

Univerzita Karlova v Praze
Přirodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

**Spektrofluorimetrické stanovení derivátů
fenothiazinu po jejich fotooxidaci, chemické a
elektrochemické oxidaci**

Diplomová práce

v Praze 2007

Barbora Mladá

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelů doc. RNDr. Petra Rychlovského, CSc. a RNDr. Karla Nesměráka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne.....*18. 4. 2007*.....

Barbora Mladá
.....

podpis

Předmětová hesla:

Analytická chemie, farmaceutická analýza

Klíčová slova:

Deriváty fenothiazinu, molekulová fluorescence, fotooxidace, elektrochemická oxidace, chemická oxidace, fotoreaktor, chlorpromazin, diethazin

Tato práce byla finančně podporovaná MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857).

Úvodem bych ráda poděkovala panu Doc. RNDr. Petru Rychlovskému Csc. a panu RNDr. Karlu Nesměrákovi za kvalitní vedení, zájem, připomínky a rady, které mi ochotně po celou dobu řešení mé diplomové práce poskytovali.

Seznam zkratek a symbolů:

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RP – HPLC	chromatografie na obrácených fázích
GC	plynová chromatografie
GC – MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
LC - ES – MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí a s použitím elektrosprejové ionizace
CFA	kontinuální průtoková analýza
SFA	segmentovaná průtoková analýza
FIA	průtoková injekční analýza
SIA	sekvenční průtoková analýza
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
UV- VIS	ultrafialová – viditelná oblast
PTFE	polytetrafluorethylen
λ_{ex}	vlnová délka excitace
λ_{em}	vlnová délka emise
s	sekunda
min	minuta
c	koncentrace
A	absorbance
např.	například
tj.	to je
aj.	a jiné
obr.	obrázek
tab.	tabulka

1	CÍL PRÁCE.....	8
2	TEORETICKÝ ÚVOD.....	9
2.1	PRŮTOKOVÉ METODY.....	9
2.1.1	<i>Kontinuální průtoková analýza.....</i>	9
2.1.2	<i>Segmentovaná průtoková analýza.....</i>	10
2.1.3	<i>Průtoková injekční analýza.....</i>	11
2.1.4	<i>Sekvenční injekční analýza.....</i>	13
2.1.4.1	<i>Využití SIA v praxi.....</i>	16
2.2	FENOTHIAZIN A JEHO DERIVÁTY.....	17
2.2.1	<i>Vlastnosti fenothiazinu a jeho derivátů.....</i>	17
2.2.2	<i>Využití fenothiazinu a jeho derivátů.....</i>	21
2.2.3	<i>Analýza fenothiazinových derivátů.....</i>	22
2.3	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	25
2.3.1	<i>Šum.....</i>	25
2.3.2	<i>Kalibrace.....</i>	25
2.3.3	<i>Bodové odhady.....</i>	25
	<i>Aritmetický průměr.....</i>	25
	<i>Odhad směrodatné odchylky.....</i>	26
	<i>Relativní směrodatná odchylka.....</i>	26
2.3.4	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti.....</i>	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
3.1	STANOVENÍ DERIVÁTŮ FENOTHIAZINU FOTOOXIDACÍ.....	28
3.1.1	<i>Přístrojové vybavení.....</i>	28
3.1.2	<i>Použité chemikálie.....</i>	28
3.1.3	<i>Použitá aparatura.....</i>	29
3.2	STANOVENÍ DERIVÁTŮ FENOTHIAZINU CHEMICKOU OXIDACÍ.....	30
3.2.1	<i>Přístrojové vybavení.....</i>	30
3.2.2	<i>Použité chemikálie.....</i>	31

3.2.3	<i>Použitá aparatura</i>	31
3.3	STANOVENÍ DERIVÁTŮ FENOTHIAZINU ELEKTROCHEMICKOU OXIDACÍ.....	32
3.3.1	<i>Přístrojové vybavení</i>	32
3.3.2	<i>Použité chemikálie</i>	33
3.3.3	<i>Použitá aparatura</i>	33
3.4	STANOVENÍ CHLORPOMAZINU A DIETHAZINU VE FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH.....	35
3.4.1	<i>Postup přípravy</i>	35
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	36
4.1	SPEKTROFLUORIMETRICKÉ STOVENÍ DERIVÁTŮ FENOTHIAZINU PO JEJICH FOTOOXIDACI TECHNIKOU FIA.....	36
4.1.1	<i>Optimalizace podmínek průtokového stanovení</i>	40
4.1.2	<i>Kalibrační závislost pro stanovení chlorpromazinu fotooxidací</i>	44
4.1.3	<i>Charakteristiky FIA stanovení chlorpromazinu fotooxidací</i>	45
4.1.4	<i>FIA fluorimetrické stanovení derivátů chlorpromazinu a diethazinu po jejich fotooxidaci</i>	47
4.2	FIA SPEKTROFLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ DERIVÁTŮ FENOTHIAZINU PO JEJICH CHEMICKÉ OXIDACI.....	49
4.2.1	<i>Optimalizace FIA podmínek stanovení</i>	50
4.2.2	<i>Kalibrační závislost FIA spektrofluorimetrického stanovení chlorpromazinu chemickou oxidací</i>	54
4.2.3	<i>Charakteristiky FIA spektrofluorimetrického stanovení chlorpromazinu s chemickou oxidací</i>	56
4.2.4	<i>Stanovení chlorpromazinu a diethazinu ve farmaceutických přípravcích</i>	58
4.3	FIA SPEKTROFLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ DERIVÁTŮ FENOTHIAZINU PO JEJICH ELEKTROCHEMICK OXIDACI.....	60
4.3.1	<i>Optimalizace FIA podmínek stanovení</i>	61
4.3.2	<i>Kalibrační závislost pro stanovení chlorpromazinu elektrochemickou</i>	

