UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Anna Kroiherová

SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA PRO SPEKTROMETRICKÉ A SPEKTROFLUROMETRICKÉ STANOVENÍ CHLORPROMAZINU, LEVOMEPROMAZINU A PROMETHAZINU

Sequential Injection Analysis for Spectrophotometric and Spectrofluorometric Determination of Chlorpromazine, Levomepromazine and Promethazine

Diplomová práce

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

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 9. května 2022.

Abstrakt

V této diplomové práci byla vyvinuta a optimalizována metoda využívající techniku sekvenční injekční analýzy pro spektrometrické a spektrofluorimetrické stanovení třech vybraných analytů ze skupiny fenothiazinů (chlorpromazin, levomepromazin a promethazin). Stanovení je založeno na oxidační reakci fenothiazinů s ceričitými ionty v kyselém prostředí, při které vzniká barevný produkt, který je možné detegovat spektrometricky ve viditelné oblasti spektra nebo spektrofluorimetricky. Byly optimalizovány podmínky měření pro sekvenční injekční analýzu a vyhodnocení bylo provedeno pomocí nelineární kalibrace v rozsahu koncentrací 3−320 mg dm^{-3} pro VIS spektrometrickou detekci a 0,3−50,0 mg dm^{-3} pro spektrofluorimetrickou detekci. Byl studován vliv ve vodě rozpustných pomocných látek (fruktosa, glukosa, laktosa), které jsou často součástí léčivých přípravků. Vyvinutá metoda sekvenční injekční analýzy s oběma typy detekce byla úspěšně aplikována na autentické vzorky léčivých přípravků (Plegomazin, Tisercin a Prothazin) obsahujících analyzované fenothiaziny. Výsledky měření byly v dobré shodě s použitou referenční metodou přímé UV spektrometrie. Výhodou vyvinuté metody SIA s VIS spektrometrickou a spektrofluorometrickou detekcí je její automatizace, rychlost, nízká spotřeba reakčního činidla a široký dynamický rozsah koncentrací analytů, umožňující využití této metody například pro rutinní kontroly léčiv ve farmaceutickém průmyslu.

Klíčová slova: sekvenční injekční analýza, phenothiazin, chlorpromazin, levomepromazin, promethazin

Abstract

In this diploma thesis, a method using the sequence analysis technique for spectrometric and spectrofluorimetric analysis of three selected analytes from the group of phenothiazines (chlorpromazine, levomepromazine and promethazine) was developed and optimized. The determination is based on the oxidation reaction of phenothiazines with cerium(IV) ions in an acidic medium, which produces a color product that is detected by VIS spectrometry or spectrofluorimetry. The measurement conditions for sequence analysis were optimized and evaluation was performed by nonlinear calibration in the dynamic range of 3−320 mg dm^{-3} for VIS spectrometric detection and 0.3−50.0 mg dm^{-3} for spectrofluorimetric detection. The influence of water-soluble common excipients (fructose, glucose, lactose), which are often part of medicinal products, was investigated. The developed sequential injection analysis with both detections was successfully applied to authentic samples of drugs (Plegomazine, Tisercine and Prothazine) containing the analyzed phenothiazines. The measurement results were in good agreement with the used reference method of direct UV spectrometry. The advantages of developed SIA method with VIS spectrometric and spectrofluorometric detection are its automation, speed, low consumption of reagent and a wide dynamic range of analyte concentrations, enabling its use, for example, for routine product control in the pharmaceutical industry.

Key words: sequential injection analysis, chlorpromazine, levomepromazine, prometh-azine, phenothiazine

Poděkování

Děkuji mému školiteli doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za vedení při mé diplomové práci, za poskytnuté konzultace a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D. Také chci poděkovat mé rodině a přátelům za podporu při studiu.

Obsah

1 Cíl práce ... 8
2 Teoretická část ... 9
2.1 Analyzované látky ... 9
2.1.1 Chlorpromazin ... 10
2.1.2 Levomepromazin ... 11
2.1.3 Promethazin ... 12
2.2 Analytické metody pro stanovení fenothiazinů ... 13
2.3 Sekvenční injekční analýza ... 15
3 Experimentální část ... 17
3.1 Analyzované lékové formy ... 17
3.2 Použité chemikálie ... 17
3.3 Příprava roztoků ... 18
3.4 Instrumentace ... 19
3.5 Zpracování naměřených dat ... 21
4 Výsledky a diskuse ... 22
4.1 Optimalizace experimentálních podmínek ... 22
4.1.1 Statické spektrometrické měření ... 22
4.1.2 Statické spektrofluorimetrické měření ... 23
4.1.3 Optimalizace podmínek pro sekvenční injekční analýzu ... 25
4.2 SIA stanovení se spektrometrickou detekcí ... 27
4.3 SIA stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí ... 30
4.4 Interference se sacharidy ... 33
4.5 Referenční stanovení fenothiazinů v analyzovaných léčivých přípravcích metodou UV spektrometrie 34
4.6 Diskuse ... 37
5 Závěr ... 39
Seznam literatury ... 40

Seznam použitých zkratek

A	absorbance
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
c_g	hmotnostní koncentrace [g dm^{-3}]
CHP	chlorpromazin
DR	dynamický rozsah [g dm^{-3}]
F	průtoková rychlost [µl min^{-1}]
FIA	průtoková injekční analýza
LMP	levomepromazin
LOQ	mez stanovitelnosti [g dm^{-3}]
PRM	promethazin
PTFE	polytetrafluorethylen
PTZ	fenothiazin
R^2	koeficient determinace
REAG	reakční činidlo
RSD	relativní směrodatná odchylka
S	plocha SIA píku [s]
SIA	sekvenční injekční analýza
U	napětí na fotonásobiči [V]
V	objem [mm^3]
λ_{em}	emisní vlnová délka [nm]
λ_{ex}	excitační vlnová délka [nm]
λ_{VIS}	vlnová délka ve viditelné oblasti spektra [nm]

1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je navrhnout a optimalizovat metodu sekvenční injekční analýzy se spektrometrickou a spektrofluorometrickou detekcí pro stanovení tří různých analytů ze skupiny fenothiazinů, konkrétně chlorpromazinu, levomepromazinu a promethazinu.

Dále je cílem aplikovat tuto metodu na autentické vzorky léčivých přípravků, obsahujících analyzované fenothiaziny v různých lékových formách (injekční roztok, potahovaná tableta) a porovnat tyto výsledky s referenční metodou.

V neposlední řadě je také cílem navrhnout metodu tak, aby byla automatizovaná a časově i finančně nenáročná.

2 Teoretická část

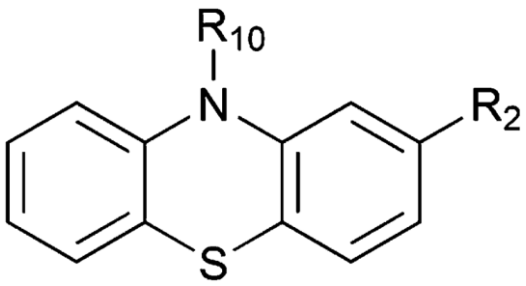
2.1 Analyzované látky

Fenothiaziny patří mezi jedny z nejstarších syntetických léčiv, která nemají přírodní prekursor. Kromě neuroleptických účinků, které jsou spojeny s blokádou dopaminergních receptorů, vykazují fenothiazinové deriváty mnoho dalších biologických aktivit [1, 2].

První derivát fenothiazinu, methylenovou modř, syntetizoval německý chemik Heinrich Caro již v roce 1876. Strukturu fenothiazinů objasnil v roce 1883 další německý chemik Heinrich August Bernthsen, který také syntetizoval fenothiazin reakcí difenylaminu se sírou [3]. Koncem 19. století Němec Paul Ehrlich objevil aktivitu methylenové modři proti plazmodiím a v roce 1891 ohlásil úspěšné vyléčení dvou pacientů s malárií po orální aplikaci methylenové modři [4].

Od té doby již bylo syntetizováno více než čtyři tisíce fenothiazinů a nejméně sto z nich našlo uplatnění v klinické praxi [5]. Fenothiaziny jsou předepisovány nejčastěji k léčbě pacientů s psychotickými nebo jinými vážnými psychiatrickými poruchami. Mají významné antipsychotické účinky, ale také další vlastnosti využívané v klinické praxi, například antiemetické a antihistaminické účinky a schopnost potencovat analgetická sedativa [6]. Mechanismem antipsychotického účinku většiny fenothiazinů je hlavně antagonistický účinek na mozkové dopaminové D_2 receptory, dále také vysoká afinita k vazbě na centrální α-adrenergní receptory [7]. Byla také prokázána antibakteriální účinnost fenothiazinů *in vitro* na některé grampozitivní i gramnegativní bakterie například na *Staphylococcus aureus*, *Escherchia coli* nebo *Salmonella spp.* [8−10]. Podle Světové zdravotnické organizace se chlorpromazin a flufenazin řadí mezi nezbytné léky pro léčbu psychických poruch jako je například schizofrenie [11].

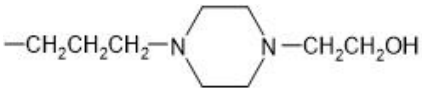
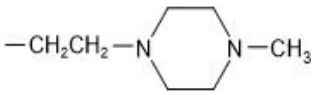
Základní strukturou fenothiazinů je tricyklický heterocykl s atomem síry v poloze 5 a atomem dusíku v poloze 10 s obvyklou substitucí v polohách 2 a 10 (obr. 2.1.). Nejčastější substituenty jsou uvedeny v tabulce 2.1. Fenothiaziny jsou nejčastěji uchovávány ve formě solí bazických sloučenin, například ve formě hydrochloridů nebo maleátů [12].



Obr. 2.1: Základní strukturní vzorec fenothiazinu.

Tabulka 2.1

Nejčastější substituenty fenothiazinů v polohách 2 a 10.

derivát	R_2	R_{10}
diethazin	–H	$–(CH_2)_2N(CH_2CH_3)_2$
flufenazin	$–CF_3$	
chlorpromazin	–Cl	$–(CH_2)_2N(CH_3)_2$
levomepromazin	$–OCH_3$	$–CH_2CH(CH_3)N(CH_3)_2$
promethazin	–H	$–CH_2CH(CH_3)N(CH_3)_2$
trifluoperazin	$–CF_3$	

2.1.1 Chlorpromazin

Chlorpromazin je derivát fenothiazinu s alifatickým postranním řetězcem. Prvně jej syntetizoval Paul Charpentier v roce 1950 ve Francii ve farmaceutické firmě Rhône-Poulenc při snaze nalézt léčivo, které by působením na centrální nervový systém zabraňovalo šoku po chirurgických zákrocích. V této době byl již známý antihistaminický a sedativní účinek řady fenothiazinů, z nichž si k derivatizaci vybral promazin. Chlorací promazinu vznikla látka s označením RP-4560, která měla při prvotních testech na zvířatech nejen mimořádnou antihistaminovou aktivitu, ale také výrazně působila na parasympatetické a adrenolytické reflexy a blokovala působení adrenalinu na krevní tlak. V roce 1952 publikoval Charpentier hypotetické terapeutické využití pro nově objevené léčivo RP-4560, které nazval vegetativní stabilizátor. Jako hypotetické použití bylo

uvedeno například uvedení do anestesie, zmírnění předoperačního stresu, léčba kardiovaskulárních a psychiatrických poruch [13]. Poprvé jako samostatné léčivo bez kombinace s jinými účinnými látkami použili chlorpromazin v témže roce u psychotických a rozrušených pacientů lékaři Pierre Deniker a Jean Delay a potvrdili vysokou sedativní účinnost chlorpromazinu. Objevení antipsychotických účinků chlorpromazinu v roce 1952 bylo začátkem éry moderní psychologie [14].

