u lékopisné metody

$n_B$  – počet paralelních stanovení metodou FIA

$\alpha$  – hladina významnosti

$\bar{x}_A$  – průměr obsahů u potenciometrického stanovení ( % )

$\bar{x}_B$  – průměr obsahů u FIA stanovení ( % )

$R_A$  – rozpětí u výsledků potenciometrické metody

$R_B$  – rozpětí u výsledků FIA metody

$U_\alpha$  – tabelovaná kritická hodnota – pro  $n_A = 3$ ,  $n_B = 5$  a  $\alpha = 0,05$

Je-li vypočítaná hodnota  $U < U_\alpha$ , potom není rozdíl mezi oběma metodami statisticky významný.

$$U = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{R_A + R_B} \quad (6)$$

Tab. č. 23: Moorův test - Thioridazin<sup>®</sup> tbl. obd., 50 × 25 mg

| Měření č.          | A [ % ] | B [ % ] |
|--------------------|---------|---------|
| 1                  | 106,16  | 109,57  |
| 2                  | 106,20  | 102,45  |
| 3                  | 107,52  | 107,49  |
| 4                  | -       | 106,41  |
| 5                  | -       | 105,69  |
| Průměr             | 106,63  | 106,32  |
| R                  | 1,36    | 7,12    |
| U                  | 0,0366  |         |
| U <sub>α</sub>     | 0,429   |         |
| U < U <sub>α</sub> | splněno |         |

Tab. č. 24: Moorův test - Prothazin<sup>®</sup> tbl. obd., 20 × 25 mg

| Měření č.          | A [ % ] | B [ % ] |
|--------------------|---------|---------|
| 1                  | 99,82   | 96,89   |
| 2                  | 98,14   | 98,18   |
| 3                  | 97,97   | 98,32   |
| 4                  | -       | 98,98   |
| 5                  | -       | 95,15   |
| Průměr             | 98,64   | 97,50   |
| R                  | 1,85    | 3,83    |
| U                  | 0,201   |         |
| U <sub>α</sub>     | 0,429   |         |
| U < U <sub>α</sub> | splněno |         |

### 5.8.2. Studentův test

Statistickou významnost rozdílu průměrů výsledků měření (  $\bar{x}_A - \bar{x}_B$  ), získaných dvěma analytickými metodami při nestejném počtu paralelních měření, lze vyhodnotit s využitím odchylek obou průměrů  $s_A$  a  $s_B$  i Studentovým testem-t. Postupuje se tak, že se vypočítají rozptyly obou měření:  $s_A^2$  a  $s_B^2$ . Je-li  $s_A^2 \geq s_B^2$  určíme hodnotu  $F_A$ , je-li  $s_B^2 > s_A^2$  vypočteme  $F_B$ .

Výpočet směrodatné odchylky:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (7)$$

Výpočet poměrů rozptylů obou měření:

$$F_A = \frac{s_A^2}{s_B^2} \quad (8)$$

$$F_B = \frac{s_B^2}{s_A^2} \quad (9)$$

$F_\alpha$  pro porovnání s  $F_A$  zjišťujeme pro stupně volnosti  $v_1 = n_A - 1$ ,  $v_2 = n_B - 1$  a pro porovnání s  $F_B$  pro stupně volnosti  $v_1 = n_B - 1$ ,  $v_2 = n_A - 1$ . Jestliže  $F_A$  nebo  $F_B$  jsou menší než tabelovaná hodnota  $F_\alpha$ , pak  $t_\alpha$  zjišťujeme pro zvolenou hladinu významnosti a stupeň volnosti  $v = (n_A + n_B - 2)$ . Kritickou hodnotu  $t_\alpha$  porovnáváme opět s vypočtenou hodnotou Studentova kritéria-t.