<i>oxidací</i>	66
4.3.3 <i>Charakteristiky FIA spektrofluorimetrického stanovení chlorpromazinu elektrochemickou oxidací</i>	67
4.3.4 <i>Stanovení chlorpromazinu a diethazinu ve farmaceutických přípravcích</i>	69
4.4 SROVNÁNÍ FOTOOXIDACE, CHEMICKÉ A ELEKTROCHEMICKÉ OXIDACE.....	71
5 ZÁVĚR	74
6 LITERATURA	76

1 Cíl práce

Cílem mé diplomové práce bylo vypracovat metodu stanovení derivátů fenothiazinu průtokovou injekční analýzou se spektrofluorimetrickou detekcí po jejich oxidaci. Druhým úkolem bylo porovnání různých způsobů on-line oxidace těchto derivátů - fotochemické, chemické a elektrochemické a zhodnocení všech dosažených parametrů stanovení při použití jednotlivých oxidačních technik. Posledním úkolem diplomové práce pak bylo ověření sledované metody stanovením dvou derivátů fenothiazinu (chlorpromazinu a diethazinu) ve farmaceutických přípravcích.

2 Teoretická část

2.1 Průtokové metody

Průtokové metody v současné době nacházejí v analytické chemie stále větší využití. Hlavní výhodou oproti běžnému manuálnímu stanovení je především snadná automatizace a tím možnost analýzy velkého počtu vzorků za časovou jednotku. V průtokových metodách je možno pracovat s původními vzorky, které jsou následně upraveny až přímo v systému. K dalším výhodám patří menší spotřeba všech činidel (10 – 100 x menší oproti klasické analýze) díky miniaturizaci aparatury, eliminaci kontaktu pracovníků s toxickými látkami a omezení kontaktu používaných chemikálií s atmosférou díky uzavřenému systému. Nevýhodou tradičních průtokových metod bývá malá flexibilita.

Průtokové metody se rozdělují do dvou hlavních skupin:

a) chromatografická analýza - mezi ně řadíme klasickou kapalinovou chromatografii (LC) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC)

b) průtokové metody analýzy - mezi ně patří kontinuální průtoková analýza (CFA), sekvenční průtoková analýza (SFA), průtoková injekční analýza (FIA), a sekvenční injekční analýza (SIA).

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

2.1.1 Kontinuální průtoková analýza-CFA

Principem této průtokové metody je kontinuální přivádění vzorku do proudu reagentu, analytický signál se odečítá v ustáleném stavu.

K zavádění vzorků slouží automatický dávkovač nebo mohou být vzorky zaváděny do aparatury manuálně ponořením přívodní trubičky do roztoku. Promíchávání roztoku vzorku a roztoků reagentů bývá dosaženo pomocí vhodné konstrukce průtokového reaktoru (reakční cívky) na základě turbulentního proudění.

