

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Spektrofluorimetrické stanovení derivátů fenothiazinu  
v lékových formách po jejich fotooxidaci  
technikou sekvenční injekční analýzy

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Bc. Michal Trejbal

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Rychlovského, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

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

**V Praze dne .....**

.....

**podpis**

Úvodem bych rád poděkoval panu Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za kvalitní vedení, zájem, připomínky a rady, které mi po celou dobu řešení mé diplomové práce poskytoval.

## Seznam zkratk a symbolů:

<b>HPLC</b>	<b>vysokoučinná kapalinová chromatografie</b>
<b>GC</b>	<b>plynová chromatografie</b>
<b>SFA</b>	<b>segmentovaná průtoková analýza</b>
<b>FIA</b>	<b>průtoková injekční analýza</b>
<b>SIA</b>	<b>sekvenční injekční analýza</b>
<b>CFA</b>	<b>kontinuální průtoková analýza</b>
<b>UV - VIS</b>	<b>ultrafialová – viditelná oblast</b>
$\lambda_{\text{ex}}$	<b>excitační vlnová délka</b>
$\lambda_{\text{em}}$	<b>emisní vlnová délka</b>
<b>Obr.</b>	<b>obrázek</b>
<b>Tab.</b>	<b>tabulka</b>
$\mu\text{l}$	<b>mikrolitr</b>
<b>min</b>	<b>minuta</b>
<b>s</b>	<b>sekunda</b>

# Obsah

<b>1</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Průtokové metody .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Sekvenční injekční analýza ( SIA ) .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Využití SIA v praxi.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Deriváty fenothiazinu.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Vlastnosti derivátů fenothiazinu .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Využití derivátů fenothiazinu.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Statistické zpracování výsledků .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Kalibrace .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Bodové odhady.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Mez detekce a mez stanovitelnosti .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Přístrojové vybavení .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Fotoreaktor .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Odstraňovač bublin.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Zapojení aparatury .....</b>	<b>19</b>
<b>3.5</b>	<b>Ovládací software .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6</b>	<b>Použité chemikálie .....</b>	<b>22</b>
<b>3.7</b>	<b>Stanovení chlorpromazinu v tabletě Plegomazinu 25 mg a 100 mg .....</b>	<b>22</b>
<b>3.8</b>	<b>Stanovení diethazinu v tabletě Deparkinu 50 mg.....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Výsledky měření a diskuse .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimalizace SIA spektrofluorimetrického stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Měření emisních a excitačních spekter .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.1.1</b>	<b>Měření emisního fluorescenčního spektra u derivátů fenothiazinu .</b>	<b>24</b>
<b>4.1.1.2</b>	<b>Měření excitačního fluorescenčního spektra u derivátů fenothiazinu .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Sledování tvorby/stabilita radikalkationtu derivátů fenothiazinu .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.2.1</b>	<b>Tvorba/stabilita radikalkationtu chlorpromazinu .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.2.2</b>	<b>Tvorba/stabilita radikalkationtu diethazinu .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Optimalizace průtokových podmínek SIA stanovení .....</b>	<b>31</b>

4.1.3.1	Vliv dávkovaného objemu vzorku .....	31
4.1.3.2	Vliv průtokové rychlosti nosného proudu.....	32
4.1.3.3	Vliv doby ozáření derivátu .....	34
4.1.4	Kalibrační závislost stanovení chlorpromazinu .....	35
4.1.5	Základní charakteristiky SIA stanovení chlorpromazinu .....	37
4.1.5.1	Citlivost stanovení u chlorpromazinu .....	37
4.1.5.2	Mez detekce a mez stanovitelnosti chlorpromazinu.....	37
4.1.5.3	Opakovatelnost stanovení chlorpromazinu .....	37
4.1.6	Kalibrační závislost stanovení diethazinu .....	38
4.1.7	Základní charakteristiky SIA stanovení diethazinu .....	39
4.1.7.1	Citlivost stanovení diethazinu .....	40
4.1.7.2	Mez detekce a mez stanovitelnosti u diethazinu .....	40
4.1.7.3	Opakovatelnost měření u diethazinu.....	40
4.1.8	Stanovení derivátů fenothiazinu v lékových formách.....	41
4.1.8.1	SIA spektrofluorimetrické stanovení chlorpromazinu po jeho fotooxidaci v lékových formách .....	41
4.1.8.2	SIA spektrofluorimetrické stanovení diethazinu po jeho fotooxidaci v lékové formě.....	43
4.2	Kontrolní stanovení derivátů fenothiazinu v lékových formách klasickou UV/VIS spektrometrii .....	45
4.2.1	Stanovení chlorpromazinu v lékových formách Plegomazinu pomocí UV/VIS spektrometrie .....	45
4.2.2	Stanovení diethazinu v lékové formě Deparkinu pomocí UV/VIS spektrometrie.....	47
5	Závěr.....	49
6	Literatura .....	50

# 1 Cíl práce

Cílem mé diplomové práce bylo navázat na svoji bakalářskou práci a použít mnou navrženou a sestavenou aparaturu pro sekvenční injekční analýzu (SIA) pro praktická stanovení obsahu účinné látky v lékových formách. Konkrétními cíly bylo: 1) Nalézt optimální podmínky pro SIA spektrofluorimetrické stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci. 2) Zjistit základní charakteristiky tohoto stanovení (citlivost, mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost). 3) Analyzovat účinnou látku (chlorpromazin a diethazin) v lékových formách (Plegomazin a Deparkin) touto navrženou metodou. 4) Provést kontrolní stanovení doporučenou spektrofotometrickou metodou v UV oblasti.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Průtokové metody

Průtokové metody v dnešní době nacházejí v analytické chemii stále větší zastoupení a především využití. Hlavní výhodou těchto technik oproti normálnímu manuálnímu procesu je snadnější automatizace. Z toho plyne, že lze analyzovat velký počet vzorků za časovou jednotku. Ve srovnání s jinými automatizovanými procesy je v průtokových metodách možno pracovat přímo s původními vzorky a upravovat je až v systému. K dalším výhodám patří minimalizace spotřeby všech činidel, vysoká produktivita analýz, eliminace kontaktu pracovníka s toxickými látkami (např. rozpouštědla). Nevýhodou klasických průtokových metod (SFA, FIA) je menší flexibilita.

Jako první našla v praxi uplatnění segmentovaná průtoková analýza (SFA), z níž se postupně vyvinuly metody průtokové (FIA) a sekvenční (SIA) injekční analýzy.

V analytické chemii se průtokové metody obecně rozdělují do dvou hlavních skupin:

#### **Chromatografické metody:**

- Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)
- Kapalinová chromatografie (LC).

#### **Průtokové metody analýzy:**

- Kontinuální průtoková analýza (CFA)
- Sekvenční průtoková analýza (SFA)
- Průtoková injekční analýza (FIA)
- Sekvenční injekční analýza (SIA)

Průtokové metody se uplatňují například při kontrole čistoty složek životního prostředí, v lékařství a farmacii.



## 2.1.1 Sekvenční injekční analýza (SIA)

Sekvenční injekční analýza je průtoková metoda, která byla vyvinutá zdokonalením průtokové injekční analýzy (FIA – Flow Injection Analysis)<sup>1</sup>, která opět umožňuje automatizaci často složitých postupů sériových analýz velkého počtu vzorků. První zmínky o metodě SIA pocházejí z 90.let, kde u zrodu SIA metody stál kolektiv analytiků v čele s J. Růžičkou<sup>2</sup>.

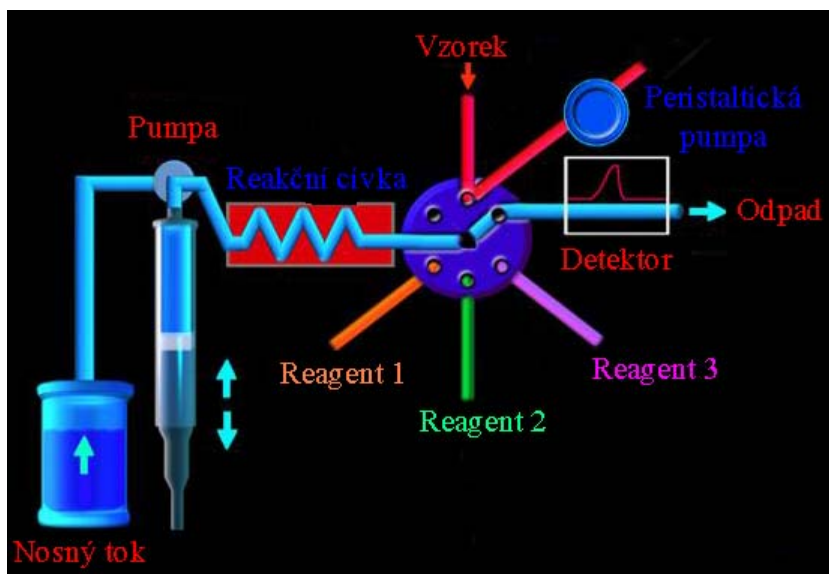
Významné rozdíly mezi technikou sekvenční injekční analýzy (SIA) a průtokové injekční analýzy (FIA) spočívá v geometrii nosného toku, kdy metoda FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco metoda SIA využívá změnu přímého a zpětného toku. Tím je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na produkt. U SIA techniky je možné provést změny dávkovaného objemu vzorku od jednotek až po stovky  $\mu\text{l}$  programováním doby otevření kanálu selekčního ventilu a tím optimalizovat disperzi zóny vzorku a citlivost stanovení. Doba trvání jednoho měřicího cyklu se pohybuje okolo 30 s; průtoková rychlost je přibližně 1 ml/min.

Systém SIA pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. K získání reprodukovatelného koncentračního gradientu produktu dospějeme přesnou synchronizací a opakovatelností jednotlivých programových kroků. Z toho vyplývá, že součástí SIA systému musí být i mikroprocesor s příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data.

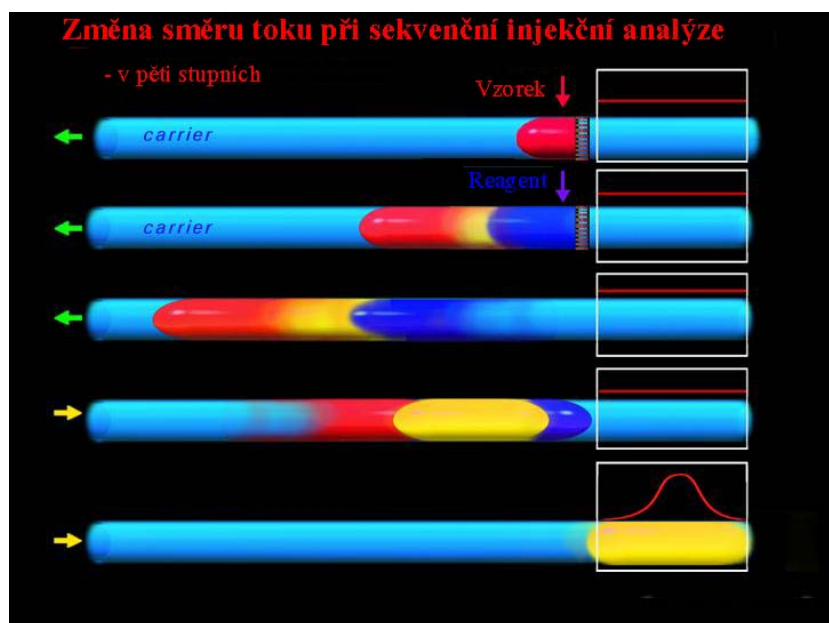
Hlavními charakteristickými rysy techniky SIA jsou oddělené měřicí cykly. Zóny činidla, nosného toku a vzorku jsou postupně dávkovány do jednobanového systému s použitím vícecestného (často 6, 8 či 10 - cestného) selekčního ventilu a pístového čerpadla (Obr.1). Pomocí selekčního ventilu jsou řazeny zóny činidel a vzorku v mísící cívce. Pohyb toku je dále pomocí čerpadla obrácen a tím dojde k dokonalému promísení zón za vzniku reakčního produktu, který je dále detekován. V SIA se používají detektory fluorescenční, UV/VIS spektrometrické nebo elektrochemické. Získaný signál má tvar píku (Obr. 2).

Výhodou SIA techniky je jednobanové uspořádání s jedním ventilem a jedním čerpadlem. Při zastaveném toku je možno provádět i kinetická měření. Protože SIA využívá zastavení a změnu směru toku, jsou spotřeby vzorku a hlavně činidel podstatně nižší než u FIA, kde je čerpání kontinuální. Velkou výhodou této techniky je její flexibilita, daná snadnou

změnou parametrů měření pomocí klávesnice počítače bez změny konfigurace SIA systému. Nevýhodou SIA oproti FIA je nižší frekvence dávkování vzorku<sup>3</sup>.