Výpočet Studentova kritéria-t:

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{\sqrt{[s_A^2/(n_A - 1) + s_B^2/(n_B - 1)]}} \quad (10)$$

$$n_A \neq n_B$$

$$\alpha = 0,05$$

$$n_A = 3, n_B = 5$$

Tab. č. 25: Studentův test-t - Thioridazin<sup>®</sup> tbl. obd., 50 × 25 mg

|             |         |
|-------------|---------|
| $\bar{x}_A$ | 106,63  |
| $\bar{x}_B$ | 106,32  |
| $S_A$       | 0,63    |
| $S_B$       | 2,34    |
| $S_A^2$     | 0,3969  |
| $S_B^2$     | 5,4756  |
| $F_A$       | -       |
| $F_B$       | 13,7959 |
| $F_\alpha$  | 19,247  |
| $T$         | 0,248   |
| $T_\alpha$  | 2,447   |

Tab. č. 26: Studentův test-t - Prothazin<sup>®</sup> tbl. obd., 20 × 25 mg

|             |        |
|-------------|--------|
| $\bar{x}_A$ | 98,53  |
| $\bar{x}_B$ | 97,50  |
| $S_A$       | 0,68   |
| $S_B$       | 1,03   |
| $S_A^2$     | 0,4624 |
| $S_B^2$     | 1,0609 |
| $F_A$       | -      |
| $F_B$       | 2,2943 |
| $F_\alpha$  | 19,247 |
| $T$         | 1,462  |
| $T_\alpha$  | 2,447  |

## 6. DISKUZE

Z tabulky a grafu č.1 vyplývá, že intenzita chemiluminiscence roste s prodlužující se dobou dávkování. Po 5 s už není nárůst intenzity chemiluminiscence tak výrazný. Delší doba dávkování navíc vede k neefektivnímu plýtvání s roztoky a ke snižování frekvence analýz. Pro další měření jsem proto zvolila dobu dávkování 5 s, které odpovídá délka cyklu 30 s. Za těchto podmínek lze metodou dosáhnout až 120 analýz za hodinu.

Z tabulky a grafu č. 2 vyplývá, že k největšímu nárůstu intenzity chemiluminiscence dochází při 20 % rychlosti pumpy. Při dalším zvýšení rychlosti pumpy intenzita klesá. Píky se rozdvoují, nestačí již koncentrace oxidačního činidla v nosném proudu. Pro další měření jsem zvolila rychlost pumpy 20 % ( 0,37 ml/min ).

Z tabulky a grafu č. 3 vyplývá, že koncentrace  $\text{KMnO}_4$  1,0 a 2,0 mM nestačí k oxidaci 0,2 mM thioridazinu. Vzniká rozdvojený pík. Při použití 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$  dosahuje intenzita chemiluminiscence maxima ( $s_r=2,01$ ). Vyšší koncentrace manganistanu způsobily zhoršení signálu a křivka zaznamenala pokles. Pro další měření jsem proto zvolila 3,0 mM  $\text{KMnO}_4$ .

Tabulka a graf č. 4 ukazují, že intenzita chemiluminiscence thioridazinu roste se zvyšující se koncentrací  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Vzhledem k tomu, že existuje riziko poškození průtokového systému silnou kyselinou, ponechala jsem  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na koncentraci 0,25 M. Při této koncentraci byl získán symetrický pík i dobrá reprodukovatelnost měření ( $s_r = 1,98$ ).

Z tabulky a grafu č. 5 vyplývá, že zvyšování podílu  $\text{KMnO}_4$  v nosném proudu vede ke snižování intenzity chemiluminiscence. Pro další měření jsem tedy zvolila poměr  $\text{KMnO}_4 : \text{H}_2\text{SO}_4$  1 :9, což ve zvoleném poměru odpovídá celkové koncentraci  $\text{KMnO}_4$  0,3 mM a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,225 M.

Z tabulky a grafu č. 6 vyplývá, že roztoky vzorků s kyselinou mravenčí v uvedených koncentracích nevykazují nárůst intenzity chemiluminiscence a dalším zvyšováním koncentrace  $\text{HCOOH}$  se již prakticky nemění. Pro další měření již  $\text{HCOOH}$  nebyla použita.

Z tabulky a grafu č. 7 vyplývá, že přídavek zásobního roztoku dodecylbenzensulfonátu sodného o koncentraci 50,0 mM ve vzorku vedl ke snížení intenzity chemiluminiscence. Použití DBS komplikovala i obtížná příprava roztoků. Z těchto důvodů nebyl DBS pro další měření používán.

Z tabulky a grafu č. 8 vyplývá, že polyfosfát sodný výrazně zvyšuje intenzitu chemiluminiscence thioridazinu. Podle výsledků slepé řady má samotný PFS nulovou intenzitu chemiluminiscence a lze ho tedy použít jako látku zvyšující chemiluminiscenci. Při proměňování kalibrační křivky v  $\mu\text{M}$  koncentraci thioridazinu, promethazinu i levomepromazinu jsem použila stálý přídavek 8,0 ml zásobního roztoku 0,25 M PFS ve vzorku, což odpovídá koncentraci PFS 80,0 mM. Při této koncentraci dochází ke zvýšení intenzity chemiluminiscence thioridazinu  $10 \times$  než bez jeho přídávku. Při vyšších koncentracích PFS se objevují problémy se špatnou rozpustností látky a velkou viskozitou roztoku.