Chlorpromazin (CASRN [50-53-3]) je systematickým názvem [3-(2-chlor-10-fenothiazinyl)propyl]dimethylamin, strukturní vzorec v tabulce 2.1. Jeho relativní molekulová hmotnost je 318,87 a pK_a = 9,41. Jedná se o bílý nebo lehce béžový prášek bez zápachu, který je prakticky nerozpustný ve vodě a neomezeně rozpustný v alkoholu a etheru. Je dostupný ve formě hydrochloridu, který je velmi dobře rozpustný ve vodě. Prodává se pod komerčními názvy Plegomazin, Thorazin nebo Largactil.

Podle United States Pharmacopeia se stanovení obsahu chlorpromazin hydrochloridu provádí rozpuštěním 700 mg chlorpromazin hydrochloridu v 75 cm^3 koncentrované octové kyseliny a 10 cm^3 6 % octanu rtuťnatého. Následně se provede titrace 0,1 mol dm^{-3} kyselinou chloristou s potenciometrickou indikací, kdy 1 cm^3 kyseliny chloristé je roven 35,53 mg chlorpromazin hydrochloridu. Stanovení obsahu chlorpromazin hydrochloridu v tabletách se provádí UV-VIS spektrometrií při 254–277 nm po extrakci diethyletherem [15].

2.1.2 Levomepromazin

Levomepromazin patří mezi fenothiaziny s postranním alifatickým řetězcem. Prvně byl syntetizován v 50. letech 20. století. V roce 1956 byl prodáván pod komerčním názvem Nozinan a byl klinicky testován v Kanadě na senilních pacientech s mentálními a nervovými poruchami a vykazoval silnější antipsychotické a sedativní účinky než chlorpromazin [16]. Kromě léčby schizofrenie [17] je dnes levomepromazin používán také proti silným nevolnostem, těžkému deliriu nebo při velkém psychickém rozrušení v případech, kdy k uklidnění nestačí benzodiazepinová anxiolytika [18, 19]. Právě pro své antipsychotické, anxiolytické, antiemetické a sedativní účinky je hojně užívaný v paliativní péči [20]. Levomepromazin může být užíván samostatně nebo v kombinaci s jinými léčivy, nejčastěji se vyskytuje v kombinaci s haloperidolem [21−23].

Levomepromazin (CASRN [60-99-1]), nazýván také jako methotrimeprazin, je systematickým názvem (2*R*)-3-(2-methoxyfenothiazin-10-yl)-*N,N*,2−trimethyl-propan-1--amin, strukturní vzorec uvádí tabulka 2.1. Jeho relativní molekulová hmotnost je 328,47 a pK_a = 9,32. Jedná se o bílý krystalický prášek bez zápachu, který je omezeně rozpustný ve vodě a methanolu. Ve formě hydrochloridu je ve vodě rozpustný bez omezení. Je dostupný pod komerčními názvy Tisercin, Nozinan nebo Levoprome.

Podle United States Pharmacopeia je stanovení levomepromazinu prováděnorozpuštěním 700 mg levomepromazinu ve 100 cm^3 chloroformu, přidá se jedna kapka krystalové violeti a roztok se titruje kyselinou chloristou 0,1 mol dm^{-3} do prvního vymizení fialového zbarvení. Jeden mililitr kyseliny chloristé je roven 32,85 mg levomepromazinu. V lékových přípravcích ve formě injekčního roztoku se stanovení obsahu levomepromazinu provádí HPLC stanovením [15].

V Evropském lékopisu 2019 je ke stanovení levomepromazin hydrochloridu popsána titrace, kdy je 0,300 g levomepromazinu rozpuštěno v 50 cm^3 2-propanolu a tento roztok je následně titrován hydroxidem sodným 0,1 mol dm^{-3} s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence. Jeden mililitr hydroxidu sodného 0,1 mol dm^{-3} je roven 36,49 mg levomepromazin hydrochloridu [24].

2.1.3 Promethazin

Promethazin je antihistaminikum první generace, antagonista H_1-receptorů a byl prvně syntetizován v roce 1947 ve firmě Rhône-Poulenc francouzskými vědci pod vedením Paula Charpentiera. Farmakologická charakterizace promethazinu ukázala, že má mnohem větší sedativní účinky než jiná antihistaminika [25]. Promethazin pro jeho silné antihistaminové a sedativní účinky začal v kombinaci s penthidinem používat francouzský vojenský lékař Henri-Marie Laborit v protišokové terapii v roce 1949 a zjistil, že promethazin potencuje aktivitu anestetických léčiv, a proto se začal často užívat v klinické anestesii [26, 27].

Od jeho objevení byl promethazin užíván k mnoha klinickým účelům, například k prevenci a mírnění nevolností při odvykací léčbě nebo při chemoterapiích, při migrénách, také jako sedativum při porodu nebo k léčbě kinetózy [28]. Dnes je často užívaný k léčbě alergických příznaků, symptomům doprovázející astma, pneumonii nebo další infekce dolních dýchacích cest [29].

Promethazin (CASRN [60-87-7]) je systematickým názvem 10−[2−(dimethylamino)-propy]fenothiazin, strukturní vzorec uvádí tabulka 2.1. Jeho relativní molekulová hmotnost je 284,42 a pK_a = 8,98. Jedná se o bílý či lehce nažloutlý krystalický prášek, který je ve formě hydrochloridu velmi dobře rozpustný ve vodě. Prodává se například pod komerčními názvy Prothazin, Phenergan nebo Phenadoz.

Pro stanovení promethazin hydrochloridu je podle United States Pharmacopeia využita metoda HPLC [16]. V Evropském lékopisu 2019 je popsána potenciometrická titrace, kdy je 0,250 g promethazin hydrochloridu rozpuštěno v 5,0 cm^3 kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol dm^{-3} a 50 cm^3 ethanolu 96 %. Tento roztok je titrován hydroxidem sodným 0,1 mol dm^{-3}. Spotřebovaný objem hydroxidu sodného se odečítá mezi dvěma inflexními body. Jeden mililitr hydroxidu sodného 0,1 mol dm^{-3} se rovná 32,09 mg promethazin hydrochloridu [24].

2.2 Analytické metody pro stanovení fenothiazinů

Ke stanovení fenothiazinů byla použita řada různých metod zahrnujících chemické i instrumentální stanovení. Tyto metody jsou uvedeny v přehledových článcích [30, 31]. Vybrané příklady publikovaných stanovení chlorpromazinu, levomepromazinu a promethazinu jsou shrnuty v tabulce 2.2.

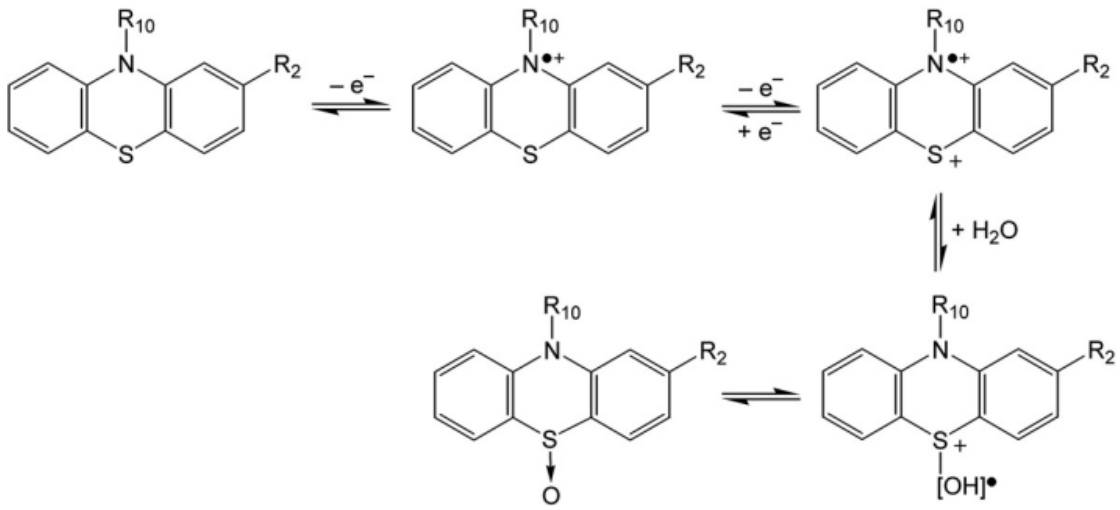
Tabulka 2.2

Vybrané publikované principy stanovení fenothiazinu v různých matricích a jejich limity kvantifikace. Analyzované fenothiaziny: 1 − chlorpromazin, 2 − levomepromazin, 3 − promethazin, 4 − promazin, 5 − thioridazin

Princip stanovení / detekce [reference]	matrice	analyzované fenothiaziny	*LOQ* / mg dm^{-3}
HPLC-UV [32, 33]	plasma, sérum, moč	2	$9{,}0 \cdot 10^{-3}$
HPLC na reverzních fázích [34]	plasma	2	$4{,}1 \cdot 10^{-3}$
UV spektrometrie [35, 36]	léčivé přípravky	2	1,5–2,9
GC [37]	plná krev, plasma	1, 2	$12{,}6 \cdot 10^{-3}$
voltametrie [38, 39]	léčivé přípravky	1, 3	$5 \cdot 10^{-2}$
chemiluminiscence [40, 41]	plasma, moč	1	neuvedeno
spektroelektrochemie [42]	léčivé přípravky	1	$1 \cdot 10^{-3}$
VIS spektrometrie [43]	léčivé přípravky	1	neuvedeno
amperometrie [44]	léčivé přípravky	1, 3	$1 \cdot 10^{-2}$
fluorescence [45]	léčivé přípravky, moč	2	$6 \cdot 10^{-2}$
turbidimetrie [46]	léčivé přípravky	3	25
biamperometrie [47]	léčivé přípravky	4, 5	0,4

Velmi častým principem stanovení je využití snadné oxidace fenothiazinů. Oxidace fenothiazinů může být chemická, například pomocí manganistanu draselného [48, 49] nebo ceričitých iontů [50], fotochemická [51] nebo elektrochemická [52].

V prvním kroku oxidace ztrácí molekula elektron, což vede ke vzniku barevného radikál kationtu (obr. 2.2). Tato reakce je reverzibilní. Radikál kation je stabilní v silně kyselém prostředí. V druhém kroku je radikál kation ireverzibilně oxidován ztrátou dalšího elektronu a vzniká fenothiazinový ion. Tento ion je následně snadno hydrolyzován za vzniku bezbarvého sulfoxidu. Rychlost prvního reakčního kroku závisí na oxidantu, kyselosti prostředí, teplotě a typu fenathiazinového derivátu. Typy substituentů a jejich poloha v molekule fenothiazinu ovlivňují stabilitu radikálového kationtu [53]. Barevný radikál kation vznikající v prvním kroku oxidace je možné detekovat spektrometricky ve VIS oblasti spektra nebo spektrofluorimetricky.



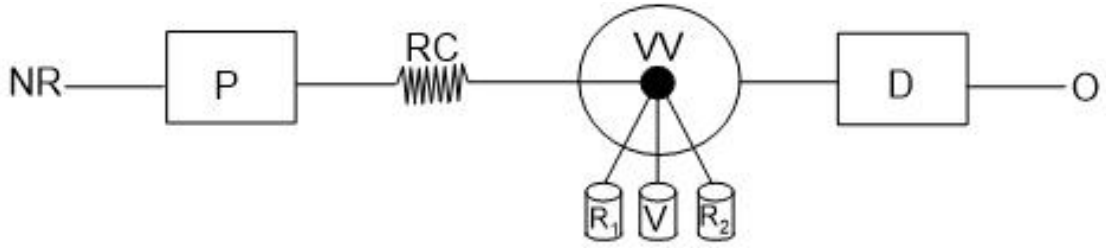
Obr. 2.2: Obecné schéma oxidace derivátů fenothiazinů (podle [53]).

2.3 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (angl. sequential injection analysis, SIA) byla vytvořena v roce 1989 v laboratořích Center for Process Analytical Chemistry na Univerzitě ve Washingtonu. Jedná se o průtokovou analytickou metodu, která vznikla při snaze eliminovat nevýhody průtokové injekční analýzy (angl. flow injection analysis, FIA), především nároky FIA na různé sestavení systému hadiček pro každou analytickou metodu a relativně vysoké nároky na údržbu peristaltických čerpadel [54].