**Obr. 1:** Schématické uspořádání sekvenční injekční analýzy



**Obr. 2:** Sekvenční injekční analýzu – Promíchání zón a detekce

## 2.1.2 Využití SIA v praxi

SIA se v praxi uplatňuje při analýze mnohých organických látek včetně léčiv i při analýze anorganických iontů.

Z anorganických iontů byly touto technikou např. ve vodě stanoveny ionty vápenaté ( $\text{Ca}^{2+}$ ) souběžně s hořečnatými ( $\text{Mg}^{2+}$ )<sup>4</sup>; s využitím tvorby barevných komplexů se spektrofotometrickou detekcí pak ionty ( $\text{Ni}^{2+}$ )<sup>5</sup>; dále byly stanoveny ionty železité ( $\text{Fe}^{3+}$ )<sup>6,7</sup> a ionty zinečnaté ( $\text{Zn}^{2+}$ )<sup>8</sup>.

Z aniontů byly současně stanoveny chloridy a fluoridy<sup>9,10</sup>; dusitany s dusičnany se spektrofotometrickou detekcí<sup>11</sup> a sírany pomocí srážecí reakce s barnatými ionty<sup>12</sup>. Fosfáty byly analyzovány samostatně<sup>13</sup> nebo současně s křemičitany<sup>14</sup>. Dále je možno např. stanovit sulfoamidy<sup>15</sup>. Technikou SIA lze též stanovit i stopová množství těžkých kovů v různých mocenstvích (vanadu<sup>16</sup>, molybdenu<sup>17</sup> a chromu<sup>18</sup>). Kadmium, měď, rtuť, indium, olovo, cín a thalium byly analyzovány metodou SIA za pomoci elektrochemické detekce.

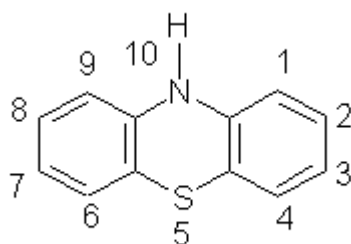
Hlavní aplikace SIA techniky jsou však ve farmaceutické analýze, kde se např. používá pro stanovení warfarinu<sup>19</sup>, diclofenalu<sup>19</sup>, lisinoprilu<sup>19</sup>, thiaminu<sup>19</sup> v léčebných přípravcích za pomoci spektrofluorimetrické detekce.

## 2.2 Deriváty fenothiazinu

Důležitější vlastností derivátů fenothiazinu je jejich antidepresní aktivita<sup>20</sup>. Ve farmakologii jsou důležitou skupinou neuroleptických a antialergických léčiv. Dnes nacházejí uplatnění především ve veterinární praxi.

### 2.2.1 Vlastnosti derivátů fenothiazinu

Fenothiazin je z chemického hlediska heterocyklická sloučenina obsahující dusík a síru.



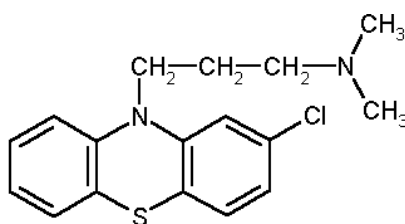
**Obr. 3:** Molekula fenothiazinu

Často využívané deriváty jsou substituovány v poloze 10 (antihistaminika a antiparkinsonika) nebo v polohách 2 a 10 (neuroleptika)<sup>21</sup>.

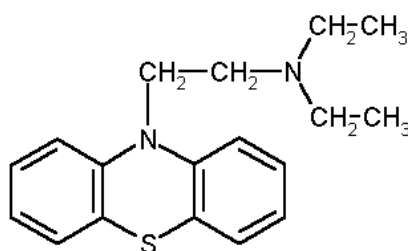
Některé z těchto derivátů fenothiazinu jsou využívány jako redox indikátory, podobně jako deriváty substituované v polohách 3 a 7. V mé diplomové práci byly použity deriváty uvedené v tabulce 1.

**Tab. 1:** Použité deriváty fenothiazinu

Název	R <sub>2</sub>	R <sub>10</sub>
Chlorpromazin	-Cl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Diethazin	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>



**Obr. 4:** Molekula chlorpromazinu



**Obr. 5:** Molekula diethazinu

Substituenty navázané v poloze 10 mají záporný indukční efekt. Je to způsobeno vlivem atomu dusíku aminoskupiny nebo heterocyklu připojeného na alkyly. Tento efekt s rostoucí délkou alkylového řetězce mezi dusíkem aminoskupiny a dusíkem fenothiazinového jádra klesá. Substituenty navázanými v poloze 2 jsou nejčastěji skupiny -Cl, -OCH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>. Ty mají zpravidla záporný indukční efekt a kladný i záporný mezomerní efekt.

### 1) Fyzikální a chemické vlastnosti

Fenothiazinové deriváty vytváří báze (žluté olejovité roztoky), které jsou ve vodě nerozpustné. Proto se připravují ve formě hydrochloridů nebo maleátů. Ty se dobře rozpouštějí ve vodě, ve zředěné kyselině chlorovodíkové a v některých organických rozpouštědél. Tato vlastnost závisí na typu substituentů<sup>21</sup>.

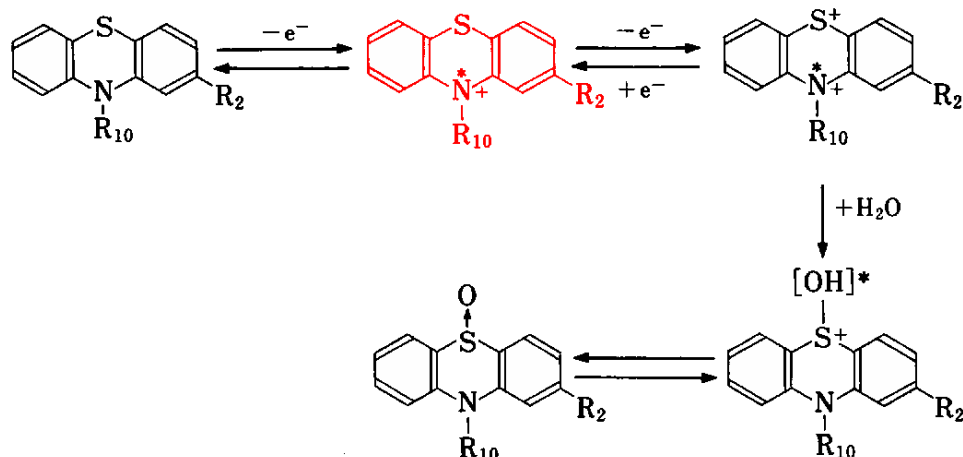
### 2) Spektrální vlastnosti

Spektrální vlastnosti jsou podobné pro všechny deriváty fenothiazinu. V absorpčních spektrech se vyskytují dva hlavní pásy v oblastech vlnových délek 220-275nm a 295-320nm.

U derivátů fenothiazinu lze po ozáření UV světlem pozorovat fluorescenci. Tato jejich vlastnost byla hlavním důvodem již řady sledování, zejména v souvislosti s chemickou strukturou, oxidačními stavy, pH a teplotou a byla již využita v chemické analýze<sup>21</sup>.

### 3) Redoxní vlastnosti

Významnou chemickou vlastností fenothiazinových derivátů je jejich schopnost se oxidovat řadou oxidačních činidel např. [Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, KBrO<sub>3</sub>, KIO<sub>3</sub>, KIO<sub>4</sub>, NaNO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aj.] nebo vlivem UV záření. Oxidační reakce fenothiazinových derivátů jsou znázorněny na (Obr. 6). Během prvního kroku jsou deriváty fenothiazinu reverzibilně oxidovány za vzniku barevného radikalkationtu, stabilního v silně kyselém prostředí. Radikalkation je v druhém kroku ireverzibilně oxidován na bezbarvý sulfoxid<sup>21</sup>.



Obr. 6: Schéma oxidačního procesu derivátů fenothiazinu

## 2.2.2 Využití derivátů fenothiazinu

Hlavní zájem je soustředěn na výzkum farmakologické účinnosti, neboť některé z těchto látek jsou významnými psychofarmaky<sup>22</sup>. Fenothiazin je základní látka řady fenothiazinových derivátů. Patří mezi nejstarší známé pesticidy používané od roku 1935. Dnes je používán ve veterinární praxi<sup>22</sup>. Výzkumem bylo zjištěno, že farmakologicky významné jsou fenothiazinové deriváty, substituované v poloze 2 a 10, které jsou používány také v anesteziologii a dermatologii. V dermatologii mají fenothiazinové deriváty i fotochemoterapeutické schopnosti proti rakovinovým nádorům a mohou sloužit i jako insekticidy<sup>23,24</sup>.

### ➤ Chlorid chlorpromazina<sup>25,26</sup>

Chlorid chlorpromazina, systematicky [3-(2-chlor-10-fenothiazinyl)propyl]dimethylamoniumchlorid,  $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ ,  $M_r = 355,32 \text{ g mol}^{-1}$ , je bílý krystalický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě a v lihu 95 %. Na světle a vzduchu nestálý.

Má charakteristické adrenolytické, anticholinergické, hypotenzivní, spasmolytické, hypotermické, anestetické, antiemetické a antihistaminické vlastnosti. Na centrální nervový systém působí silně tlumivě, silně potencuje účinek hypnotik i narkotik. Má i vedlejší nežádoucí účinky (např. potenciální hepatotoxicita), které byly kromě jiných důvodů příčinou

dalšího rozsáhlého výzkumu v oblasti derivátů fenothiazinu. Používá se především v psychiatrii k terapii schizofrenie, stavů psychomotorického neklidu, halucinací i některých úzkostných a obsedantních neuros. Je dále indikován jako sedativum vegetativního nervstva a centrálního nervového systému v neurologii, vnitřním lékařství, pediatrii, dermatologii i v chirurgii.

➤ Chlorid diethazinia<sup>25,26</sup>

Chlorid diethazinia, systematicky [2-(10-fenothiazinyl)ethyl]diethylamoniumchlorid,  $C_{18}H_{23}ClN_2S \cdot HCl$ ,  $M_r = 334,91 \text{ g mol}^{-1}$ , je bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, lihu 95 % a v chloroformu. Na světle nestálý.

Jedná se o fenothiazinový derivát se silným parasymptolytickým účinkem. Má i nepřilíš silné sedativní, antiadrenergní, antihistaminové a hypotermické účinky. Používá se u všech typů parkinsonského syndromu, a to především tam, kde je silně vyznačen třes.

## 2.3 Statistické zpracování výsledků

### 2.3.1 Kalibrace

U kalibrace se využívá empirického postupu, kdy dochází ke zjištění závislosti mezi měřenou veličinou a požadovanou informací. Obvykle se uplatňuje v instrumentální analýze, kdy se z intenzity měřeného signálu hledá odpovídající obsah stanovované složky (analytu).

Zároveň by mělo docházet k odstranění chyby, která byla způsobena případnou nedokonalostí průběhu jednotlivých operací předcházejících vlastnímu měření, a to tak, aby se při tom příliš nezvětšila náhodná složka chyby. Kalibrace je po každé prováděna pomocí standardů se známým obsahem analytu nebo pomocí referenčních materiálů se známým celkovým složením.

## 2.3.2 Bodové odhady

K vyhodnocení dat byly použity<sup>27</sup>:

### Aritmetický průměr:

Ze série  $n$  měření získáme výsledky  $x_1 - x_n$ . Aritmetický průměr je nejlepším vyjádřením výsledku série paralelních stanovení. Určuje se jako součet všech výsledků série paralelních stanovení, dělený počtem měření  $n$ .

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

### Směrodatná odchylka:

Nejlepší mírou přesnosti série paralelních stanovení je odhad směrodatné odchylky. Určuje se jako odmocnina čtverců odchylek děleného počtem měření zmenšených o jednotku ( $n-1$ ).

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

### Relativní směrodatná odchylka:

Nejlepší relativní mírou přesnosti série paralelních stanovení je relativní směrodatná odchylka, daná poměrem odhadu směrodatné odchylky a průměru, která se někdy udává v procentech.

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}$$

## 2.3.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce je nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou můžeme danou analytickou metodou detekovat. Podle definice IUPAC je mez detekce koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky ( $3\sigma$ ) signálu nulového vzorku<sup>28</sup>.



Mez stanovitelnosti je nejmenší množství látky ve vzorku, které je možno danou analytickou metodou ještě s určitou přesností stanovit. Podle definice IUPAC je mez stanovitelnosti koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný desetinásobku směrodatné odchylky ( $10\sigma$ ) signálu nulového vzorku<sup>28</sup>.