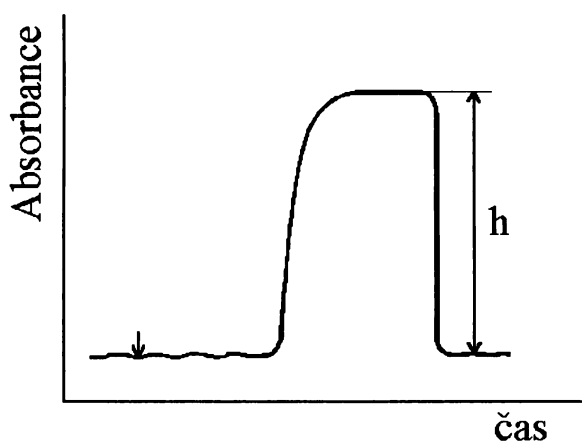
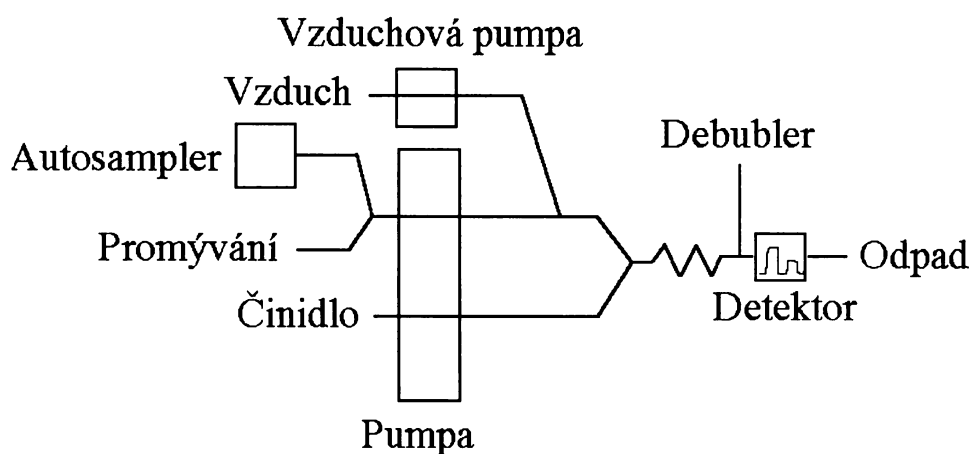
2.1.2 Segmentovaná průtoková analýza-SFA

Segmentovaná průtoková analýza (segmented flow analysis) je zdokonalenou, pokročilou modifikací CFA. Je založena na kontinuálním přísunu vzorku.

Vzorek, činidlo a ostatní požadované složky jsou nasávány pomocí peristaltické několikakanálové pumpy do reakční cívky. Tam dochází mezi činidlem a vzorkem k chemické reakci. Současně je do zařízení vháněn segmentorem vzduch ve formě velmi jemných bublinek, které oddělují jednotlivé zóny vzorku a zároveň podporují turbulentní proudění, čímž se urychluje promíchávání vzorku s činidlem (zvětšuje se konverze chemické reakce). Chemická reakce v tomto uspořádání proběhne tedy do rovnovážného stavu a měření reakčního produktu v průtokovém detektoru je prováděno v ustáleném stavu.

Ve srovnání s průtokovou injekční analýzou je technika SFA citlivější, mezi její nevýhody patří zejména větší spotřeba vzorku, pulzace toku, nutnost udržovat konstantní velikost bublin a odstranění vzduchu pomocí debubleru před vstupem vzorku do detektoru.

Na obrázku 1 je uvedeno obecné schéma techniky SFA v základním zapojení a tvar dosaženého signálu.



Obr. 1: *Segmentovaná průtoková analýza. A) schéma zapojení. B) časový průběh analytického signálu.*

2.1.3 Průtoková injekční analýza – FIA

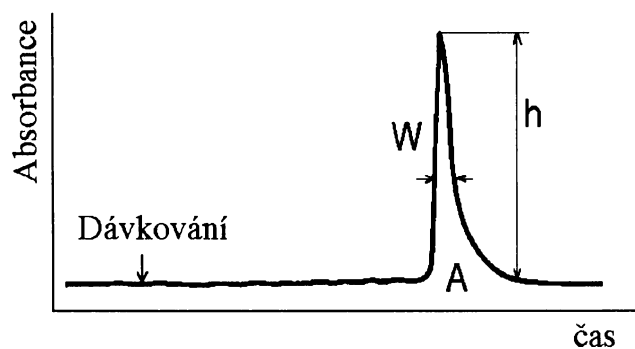
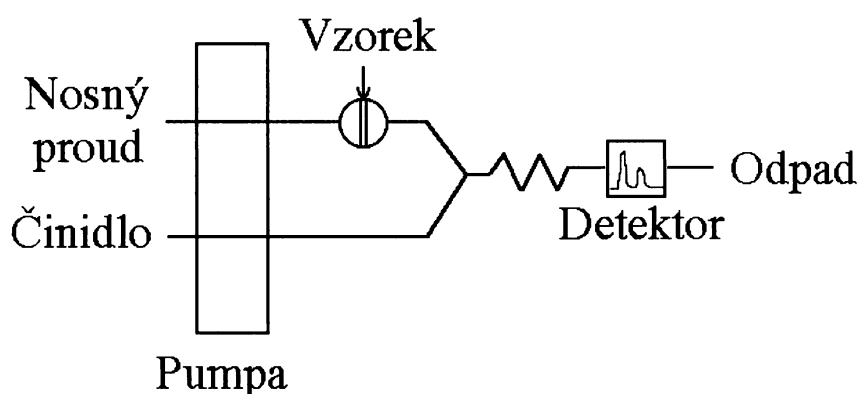
Průtoková injekční analýza (FIA-Flow Injection Analysis) je průtokovou metodou s plynulým tokem všech činidel. Její princip byl poprvé publikován v roce 1975 Růžičkou a Hansenem¹. Základem metody je kontrolovaná disperze vzorku v prostoru čase.