Obecný princip SIA je stejný jako u FIA, kdy analyt v roztoku vzorku je reakcí s činidlem převeden na detegovatelný produkt, u kterého je měřena vhodná analytická vlastnost (např. absorbance). U FIA je zóna vzorku vstřikována dávkovacím ventilem do kontinuálního nosného proudu, oproti tomu SIA využívá přímý a zpětný tok nosného proudu, čímž je dosahováno vyššího stupně konverze analytu na požadovaný produkt [55].

Přístroj pro SIA se většinou skládá z pístové pumpy, spojovacích hadiček, reakční cívky, vícecestného ventilu a vhodně zvoleného detektoru (obr. 2.3). Sekvenční injekční analýza probíhá po sekvencích, kdy se nasává přesně definovaný objem vzorku a reagentů do reakční cívky přes vícecestný ventil. Nasávání reagentů vícecestným ventilem umožňuje použít více reakčních činidel a různé nosné proudy. K dokonalému promíchání vzorku a reagentů dochází díky využití zpětného toku nosného proudu. Se SIA mohou být použity různé metody detekce, například UV-VIS spektrometrie, elektrochemické metody, luminiscenční spektrometrie a mnoho dalších [56].



Obr. 2.3: Obecné schéma přístroje pro sekvenční injekční analýzu. NR nosný roztok, P pístová pumpa, RC reakční cívka, VV vícecestný ventil, V vzorek, R_1 a R_2 reakční činidla, D detektor, O odpad.

Kromě své všestrannosti a mechanické jednoduchosti má metoda SIA další výhody, jako například schopnost jednoduše měnit experimentální parametry, řídit reakční dobu a stupeň disperzní zóny a možnost automatizace. [57]

Stanovení fenothiazinů metodou SIA je v literatuře dosud málo popsáno. Publikované metody využívající metodu SIA zahrnují chemickou oxidaci fenothiazinů s následnou UV detekcí [58, 59] nebo separaci fenothiazinů na C18 monolitické koloně s UV detekcí [60, 61].

3 Experimentální část

3.1 Analyzované lékové formy

Analyzovanými léčivými přípravky v této práci byly:

- Tisercin® injekční roztok s deklarovaným obsahem levomepromazinu 25 mg v jednom mililitru roztoku, číslo šarže 14A0321 (Egis Pharmaceuticals PLC, Maďarsko),
- Tisercin® potahované tablety s deklarovaným obsahem levomepromazinu 25 mg/tbl, číslo šarže 158900690 (Egis Pharmaceuticals PLC, Maďarsko),
- Prothazin® potahované tablety s deklarovaným obsahem promethazin hydrochloridu 25 mg/tbl, číslo šarže 200075 (Teofarma, Itálie),
- Plegomazin potahované tablety s deklarovaným obsahem chlorpromazin hydrochloridu, 25 mg/tbl, rok výroby 2000,
- Plegomazin tablety s deklarovaným obsahem chlorpromazin hydrochloridu 100 mg/tbl, rok výroby 1998 (Egis Pharmaceuticals PLC, Maďarsko).

3.2 Použité chemikálie

Pro přípravu standardů byly použity: chlorpromazin hydrochlorid, ≥ 98,0 % (Sigma-Aldrich), levomepromazin (Egis Pharmaceuticals, Maďarsko) a promethazin hydrochlorid (Specia Rhône Poulenc, Francie).

Veškeré další použité chemikálie byly analytické čistoty: síran ceričitý (Lachema, Česká republika), kyselina sírová 96 % (Lach-Ner, Česká republika), kyselina chlorovodíková 35 % (Lach-Ner, Česká republika), fruktosa (Penta, Česká republika), glukosa (SPOFA, Česká republika), laktosa (Penta, Česká republika).

Deionizovaná voda použita k přípravě roztoků a jako nosný proud byla připravena zařízením MilliQ (Millipore)

3.3 Příprava roztoků

Připravené roztoky byly uchovávány v chladu a temnu v uzavřených odměrných baňkách nebo zásobních láhvích:

- Zásobní roztok síranu ceričitého o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} v prostředí vodíkových iontů o koncentraci 0,1 mol dm^{-3}.

  Na analytických vahách bylo naváženo 0,1011 g síranu ceričitého a kvantitativně převedeno do 250cm^3 odměrné baňky. Bylo přidáno 50 cm^3 kyseliny sírové o koncentraci 0,5 mol dm^{-3}. Roztok byl doplněn po rysku demineralizovanou vodou. Pracovní roztok síranu ceričitého o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} v prostředí vodíkových iontů o koncentraci $5 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} byl připraven pipetováním 25 cm^3 zásobního roztoku do 50cm^3 odměrné baňky, která byla doplněna demineralizovanou vodou po rysku.
- Standardní roztok chlorpromazin hydrochloridu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}.

  Na analytických vahách bylo naváženo 0,03559 g chlorpromazin hydrochloridu a kvantitativně převedeno do 100cm^3 odměrné baňky a doplněno demineralizovanou vodou po rysku.
- Standardní roztok levomepromazinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}.

  Na analytických vahách bylo naváženo 0,03285 g levomepromazinu a kvantitativně převedeno do 100cm^3 odměrné baňky, byla přidána 1 kapka 35% kyseliny chlorovodíkové a doplněna demineralizovanou vodou po rysku.
- Standardní roztok promethazin hydrochloridu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}.

  Na analytických vahách bylo naváženo 0,03207 g promethazin hydrochloridu a kvantitativně převedeno do 100cm^3 odměrné baňky, která byla doplněna demineralizovanou vodou po rysku.
- Roztok injekčního roztoku Tisercin® o koncentraci 100 mg dm^{-3}.

  Z ampule obsahující injekční roztok Tisercin® s obsahem 25 mg cm^{-3} levomepromazinu byl pipetován 1 cm^3 roztoku do 250cm^3 odměrné baňky a doplněn po rysku demineralizovanou vodou.
- Roztok potahované tablety Tisercin® o koncentraci 100 mg dm^{-3}.

  Potahovaná tableta Tisercin® s obsahem 25 mg levomepromazinu byla zvážena na analytických vahách, rozetřena v třecí misce a kvantitativně převedena do 250cm^3 odměrné baňky, která byla doplněna demineralizovanou vodou po rysku. Roztok byl

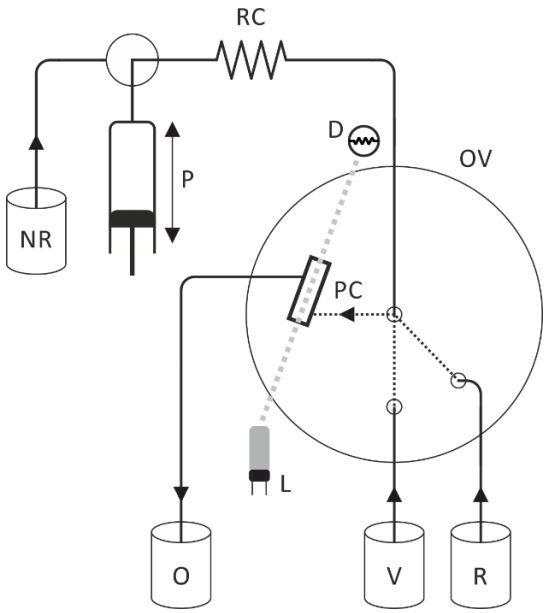
vložen do ultrazvuku na dobu 30 minut. Roztok byl ponechán ve tmě a chladu 24 hodin a poté přefiltrován přes filtrační papír Filtrak 389.

- Roztok potahované tablety Prothazin® o koncentraci 100 mg dm^{-3}
  Potahovaná tableta léčivého přípravku Prothazin® s obsahem 25 mg promethazin hydrochloridu byla zvážena na analytických vahách, rozetřena v třecí misce a kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 250cm^3, která byla doplněna demineralizovanou vodou po rysku. Roztok byl vložen do ultrazvuku na dobu 30 minut. Roztok byl ponechán ve tmě a chladu 24 hodin a poté přefiltrován přes filtrační papír Filtrak 389.
- Roztok potahované tablety Plegomazin o koncentraci 100 mg dm^{-3}
  Potahovaná tableta léčivého přípravku Plegomazin s obsahem 25 mg chlorpromazin hydrochloridu byla zvážena na analytických vahách, rozetřena v třecí misce a kvantitativně převedena do 250cm^3 odměrné baňky, která byla doplněna demineralizovanou vodou po rysku. Roztok byl vložen do ultrazvuku na dobu 30 minut. Roztok byl ponechán ve tmě a chladu 24 hodin a poté přefiltrován přes filtrační papír Filtrak 389.
- Roztok tablety Plegomazin o koncentraci 100 mg dm^{-3}
  Tableta léčivého přípravku Plegomazin s obsahem 100 mg chlorpromazin hydrochloridu byla zvážena na analytických vahách, rozetřena v třecí misce a kvantitativně převedena do 1000cm^3 odměrné baňky, která byla doplněna demineralizovanou vodou po rysku. Roztok byl vložen do ultrazvuku na dobu 30 minut. Roztok byl ponechán ve tmě a chladu 24 hodin a poté přefiltrován přes filtrační papír Filtrak 389.

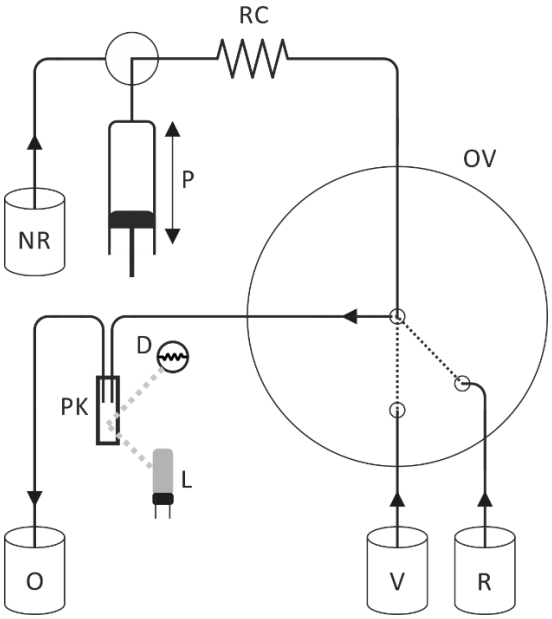
3.4 Instrumentace

Statická spektrometrická měření byla provedena na jednopaprskovém spektrometru HP 8453 (Agilent, USA) s diodovým polem v křemenných kyvetách o délce optické dráhy 1 cm. Statické spektrofluorimetrické měření bylo provedeno na spektrofluorimetru Aminco Bowman Series 2 (Aminco, USA) v křemenné kyvetě o délce 10×10 mm a konstantním napětí na fotonásobiči 750 V.

Sekvenční injekční analýza byla realizována na přístroji FIAlab-3500, který byl ovládán softwarem FIAlab ver. 5.0 (FIAlab Instruments, USA). Roztoky byly nasávány 1,00 cm^3 pístovou pumpou při VIS spektrometrické detekci a 2,50 cm^3 pístovou pumpou při spektrofluorimetrické detekci přes osmicestný ventil. Reakční cívka byla vyrobena z PTFE hadičky (Unchurch, USA) o vnitřním průměru 0,8 mm s celkovým objemem 1000 mm^3. Spojovací hadičky z PTFE měly vnitřní průměr 0,5 mm. Spektrometrická detekce ve VIS oblasti spektra byla provedena na vláknovém spektrometru Ocean Optics QE65000 (Ocean Optics, USA) připojený optickými vlákny o vnitřním průměru 400 µm k průtokové cele o vnitřním objemu 80 mm^3. Průtoková cela byla napojena skrze vícecestný ventil. Spektrofluorimetrická detekce byla realizována na luminiscenčním spektrometru Aminco Bowman® Series 2 (Aminco, USA) s průtokovou kyvetou o vnitřním objemu 110 mm^3 a šířkou absorbční vrstvy 10 mm. Na fotonásobič bylo vkládáno konstantní napětí 750 V během všech měření. Schéma zapojení je uvedeno na obr. 3.1 a 3.2



Obr. 3.1: Schéma použité aparatury pro stanovení fenothiazinů SIA metodou se spektrometrickou detekcí ve VIS oblasti spektra: NR nosný roztok (destilovaná voda), P pístová pumpa o objemu 1 cm^3, RC reakční cívka, OV osmicestný ventil, V vzorek (případně roztok standardu), R reakční činidlo (roztok ceričitých iontů), PC průtoková cela, L zdroj záření, D detektor, O odpad.