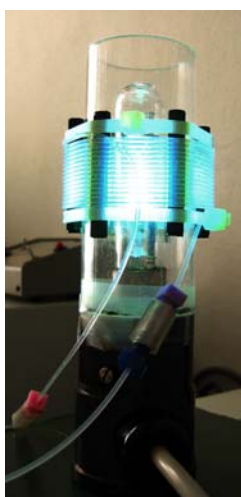
## 3 Experimentální část

### 3.1 Přístrojové vybavení

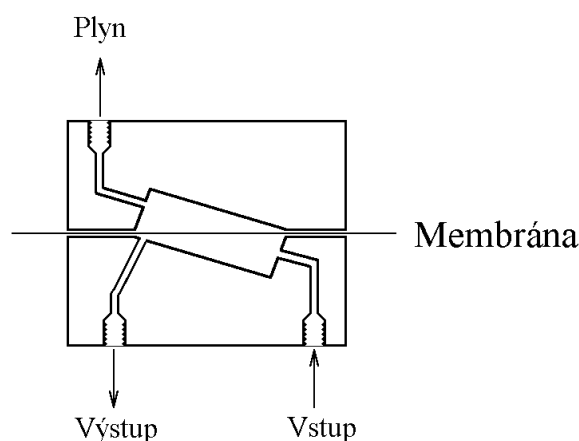
- Spektrofluorimetrický detektor Hitachi F-1050 (Tokyo, Japan) jako detektor, vybavený průtokovou křemennou kyvetou o objemu 10  $\mu$ l
- Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 (Aminco, USA)
- UV/VIS spektrofotometr PU 8800 (Pye-Unicam, GB)
- Programovatelné pístové čerpadlo 74901-05 Cole-Parmer (Cole-Parmer, USA)
- Osmicestný selekční ventil Vici-Valco C25-3188 EMH (Valco, USA)
- Třicestný přepínací ventil Cole-Parmer (Cole-Parmer, USA)
- Fotoreaktor vlastní výroby
- Teflonové spojovací kapiláry o vnitřním průměru 0,5 mm (Supelco, USA) příslušných délek

### 3.2 Fotoreaktor

Fotoreaktor (Obr. 7) byl tvořen teflonovou kapilárou (Supelco, USA) vnitřního průměru 0,5 mm a délky 3 m (vnitřní objem 570  $\mu$ l), která je šroubovicovitě obtočena kolem střednětlaké, 35W rtuťové výbojky (emisní čáry v intervalu 253 nm – 580 nm). Kapilára je udržována v konstantní vzdálenosti od výbojky pomocí křemenné trubice, připevněné na výbojce a pomocí plastových distančních sloupků.



Obr. 7: Fotoreaktor (nezakrytý)



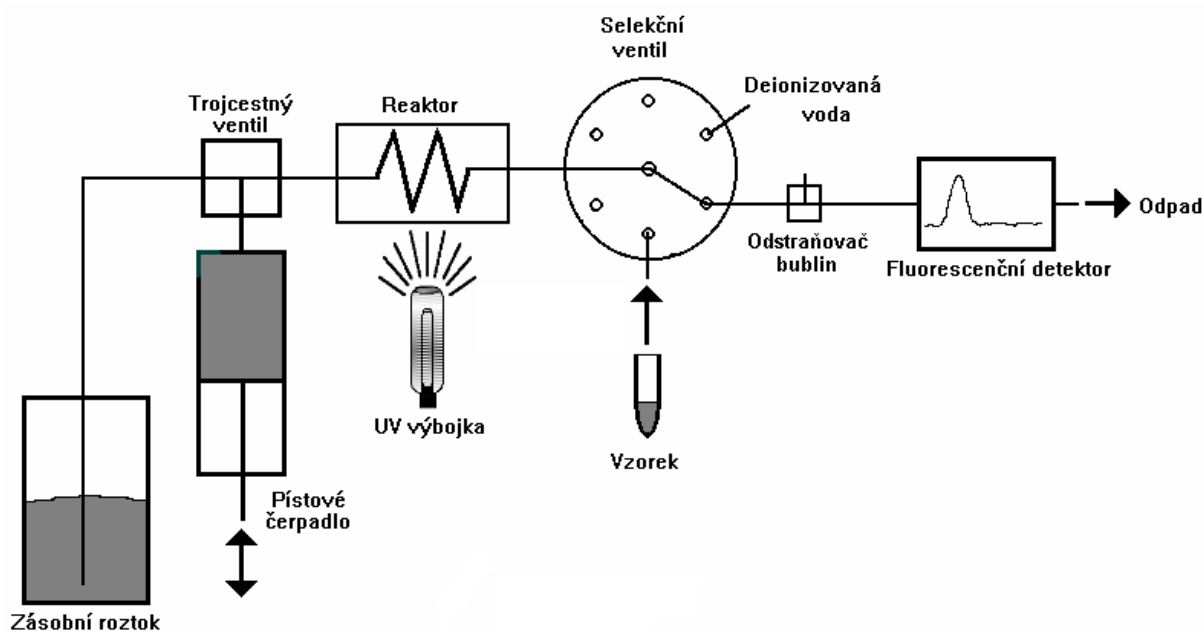
Obr. 8: Odstraňovač bublin (vnitřní prostory zvětšeny)

### 3.3 Odstraňovač bublin

Odstraňovač bublin (Obr. 8) vlastní konstrukce vychází z konstrukce membránových separátorů fází, používaných při extrakčních průtokových stanoveních (vnitřní objem 100  $\mu\text{l}$ ). Je tvořen dvěma kusy teflonového bloku navzájem spojených přes teflonovou membrámu.

### 3.4 Zapojení aparatury

Pro spektrofotometrické stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci byla sestavena klasická aparatura pro sekvenční injekční analýzu (Obr. 9), kterou jsem navrhl a sestavil během své bakalářské práce, a která se skládá z pístového čerpadla, selekčního a přepínacího ventilu, detektoru, reaktoru s reakční cívkou, odstraňovače bublin, spojovacích kapilár a řídicího počítače.



Obr. 9: Aparatura pro sekvenční injekční analýzu

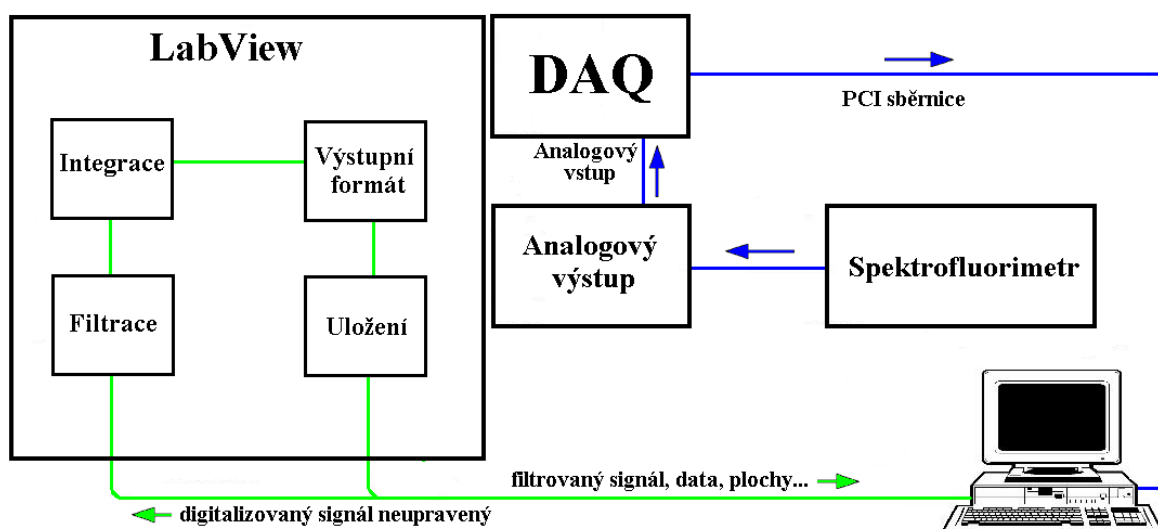
Ve fotoreaktoru s reakční cívkou dochází k fotooxidaci příslušného derivátu na radikalkation. Reakční cívka slouží zároveň jako pojistka, aby nedošlo k vniknutí vzorku a činidla do pístového čerpadla. U pístového čerpadla lze definovat čerpaný objem pomocí doby čerpání při konstantní rychlosti pohybu pístu ve vestavěné injekční stříkačce. Selekční ventil obecně umožňuje seřazení jednotlivých zón v mísící cívce, zajišťuje nadávkování všech

činidel a pomocných roztoků. Po obrácení toku i transport zón do detektoru.

### 3.5 Ovládací software

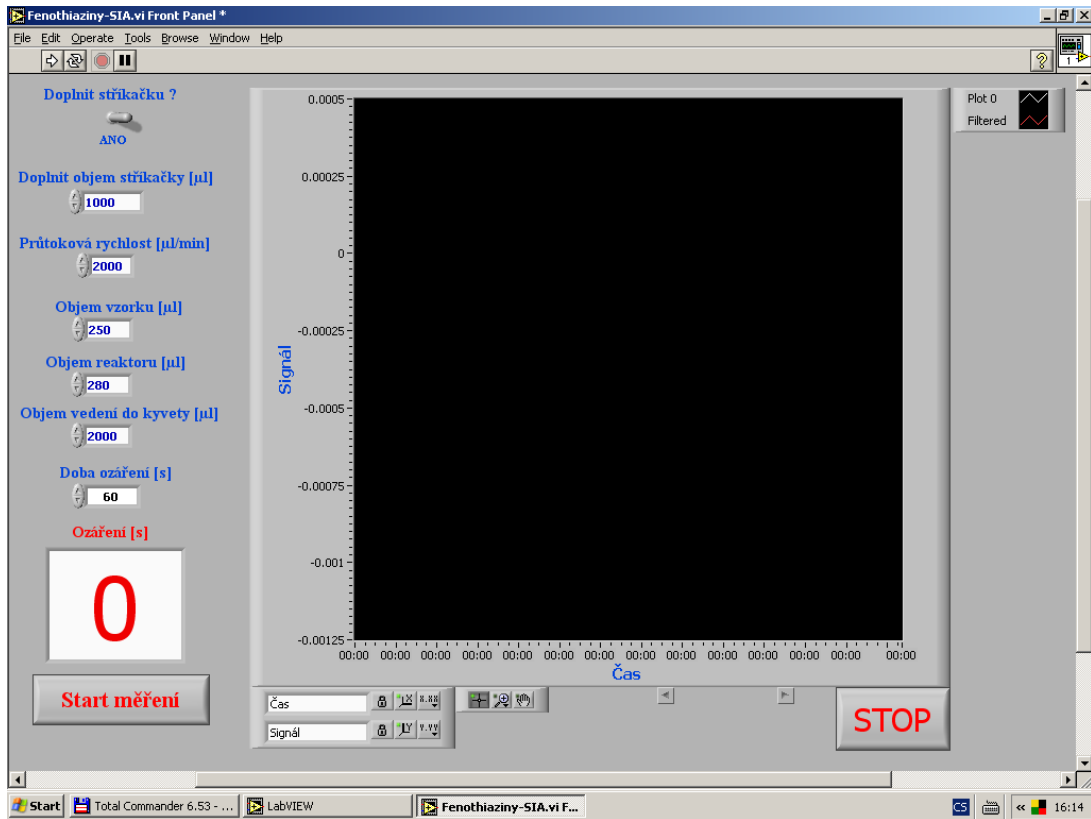
Metoda sekvenční injekční analýzy předpokládá přesné a opakovatelné dávkování objemů vzorků, transport reakční směsi do detektoru a propláchnutí aparatury. Tento postup se skládá z řady dílčích úkonů, které je nutné z důvodu reprodukovatelnosti provádět stále stejně. Proto je nutné použít pro řízení sekvence jednotlivých operací počítač.

Pro řízení aparatury byl v rámci bakalářské práce navržen a vytvořen program v grafickém programovacím prostředí LabView 7.1.(National Instruments, USA). Tento software umožňuje řízení peristaltické pumpy, selekčního ventilu, pomocného ventilu i řízení vlastní analýzy a sběr a zpracování dat ze spektrofluorimetrického detektoru (Obr. 10).