Změřila jsem kalibrační závislost thioridazinu s přídávkem 8,0 ml PFS, kterou lze v rozsahu koncentrací 10,0 – 100,0  $\mu\text{M}$  považovat za lineární. Tuto kalibrační křivku jsem použila pro stanovení obsahu léčiva v přípravku Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. Detekční limit byl 5,0  $\mu\text{M}$ .

Za stejných optimalizovaných podmínek jsem proměřila také kalibrační závislosti promethazinu a levomepromazinu s přídávkem 8,0 ml 0,25 M PFS, což odpovídá koncentraci PFS 80,0 mM. Při této koncentraci dochází ke zvýšení intenzity chemiluminiscence promethazinu  $10 \times$  než bez jeho přídávku. U levomepromazinu došlo ke zvýšení intenzity chemiluminiscence  $2,3 \times$  než bez jeho přídávku. Křivky lze v případě promethazinu v rozsahu koncentrací 5,0 – 100,0  $\mu\text{M}$  a v případě levomepromazinu v rozsahu koncentrací 10,0 – 100,0  $\mu\text{M}$  považovat za lineární. Tyto kalibrační křivky jsem použila pro stanovení obsahu promethazinu v přípravku Prothazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. a levomepromazinu v přípravku Tisercin<sup>®</sup> inj. Detekční limit v případě promethazinu 5,0  $\mu\text{M}$  a v případě levomepromazinu 4,0  $\mu\text{M}$ . Detekční limity byly zjištěny jako dvojnásobek šumu základní linie.

Při stanovení obsahu v přípravku Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. se rozdíly mezi nalezenou a předpokládanou koncentrací pohybovaly od 2,45 do 9,57 %. V přípravku Prothazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. se rozdíly mezi nalezenou a předpokládanou koncentrací pohybovaly od 1,02 do 4,85 %. Obsah levomepromazinu v přípravku Tisercin<sup>®</sup> inj. nemohl být stanoven. Antioxidační přísada Acidum ascorbicum zvyšuje intenzitu chemiluminiscence levomepromazinu. Podniková norma nebyla k dispozici.

S přípravkem Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. a Prothazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. jsem provedla zkoušku obsahové stejnoměrnosti podle ČL 2002. Přípravky vyhovují zkoušce, ve všech deseti jednotkách leží nalezený obsah účinné látky v povoleném rozmezí.

Na závěr jsem obsah thioridazinu a promethazinu v HVLP stanovila srovnávací lékopisnou metodou ČL 2002.

Při statistickém zhodnocení obou metod pomocí Moorova testu vyšla vypočítaná hodnota  $U$  menší než tabelovaná kritická hodnota  $U_{\alpha}$ . I v případě Studentova testu –  $t$  byla vypočítaná hodnota  $t$  menší než kritická hodnota  $t_{\alpha}$  určená podle tabulek. To znamená, že obě metody lze považovat za srovnatelné a metodu FIA s chemiluminiscenční detekcí lze použít pro stanovení thioridazinu v přípravku Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. a promethazinu v přípravku Prothazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd.



## 7. SOUHRN

V literatuře jsem vyhledala články týkající se různých způsobů stanovení fenothiazinových derivátů ( thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu ) a práce zabývající se využitím FIA metody s chemiluminiscenční a fluorimetrickou detekcí ve farmaceutické analýze.

Otestovala jsem systém FIA řízený počítačem a nastavila jsem vhodné parametry přístroje ( doba dávkování, rychlost čerpání roztoků do systému, časové parametry ), které jsem zachovávala po celou dobu měření konstantní.

Určila jsem optimální složení nosného proudu a otestovala vliv některých látek na intenzitu chemiluminiscence. Největší vliv na intenzitu chemiluminiscence byl prokázán u polyfosfátu sodného. Ten jsem použila při proměrování kalibrační závislosti.