Obr. 3.2: Schéma použité aparatury pro stanovení fenothiazinů SIA metodou se spektrofluorimetrickou detekcí: NR nosný roztok (destilovaná voda), P pístová pumpa o objemu 2,5 cm^3, RC reakční cívka, OV osmicestný ventil, V vzorek (případně roztok standardu), R reakční činidlo (roztok ceričitých iontů), PK průtoková kyveta, L zdroj záření, D detektor, O odpad.

3.5 Zpracování naměřených dat

Veškerá stanovení byla provedena v pěti opakováních, pokud není uvedeno jinak. Data byla statisticky zpracována. Výsledky jsou uvedeny jako mediány s příslušnými intervaly spolehlivosti. Statistické zpracování bylo provedeno v prostředí programu Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, USA). Grafy byly zpracovány v prostředí programu OriginPro 8.1 (Microcal).

4 Výsledky a diskuse

Stanovení chlorpromazinu, levomepromazinu a promethazinu bylo založeno na měření absorbance produktu ve viditelné oblasti spektra při spektrometrické detekci a měření fluorescence produktu při spektrofluorimetrické detekci po oxidační reakci uvedených fenothiazinů s ceričitými ionty v kyselém prostředí. K vyhodnocení byla použita nelineární kalibrační závislost. Odchýlení od linearity je běžně známý jev u sekvenční injekční analýzy [62]. Mez stanovitelnosti (*LOQ*) byla vypočtena jako koncentrace, která poskytuje signál rovný desetinásobku šumu základní linie.

4.1 Optimalizace experimentálních podmínek

Jako první byla provedena měření a optimalizace experimentálních podmínek ve statickém uspořádání. Poté byly tyto experimentální podmínky přizpůsobeny pro měření metodou sekvenční injekční analýzy.

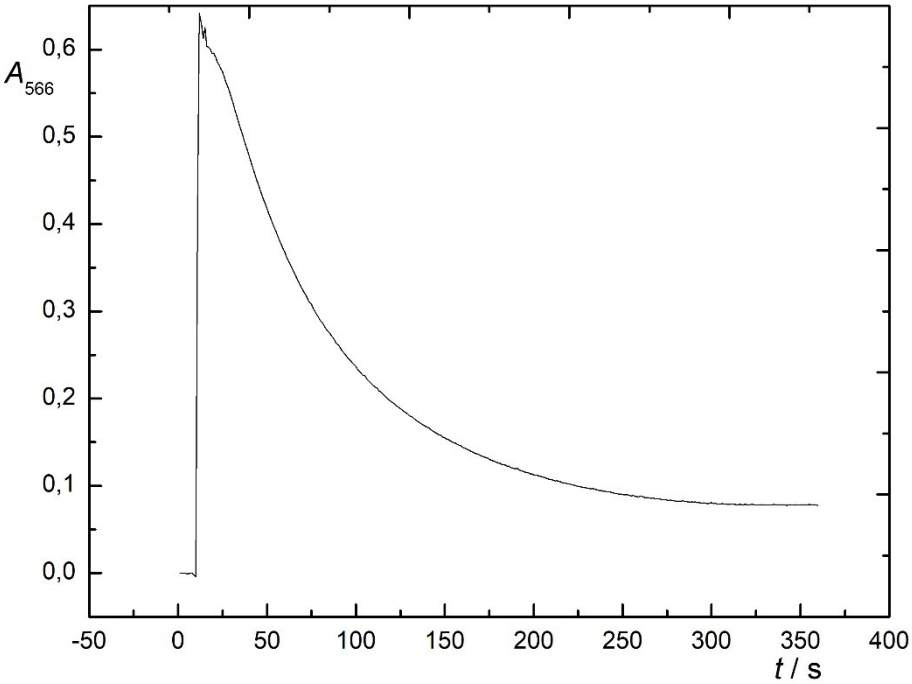
4.1.1 Statické spektrometrické měření

Pro prvotní experimenty ve statickém uspořádání byla zvolena koncentrace ceričitých iontů $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} a koncentrace vodíkových iontů $1 \cdot 10^{-1}$ mol dm^{-3}. Tyto koncentrace byla později optimalizovány pro měření metodou sekvenční injekční analýzy (odd. 4.1.3).

Při statickém spektrometrickém měření byla proměřena spektra všech analytů ve viditelné oblasti po jejich oxidační reakci, kdy byla vybrána vhodná vlnová délka pro jejich detekci. Pro spektrometrickou detekci ve VIS spektru byla jako nejvhodnější zjištěna vlnová délka pro levomepromazin 566 nm, pro chlorpromazin 526 nm a pro promethazin 514 nm.

Byla také změřena kinetika reakce pro levomepromazin, chlorpromazin a promethazin, kdy se ukázalo, že produkt oxidační reakce je časově málo stabilní, obr. 4.1. Tento

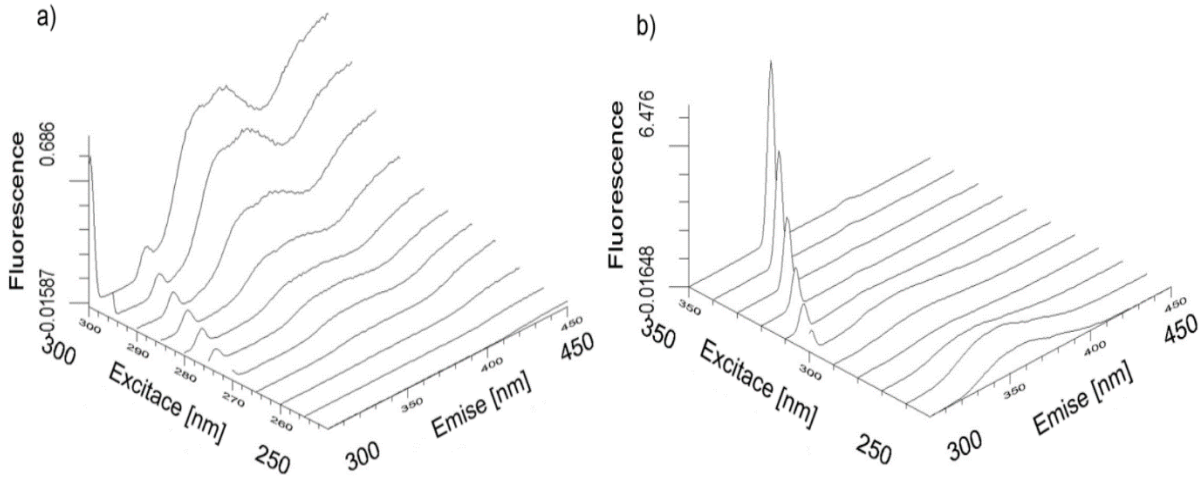
problém lze snadno obejít použitím SIA metody, u které je čas od dávkování k detekci přesně reprodukovatelný, tudíž je u reakce vždy dosaženo stejného stupně konverze.



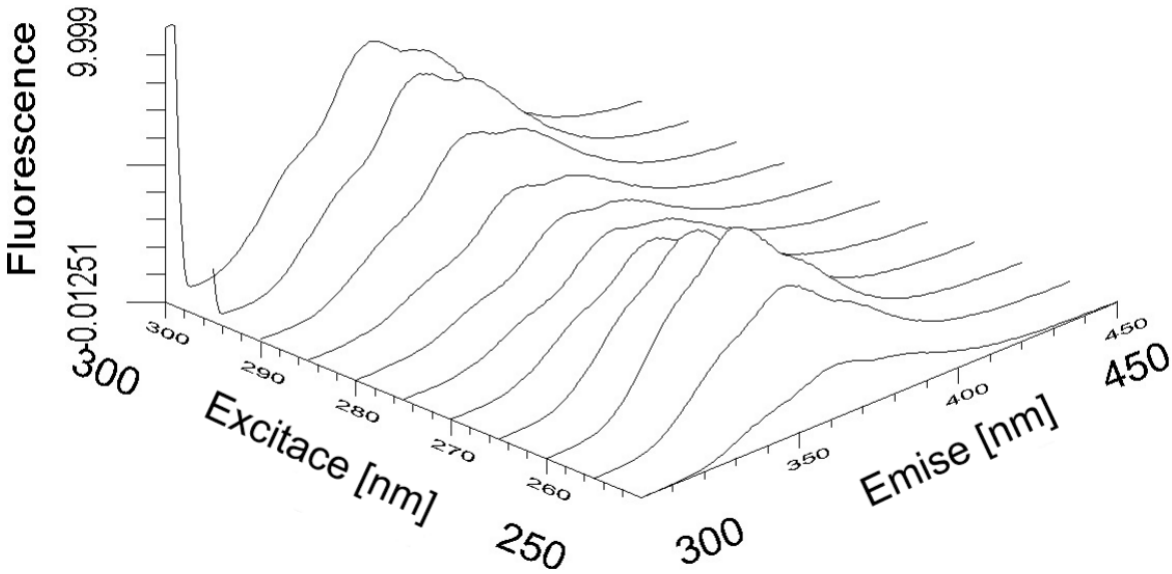
Obr. 4.1: Závislost absorbance při λ_{VIS} = 566 nm na čase pro standardní roztok levomepromazinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} (V_{LMP} = 1 cm^3, V_{REG} = 1 cm^3, $c_{Ce(SO_4)_2}$ = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c_{H^+} = $1 \cdot 10^{-1}$ mol dm^{-3})

4.1.2 Statické spektrofluorimetrické měření

Pro měření se spektrofluorimetrickou detekcí byly nejprve proměřena emisní a excitační spektra všech analytů i reakčního činidla samostatně (obr. 4.2). Následně byla vybrána vhodná emisní a excitační vlnová délka tak, aby produkt oxidační reakce ceričitých iontů s analytem (obr. 4.3) poskytoval nejvyšší signál a zároveň samotné reakční činidlo a samotný analyt měly co nejmenší signál. Pro všechny analyzované fenothiaziny byla jako vhodná excitační vlnová délka zvolena 260 nm a jako nejvhodnější emisní vlnová délka byla vybrána pro chlorpromazin a levomepromazin λ_{em} = 370 nm a pro promethazin λ_{em} = 360 nm.