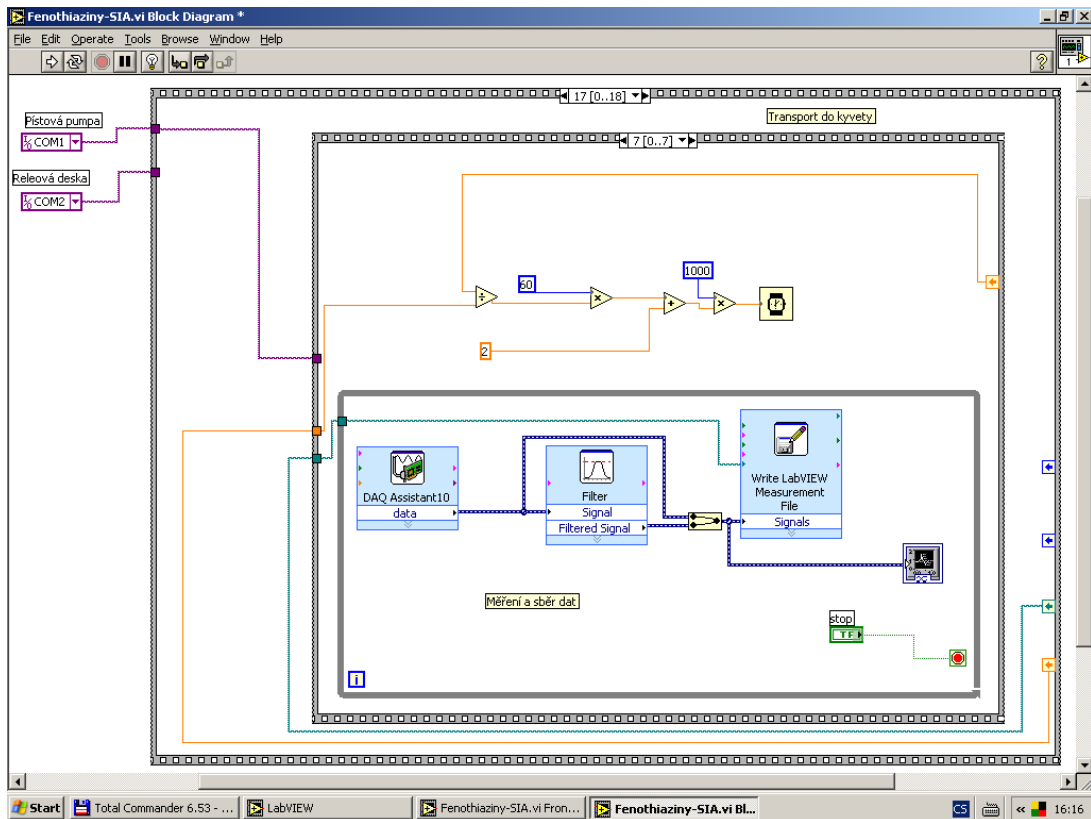


**Obr. 10:** Schéma zpracování výstupních dat ze spektrofluorimetru řídicím programem

Na (Obr. 11, Obr. 12) je pro ilustraci uveden kontrolní panel virtuálního přístroje pro sekvenční injekční analýzu se spektrofluorimetrickou detekcí a výšek z odpovídajícího blokového schématu.



Obr. 11: Kontrolní panel virtuálního přístroje pro sekvenční injekční analýzu



Obr. 12: Výsek z odpovídajícího blokového schématu

### 3.6 Použité chemikálie

- Chlorpromazin hydrochlorid: Základní roztok o koncentraci  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,1777 g chlorpromazin hydrochloridu (LPC Chemical Dyes, GB;  $M_r = 355,47$ ) v deionizované vodě a doplněním na objem 100 ml. Roztok byl skladován v chladu a chráněn před světlem.
- Diethazin hydrochlorid: Základní roztok o koncentraci  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,0746 g diethazin hydrochloridu (LPC Chemical Dyes, GB;  $M_r = 334,91$ ) v deionizované vodě a doplněním na objem 50 ml. Roztok byl skladován v chladu a chráněn před světlem.
- Kyselina chlorovodíková 37 % (Merck, SRN)
- Deionizovaná voda byla připravena přístrojem Milli Q<sup>plus</sup> firmy Millipore (USA).
- Lékové formy: Plegomazin (Egis Pharmaceuticals; Budapest; Hungary)
  - Červené tablety: 25 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě
  - Žluté tablety: 100 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě
- Lékové formy: Deparkin (Lečiva; Praha)
  - Žluté tablety: 50 mg diethazin hydrochlorid v 1 tabletě

### 3.7 Stanovení chlorpromazinu v tabletě Plegomazin 25 mg a 100 mg

Obsah chlorpromazinu byl stanoven v tabletě Plegomazin (25 mg nebo 100 mg chlorpromazinu v tabletě). Nejprve byly zváženy čtyři tablety Plegomazinu (25 mg/tableta nebo 100 mg/tableta) a z jejich hmotnosti byla vypočtena průměrná hmotnost jedné tablety. Poté byly ve třecí misce rozetřeny tyto 4 tablety na jemný prášek. Navážené množství, s kterým bylo dále pracováno, odpovídalo vždy průměrné hmotnosti jedné tablety. Dané množství rozetřeného léku bylo rozpouštěno v 20 ml deionizované vody. Nerozpuštěný podíl byl odfiltrován přes vatou. Supernatant byl doplněn v 50 ml odměrné baňce destilovanou vodou. Připravený roztok byl skladován v chladu a tmě.

Z tohoto zásobního roztoku byl připraven roztok o teoretické koncentraci  $2 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>, který byl následně analyzován.

### **3.8 Stanovení diethazinu v tabletě Deparkinu 50 mg**

Obsah diethazinu byl stanoven v tabletě Deparkin (50 mg diethazinu v tabletě). Nejprve byly zváženy dvě tablety Deparkinu (50 mg/tableta) a z jejich hmotnosti byla vypočtena průměrná hmotnost jedné tablety. Poté byly ve třetí misce rozetřeny tyto 2 tablety na jemný prášek. Navážené množství, s kterým bylo dále pracováno, odpovídalo vždy průměrné hmotnosti jedné tablety. Dané množství rozetřeného léku bylo rozpouštěno v 20 ml deionizované vody. Nerozpouštěný podíl byl odfiltrován přes vat. Supernatant byl doplněn v 50 ml odměrné baňce destilovanou vodou. Připravený roztok byl skladován v chladu a tmě.

Z tohoto zásobního roztoku byl připraven roztok o teoretické koncentraci  $2 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>, který byl následně analyzován.

## **4 Výsledky měření a diskuse**

Jak bylo již řečeno, tato diplomová práce přímo navazuje na moji bakalářskou práci, v jejímž rámci jsem navrhl a postavil SIA aparaturu pro spektrofluorimetrické stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci. V rámci bakalářské práce jsem také vytvořil ovládací software k této aparatuře. V rámci diplomové práce bylo pak prvním úkolem nalézt optimální podmínky pro stanovení dvou vybraných derivátů fenothiazinu touto technikou na dané aparatuře.

Jako kritérium pro hodnocení optimalizačních experimentů byla zvolena dosažená odezva fluorimetrického detektoru (výška SIA píku). Všechny optimalizační experimenty byly vždy třikrát opakovány a do grafických závislostí byly vynášeny průměrné hodnoty z těchto experimentů.

### **4.1 Optimalizace SIA spektrofluorimetrického stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci**

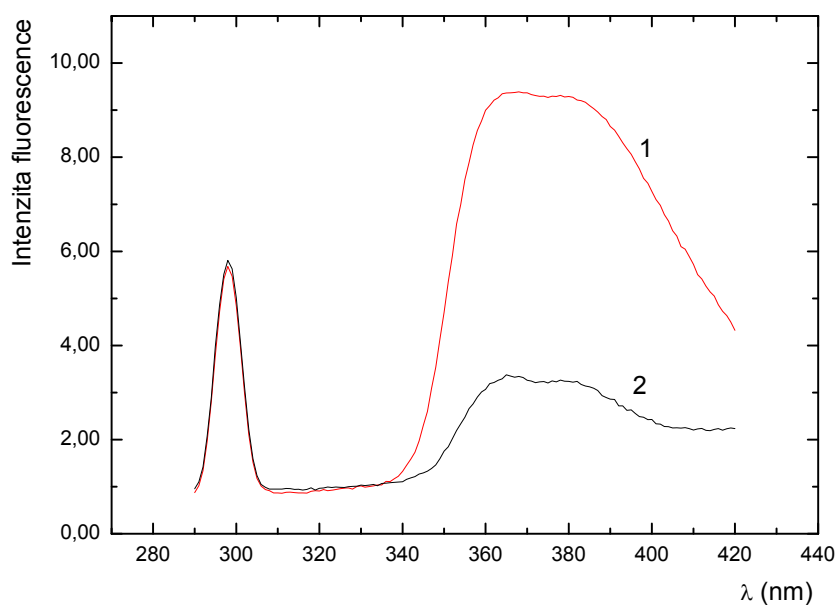
Jak již bylo řečeno v úvodu, stanovení derivátů fenothiazinu je v tomto případě založeno na jejich oxidaci UV zářením, které je emitováno střednětlakou rtuťovou výbojkou, na příslušný radikalkation, který poskytuje výraznou fluorescenci.

#### **4.1.1 Měření emisních a excitačních spekter**

##### **4.1.1.1 Měření emisního fluorescenčního spektra derivátů fenothiazinu**

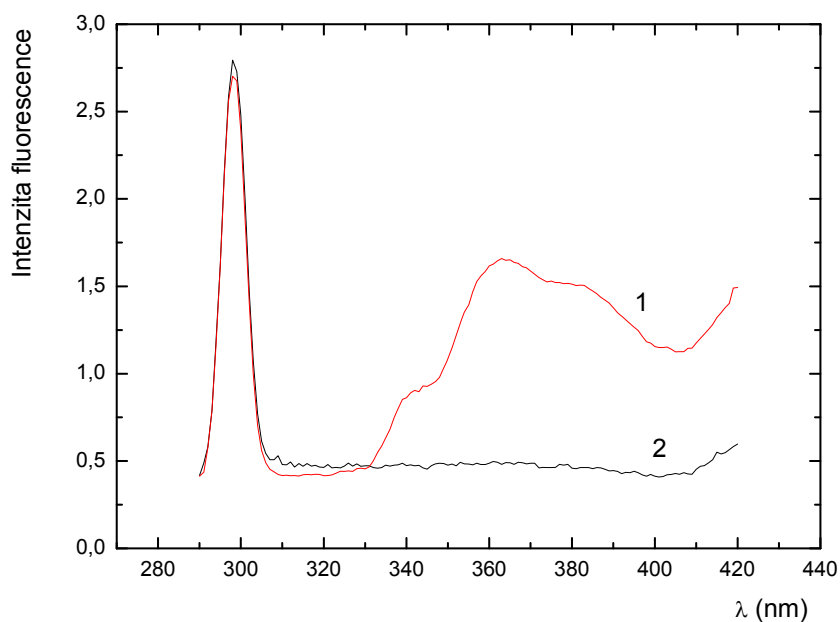
Proměření emisního fluorescenčního spektra obou derivátů fenothiazinu (chlorpromazin a diethazin) bylo provedeno na spektrofluorimetru AMINCO. Nejdříve byl proměřen připravený roztok derivátu; ten byl následně 10 minut ozařován ve fotoreaktoru a opět proměřen.





**Obr. 13:** Měření emisního spektra diethazinu

$c_{\text{diethazinu}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$ ; **1**- po 10 min. osvětlení; **2** - před osvětlením



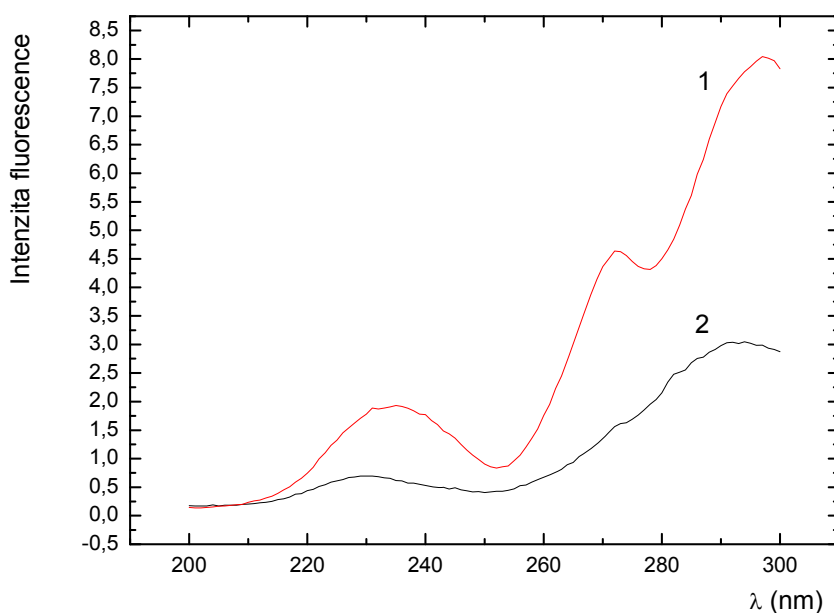
**Obr. 14:** Měření emisního spektra chlorpromazinu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$ ; **1**- po 10 min. osvětlení; **2** - před osvětlením

Na základě změřených emisních spekter (Obr. 13, Obr. 14) je vidět, že nejlepší je zvolit emisní vlnovou délku  $\lambda_{em} = 360$  nm. Pro pozdější experimenty však na spektrofluorimetrickém detektoru Hitachi byla nakonec nastavena emisní vlnová délka  $\lambda_{em} = 350$  nm. Při této vlnové délce byla na daném detektoru získána nejvyšší odezva.