Za optimalizovaných podmínek jsem proměřila kalibrační křivky thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu bez a s přídavkem PFS o desetkrát nižší koncentraci thioridazinu, promethazinu a levomepromazinu. Tu jsem poté použila k odečtení koncentrací léčiv ve farmaceutických přípravcích. Zjištění obsahu levomepromazinu v přípravku Tisercin<sup>®</sup> inj. jsem nemohla FIA metodou uskutečnit. Intenzitu chemiluminiscence zvyšuje obsažená antioxidační přísada acidum ascorbicum. Podniková norma nebyla k dispozici.

Obsah thioridazinu v přípravku Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. a obsah promethazinu v přípravku Prothazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. jsem stanovila i metodou dle ČL 2002.

Výsledky získané metodou FIA s chemiluminiscenční detekcí a lékopisným stanovením dle ČL 2002 jsem statisticky zhodnotila pomocí Moorova a Studentova testu – t a prokázala jejich srovnatelnost.

## 8. ZÁVĚR

Zjišťovala jsem, zda metoda FIA s chemiluminiscenční detekcí za použití  $\text{KMnO}_4$  jako oxidačního činidla v prostředí kyseliny sírové může být použita pro přímé stanovení fenothiazinových derivátů. Také jsem vyzkoušela vliv některých látek zvyšujících intenzitu chemiluminiscence a pro další měření jsem používala vzorky s polyfosfátem sodným, který umožnil snížit koncentraci thioridazinu  $14 \times$ , promethazinu  $20 \times$  a levomepromazinu  $17,5 \times$ . Statistické zhodnocení pomocí Moorova a Studentova testu– t ukázalo, že rozdíl mezi lékopisnou metodou ČL 2002, tj. nevodnou titrací s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence v případě thioridazinu a acidobazickou titrací s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence v případě promethazinu, a metodou FIA s chemiluminiscenční detekcí není statisticky významný. Obě metody jsou tedy srovnatelné a chemiluminiscenční stanovení thioridazinu v přípravku Thioridazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. a promethazinu v přípravku Prothazin<sup>®</sup> 25 mg, tbl. obd. metodou FIA lze aplikovat v praxi. Automatizovaná metoda FIA s chemiluminiscenční detekcí řízená počítačem je rychlejší a jednodušší než titrační metody uvedené v lékopise ČL 2002 a lze je touto metodou nahradit.

## 9. LITERATURA

1. Katzung, B.G.: Farmakologie, Praha, Nakladatelství a vydavatelství H & H, 1994, s. 412
2. Melichar, B a kol.: Chemická léčiva, 3. vyd., Praha, Avicenum, 1987, s. 133-142
3. Dymeš, A., Zýka, J.: Oxidimetrická studie vybraných fenothiazinových derivátů, Československá farmacie, 1988, 37 (4), s. 166-171
4. Suchopár, J.: Remedia compendium, Panax, Praha 1997, s. 179-180
5. Kolektiv autorů: Český lékopis 2002, Praha, Grada Publishing, spol. s.r.o., 2002, I.díl – s. 863 – 866, III. díl – s. 3166, IV. díl – s. 3965, 4360
6. Cepas, J., Silva, M., Peréz-Bendito, D.: Improved peroxyoxalate chemiluminescence – based determinations by use of continuous reagent addition to remove background emission, Anal.Chem, 1994, 66 (2), s. 4079-4084
7. Kojlo, A., Michalowski, J., Wolyniec, E.: Chemiluminescence determination of thioridazine hydrochloride by flow-injection analysis, J. Pharm. Biomed. Anal., 2000, 22 (1), s. 85-91
8. Sultan, S. M., Hassan, Y. A. M., Abulkibash, A. M.: Chemiluminescence assay of promethazine hydrochloride using acidic permanganate employing flow injection mode operated with syringe and peristaltic pumps, Talanta, 2003, 59 (6), s. 1073-1080
9. Xue, Y. Y., He, Y. H., Feng, M. L., Lu, J. R.: Determination of promethazine hydrochloride by flow-injection analysis with chemiluminescence detection, Fenxi-Huaxue, 1999, 27 (4), s. 427-429
10. Aly, F. A., Alarfaj, N. A., Alwarthan, A. A.: Flow – injection – chemiluminometric determination of some phenothiazines in dosage forms and biological fluids, Anal.Chim.Acta, 1998, 358 (3), s. 255-262
11. Catala, I. M., Lahuerta, Z. L., Martinez, C. J.: Entrapment of iron(III)phosphate in a polymeric matrix and their application to FIA-spectrophotometric determination of thioridazine and chlorpromazine in pharmaceutical formulations, Lab. Rob. Autom., 1998, 10 (1), s. 33-37
12. Lopez-Paz, J. L., Garcia-Mateo, J. V., Martinez-Calatayud, J.: A solid-phase reactor as the catalyst source in a flow-injection assembly. Spectrophotometric determination of thioridazine, J. Flow. Injection. Anal., 1997, 14 (1), s. 15-24