Obr. 4.2.: Závislost fluorescence a) samotného standardu chlorpromazinu, b) samotného síranu ceričitého v kyselém prostředí na excitační a emisní vlnové délce (c_{CHP}=5 · 10^{-4} mol dm^{-3}, V_{CHP} = 1 cm^3, $c_{\mathrm{Ce(SO_4)_2}}$ = 5 · 10^{-4} mol dm^{-3}, $c_{\mathrm{H^+}}$ = 5 · 10^{-2} mol dm^{-3}, V_{REAG} = 1 cm^3, U = 750 V)



Obr. 4.3: Závislost fluorescence produktu oxidační reakce chlorpromazinu a síranu ceričitého na excitační a emisní vlnové délce (c_{CHP} = 5 · 10^{-4} mol dm^{-3}, V_{CHP} = 1 cm^3, $c_{\mathrm{Ce(SO_4)_2}}$ = 5 · 10^{-4} mol dm^{-3}, $c_{\mathrm{H^+}}$ = 5 · 10^{-2} mol dm^{-3}, V_{REAG} = 1 cm^3, U = 750 V)

4.1.3 Optimalizace podmínek pro sekvenční injekční analýzu

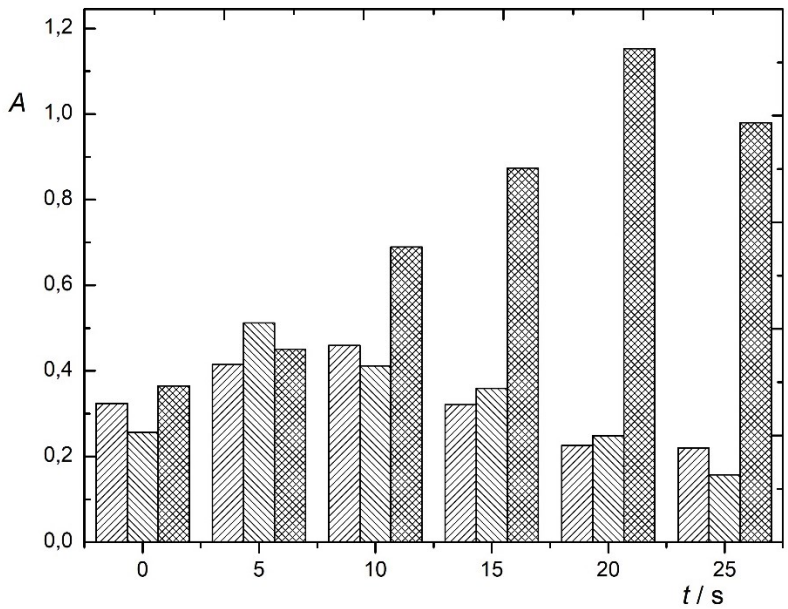
Nejprve byl optimalizován poměr koncentrace síranu ceričitého a koncentrace vodíkových iontů. Redoxní potenciál ceričitých iontů se zvyšuje se zvyšující se koncentrací vodíkových iontů, což má za následek zvýšení množství produktu oxidace, ale zároveň se zvyšujícím se obsahem vodíkových iontů se zvyšuje rychlost degradace produktu oxidace [63]. Bylo tedy nutné zvolit takový poměr koncentrací ceričitých a vodíkových iontů, který umožnil dostatečnou oxidační sílu ceričitých iontů a zároveň takovou koncentraci vodíkových iontů, při které by nedocházelo k příliš rychlé degradaci produktu, aby byla možná jeho detekce. V přístroji pro sekvenční injekční analýzu nebylo možné použít vyšší koncentraci vodíkových iontů než 0,1 mol dm^{-3} z důvodu možného poškození spojovacích PTFE hadiček. Na základě výsledků optimalizačních experimentů (tabulka 4.1) byla jako nejvhodnější vybrána koncentrace síranu ceričitého $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} a koncentrace vodíkových iontů $5 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}.

Tabulka 4.1

Optimalizace koncentrace ceričitých a vodíkových iontů v reakčním činidle pro oxidaci fenothiazinů. Uvedené koncentrace byly převzaty z [63] a přizpůsobeny technickým možnostem přístroje FIAlab−3500. Pro optimalizaci byl použit standardní roztok levomepromazinu o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}.

$c_{Ce(SO_4)_2}$ / mol dm^{-3}	c_{H^+} / mol dm^{-3}	A_{566}
$2{,}59 \cdot 10^{-3}$	$8{,}2 \cdot 10^{-2}$	0,130
$3{,}80 \cdot 10^{-3}$	$7{,}0 \cdot 10^{-2}$	0,167
$4{,}08 \cdot 10^{-3}$	$9{,}6 \cdot 10^{-2}$	0,326
$2{,}50 \cdot 10^{-4}$	$2{,}5 \cdot 10^{-2}$	0,473
$5{,}00 \cdot 10^{-4}$	$5{,}0 \cdot 10^{-2}$	0,575

Při optimalizaci podmínek SIA s VIS spektrometrickou detekcí byla optimalizována doba zadržení reaktantů v cívce, jelikož každý analyt potřeboval různě dlouhou dobu pro zreagování. Vyzkoušena byla doba 0, 5, 10, 15, 20 a 25 sekund. Jak lze vidět na obr. 4.4 nejvhodnější doba zadržení v cívce pro promethazin byla 5 sekund, pro levomepromazin 10 sekund, pro chlorpromazin 20 sekund.



Obr. 4.4: Změna absorbance v závislosti na době zadržení v reakční cívce při stanovení metodou SIA s VIS spektrometrickou detekcí pro standardní roztoky promethazinu, levomepromazinu a chlorpromazinu o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} (dávkovaný objem vzorku 100 mm^3, dávkovaný objem činidla 100 mm^3, $c_{Ce(SO_4)_2} = 5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, $c_{H^+} = 5 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}, $F = 50$ mm^3 s^{-1}).

Dále byl optimalizován dávkovaný objem vzorku a reakčního činidla. Pro spektrometrické stanovení byl zvolen dávkovaný objem vzorku i činidla jako 100 mm^3. Pro spektrofluorimetrickou detekci byl dávkovaný objem vzorku snížen na 50 mm^3 a dávkovaný objem reakčního činidla byl snížen na 25 mm^3. Při dávkování vyšších objemů nedocházelo k dostatečnému vymytí průtokové kyvety umístěné ve spektrofluorimetru. Změna poměru dávkovaného objemu činidla a dávkovaného objemu vzorku neměla vliv na odezvu.

Byla optimalizována průtoková rychlost nosného proudu. Změna průtokové rychlosti neměla vliv na stanovení. Průtoková rychlost nosného proudu byla zvolena 50 mm^3 s^{-1}.

Použité optimální podmínky stanovení metodou SIA pro jednotlivé fenothiaziny jsou shrnuty v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2

Použité optimální podmínky pro stanovení fenothiazinů metodou sekvenční injekční analýzy s VIS spektrometrickou, resp. spektrofluorimetrickou detekcí, pro analyzované fenothiaziny.

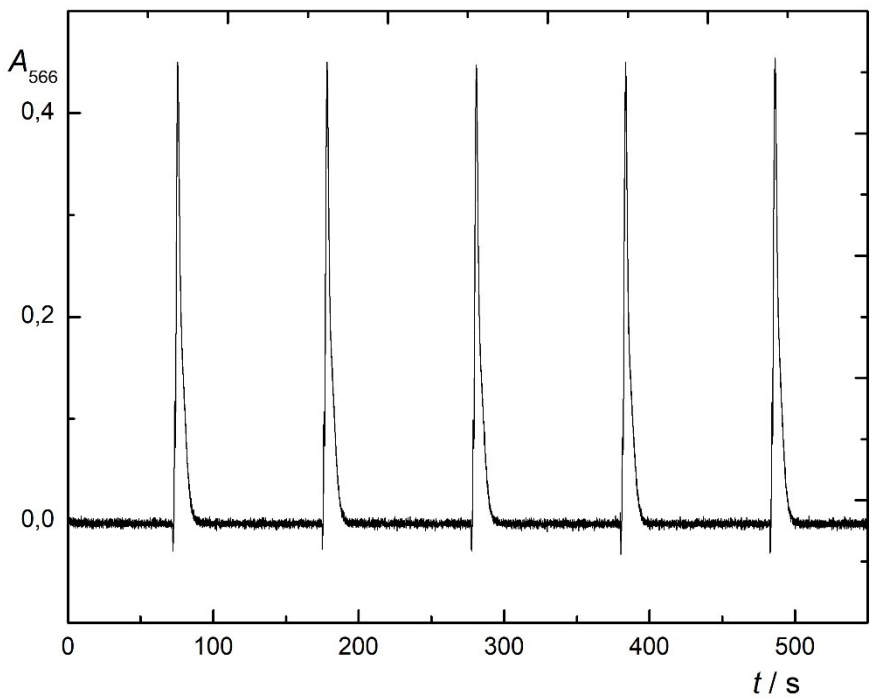
Fenothiazin	Doba zadržení v cívce / s	VIS detekce	Spektrofluorimetrická detekce	
		λ_{VIS} / nm	λ_{exc} / nm	λ_{em} / nm
Chlorpromazin	20	526	260	370
Levomepromazin	10	566	260	370
Promethazin	5	514	260	360

4.2 SIA stanovení se spektrometrickou detekcí

Sekvenční injekční analýza pro stanovení fenothiazinů s VIS spektrometrickou detekcí byla realizována v následující sekvenci:

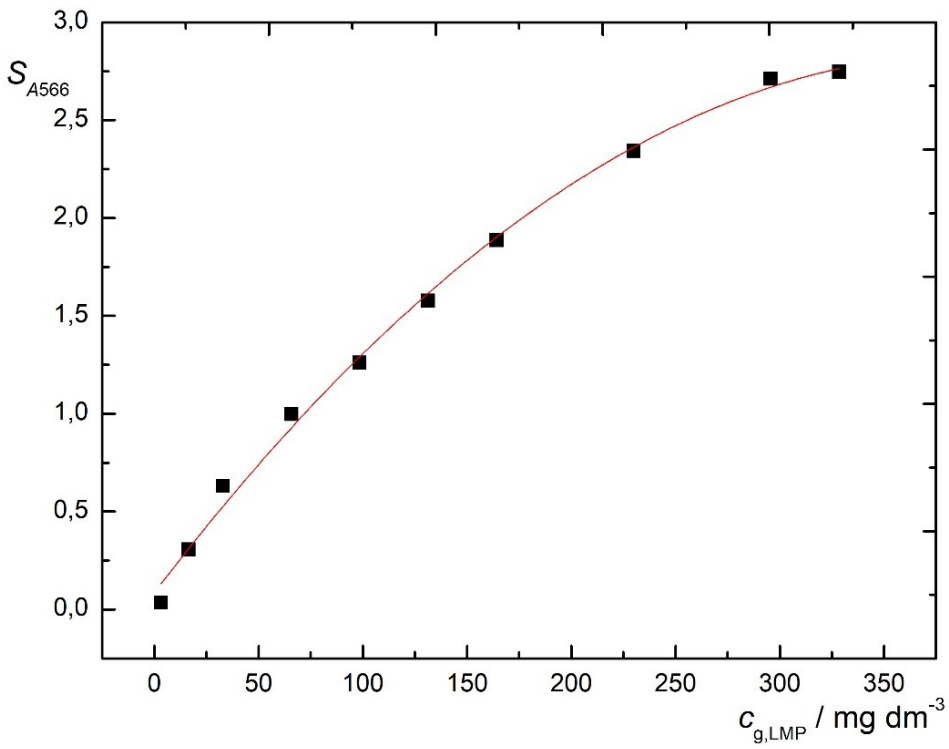
1. do reakční cívky aparatury bylo nasáto 100 mm^3 roztoku vzorku (resp. standardu), dále 100 mm^3 roztoku síranu ceričitého o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} a koncentraci vodíkových iontů $5 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}, po časové prodlevě vhodně zvolené v závislosti na analytu byl obsah reakční cívky vymyt do odpadu přes detekční průtokovou celu, tím byl získán signál při vhodné vlnové délce zvolené podle analytu.
2. reakční cívka, spojovací hadičky a detekční průtoková cela byly promyty destilovanou vodou.

Na obr. 4.5 je vyobrazen příklad získaného záznamu (SIAgram). Cyklus jednoho měření trval 150 s, za hodinu lze tedy analyzovat 24 vzorků.



Obr. 4.5: Závislost absorbance při vlnové délce 566 nm na čase (SIA pík) pro standardní roztok levomepromazinu o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} (dávkovaný objem vzorku 100 mm^3, dávkovaný objem činidla 100 mm^3, $c_{Ce(SO_4)_2} = 5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, $c_{H^+} = 5 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}, $F = 50$ mm^3 s^{-1})

Pro sestavení kalibračních závislostí byly jako analytický signál použity plochy SIA píků. Při optimálních podmínkách byla proměřena závislost plochy píku na hmotnostní koncentraci standardu daného fenothiazinu (obr. 4.6).