Přesný objem vzorku je prostřednictvím dvoupolohového ventilu se smyčkou dávkován do kontinuálního proudu vhodné kapaliny (činidlo, pufr). Tok kapaliny je realizován pomocí pumpy. Nadávkovaná zóna vzorku je v kontinuálním nosném proudu rozmývána a tvoří se koncentrační gradient. V reakční cívce poté dochází k chemické

čínidlem a vzniklý produkt v reprodukovatelném čase postoupí do průtokové cely, kde je detekován a signál zaznamenán. Signál má tvar píku, jehož výška, šířka a plocha jsou úměrné koncentraci analytu a závisí také na průtokové rychlosti nosného roztoku, vnitřním průměru a délce vedení a také na velikosti nadávkovaného objemu.

K popisu koncentračního gradientu se užívá disperzní koeficient, který je dán poměrem počáteční koncentrace a aktuální koncentrace v daném čase².

Dosažení chemické rovnováhy není v metodě FIA nezbytné, ale vlastní stanovení musí vždy být provedeno za přísně reprodukovatelných experimentálních podmínek. Do FIA aparatury může být zařazena např. kolonka s iontoměničem, extrakční, dialyzační nebo prekoncentrační jednotka. Na obrázku 2 je uvedeno obecné schéma techniky FIA v základním zapojení a tvar dosaženého signálu.



Obr. 2: Průtoková injekční analýza. A) schema zapojení. B) časový průběh analytického signálu

Pro stanovení FIA technikou lze využít v podstatě kteroukoliv nepříliš pomalou chemickou reakci, jejíž reakční produkt je možno detekovat vybranou instrumentální analytickou metodou. Mezi nejčastěji využívané detektory se řadí detektory spektrometrické - UV/VIS spektrometrický, refraktometrický, fluorimetrický. Jinak lze též s úspěchem použít atomový absorpční detektor, plamenový fotometr či ICP-atomový emisní spektrometr. Z elektrochemických detektorů jsou to hlavně ampérometrický, potenciometrický, coulometrický a konduktometrický.

Tab. 1 Srovnání metod CFA a SFA

Sledovaný parametr	Metoda CFA	Metoda FIA
Dávkování vzorku	nasávání	vstřík
Objem vzorku	obvykle 0,2 - 2,0 ml	obvykle 10 - 100 μ l
Doba odečtu signálu	řádově minuty	řádově sekundy
Průměr trubiček	obvykle 1 - 2 mm	obvykle 0,5 - 0,7 mm
Přesnost měření	1 - 2 %	1 - 2 %
Počet analýz za čas	\pm 80 vzorků / hodina	\pm 300 vzorků / hodina
Spotřeba činidel	vysoká	nízká
Promývání aparatury	je nutné	není nutné
Detekce	v rovnovážném stavu	v konstantním čase
Vyhodnocení	výška	výška, plocha, šířka
Citlivost	vyšší ve srovnání s FIA	nižší ve srovnání s CFA

2.1.4 Sekvenční injekční analýza-SIA

Sekvenční injekční analýza je poměrně nová průtoková metoda, která byla vyvinuta během odstraňování nevýhod a nedokonalostí techniky průtokové injekční analýzy³. Obě metody jsou si navzájem podobné, avšak SIA evidentně představuje samostatný přístup k analýze v průtokovém uspořádání. První práce zabývající se

samostatný přístup k analýze v průtokovém uspořádání. První práce zabývající se problematikou SIA byly publikovány v 90. letech opět kolektivem autorů v čele s J. Růžičkou⁴.

Hlavními rozdíly obou zmiňovaných technik je odlišnost v geometrii nosného toku. Metoda FIA využívá přímý konstantní tok, oproti tomu SIA využívá změny přímého a zpětného toku. Tak je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na reakční produkt.

V metodě SIA je dávkovací ventil s vyměnitelnou smyčkou nahrazen 6-10 pozičním selekčním ventilem, z čehož plynou další rozdíly mezi oběma metodami. U SIA techniky je možno měnit dávkovaný objem vzorku od jednotek až po stovky μl pouhým naprogramováním doby otevření příslušného kanálu selekčního ventilu a tím optimalizovat disperzi zóny vzorku podle koncentrace analytu a tím tedy i citlivost stanovení. U FIA analýzy je oproti tomu v rámci jedné série měření dávkovaný objem vzorku neměnitelný (je dán objemem dávkovací smyčky). Doba trvání jednoho měřícího SIA cyklu se pohybuje okolo 30 s, hodnoty průtokových rychlostí SIA techniky se prakticky neliší od FIA a pohybují se okolo 1 ml/min.