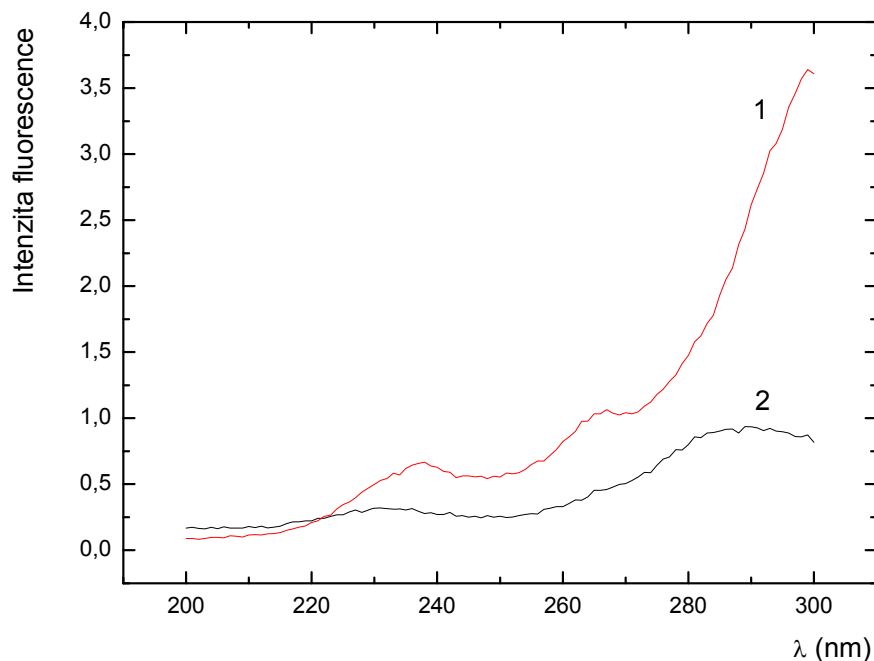
#### 4.1.1.2 Měření excitačního fluorescenčního spektra u derivátů fenothiazinu

Proměření excitačního fluorescenčního spektra obou derivátů fenothiazinu (chlorpromazin a diethazin) bylo opět provedeno na spektrofluorimetru AMINCO. Nejdříve byl proměřen připravený roztok derivátu; ten byl následně 10 minut ozařován ve fotoreaktoru a opět proměřen.



**Obr. 15:** Měření excitačního spektra diethazinu

$c_{diethazinu} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$ ; **1** - po 10 min. osvícení; **2** - před osvícením



**Obr. 16:** Měření excitačního spektra chlorpromazinu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$ ; **1**- po 10 min. osvětlení; **2** - před osvětlením

Na základě změřených excitačních spekter (Obr. 15, Obr. 16) je vidět, že nejlepší je zvolit excitační vlnovou délku  $\lambda_{ex} = 270 \text{ nm}$ .

#### 4.1.2 Sledování tvorby/stability radikálního derivátů fenothiazinu

Je obecně známo, že radikální kationt derivátu fenothiazinu je stabilní v kyselém prostředí. Proto v rámci optimalizačních měření byla nejdříve sledován vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové na tvorbu radikálního kationtu. Toto optimalizační měření bylo již prováděno na SIA aparatuře se spektrofluorimetickým detektorem.

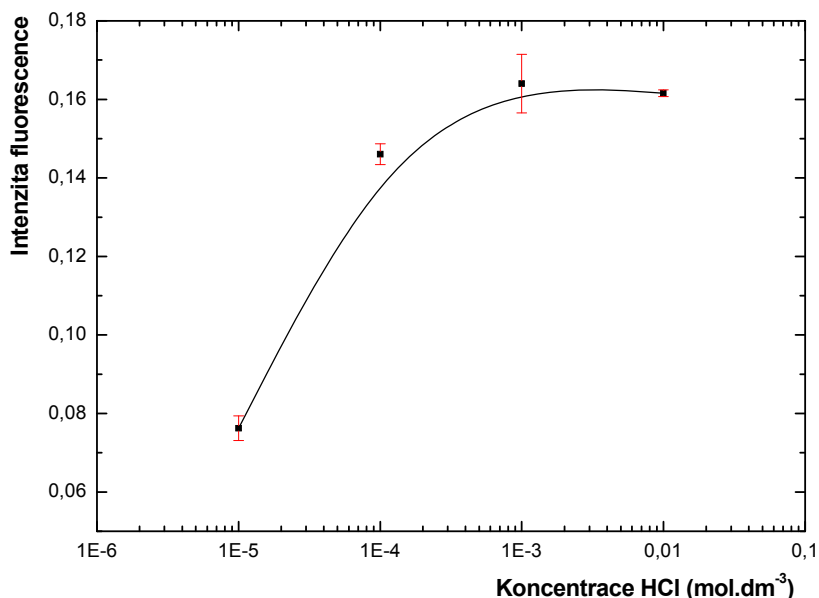
### 4.1.2.1 Tvorba/stabilita radikalkationtu chlorpromazinu

Tvorba/stabilita radikalkationtu chlorpromazinu po fotooxidaci derivátu v prostředí různé koncentrace HCl byla sledována na aparatuře zapojené podle obr.9. Experimenty byly prováděny s roztokem chlorpromazinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Excitační vlnová délka byla  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$  a emisní vlnová délka  $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ . Koncentrační rozsah použité kyseliny chlorovodíkové byl  $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Při sledování tvorby/stability radikalkationtu chlorpromazinu byly nastaveny následující optimální hodnoty na ovládacím panelu řídicího software aparatury (Tab 2).

**Tab. 2:** *Nastavené parametry SIA aparatury pro sledování vlivu HCl na tvorbu a stabilitu radikalkationtu chlorpromazinu*

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	1250 $\mu\text{l}$
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	250 $\mu\text{l}$
Objem reaktoru	1000 $\mu\text{l}$
Objem vedení do kyvety	2000 $\mu\text{l}$
Doba ozáření	60 s



**Obr. 17:** Vliv koncentrace HCl v roztoku chlorpromazinuHCl na intenzitu fluorescence radikalkationtu (doba ozáření 60s)

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ;  $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \text{ ml.min}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$

Z (Obr. 17) je patrné, že nejvyšší intenzita fluorescence je pozorována v roztoku chlorpromazinu v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ . Proto pro další experimenty byly používány roztoky chlorpromazinu v této koncentraci HCl.

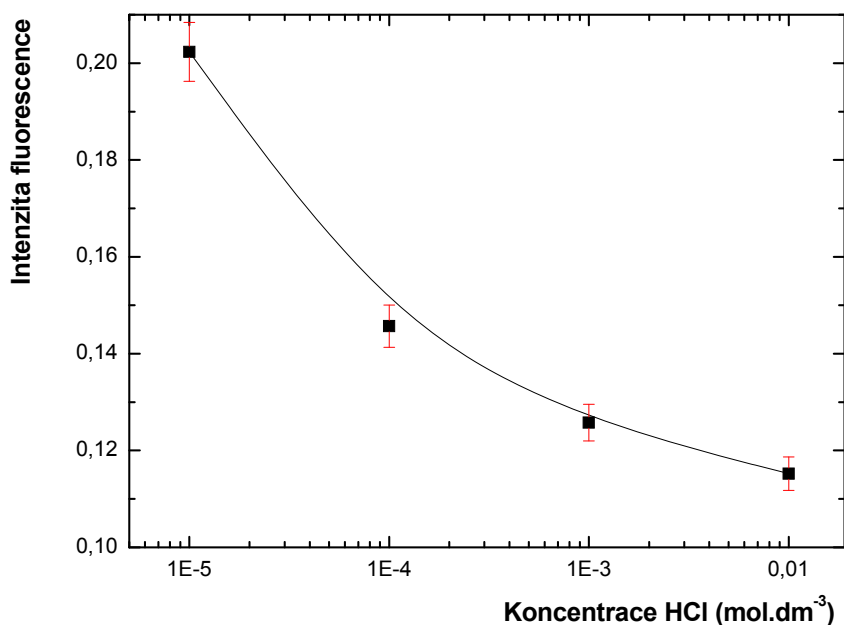
#### 4.1.2.2 Tvorba/stabilita radikalkationtu diethazinu

Tvorba/stabilita radikalkationtu diethazinu po fotooxidaci derivátu v prostředí různé koncentrace HCl byla opět sledována na aparatuře zapojené podle obr.9. Experimenty byly prováděny s roztokem diethazinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ . Excitační vlnová délka byla opět  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$  a emisní vlnová délka  $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ . Koncentrační rozsah použité kyseliny chlorovodíkové byl opět v rozmezí  $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$ .

Při sledování tvorby/stability radikalkationtu diethazinu byly nastaveny následující optimální hodnoty na ovládacím panelu řídicího software aparatury (Tab. 3).

**Tab. 3:** Nastavené parametry SIA aparatury pro sledování vlivu HCl na tvorbu a stabilitu radikalkationtu diethazinu

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	1250 $\mu\text{l}$
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	250 $\mu\text{l}$
Objem reaktoru	1000 $\mu\text{l}$
Objem vedení do kyvety	2000 $\mu\text{l}$
Doba ozáření	60 s



**Obr. 18:** Vliv koncentrace HCl v roztoku diethazinu HCl na intenzitu fluorescence radikalkationtu (doba ozáření 60s)

$$c_{\text{diethazinu}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}; V_{\text{diethazinu}} = 250 \mu\text{l}; v_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}; \lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}; \lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$$

Z (Obr. 18) je patrné, že nejvyšší intenzita fluorescence je pozorována v roztoku diethazinu s koncentrací HCl  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Pro další experimenty však byla nakonec zvolena koncentrace  $1 \cdot 10^{-3}$  HCl, tak aby byly zachovány stejné podmínky pro stanovení obou derivátů.

### 4.1.3 Optimalizace průtokových podmínek SIA stanovení

Pro všechna další optimalizační měření byly použity detekční podmínky zjištěné v přecházejících kapitolách. Při optimalizačních experimentech byla vždy hodnocena intenzita fluorescenčního signálu (výška SIA píku).

Velikost fluorescenčního signálu SIA stanovení s fotochemickou oxidací obecně ovlivňuje několik parametrů. Především je to průtoková rychlost nosného proudu, objem dávkovaného vzorku a doba ozáření derivátu fenothiazinu.

Optimalizační měření byla prováděna na aparatuře zapojené podle (Obr. 9). K optimalizačním experimentům byl vybrán pouze jeden zástupce derivátů fenothiazinu - chlorpromazin. Tato volba byla provedena z důvodu zásobního množství daného preparátu.

Zjištěné optimální průtokové podmínky pak byly aplikovány i na druhý derivát fenothiazinu – diethazin.

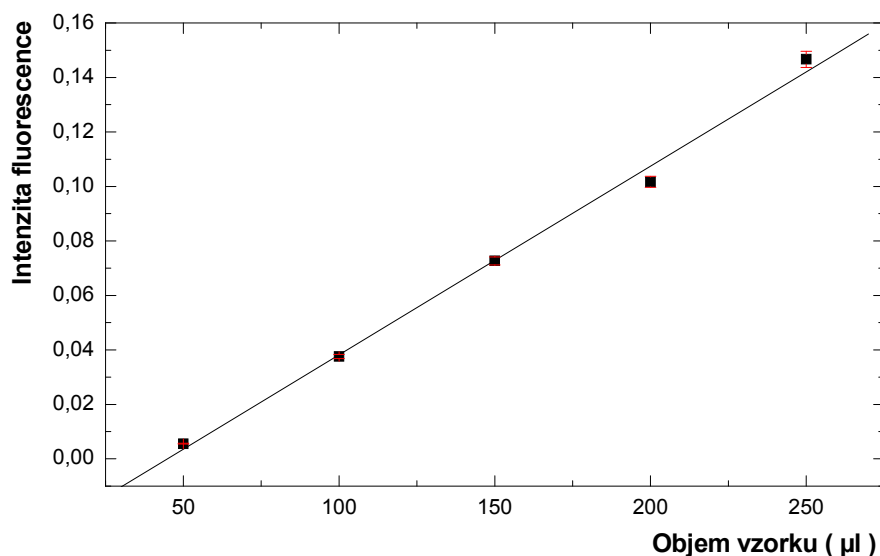
Experimenty byly prováděny s roztokem chlorpromazinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v HCl o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Excitační vlnová délka byla  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$  a emisní vlnová délka  $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ .

#### 4.1.3.1 Vliv dávkovaného objemu vzorku

Pro měření vlivu dávkovaného objemu vzorku na velikosti intenzity fluorescence SIA signálu byly nastaveny následující hodnoty v ovládacím softwaru aparatury podle (Tab. 4).

**Tab. 4:** Nastavené parametry na měření vlivu dávkovaného objemu vzorku

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	1250 $\mu\text{l}$
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	250 $\mu\text{l}$
	200 $\mu\text{l}$
	150 $\mu\text{l}$
	100 $\mu\text{l}$
	50 $\mu\text{l}$
Objem reaktoru	1000 $\mu\text{l}$
Objem vedení do kyvety	2000 $\mu\text{l}$
Doba ozáření	60 s



**Obr. 19:** Vliv velikosti dávkovaného objemu na intenzitě fluorescence

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{HCL}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $v = 1000 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$

Z proměřené závislosti vyplývá, že nejvhodnější bylo dávkovat objem 250  $\mu\text{l}$  příslušného derivátu. Při použití většího množství derivátu by se intenzita fluorescenčního signálu dále zvyšovala. Došlo by ale k překročení vnitřního objemu kapiláry fotoreaktoru a veškerý objem vzorku by již nebyl ozářen. Došlo by tak k výraznému zakřivení proměřované závislosti. Podobně by příliš velký dávkovaný objem vzorku zvýšil rozmytí zóny a došlo by tak k výslednému prodloužení analýzy. Pro další měření byl tedy dávkován objem 250  $\mu\text{l}$  derivátu.

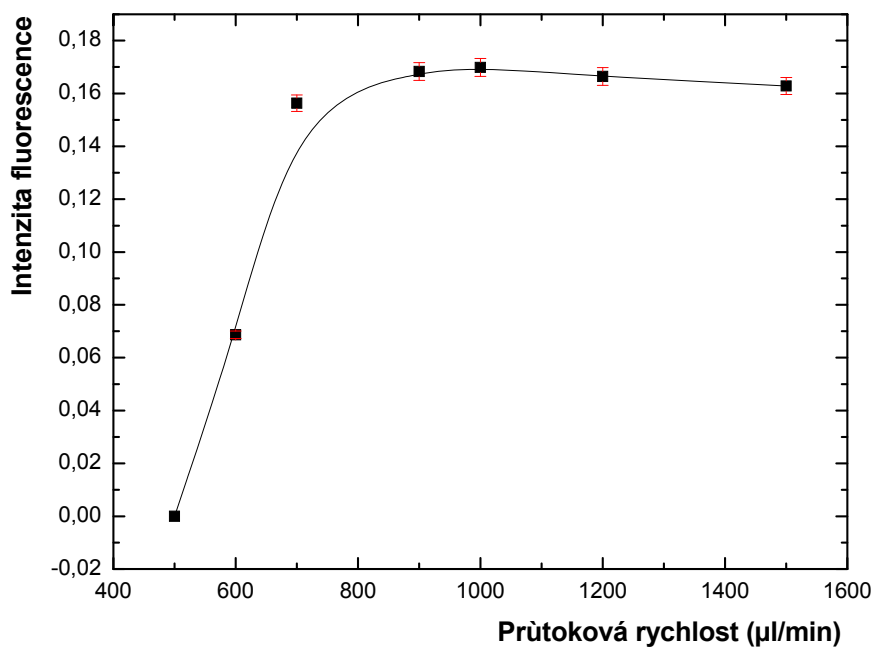
#### 4.1.3.2 Vliv průtokové rychlosti nosného proudu

Pro měření vlivu průtokové rychlosti nosného proudu na velikosti intenzity fluorescence SIA signálu byly nastaveny následující hodnoty v ovládacím softwaru aparatury (Tab. 5):



**Tab. 5:** Nastavené parametry na měření vlivu průtokové rychlosti nosného proudu

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	1250 $\mu\text{l}$
Průtoková rychlost	1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ 1200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$ 900 $\mu\text{l}/\text{min}$ 700 $\mu\text{l}/\text{min}$ 600 $\mu\text{l}/\text{min}$ 500 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	250 $\mu\text{l}$
Objem reaktoru	1000 $\mu\text{l}$
Objem vedení do kyvety	2000 $\mu\text{l}$
Doba ozáření	60 s



**Obr. 20:** Vliv velikosti průtokové rychlosti nosného proudu na intenzitě fluorescence

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{HCL}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $V_{\text{chlorpromazinu.HCl}} = 250 \mu\text{l}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$

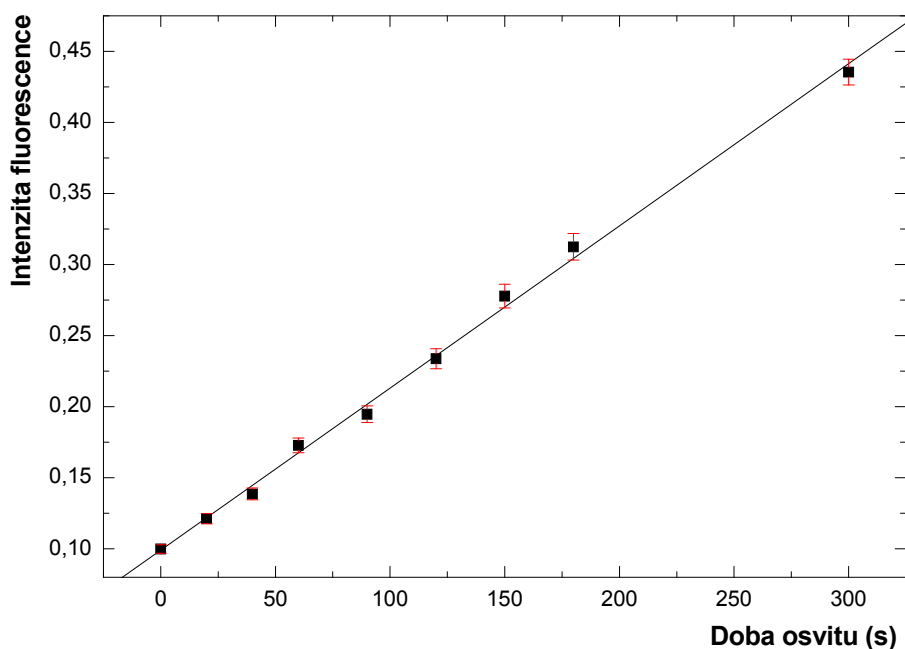
Z uvedené závislosti vyplývá, že nejvýhodnější je použít průtokovou rychlost asi 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

#### 4.1.3.3 Vliv doby ozáření derivátu

Při sledování vlivu doby ozáření derivátu ve fotoreaktoru na velikosti výsledné intenzity fluorescence SIA signálu byly nastaveny následující hodnoty v ovládacím softwaru aparatury (Tab. 6):

**Tab. 6:** *Nastavené parametry na měření vlivu doby ozáření*

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	1250 $\mu\text{l}$
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	250 $\mu\text{l}$
Objem reaktoru	1000 $\mu\text{l}$
Objem vedení do kyvety	2000 $\mu\text{l}$
Doba ozáření	300 s
	180 s
	150 s
	120 s
	90 s
	60 s
	40 s
	20 s
	0 s



**Obr. 21:** Vliv doby osvitu derivátu na výslednou intenzitu fluorescence

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 1.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{HCL}} = 1.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ ;  $V_{\text{chlorpromazinu.HCl}} = 250 \text{ } \mu\text{l}$ ;  $v = 1000 \text{ } \mu\text{l.min}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$

Z proměřené závislosti vyplývá, že intenzita fluorescence derivátu se přímo úměrně zvětšuje s dobou ozáření. Bylo by tedy výhodné zvolit co nejdélší dobu ozařování. V tomto případě by se ale neúměrně prodloužila doba analýzy; mohlo by ale také docházet až k oxidaci radikalkationtu na sulfoxid, který není za daných podmínek fluorescenčně aktivní. Zároveň při použití dlouhých časů docházelo k zahřívání roztoku derivátu ve fotoreaktoru a k tvorbě velkého množství plynné fáze. Proto pro další měření byla jako kompromis vybrána doba ozařování 60 s.

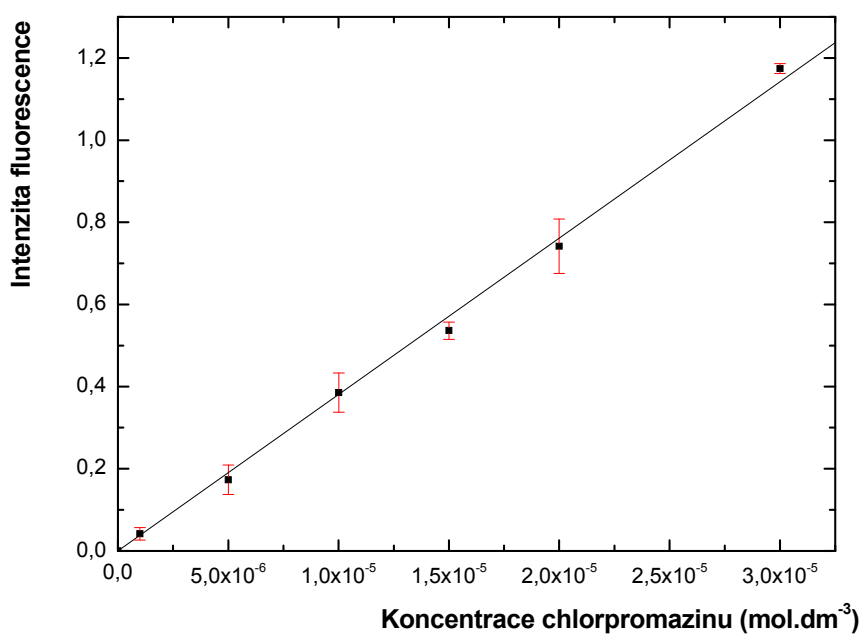
#### 4.1.4 Kalibrační závislost stanovení chlorpromazinu

Po zjištění optimálních průtokových podmínek SIA stanovení byla proměřena kalibrační křivka stanovení chlorpromazinu v koncentračním rozsahu  $1.10^{-6} - 3.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ .

Při proměňování kalibrační závislosti byly nastaveny následující optimální hodnoty v ovládacím softwaru aparatury (Tab. 7):

**Tab. 7:** *Nastavené optimální parametry pro SIA stanovení chlorpromazinu*

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	1250 $\mu\text{l}$
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	250 $\mu\text{l}$
Objem reaktoru	1000 $\mu\text{l}$
Objem vedení do kyvety	2000 $\mu\text{l}$
Doba ozáření	60 s



**Obr. 22:** *Kalibrační závislost stanovení chlorpromazinu*

$$c_{\text{HCL}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}; V_{\text{chlorpromazinu.HCl}} = 250 \mu\text{l}; v = 1000 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}; \lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}; \lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$$

Kalibrační závislost je lineární v celém měřeném rozsahu.

## **4.1.5 Základní charakteristiky SIA stanovení chlorpromazinu**

V diplomové práci byly dále určeny základní charakteristiky navrhovaného SIA spektrofluorimetrického stanovení chlorpromazinu po jeho fotooxidaci na radikalkation. Byla určena citlivost stanovení jako směrnice kalibrační závislosti, mez detekce ( $3\sigma$ ), mez stanovitelnosti ( $10\sigma$ ) a opakovatelnost měření (určena jako relativní směrodatná odchylka – RSD (%)).

### **4.1.5.1 Citlivost stanovení u chlorpromazinu**

Citlivost stanovení chlorpromazinu SIA technikou se spektrofluorimetrickou detekcí byla určena z proměřené kalibrační závislosti jako její směrnice:  $0,038075 \text{ dm}^3/\mu\text{mol}$ .

### **4.1.5.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti chlorpromazinu**

Pro zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti byla proměřena kalibrační závislost v oblasti nízkých, ještě měřitelných hodnot koncentrací chlorpromazinu. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny z výše uvedené kalibrační závislosti při dané nastavené citlivosti na detektoru.