13. De-Gregorio-Alapont, A., Garcia-Mateo, J. V., Bernt, I., Martinez-Calatayud, J.: Spectrophotometric determination of thioridazine with a solid-phase reactor of cerium(IV) in a continuous-flow assembly, *J. Flow. Injection. Anal.*, 1996, 13 (1), s. 53-60
14. Koupparis, M. A., Baruchova, A.: Automated flow-injection spectrophotometric determination of some phenothiazines using iron perchlorate: applications in drug assays, content uniformity and dissolution studies, *Analyst*, 1986, 111 (3), s. 313-318
15. Daniel, D., Gutz, I. G. R.: Flow injection spectroelectroanalytical method for the determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical preparations, *Anal. Chim. Acta*, 2003, 494 (1-2), s. 215-224
16. Lima, J. L. F. C., Montenegro, M. C. B. S. M., Sales, M. G. F.: Ion-selective electrodes for promethazine determinations in pharmaceutical preparations and application to flow-injection analysis, *J. Pharm. Sci.*, 1997, 86 (11), s. 1234-1238
17. Kojlo, A.: Indirect potentiometric determination of chlorpromazine with an oxidative column in a flow-injection system, *Anal. Lett.*, 1997, 30 (13), s. 2353-2363
18. Martinez-Calatayud, J., Navasquillo-Sarrion, S., Sanchez-Sampedro, A., Gomez-Benito, C.: Determination of promethazine hydrochloride with bromophenol blue by a turbidimetric method and flow-injection analysis, *Microchem. J.*, 1992, 45 (2), s. 129-136
19. Martinez-Calatayud, J., Garcia-Mateo, J. V.: Cerium(IV) arsenite as a solid-phase for use in flow-injection analysis. Spectrophotometric determination of promethazine hydrochloride, *Anal. Chim. Acta*, 1992, 264 (2), s. 283-289
20. Laassis, B., Aaron, J. J., Mahedero, M. C.: Fluorimetric determination of phenothiazine derivatives by photooxidation in a flow-injection system, *Talanta*, 1994, 41 (11), s. 1985-1989
21. Martinez-Calatayud, J., Garcia-Sancho, T.: Spectrophotometric determination of promethazine by flow-injection analysis and oxidation by cerium(IV), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1992, 10 (1), s. 37-42
22. Chen, D., Rios, A., Luque-de-Castro, M. D., Valcarcel, M.: Simultaneous flow-injection determination of chlorpromazine by photochemical reaction, *Talanta*, 1991, 38 (11), s. 1227-1233

23. Sultan, S. M.: Injection method for the assay of phenothiazine neuroleptics in pharmaceutical preparations using ammonium vanadate, *Analyst*, 1991, 116 (2), s. 177-181
24. Laassis, B., Aaron, J. J.: Flow-injection fluorimetric analysis of several aminophenothiazines based on photooxidation, *Analisis*, 1997, 25 (6), s. 183-188
25. Polášek, M., Dolejšová, J., Karlíček, R.: Flow-injection spectrophotometric determination of phenothiazines using analyte oxidation in manganese dioxide-packed reactors, *Pharmazie*, 1998, 53 (3), s. 168-172
26. Chen, D., Rios, A., Luque-de-Castro, M. D., Valcarcel, M.: Photochemical-spectrofluorimetric determination of phenothiazine compounds by unsegmented-flow-methods, *Analyst*, 1991, 116 (2), s. 171-176
27. Karlíček, R., Solich, P.: Trendy v rozvoji a aplikaci průtokové injekční analýzy v analýze léčiv, *Českoslov. Farm.*, 1992, č. 2, s. 62-68
28. Zýka, J. a kol.: Analytická příručka II. Díl, 3. vyd., Praha, SNTL/ALFA, 1980, s. 223-259
29. Karlíček, R.: Fluorimetrie VII – Sborník s semináři, FaF UK Hradec Králové, 1995
30. Lopez-Erroz, C., Vinas, P., Cerdan, F. J., Hernandez-Cordoba, M.: Determination of clenbuterol in pharmaceutical preparations by reaction with o-phthalaldehyde using a flow-injection-fluorimetric procedure, *Talanta*, 2000, 53 (1), s. 47-53
31. Ruhdas-Rama, M. J., Ruiz-Medina, A., Molina-Diaz, A.: A flow-through sensing device with fluorimetric transduction for the determination of warfarin using an anion-exchanger gel combined with FIA systém, *Anal.Sci*, 2001, 17 (8), s. 1007-1010
32. Solich, P., Polydorou, C. K., Koupparis, M. A., Efstathiou, C. E.: Automated flow injection fluorimetric determination and dissolution of bumetanide in pharmaceuticals, *Anal.Chim.Acta*, 2001, 438 (1-2), s. 131-136
33. Easwaramoorthy, D., Yu, Yc., Juany, H. J.: Chemiluminescence detection of paracetamol by a luminol – permanganate based reaction, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 439 (1), s. 95-100