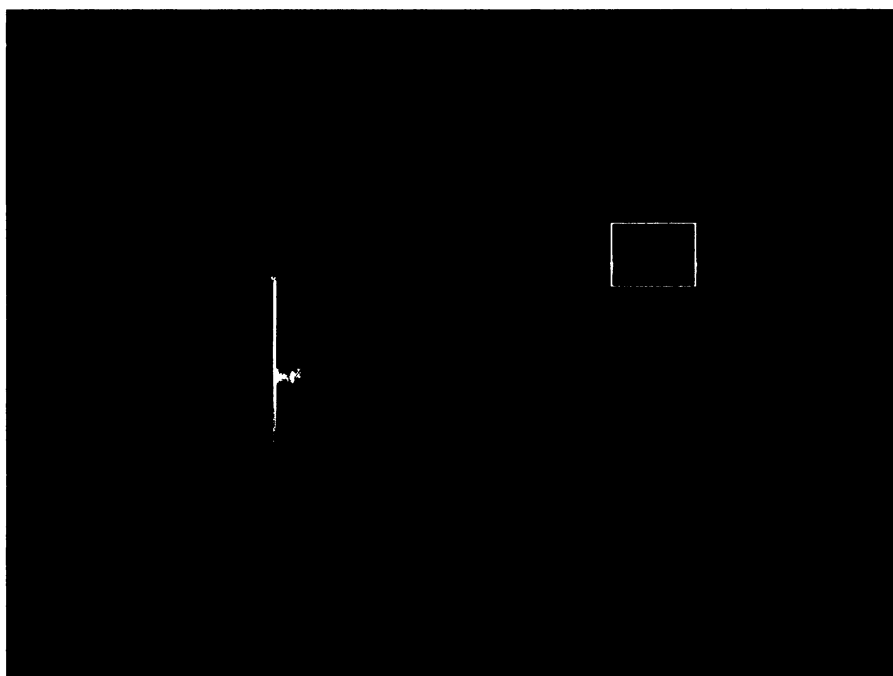
Charakteristickým rysem SIA techniky jsou oddělené měřící cykly. Nejprve jsou zóny vzorku, nosného toku a činidla postupně vnášeny do jednobanového systému prostřednictvím vícecestného selekčního ventilu a za pomoci pístového čerpadla (obr. 3a). Následně je směr toku obrácen, čímž dojde k promísení reaktantů a vzniklý produkt je dále detegován. Lze také využít uzavření zóny vzorku mezi dvě zóny stejného činidla a tak zvýšit výtěžek reakčního produktu a tím i citlivost stanovení⁵. Systém SIA pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu čerpadla, synchronizovaných přepínáním pozic selekčního ventilu. Reprodukovatelný koncentrační gradient získáme přesnou synchronizací a opakovatelností jednotlivých programových kroků. Z toho vyplývá, že důležitou součástí SIA systému musí tvořit i vhodný mikroprocesor s příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřícího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data.

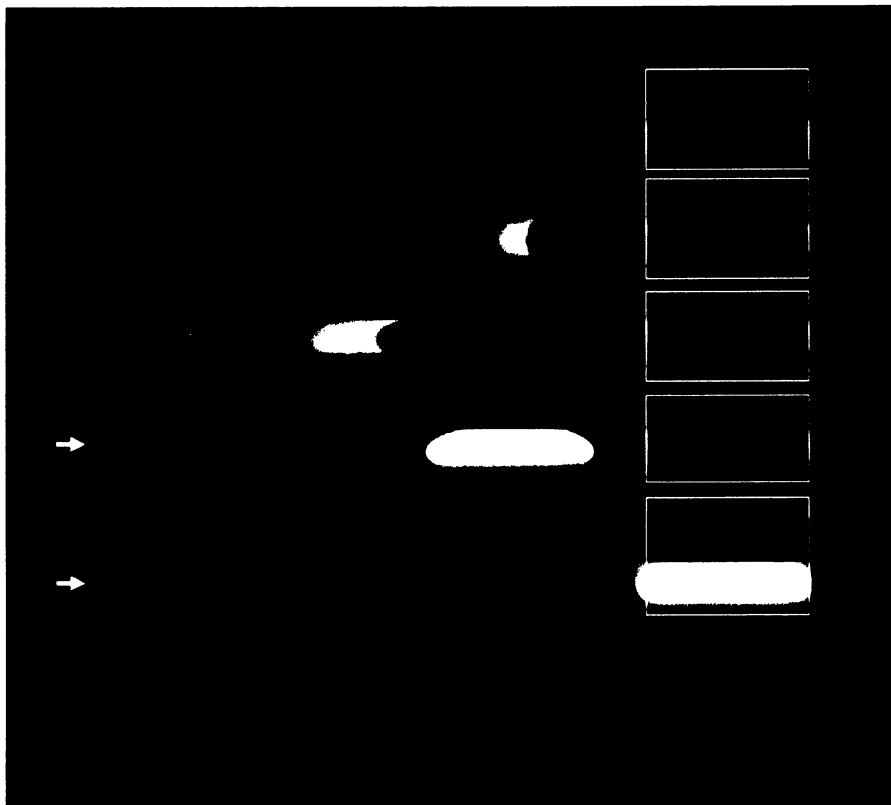
Vstupní jednotkou SIA systému je čerpadlo, které je řízeno také softwarově. Součástí systému je také vícecestný selekční ventil. Nejčastěji se jedná o 6, 8 a 10-cestné ventily. Selekční ventil řídí seřazení jednotlivých zón v mísící cívce, zajišťuje připojení všech požadovaných činidel k systému a po obrácení toku i transport zón do detektoru. Časování poloh selektoru a jejich synchronizaci s pohybem čerpadla řídí a kontroluje počítač. V SIA systémech se používají jednodušší a kratší cívky než u FIA