Obr. 4.6.: Závislost plochy SIA píku při vlnové délce 566 nm na koncentraci standardu levomepromazinu v dynamickém rozsahu 3–320 mg dm^{-3} (dávkovaný objem vzorku 100 mm^3, dávkovaný objem činidla 100 mm^3, $c_{Ce(SO_4)_2}$ = 5 · 10^{-4} mol dm^{-3}, c_{H^+} = 5 · 10^{-2} mol dm^{-3}, F = 50 mm^3 s^{-1})

Kalibrační závislost lze popsat rovnicí

$$S = ac_{PTZ}^2 + bc_{PTZ} + d \tag{4.1}$$

kde S je plocha SIA píku změřená při vhodné vlnové délce, c_{PTZ} je hmotnostní koncentrace fenothiazinu [mg dm^{-3}], a, b, d jsou koeficienty rovnice. Zjištěné hodnoty koeficientů kalibrační závislosti pro VIS spektrometrickou detekci jsou uvedeny v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3

Kalibrační parametry, koeficienty determinace, limity kvantifikace a dynamické rozsahy pro stanovení chlorpromazinu, levomepromazinu a promethazinu metodou SIA s VIS spektrometrickou detekcí po oxidaci ceričitými ionty v kyselém prostředí.

Fenothiazin	a / mg^{-2}dm^{6}	b / mg^{-1}dm^{3}	d	R^2	LOQ / mg dm^{-3}	DR / mg dm^{-3}
Chlorpromazin	$-5{,}2 \cdot 10^{-5}$	$2{,}7 \cdot 10^{-2}$	$3{,}9 \cdot 10^{-2}$	0,9942	0,31	15−250
Levomapromazin	$-1{,}8 \cdot 10^{-5}$	$1{,}3 \cdot 10^{-2}$	$8{,}6 \cdot 10^{-2}$	0,9964	0,31	3−320
Promethazin	$-5{,}4 \cdot 10^{-5}$	$1{,}8 \cdot 10^{-2}$	$1{,}8 \cdot 10^{-2}$	0,9952	0,31	3−160

Vyvinutá metoda SIA s VIS spektrofotometrickou detekcí byla použita pro stanovení chlorpromazinu v autentických vzorcích léčivého přípravku Plegomazin ve formě tablet, levomepromazinu v léčivém Tisercin ve formě tablet a injekčního roztoku a promethazinu v léčivém přípravku Prothazin ve formě tablet. Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Tabulka 4.4

Výsledky stanovení obsahu fenothiazinu v různých léčivých přípravcích metodou SIA se spektrometrickou detekcí ve VIS oblasti spektra

Fenothiazin	Název přípravku, léková forma	Obsah	
		deklarovaný	nalezený / % ± RSD
Chlorpromazin hydrochlorid	Plegomazin tableta	25 mg/tbl	106,73 ± 6,97
	Plegomazin tableta	100 mg/tbl	106,08 ± 1,56
Levomepromazin hydrochlorid	Tisercin injekční roztok	25 mg ml^{-1}	103,31 ± 3,17
	Tisercin tableta	25 mg/tbl	100,98 ± 1,27
Promethazin hydrochlorid	Prothazin tableta	25 mg/tbl	99,71 ± 7,22

4.3 SIA stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí

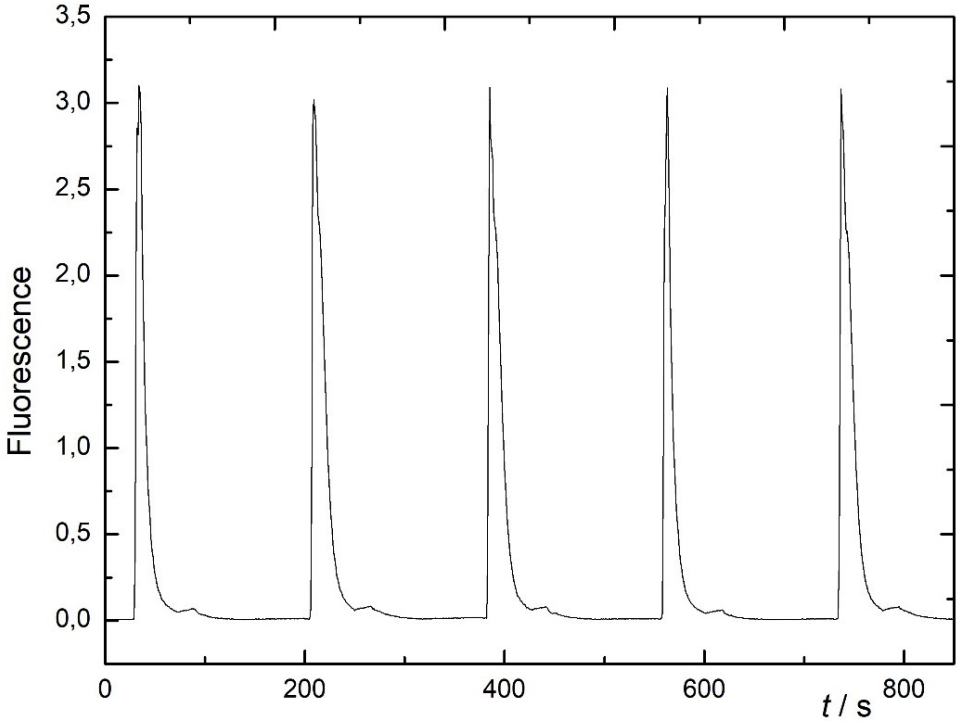
Sekvenční injekční analýza pro stanovení fenothiazinů se spektrofluorimetrickou detekcí byla realizována v následující sekvenci:

1. do reakční cívky aparatury bylo nasáto 50 mm^3 roztoku vzorku (resp. standardu), dále 25 mm^3 reakčního činidla síranu ceričitého o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} a koncentraci vodíkových iontů $5 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}, po časové prodlevě vhodně zvolené v závislosti na analytu byl obsah reakční cívky promyt průtokovou kyvetou umístěnou

ve spektrofluorimetru do odpadu, tím byl získán signál při vhodné emisní a excitační vlnové délce zvolené podle analytu.

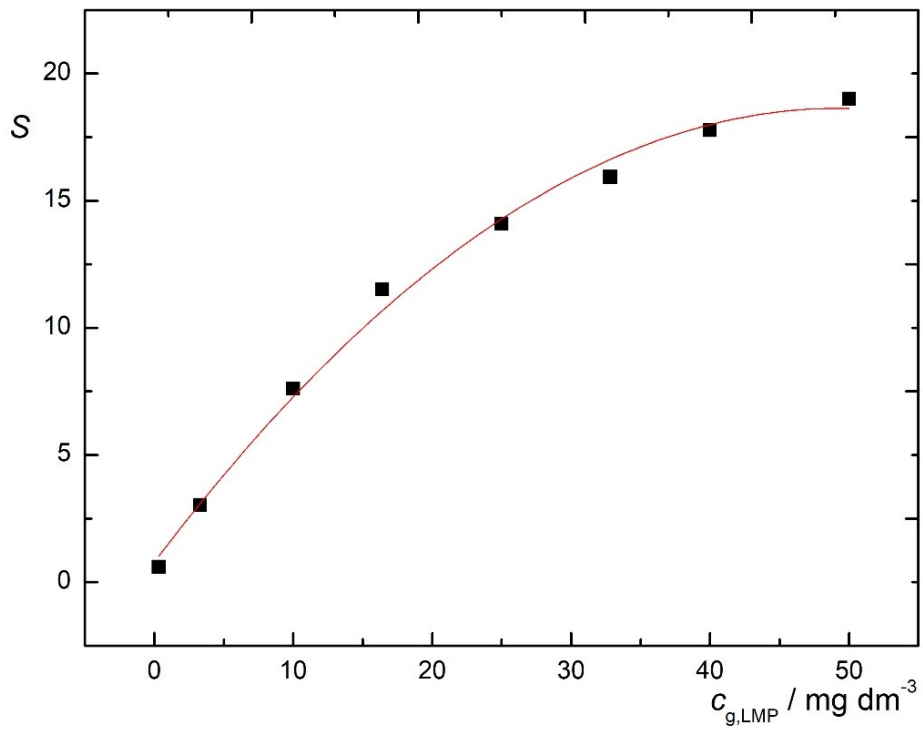
2. reakční cívka, spojovací hadičky a průtoková kyveta byly promyty destilovanou vodou.

Na obr. 4.7 je vyobrazen příklad získaného záznamu (SIAgram). Cyklus jednoho měření trval 180 s, za hodinu lze tedy analyzovat 20 vzorků.



Obr. 4.7: Závislost fluorescence na čase (SIA pík) pro standardní roztok levomepromazinu o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} (dávkovaný objem vzorku 50 mm^3, dávkovaný objem činidla 25 mm^3, $\lambda_{em} = 370$ nm, $\lambda_{ex} = 260$ nm, $c_{Ce(SO_4)_2} = 5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, $c_{H^+} = 5 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}, $U = 750$ V, $F = 50$ mm^3 s^{-1})

Jako analytický signál pro konstrukci kalibračních závislostí byly použity plochy SIA píků. Při optimálních podmínkách byla proměřena závislost plochy píků při vhodné excitační a emisní vlnové délce na hmotnostní koncentraci standardu daného fenothiazinu (obr. 4.8).



Obr. 4.8: Závislost plochy SIA píku na koncentraci standardu levomepromazinu v rozmezí 0−50 mg dm^{-3} (λ_{ex} = 260 nm, λ_{em} = 370 nm, $c_{Ce(SO_4)_2}$ = 5 · 10^{-4} mol dm^{-3}, c_{H^+} = 5 · 10^{-2} mol dm^{-3}, U = 750 V, F = 50 mm^3 s^{-1})

Kalibrační závislost lze popsat rovnicí (4.1). Zjištěné hodnoty koeficientů kalibrační závislosti pro spektrofluorimetrickou detekci jsou uvedeny v tabulce 4.5.

Tabulka 4.5

Kalibrační parametry, koeficienty determinace, limity kvantifikace a dynamické rozsahy pro stanovení chlorpromazinu, levomepromazinu a promethazinu metodou SIA se spektrofluorimetrickou detekcí po oxidaci ceričitými ionty v kyselém prostředí.

Fenothiazin	a / mg^{-2}dm^6	b / mg^{-1}dm^3	d	R^2	LOQ / mg dm^{-3}	DR / mg dm^{-3}
Chlorpromazin	−6,9 · 10^{-3}	0,73	1,3	0,9975	2,6 · 10^{-3}	0,3−40
Levomapromazin	−7,3 · 10^{-3}	0,72	0,78	0,9947	2,6 · 10^{-3}	0,3−50
Promethazin	−8,9 · 10^{-3}	0,66	1,4	0,9914	2,6 · 10^{-3}	0,3−50

Vyvinutá metoda SIA s VIS spektrofotometrickou detekcí byla použita pro stanovení chlorpromazinu v autentických vzorcích léčivého přípravku Plegomazin ve formě tablet, levomepromazinu v léčivém přípravku Tisercin ve formě tablet a injekčního roztoku a promethazinu v léčivém přípravku Prothazin ve formě tablet. Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny v tabulce 4.6.