34. Sanfelier-Alonso, M. C., Lahuretha-Zamora, L., Martinez-Calatayud, J.: Flow injection with chemiluminescence detection for the determination of iproniazid, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 437 (2), s. 225-231
35. Yang, M. L., Li, L. Q., Feng, M. L., Lu, J. R., Zhang, Z. J.: Determination of dipyrindamole by flow-injection analysis with chemiluminescence detection, *Fenxi Huaxue*, 2000, 28 (2), s. 161-163
36. Obha, Y., Yamashita, M., Nakazono, M., Ma, L., Zaitso, K.: Flow-injection analysis for pyrogallol using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carboiimide as polyphenol chemiluminescence enhancer, *Anal. Sci.*, 2000, 16 (9), s. 979-980
37. Paseková, H., Polášek, M.: Determination of procaine, benzocaine and tetracaine by sequential-injection analysis with permanganate-induced chemiluminescence detection, *Talanta*, 2000, 52 (1), s. 67-75
38. Aly, F. A., Al Tamini, S. A., Alwarthan, A. A.: Determination of flufenamic acid and mefenamic acid in pharmaceutical preparations and biological fluids using flow injection analysis with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 416 (1), s. 87-96
39. Aly, F. A., Al Tamini, S. A., Alwarthan, A. A.: Determination of phenolic sympatomimetic drugs in pharmaceutical samples and biological fluids by flow-injection chemiluminescence, *J. of AOAC International*, 2000, 83 (6), s. 1299-1305
40. Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod, Bratislava, SNTL, 1980, s. 44-48
41. Andrlová, M.: Diplomová práce, FaF UK Hradec Králové, 2003
42. Karlíček, R.: Průtoková injekční analýza VI – Sborník k semináři, FaF UK Hradec Králové, 1995
43. Kirchherr, H., Kühn-Velten, W. N.: Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach, *J. of Chromatography B*, 2006, 843 (1), s. 100-113
44. Bhushan, R., Deepak, G.: HPLC resolution of thioridazine enantiomers from pharmaceutical dosage form using cyclodextrin-based chiral stationary phase, *J. of Chromatography B*, 2006, 837 (1-2), s. 133-137

45. Muijselaar, P. G. H. M., Claessens, H. A., Crameris, C. A.: Determination of structurally related phenothiazines by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography, *J. of Chromatography A*, 1996, 735 (1-2), s. 395-402
46. Vissers, B., Bohets, H., Evaraert, J. a kol.: Characteristics of new composite- and classical potentiometric sensors for the determination of pharmaceutical drugs, *Electrochimica Acta*, 2006, 51 (24), s. 5062-5069
47. Abubakrs, M., Idris–Fahad, N., Assubaie–Salah, M. Sultan: Chemometric optimization of a SIA promethazine hydrochloride assay method, *Microchem. J.*, 2006, 83 (1), s. 7-13
48. Wójciak-Kosior, M., Skalska, A., Matysik, A.: Determination of phenothiazine derivatives by high performance thin-layer chromatography combined with densitometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, 41 (1), s. 286-289
49. Mercolini, L., Bugamelli, F., Kenndler, E. a kol.: Simultaneous determination of the antipsychotic drugs levomepromazine and clozapine and their main metabolites in human plasma by a HPLC-UV method with solid-phase extraction, *J. of Chromatography B*, In Press, Corrected Proof, Available online, 2006