mohou obsahovat reaktivní náplň. Většinou je součástí aparatury jediná reakční cívka, umístěná mezi čerpadlo a selekční ventil. Zařízení může být eventuálně doplněno zadržovací cívkou sloužící v součinnosti se selekčním ventilem k zavedení vzorku do aparatury.

Při analytických stanoveních v režimu SIA lze využít stejných typů detektorů jako u FIA techniky. Detektor musí být opatřen průtokovou měřící celou. V praxi jsou nejčastěji používány UV/VIS spektrometrický, fluorescenční, chemiluminiscenční nebo elektrochemické detektory.

Výhodou SIA oproti FIA je, že i při práci s několika roztoky probíhá analýza v jednokanálovém uspořádání s jedním ventilem a jedním čerpadlem. Při zastaveném toku lze provádět i kinetická měření (určení reakčních řádu) stejně jako u FIA. Jelikož SIA využívá zastavení a změnu směru toku, jsou spotřeby vzorku, činidel a objem odpadu podstatně nižší než u FIA, kde jsou roztoky čerpány kontinuálně. Velkou výhodou SIA je její flexibilita daná snadnou změnou parametrů měření prostřednictvím klávesnice počítače, aniž je třeba měnit konfiguraci SIA systému. Nevýhodou SIA oproti FIA je nižší frekvence dávkování vzorku⁵.





Obr. 3: Sekvenční injekční analýza. A) schema. B) promíchání zón a detekce.

2.1.4.1 Využití SIA v praxi

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

Z anorganických iontů byly např. ve vodě stanoveny vápenaté ionty (Ca^{2+}) souběžně s hořečnatými (Mg^{2+})⁶, s využitím tvorby barevných komplexů se spektrofotometrickou detekcí⁷, dále byly stanoveny ionty železité^{8,9} a ionty zinečnaté¹⁰. Z aniontů byly např. současně stanoveny chloridy a fluoridy^{11,12}, dusitany s dusičnany se spektrofotometrickou detekcí¹³ a sírany pomocí srážecí reakce s barnatými ionty¹⁴. Fosfáty byly analyzovány samostatně¹⁵ nebo současně s křemičitany¹⁶. Dále je možno určit sulfoamidy¹⁷. Technikou SIA lze též určovat i stopová množství některých těžkých kovů - spektrofotometrickém stanovení (vanadu¹⁸, molybdenu¹⁹ a chromu²⁰). Kadmium, měď, rtuť, indium, olovo a thalium byly stanoveny metodou SIA s elektrochemickou detekcí.

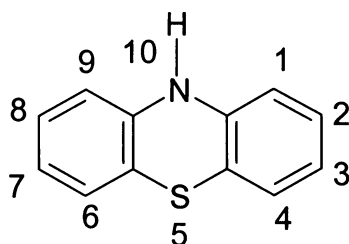
Hlavní oblastí aplikace SIA techniky je však farmaceutická analýza. S využitím spektrofluorimetrické detekce byl např. ve farmaceutických přípravcích stanoven warfarin²¹, lisinopril²¹, diclofenal²¹ nebo thiamin²¹.

2.1 Fenothiazin a jeho deriváty

Studiu vlastností fenothiazinu a jeho derivátů je stále věnována značná pozornost. Jejich nejdůležitější vlastností je antidepresní aktivita²². Zájem je soustředěn především na výzkum jejich farmakologické účinnosti. Jsou důležitou skupinou neuroleptických a antialergických léčiv. Více než 100 komponent bylo odvozeno ze základního fenothiazinového skeletu a farmakologicky testováno během posledních desítek let.

2.2.1 Vlastnosti fenothiazinu a jeho derivátů

Z chemického hlediska je fenothiazin heterocyklická sloučenina obsahující dusík a síru.