Tabulka 4.6

Výsledky stanovení obsahu fenothiazinu v různých léčivých přípravcích formách metodou SIA se spektrofluorimetrickou detekcí

Fenothiazin	Název přípravku, léková forma	Obsah	
		deklarovaný	nalezený / % ± RSD
Chlorpromazin hydrochlorid	Plegomazin tableta	25 mg/tbl	103,88 ± 1,57
	Plegomazin tableta	100 mg/tbl	99,97 ± 2,60
Levomepromazin hydrochlorid	Tisercin injekční roztok	25 mg ml^{-1}	106,65 ± 1,85
	Tisercin tableta	25 mg/tbl	103,42 ± 1,22
Promethazin hydrochlorid	Prothazin tableta	25 mg/tbl	106,68 ± 4,45

4.4 Interference se sacharidy

V léčivých přípravcích obsahujících fenothiaziny se často vyskytují pomocné látky (sacharidy, mikrokrystalická celulosa, mastek, magnesium stearát) [25]. Ve vodě nerozpustné pomocné látky byly odstraněny filtrací. Byl tedy studován vliv ve vodě rozpustných pomocných látek: glukosy, fruktosy a laktosy. Při spektrofluorimetrickém stanovení byly změřeny roztoky obsahující konstantní koncentraci fenothiazinu 10 mg dm^{-3} a zvyšující se koncentraci daného sacharidu v rozmezí koncentrací 100−2000 mg dm^{-3}. Chyby měření byly stanoveny jako poměr plochy SIA píku fenothiazinu bez jiných látek a plochy SIA píku fenothiazinu s obsahem přidaných látek. Z výsledků uvedených v tabulce 4.7 je zřejmé, že přítomnost těchto sacharidů nemá efekt na výsledky stanovení fenothiazinů metodou SIA se spektrofluorimetrickou detekcí ani při 2000 násobném nadbytku.

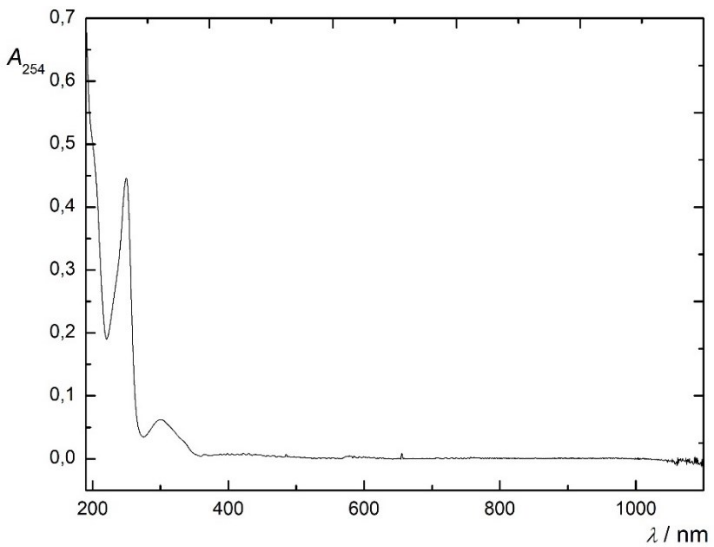
Tabulka 4.7

Vliv fruktosy, glukosy a laktosy na stanovení fenothiazinů metodou SIA se spektrofluorometrickou detekcí. Koncentrace fenothiazinu 10 mg dm^{-3}.

Fenothiazin	$c_{sacharid}$ / mg dm^{-3}	Chyba měření		
		Fruktosa	Glukosa	Laktosa
Chlorpromazin	100	1,04	1,01	0,99
	500	1,12	1,10	1,01
	1000	0,99	0,99	1,14
	2000	0,99	1,02	1,12
Levomepromazin	100	0,99	1,10	1,19
	500	1,09	1,00	1,12
	1000	0,97	1,08	1,08
	2000	0,96	1,04	1,17
Promethazin	100	1,06	1,02	1,14
	500	1,09	1,11	1,13
	1000	1,06	1,13	1,30
	2000	1,04	1,08	1,18

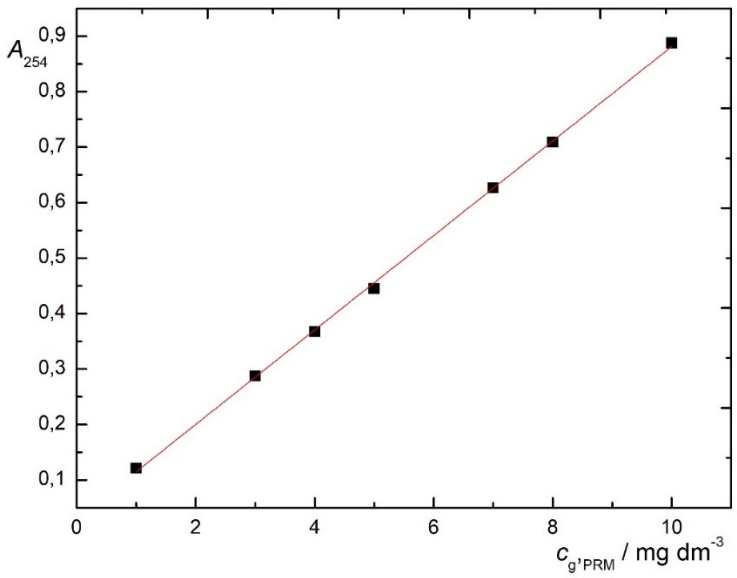
4.5 Referenční stanovení fenothiazinů v analyzovaných léčivých přípravcích metodou UV spektrometrie

Jako referenční metoda pro stanovení fenothiazinů v analyzovaných léčivých přípravcích byla použita metoda přímé UV spektrometrie. Jako signál byla zvolena absorbance při vlnové délce 254 nm (obr. 4.9).



Obr. 4.9: Absorpční spektrum 5 mg dm^{-3} promethazinu ve vodném roztoku (měřeno v kyvetě optické dráhy 1 cm).

Byly změřeny absorbance kalibračních roztoků pro každý fenothiazin v rozsahu 1−10 mg dm^{-3}. Byla sestavena kalibrační závislost absorbance při 254 nm na hmotnostní koncentraci fenothiazinu. (obr. 4.10).



Obr. 4.10: Kalibrační závislost absorbance při 254 nm na hmotnostní koncentraci promethazinu v dynamickém rozsahu 0−10 mg dm^{-3} (měřeno v kyvetě optické dráhy 1 cm).

Tuto kalibrační závislost je možné popsat rovnicí

$$A_{254} = ac_{PTZ} + b \tag{4.2}$$

kde A_{254} je maximální absorbance při vlnové délce 254 nm, c_{PTZ} je hmotnostní koncentrace fenothiazinu [mg dm^{-3}], a, b jsou koeficienty rovnice. Zjištěné hodnoty koeficientů kalibrační závislosti jsou uvedeny v tabulce 4.8.

Tabulka 4.8

Kalibrační parametry a koeficienty determinace pro stanovení chlorpromazinu, levomepromazinu a promethazinu metodou přímé UV spektrometrie při vlnové délce 254 nm.

Fenothiazin	a / mg^{-1} dm^3	b	R^2
Chlorpromazin	$8{,}9 \cdot 10^{-2}$	$8{,}4 \cdot 10^{-3}$	0,9991
Levomapromazin	$7{,}7 \cdot 10^{-2}$	$2{,}1 \cdot 10^{-2}$	0,9999
Promethazin	$8{,}5 \cdot 10^{-2}$	$2{,}9 \cdot 10^{-2}$	0,9995

Výsledky referenčního měření autentických vzorků přímou UV spektrometrií jsou uvedeny v tabulce 4.9.

Tabulka 4.9

Výsledky stanovení obsahu fenothiazinu v různých léčivých přípravcích metodou přímé UV spektrometrie.

Fenothiazin	Název přípravku, léková forma	Obsah	
		deklarovaný	nalezený / % ± RSD
Chlorpromazin hydrochlorid	Plegomazin tableta	25 mg/tbl	101,00 ± 2,24
	Plegomazin tableta	100 mg/tbl	100,11 ± 3,90
Levomepromazin hydrochlorid	Tisercin injekční roztok	25 mg ml^{-1}	99,93 ± 1,08
	Tisercin tableta	25 mg/tbl	99,55 ± 2,23
Promethazin hydrochlorid	Prothazin tableta	25 mg/tbl	98,70 ± 0,78

4.6 Diskuse

Pro stanovení vybraných fenothiazinů, chlorpromazinu, levomepromazinu a promethazinu, byla vyvinuta a optimalizována metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou a spektrofluorimetrickou detekcí po oxidační reakci s ceričitými ionty v kyselém prostředí.

Spektrofotometrická detekce byla založena na měření absorbance barevného produktu ve viditelné oblasti spektra po oxidační reakci analytu s ceričitými ionty. Spektrofluorometrická detekce byla založena na měření fluorescence produktu analytu po oxidační reakci s ceričitými ionty. Oba způsoby detekce byly následně vyhodnoceny metodou kalibrační nelineární závislosti. K vyhodnocení byla použita plocha SIA píků, které byly při měření více spolehlivé a přesné.

Spektrofotometrické stanovení poskytovalo více správné výsledky, ale s větší odchylkou měření a menší citlivosti. Oproti tomu spektrofluorimetrické stanovení poskytovalo méně správné výsledky, ale s menší odchylkou měření než u spektrofotometrického stanovení. Spektrofluorimetrické stanovení má také vyšší citlivost. Jako referenční metoda byla použita přímá UV spektrometrie. Výsledky jednotlivých typů detekce jsou uvedeny v tabulce 4.10.

Tabulka 4.10

Výsledky stanovení obsahu fenothiazinu v různých léčivých přípravcích metodami použitými v této práci: SIA-VIS – sekvenční injekční analýza s detekcí ve viditelné oblasti spektra, SIA-FLD – sekvenční injekční analýza se spektrofluorimetrickou detekcí, UV – přímá spektrometrie v UV oblasti)

Fenothiazin	Název přípravku, léková forma	Obsah			
		deklarovaný	nalezený / % ± RSD		
			SIA-VIS	SIA-FLD	UV
Chlorpromazin.HCl	Plegomazin tableta	25 mg/tbl	106,73 ± 6,97	103,88 ± 1,57	101,00 ± 2,24
	Plegomazin tableta	100 mg/tbl	106,08 ± 1,56	99,97 ± 2,60	100,11 ± 3,90
Levomepromazin.HCl	Tisercin injekční roztok	25 mg ml^{-1}	103,31 ± 3,17	106,65 ± 1,85	99,93 ± 1,08
	Tisercin tableta	25 mg/tbl	100,98 ± 1,27	103,42 ± 1,22	99,55 ± 2,23
Promethazin.HCl	Prothazin tableta	25 mg/tbl	99,71 ± 7,22	106,68 ± 4,45	98,70 ± 0,78

Vyvinutá metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou a spektrofluorimetrickou detekcí je rychlá, poskytuje dostatečně přesné a správné výsledky například pro orientační analýzu a oproti lékopisné metodě využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii i finančně méně nákladná. Za výhodu lze také považovat nízkou spotřebu chemikálií bez nutnosti využití organických činidel.

5 Závěr

V diplomové práci byla vyvinuta a optimalizována metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou a spektrofluorimetrickou detekcí ke stanovení analytů ze skupiny fenothiazinů: chlorpromazinu, levomepromazinu a promethazinu. Vyvinutá metoda byla pro oba typy detekce úspěšně aplikována na autentické vzorky léčivých přípravků obsahujících uvedené analyty. Byl studován vliv ve vodě rozpustných přídatných látek v léčivých přípravcích při spektrofluorimetrické detekci.

Stanovení obsahu analytů ve vzorcích bylo provedeno pomocí kalibrační závislosti s nelineární regresí. Srovnávací metodou byla přímá UV spektrometrie. Naměřené koncentrace chlorpromazinu, levomepromazinu a promethazinu v reálných vzorcích jsou v dobré shodě s nalezenými koncentracemi pomocí přímé UV spektrometrie.

Vyvinuté metody sekvenční injekční analýzy pro stanovení obsahu vybraných fenothiazinů se ukázala jako vhodná metoda pro rychlé stanovení fenothiazinů. Oproti některým již zavedeným metodám pro analýzu fenothiazinů je stanovení SIA metodou méně nákladné, umožňuje menší spotřebu chemikálií a není nutné využívat organická činidla. Její výhodou je také snadná automatizace.

Seznam literatury

[1] Jaszczyszyn A., Gasiorowski K., Swiatek P., Malinka W., Cieslik-Boczula K., Petrus J., Czarnik-Matusewicz B.: Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacological Reports* **64** (2012), 16–23.

[2] Gangopadhyay S., Karmakar P.: Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *European Journal of Pharmacology* **648** (2010), 6−14.