Byla 10 x změřena velmi nízká koncentrace chlorpromazinu (koncentrace  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a odečtené hodnoty intenzity fluorescence byly přepočteny přes danou kalibrační závislost na příslušné hodnoty koncentrace a ty byly statisticky zpracovány. Mez detekce byla určena jako trojnásobek směrodatné odchylky ( $0,057 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a mez stanovitelnosti jako desetinásobek směrodatné odchylky ( $0,192 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

### **4.1.5.3 Opakovatelnost stanovení chlorpromazinu**

Určení opakovatelnosti je nezbytnou součástí každé analýzy. Náhodné chyby ovlivňují přesnost analýzy<sup>30</sup>. Pro zjištění opakovatelnosti měření byla 10 x těsně za sebou změřena odezva chlorpromazinu o koncentrace  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Z naměřených hodnot byl zjištěn aritmetický průměr, směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka a interval spolehlivosti.

Opakovatelnost měření vyjádřená jako % RSD (na hladině  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) pro dané stanovení byla 3,26 %.

Dosažené základní charakteristiky stanovení chlorpromazinu jsou shrnuty v následující (Tab. 8):

**Tab. 8:** Základní charakteristiky spektrofluorimetrického SIA stanovení chlorpromazinu

<b>Parametr</b>	<b>Hodnota</b>
citlivost, $\text{dm}^3 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$	0,038075
opakovatelnost, %RSD	3,26
mez detekce, $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,057
mez stanovitelnosti, $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,192
absolutní mez detekce *, ng	5
absolutní mez stanovitelnosti *,ng	17

\*dávkovaný objem 250  $\mu\text{l}$

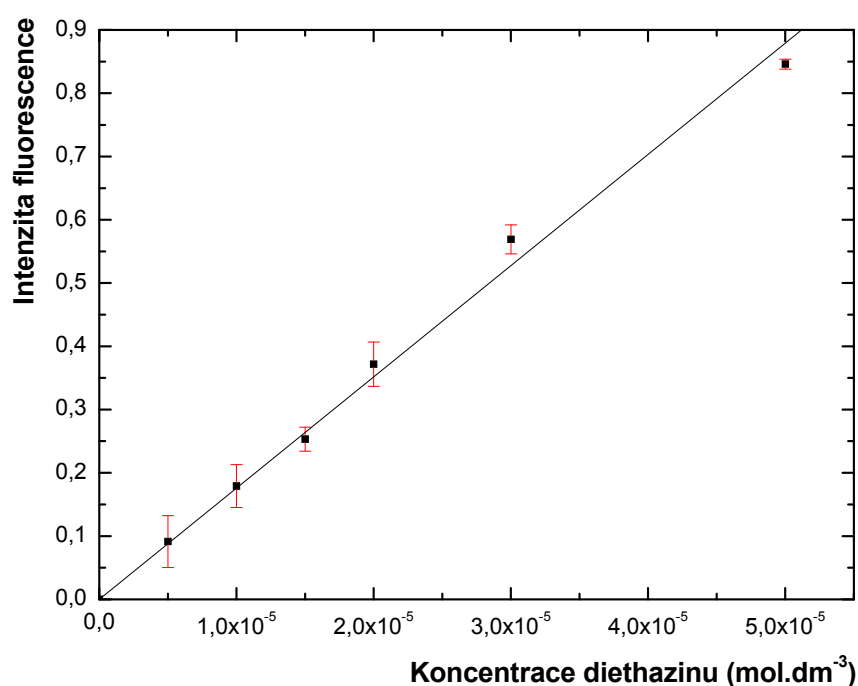
#### 4.1.6 Kalibrační závislost stanovení diethazinu

Při použití optimálních experimentálních podmínek zjištěných pro stanovení chlorpromazinu byla proměřena kalibrační křivka pro stanovení diethazinu v koncentračním rozsahu  $5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Po proměření kalibrační závislosti byly nastaveny následující optimální hodnoty v ovládacím softwaru aparatury (Tab. 9):

**Tab. 9:** Nastavené optimální parametry pro SIA stanovení diethazinu

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	1250 $\mu\text{l}$
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	250 $\mu\text{l}$
Objem reaktoru	1000 $\mu\text{l}$
Objem vedení do kyvety	2000 $\mu\text{l}$
Doba ozáření	60 s



**Obr. 23:** Kalibrační závislost stanovení diethazinu

$$c_{HCL} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}; V_{\text{diethazinu.HCl}} = 250 \mu\text{l}; v = 1000 \mu\text{l.min}^{-1}; \lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}; \lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$$

Kalibrační závislost je lineární v celém měřeném rozsahu.

#### 4.1.7 Základní charakteristiky SIA stanovení diethazinu

Základní charakteristiky spektrofluorimetrického SIA stanovení diethazinu byly určeny podobně jako v případě stanovení chlorpromazinu. Byla určena citlivost stanovení jako směrnice kalibrační závislosti, mez detekce ( $3\sigma$ ), mez stanovitelnosti ( $10\sigma$ ) a opakovatelnost měření (určena jako relativní směrodatná odchylka – RSD (%)).

#### **4.1.7.1 Citlivost stanovení diethazinu**

Citlivost stanovení diethazinu SIA technikou se spektrofluorimetrickou detekcí byla určena z proměřené kalibrační závislosti jako její směrnice:  $0,017551 \text{ dm}^3/\mu\text{mol}$ .

#### **4.1.7.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti u diethazinu**

Pro zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti byla proměřena kalibrační závislost v oblasti nízkých, ještě měřitelných hodnot koncentrací diethazinu. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny z výše uvedené kalibrační závislosti při dané nastavené přístrojové citlivosti.

Byla 10 x změřena velmi nízká koncentrace diethazinu (koncentrace  $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a odečtené hodnoty intenzity fluorescence byly přepočteny přes danou kalibrační závislost na příslušné hodnoty koncentrace a ty byly statisticky zpracovány. Mez detekce byla určena jako trojnásobek směrodatné odchylky ( $0,295 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a mez stanovitelnosti jako desetinásobek směrodatné odchylky ( $0,985 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

#### **4.1.7.3 Opakovatelnost měření u diethazinu**

Pro zjištění opakovatelnosti měření byla 10x změřena koncentrace  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  diethazinu.

Z naměřených hodnot byl zjištěn aritmetický průměr, směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka a interval spolehlivosti.

Opakovatelnost měření vyjádřená jako % RSD (na hladině  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) pro dané stanovení byla 2,6 %.

Dosažené základní charakteristiky stanovení u diethazinu jsou shrnuty v následující (Tab. 10):



**Tab. 10:** Základní charakteristiky spektrofluorimetrického SIA stanovení diethazinu

<b>Parametr</b>	<b>Hodnota</b>
citlivost, $\text{dm}^3 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$	0,017585
opakovatelnost, %	2,6
mez detekce, $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,295
mez stanovitelnosti, $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,985
absolutní mez detekce *, ng	22
absolutní mez stanovitelnosti *, ng	73

\*dávkovaný objem 250  $\mu\text{l}$

#### **4.1.8 Stanovení derivátů fenothiazinu v lékových formách**

Po zjištění optimálních pracovních podmínek a proměření základních charakteristik stanovení bylo prováděno stanovení derivátů fenothiazinu v lékových formách navrženou SIA metodou se spektrofluorimetrickou detekcí po jejich fotooxidaci na příslušný radikalkation. Kontrolní stanovení bylo prováděno klasickou spektrofotometrickou metodou v UV oblasti.

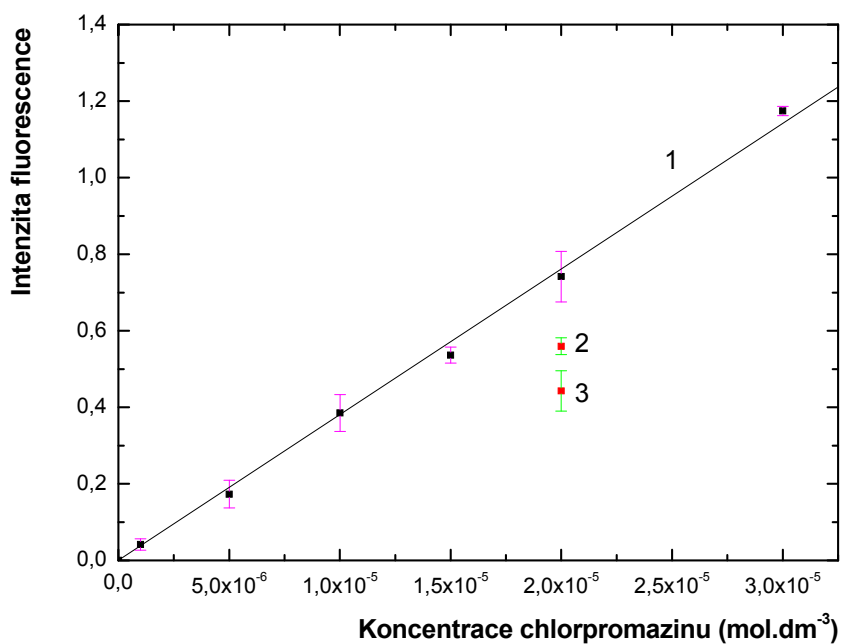
##### **4.1.8.1 SIA spektrofluorimetrické stanovení chlorpromazinu po jeho fotooxidaci v lékových formách**

Ve vzorcích tablet Plegomazinu (25 mg chlorpromazinu v červené tabletě) a tablet Plegomazinu (100 mg chlorpromazinu ve žluté tabletě), připravených postupem uvedeným v experimentální části práce (oddíl 3.7.), byl navrženou metodou ověřen obsah chlorpromazinu. Připravené vzorky byly naředěny na teoretickou koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a třikrát proměřeny. Výsledky stanovení jsou shrnuty na (Obr. 24) a v (Tab.11).

**Tab. 11:** Nastavené parametry pro SIA stanovení chlorpromazinu v lékové formě

*Plegomazin*

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	1250 $\mu\text{l}$
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	250 $\mu\text{l}$
Objem reaktoru	1000 $\mu\text{l}$
Objem vedení do kyvety	2000 $\mu\text{l}$
Doba ozáření	60 s



**Obr. 24:** Kalibrační závislost SIA stanovení chlorpromazinu a nalezený obsah v lékových formách Plegomazinu

1 – kalibrační závislost chlorpromazinu; 2 – léková forma Plegomazinu 100mg; 3 – léková forma Plegomazinu 25mg;  $V_{\text{chlorpromazinu.HCl}} = 250 \mu\text{l}$ ;  $v = 1000 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$

**Tab. 12:** Stanovení chlorpromazinu v lékových formách Plegomazinu

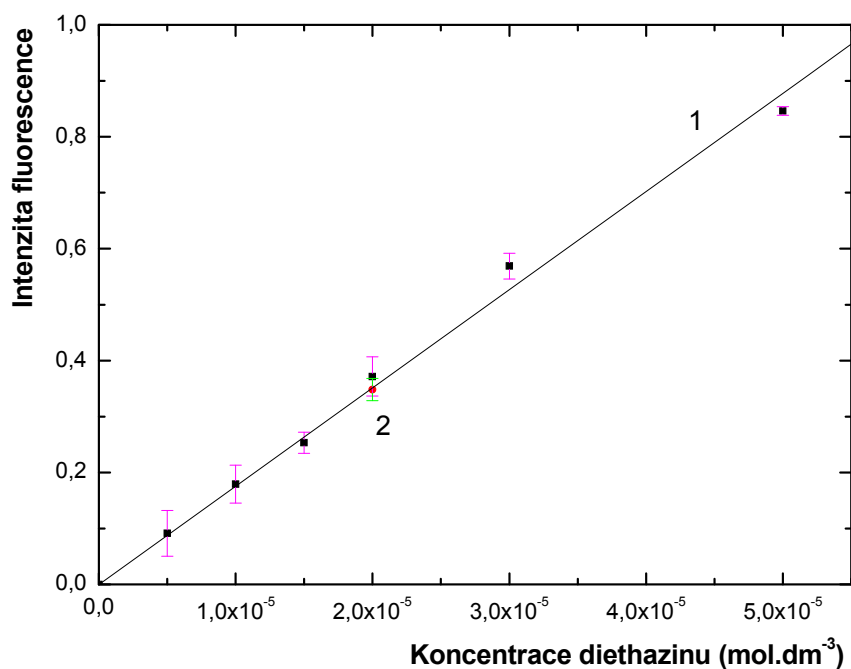
Vzorek	SIA stanovení chlorpromazinu		
	Nominální hodnota (mg)	Nalezená hodnota (mg)	%
Plegomazin (100mg/tab.)	100,0	73,49 ± 0,56	73,49
Plegomazin (25mg/tab.)	25,0	14,54 ± 0,28	58,15

#### 4.1.8.2 SIA spektrofluorimetrické stanovení diethazinu po jeho fotooxidaci v lékové formě

Ve vzorcích tablet Deparkinu (50 mg diethazinu v tabletě), připravených postupem uvedeným v experimentální části práce (oddíl 3.8.), byl navrhovanou metodou ověřen obsah diethazinu. Připravený vzorek byl naředěn na teoretickou koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a třikrát proměřen. Výsledky stanovení jsou shrnuty na (Obr. 25) a v (Tab. 14).