Nejčastěji využívané deriváty jsou substituovány v poloze 10 (antihistaminika a antiparkinsonika), popřípadě v poloze 2 a 10 (neuroleptika)²³.

Některé tyto deriváty jsou využívány jako redox indikátory, podobně jako deriváty substituované v poloze 3 a 7. V práci byly použity deriváty uvedené v tabulce 2. Substituenty v poloze 10 mají záporný indukční efekt vlivem atomu dusíku aminoskupiny nebo heterocyklu připojeného na alkyly. Tento efekt s rostoucí délkou alkylového řetězce mezi dusíkem fenothiazinového jádra a dusíkem aminoskupiny klesá. V poloze 2 jsou nejčastějšími substituenty skupiny -Cl, -OCH₃, -CF₃ aj. Ty mají zpravidla záporný indukční efekt a kladný i záporný mezomerní efekt. Kromě indukčního efektu se mohou uplatňovat i sférické vlivy substituentů²⁴. Vlivem různých druhů efektů dochází k posunu elektronů a tedy ke změně elektronové hustoty v jednotlivých polohách fenothiazinového skeletu, a tím i ke změně jeho reaktivity²⁵. Tyto vlivy se projevují např. v různých hodnotách maxim absorpance (u kladného mezomerního efektu v oblasti kolem 255 nm a 305 nm, u záporného v oblasti kolem 235 a 265 nm)²⁶.

Tab. 2 Použité deriváty fenothiazinu

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

1) Fyzikální a chemické vlastnosti

Fenothiazinové deriváty tvoří báze (žluté olejovité roztoky), které jsou ve vodě nerozpustné. V praxi se proto užívají ve formě hydrochloridů popř. maleátů. Ty jsou velmi dobře rozpustné ve vodě, zředěné kyselině chlorovodíkové a řadě organických rozpouštědel. Tato vlastnost závisí na typu substituentů²³.

Soli fenothiazinových derivátů mohou disociovat a reagují jako velmi slabé kyseliny. Bylo zjištěno, že hodnoty disociačních konstant (pK_a) se mění v přítomnosti iontových nebo neiontových tenzidů ve vodném roztoku. Např. hodnota pK_a hydrochloridu chlorpromazinu a diethazinu se snižuje v přítomnosti kationtového (Septonex) a neiontového tenzidu a zvyšuje v přítomnosti aniontového tenzidu (Triton X-305)²³.

2) Spektrální vlastnosti

Všechny deriváty fenothiazinu mají podobné spektrální vlastnosti. V jejich absorpčních spektrech se vyskytují dva hlavní pásy v oblastech vlnových délek 210 - 280 nm a 300 - 317 nm.

U derivátů fenothiazinu lze po ozáření UV světlem pozorovat fluorescenci. Tato jejich vlastnost byla předmětem již řady sledování, zejména v souvislosti s chemickou strukturou, oxidačními stavy, pH a teplotou a byla již využita v chemické analýze²³.

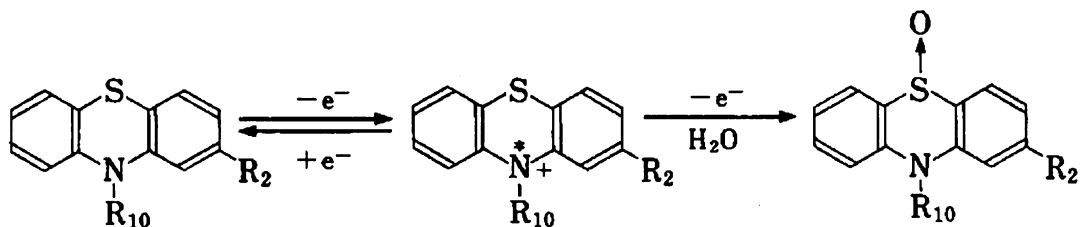
Všechny deriváty fenothiazinu se stejným substituentem v poloze 2 mají stejná excitační a fluorescenční spektra. Substituent v poloze 10 nemá vliv na fluorescenční vlastnosti látky²³. Intenzita fluorescence je silně závislá na pH a době ozařování²³.