[3] Ohlow M.J., Moosmann B.: Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discovery Today* **16** (2011), 119–131.

[4] Pascual A., Maud H., Briolant S., Charras S., Baret E,, Amalvict R., Huyghues des Etages E., Feraud M., Rogier C., Pradines B.: *In vitro* activity of Proveblue (Methylene Blue) on *Plasmodium falciparum* strains resistant to standard antimalarial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55** (2011), 2472−2474.

[5] Puzanowska-Tarasiewicz H., Karpińska J., Kojło A., Starczewska B., Wołyniec E.: The reactions of 2,10-disubstituted phenothiazines with metal ions. A review. *Chemia Analityczna* **48** (2003), 181–187.

[6] Brunton L.L., Hilal-Dandan R., Knollmann B.C.: *Goodman & Gilman´s: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13th ed*. New York, McGraw-Hill 2017.

[7] Mosnaim A.D., Ranade V.V., Wolf M.E., Puente J., Valenzuela M.A.: Phenothiazine molecule provides the basic chemical structure for various classes of pharmacotherapeutic agents. *American Journal of Therapeutics* **13** (2006), 261–273.

[8] Hendricks O., Butterworth T.S., Kristiansen J. E.: The *in-vitro* antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22** (2003), 262−264.

[9] Kristiansen J.E., Amaral L.: The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **40** (1997), 319−327.

[10] Lagadinou M., Onisor M.O., Rigas A., Musetescu D.V., Gkentzi D., Assimakopoulos S.F., Panos G., Marangos M.: Antimicrobial properties on non-antibiotic drugs in the era of increased bacterial resistance. *Antibiotics* **9** (2020), 107−128.

[11] World Health Organization: *World Health Organization Model List of Essential Medicines: 22nd list.* World Health Organization, Geneva 2021.

[12] Madej K., Koscielniak P.: Review of analytical methods for identification and determination of PHEs and tricyclic antidepressants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **38** (2008), 50–66.

[13] López-Munoz F., Alamo C., Cuenca E., Shen W., Clervoy P., Rubio G.: History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Annals of Clinical Psychiatry* **17** (2005), 35−113.

[14] Taurand G.: Phenothiazine and derivatives. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7th Edition. Wiley 2000.

[15] United States Pharmacopoeia Convention: *The United States Pharmacopoeia 44, National Formulary 39.* United States Pharmacopoeia Convention, Rockville 2021.

[16] Huot. J. M., Kristof A. C.: Levomepromazine (Nozinan) – a new neuroleptic agent for treatment of senile patients. *Canadian Medical Association Journal* **81** (1959), 536−538.

[17] Huhn M., Nikolakopoulou A., Schneider-Thoma J., Krause M., Samara M., Peter N., Arndt T., Bäckers L., Rothe P., Cipriani A., Davis J., Salanti G., Leucht S..: Comparative efficacy and tolerability of 32 oral antipsychotics for the acute treatment of adults with multi−episode schizophrenia: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet* **394** (2019), 939−951.

[18] Furukawa S., Hitosugi M.: Autopsic examination case of levomepromazine toxicity. *Journal of Clinical Toxicology* **6** (2016), 278−279.

[19] Kopeček M.: Klinické a teoretické aspekty podávání antipsychotik (neuroleptik). *Remedia* **6** (2002), 447–465.

[20] Dietz I., Schmitz A., Lampey I., Schulz Ch.: Evidence for the use of levomepromazin for symptom control in the palliative care setting: a systematic review. *Palliative Care* **12** (2013), 1−12.

[21] Higashima, M., Takeda, T., Nagasawa, T., Hirao, N., Oka, T., Nakamura, M., Koshino, Y.: Combined therapy with low-potency neuroleptic levomepromazine as an adjunct to haloperidol for agitated patients with acute exacerbation of schizophrenia. *European Psychiatry* **18** (2004), 380−381.

[22] Kornhuber J., Wiltfang J., Riederer P., Bleich S.: Neuroleptic drugs in the human brain: clinical impact of persistence and region-specific distribution. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* **256** (2006), 274-280.

[23] Gertz H. J., Schmidt L. G.: Low melanin content of substantia nigra in case of neuroleptic malignant syndrome. *Pharmacopsychiatry* **24** (1991), 93−95.

[24] Council of Europe: *European Pharmacopoeia: 10th edition*. Council of Europe, Strasbourg 2019.

[25] Shen W. W.: A history of antipsychotic drug development. *Comprehensive Psychiatry* **40** (1999), 407−414.

[26] Munoz. F., Alamo C., Rubio G., Cuenca E.: Half a century since the clinical introduction of chlorpromazine ad the birth of modern psychoparmacology. *Progress in Neuro−Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **28** (2004), 205−208.

[27] Loyn W.: Promethazin in general anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia* **28** (1956), 126−129.

[28] Strenoski-Nix L. C., Ermer J., DeCleene S., Cevallos W., Mayer P. R.: Pharmacokinetics of promethazine hydrochloride after administration of rectal suppositories and oral syrup to healthy subjects. *American Journal of Health-System Pharmacy* **57** (2000), 1499−1505.

[29] Cantisani C., Ricci S., Grieco T., Paolino G., Faina V., Silvestri E. Calvieri S.: Topical promethazine side effects: Our experience and review of the literature. *BioMed Research International* **2013** (2013), 151509.

[30] Kojlo A., Karpinska J., Kuzmicka L., Misiuk W., Puzanowska-Tarasiewicz H., Tarasiewicz M.: Analytical study of the reaction of phenothiazines with some oxidants, metal ions, and organic substances. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* **19** (2001), 45–70.

[31] Hefnawy M.M.: Analysis of certain tranquilizers in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **27** (2002), 661–678.

[32] Mercolini L., Bugamelli F., Kenndler E., Boncompagni G., Franchini L., Raggi M. A.: 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. *Journal of Chromathography B* **846** (2007), 273−280.

[33] Leonnechen T., Andersen A., Hals P. A., Dahl S. G.: High performance liquid chromatographic determination of levomepromazine (methotrimepazine) and its main metabolites in serum and urine. *Therapeutic Drug Monitoring* **12** (1990), 574−581.

[34] Horst P. G. J., Foudraine N. A., Cuypers G., Dijk van E. A., Oldenhof N.J.J.: Simultaneous determination of levomepromazine, midazolam and their major metabolites in human plasma by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **791** (2003), 389−398.

[35] Karpínska J., Wiszowata A., Skooczylas M.: Simultaneous determination of levomepromazine hydrochloride and its sulfoxide by UV-derivative spectrophotometry and bivariate calibration method. *Analytical Letters* **39** (2011), 1129−1141.

[36] Blazheyeskiy M. Y., Mozgova O. O.: Quantitative determination of levomepromazine in pharmaceuticals by spectrophotometric method as its sulfoxide. *French-Ukrainian Journal of Chemistry* **8** (2020), 117−124.

[37] Shinmen N., Lee X.P., Kumazawa T., Hasegawa C., Ishiwata Y., Sato K., Seno H., Suzuki O.: Simultaneous determination of some phenothiazine derivatives in human blood by

headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Journal of AOAC International* **91** (2008), 1354−1362.

[38] Ni Y., Wang L., Kokot S.: Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta* **439** (2001), 159−168.

[39] Dermis S., Biryol I.: Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride. *Analyst* **114** (1989), 525−526.

[40] Yuming H., Zhaohui Ch.: Chemiluminescence of chlorpromazine hydrochloride based in cerium oxidation sensitized by rhodamine 6G. *Talanta* **57** (2002), 953−959.

[41] Wenbing S., Jidong Y., Yuming H.: Ion-pair complex-based solvent extraction combined with chemiluminescence determination of chlorpromazine hydrochloride with luminol in reverse micelles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **36** (2004), 197−203.

[42] Daniela D., Ivano G.R.: Spectroelectrochemical determination of chlorpromazine hydrochloride by flow-injection analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **37** (2005), 281−286.

[43] Aman T., Rashid A., Khokhar I., Iqbal J.: Spectrometric determination of chlorpromazine. *Analytical Letters* **30** (1997), 109−119.

[44] Petit Ch., Murakami K., Erdem A., Kilinc E., Ortiz Borondo G., Liegeois J.F., Kauffmann J.M.: Horse-radish peroxidase immobilized electrode for phenothiazine analysis. *Electroanalysis* **10** (1998), 1241–1248.

[45] Laassis B., Aaron J.J., Mahedero M.C.: Photochemically induced fluorescence determination of biomedically important phenothiazines in aqueous media at different pH values. *Analytica Chimica Acta* **290** (1994), 27–33

[46] 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. *Microchemical Journal* **45** (1992), 129–136

[47] Michalowski J., Kojlo A., Magnuszewska B., Trojanowicz M.: Flow-injection biamperometry of phenothiazine derivatives. *Analytica Chimica Acta* **289** (1994), 339–346.

[48] Ma H., Gao R., Luo J., Yang M.: Determination of phenothiazines drugs by flow injection on-line oxidizing fluorophotometric method. *Fenxi Ceshi Xuebao* **29** (2010), 364–367. *Chemical Abstracts* **155**:193627.

[49] Kojlo A., Michalowski J., Wolyniec E.: Chemiluminescence determination of thioridazine hydrochloride by flow-injection analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **22** (2000), 85–91.

[50] Martinez Calatayud J., Sancho Garcia T.: Fluorometric determination of promethazine hydrochloride by flow-injection analysis (FIA) and oxidation by cerium (IV). *Pharmazie* **47** (1992), 557–558.

[51] Chen D., Rios A., Luque de Castro M.D., Valcarcel, M.: Photochemical-spectrofluorometric determination of phenothiazine compounds by unsegmented-flow methods. *Analyst* **116** (1991), 171–176.

[52] Paduszek B., Kalinowski M.K.: Redox behavior of phenothiazine and phenazine in organic solvents. *Electrochimica Acta* **28** (1983), 639–642.

[53] Nesměrák K., Červený V., Hraníček J., Rychlovksý P.: A spectrofluorimetric determination of phenothiazine derivatives after their photooxidation or chemical or electrochemical oxidation in a flow injection arrangement. *Microchemical Journal* **106** (2013), 226−232.

[54] Townshend, A.: *Encyclopedia of Analytical Science.* London, Academic Press 1995.

[55] Paseková H., Polášek M., Solich P.: Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy* **93** (1999), 354−359.

[56] Lenehan, C.E.; Barnett, N. W; Lewis, S.W.: Sequential injection analysis. *Analyst* **127** (2002), 997–1020.

[57] Guzman, M.; Pollema, C.; Růžička, J.; Christian, G. D.: Sequential injection technique for atomation of complex analytical procedures: Fluorometric assay of factor thirteen. *Talanta* **40** (1993), 81–87.

[58] Idris A.M., Assubaie F.N., Sultan M.S.: Chemometric optimization of a SIA promethazine hydrochloride assay method. *Microchemical Journal* **83** (2006), 7−13.

[59] Naheid S.A., Idris A. M., Elgorashe R.E.F., Altayen M.A.H., Alnajjar A.O., Assubaie F.N.: High Throughput Sequential Injection Assay Method for Chlorpromazine. *Journal of Analytical Chemistry* **68** (2013), 233−240.

[60] Idris A.M., Elgorashe R.E.E.: Sequential Injection Chromatography for Separation and Quantification of Chlorpromazine in Human Urine and Pharmaceutical Formulations. *Journal of AOAC International* **96** (2013), 282−289.

[61] Idris A.M.: Sequential injection chromatography with monolithic column for phenothiazines assay in human urine and pharmaceutical formulations. *Current Pharmaceutical Analysis* **16** (2020), 967−975.

[62] Gómez V., Callao M.P.: Analytical applications of second-order calibration methods. *Analytica Chimica Acta* **627** (2008), 169−183.

[63] Suliman F.E.O., Sultan S.M. Sequential optimization of a flow injection spectrophotometric method for the assay of chlorpromazine in pharmaceutical preparations. *Talanta* **41** (1994), 1865–1871.