**Tab. 13:** Nastavené parametry pro SIA stanovení diethazinu v lékové formě Deparkin

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	1250 $\mu\text{l}$
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	250 $\mu\text{l}$
Objem reaktoru	1000 $\mu\text{l}$
Objem vedení do kyvety	2000 $\mu\text{l}$
Doba ozáření	60 s



**Obr. 25:** Kalibrační závislost SIA stanovení diethazinu a nalezený obsah v lékové formě Deparkin

1 – kalibrační závislost diethazinu; 2 – léková forma Deparkin 50mg;  $V_{\text{diethazinu.HCl}} = 250 \mu\text{l}$ ;  $v = 1000 \mu\text{l.min}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$

**Tab. 14:** Stanovení diethazinu v lékové formě Deparkinu

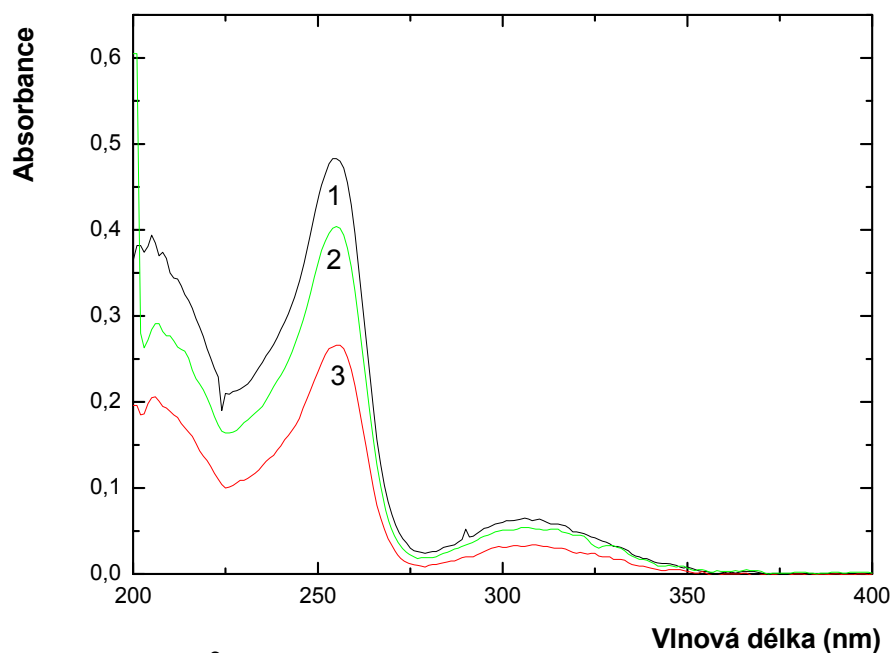
Vzorek	SIA stanovení diethazinu		
	Nominální hodnota (mg)	Nalezená hodnota (mg)	%
Deparkin (50 mg/tab.)	50,0	49,59 ± 0,19	99,21

## **4.2 Kontrolní stanovení derivátů fenothiazinu v lékových formách klasickou UV/VIS spektrometrií**

Pro kontrolu obsahu derivátu fenothiazinu ve farmaceutickém přípravku byla provedena měření jinou nezávislou metodou. K tomu byla vybrána klasická UV/VIS spektrofotometrie při vlnové délce absorpčního maxima daného derivátu.

### **4.2.1 Stanovení chlorpromazinu v lékových formách Plegomazim pomocí UV/VIS spektrometrie**

Ve vzorcích tablet Plegomazinu (25 mg chlorpromazinu v červené tabletě) a tablet Plegomazinu (100 mg chlorpromazinu ve žluté tabletě), připravených postupem uvedeným v experimentální části práce (oddíl 3.7), byl pomocí UV/VIS spektrofotometrie ověřen obsah chlorpromazinu. Připravené vzorky byly naředěny na teoretickou koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a třikrát proměřeny. Výsledky stanovení jsou shrnuty na (Obr. 26) a v (Tab.15).



\* koncentrace  $1 \cdot 10^{-3}$  HCl

**Obr. 26:** Stanovení chlorpromazinu v lékových formách Plegomazinu pomocí UV/VIS spektrofotometrie

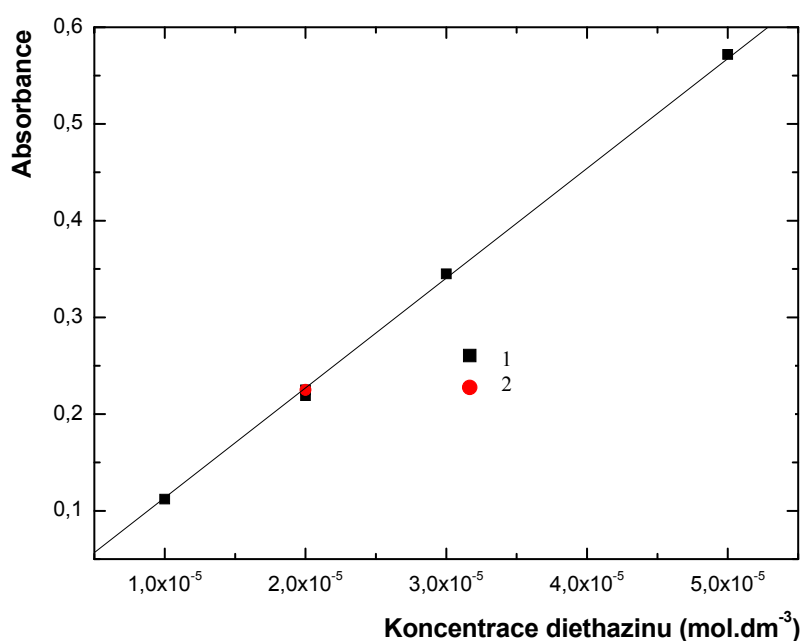
1 – chlorpromazin o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>; 2 – vzorek Plegomazinu 100 mg o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>; 3 – vzorek Plegomazinu 25 mg o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>

**Tab. 15:** Stanovení chlorpromazinu v lékových formách Plegomazin

Vzorek	UV/VIS spektrometrie		
	Nominální hodnota (mg)	Nalezená hodnota (mg)	%
Plegomazin (100mg/tab.)	100,0	73,64	73,64
Plegomazin (25mg/tab.)	25,0	13,76	55,07

## 4.2.2 Stanovení diethazinu v lékové formě Deparkinu pomocí UV/VIS spektrometrie

Ve vzorcích tablet Deparkinu (50 mg diethazinu v tabletě), připravených postupem uvedeným v experimentální části práce (oddíl 3.8), byl pomocí UV/VIS spektrofotometrie ověřen obsah diethazinu. Připravený vzorek byl naředěn na teoretickou koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a třikrát proměřen. Výsledky stanovení jsou shrnuty na (Obr. 27) a v (Tab. 16).



**Obr. 27:** Stanovení diethazinu v lékové formě Deparkinu pomocí UV/VIS spektrometrie

1 – koncentrace diethazinu s  $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 2 – léková forma Deparkin

**Tab. 16:** Stanovení diethazinu v lékové formě Deparkin

Vzorek	UV/VIS spektrometrie		
	Nominální hodnota (mg)	Nalezená hodnota (mg)	%
Deparkin (50 mg/tab.)	50,0	$49,41 \pm 0,22$	98,82

Z obou tabulek (Tab. 15) a (Tab. 16) je vidět velmi dobrá shoda výsledků stanovení u obou farmaceutických přípravků Plegomazin i Deparkin získaných metodou SIA a kontrolní spektrofotometrickou metodou v UV oblasti.



## 5 Závěr

Ve své diplomové práci jsem navázal na svoji bakalářskou práci. Ze své bakalářské práce jsem využil navrženou a postavenou aparaturu pro sekvenční injekční analýzu se spektrofluorimetrickou detekcí; společně s vytvořeným řídicím a vyhodnocovacím softwarem.

V rámci diplomové práce byly optimalizovány podmínky SIA stanovení vybraných derivátů fenothiazinu se spektrofluorimetrickou detekcí po jejich fotooxidaci a byly určeny základní charakteristiky stanovení dvou vybraných derivátů - chlorpromazinu a diethazinu touto metodou. Toto stanovení je velmi citlivé a umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace derivátu (5 ng chlorpromazinu) při velmi malé spotřebě vzorku (250 µl)

Na závěr byla navržená metoda aplikována na praktické stanovení obou derivátů v lékových formách Plegomazin a Deparkin. Výsledky analýzy byly ověřeny jinou nezávislou metodou - klasickou UV/VIS spektrometrií. V případě stanovení obou derivátů v obou přípravech oběma metodami byly získány prakticky shodné výsledky. Zjištěný nižší obsah chlorpromazinu v tabletách Plegomazin je způsoben samovolným rozkladem chlorpromazinu v tabletách, jejichž stáří výrazně přesahuje 20 let.

## 6 Literatura

1. Růžička J., Hansen E. H.: *Flow Injection Analysis*. J. Wiley, New York (1988).
2. Růžička J., Marshall G. D.: *Anal. Chim. Acta* **237**, 329 (1990)
3. Gübeli T., Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Chem.* **63**, 2407 (1991)
4. Rius A., Callao M. P., Rius F. X.: *Anal. Chim. Acta* **316**, 27 (1995)
5. Rubí E., Jiménez M. S., Mirabó F. B., Forteza R., Cerda V.: *Talanta* **44**, 553 (1997)
6. Oliveira P., Masini J. C.: *Anal. Lett.* **34**, 389 (2001)
7. Costa R., Araújo A.: *Anal Chim. Acta* **438**, 227 (2001)
8. van Staden J.F., Tsanwani M.: Fresen J.: *Anal. Chem.* **371**, 376 (2001)
9. Alpizar J., Crespi A., Cladera A., Forteza R., Cerda V.: *Lab. Rob. Autom.* **8**, 165 (1996)
10. Oms M. T., Cerda A., Cerda V.: *Anal. Chim. Acta.* **315**, 321 (1995)
11. van Staden J. F., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta.* **331**, 271 (1996)
12. van Staden J. F., Taljaard R. E., Fresenius J.: *Anal. Chem.* **357**, 577 (1997)
13. van Staden J. F., Taljaard R. E.: *Mikrochim. Acta* **128**, 223 (1998)
14. van Staden J. F., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta.* **323**, 75 (1996)
15. Paseková H., Polašek M., Cigarro J.F. a kol.: *Anal. Chim. Acta.* **438**, 165 (2001)
16. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *J. Flow Inj. Anal.* **13**, 148 (1996)
17. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *Microchem. J.* **55**, 392 (1997)
18. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *Talanta.* **44**, 1563 (1997)
19. Pimenta A.M., Montenegro M.C.B.S.M., Araújo A.N., Martínéz Calatayud J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 25 (2006)
20. Curry S.M.: *Drug Psychiatry.* **3**, 489, (1985)
21. Karvinska J., StarczewskaB., Puzanowska-Tarasiewicz H.: *Anal. Sci.* **12**, (1996)
22. Kalábová A.: *Diplomová práce, Př.F UK*, Praha, (1986)
23. Confer G.J.S.: *J.Photochem. Photobiol.* **52**, 489 (1990)
24. Gupta R.R.: *Chemical and Biological Aspets.Elsevir,Amsterdam*, (1988)
25. Lüllmann, H.;Mohr, K.;Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*. 5 přek. vyd. Grada (2006)
26. Ministerstvo zdravotnictví ČR : *Český lékopis 2005 – Doplněk 2006*. Praha, Grada (2006)
27. Čermáková, Feltl L. a kol.: *Analytická chemie I*, SNTL, Praha (1980)

28. Panico, R.; Powell, W.H.; Richer, J.C.; *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds*, Recommendations, (1993)
29. Mladá B., *Diplomová práce*, Př.F UK, Praha (2007)
30. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychnovský, P.; Plzák, Z.; *Základní analytická chemie* **182**, Karolinum, Praha (2002)