3) Redoxní vlastnosti

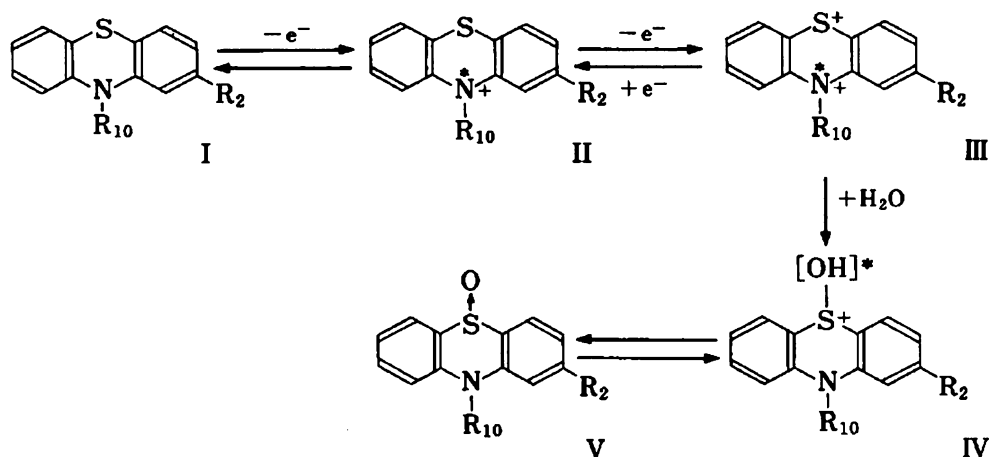
Nejdůležitější chemickou vlastností fenothiazinových derivátů je jejich schopnost se oxidovat řadou oxidačních činidel ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, NH_4VO_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KBrO_3 , KIO_3 , KIO_4 , NaNO_2 , H_2O_2 , aj.) nebo vystavením vlivu UV záření. Barva vzniklého produktu je závislá na typu substituentu v poloze 2 a 10²³.

Oxidační reakce fenothiazinových derivátů jsou znázorněny schématem na obrázku 4²³. Během prvního kroku jsou deriváty fenothiazinu reverzibilně oxidovány za vzniku barevného radikalkationtu stabilního v silně kyselém prostředí (důkaz existence radikalkationtů byl proveden EPR spektroskopií²⁴). Radikalkation je v druhém kroku ireverzibilně oxidován na bezbarvý sulfoxid²³.

Obrázek 5 znázorňuje nejpravděpodobnější, detailní mechanismus oxidačního procesu fenothiazinů (I). Prvním krokem je ztráta elektronu, která poskytuje barevné zbarvení vzniklému radikalkationtu (II). Tato reakce je reverzibilní, radikalkationt ztrátou dalšího elektronu dává vznik fenothiaziniovému iontu (III). Ten je dále snadno hydrolyzován za tvorby bezbarvého sulfoxidu (V).



Obr. 4: Oxidační proces derivátů fenothiazinu



Obr.5 : detailní schéma oxidačního procesu derivátů fenothiazinu.

Rychlost prvního kroku reakce závisí na typu oxidantu, kyselosti prostředí, teplotě a typu daného fenothiazinového derivátu²³. Předpokládá se, že rychlost druhého kroku (Obr. 5) je silně závislá na rychlosti hydrolyzy²³. Stabilita radikálkationtu závisí na typu a pozici substituentů v molekule fenothiazinového skeletu. Stabilnější jsou radikálkationty, které mají v poloze 10 alkylový řetězec než ty s heterocyklickými substituenty.

Dalším faktorem významně ovlivňujícím stabilitu radikálkationtu je kyselost reakčního prostředí. Radikálkationt je stabilní v prostředí koncentrovaných kyselin (2-10 mol.l⁻¹)²⁵.

4) Elektrochemické chování derivátů fenothiazinu

Oxidační procesy derivátů fenothiazinu probíhají za relativně nízkých redox. potenciálů. Se zvyšující se koncentrací kyseliny nedochází k jejich výraznému poklesu, ale jsou silně ovlivňovány typem substituentu v poloze 2²³.

Proces elektrochemické oxidace derivátů fenothiazinu závisí na polaritě, kyselosti reakčního prostředí a přítomnosti substituentů v polohách 2 a 10²³.

2.2.2 Využití fenothiazinu a jeho derivátů

Intenzivní zájem je soustředěn především na výzkum farmakologické účinnosti derivátů fenothiazinu, neboť některé z těchto látek jsou významnými psychofarmaky²⁴. Fenothiazin, základní látka řady fenothiazinových derivátů, je nejstarším známým pesticidem používaným od roku 1935. Dnes je používán ve veterinární praxi²⁴. Bylo zjištěno, že farmakologicky významné jsou fenothiazinové deriváty, substituované v poloze 2 a 10. Jsou používány také v anesteziologii; dermatologii. Mají fotochemoterapeutické schopnosti proti rakovinovým nádorům a mohou být použity i jako insekticidy^{27, 28}.

Chlorid chlorpromazina²⁹

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

Má výrazné adrenolytické, anticholinergické, hypotenzivní, spasmolytické, anestetické, hypotermické, 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 diethazina²⁹

Chlorid diethazina, systematicky [2-(10-fenothiazinyl)ethyl]diethylamoniumchlorid, $C_{18}H_{23}ClN_2S \cdot HCl$, $M = 334,91 \text{ g mol}^{-1}$, 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 nepříliš silné sedativní, antiadrenergní, antihistaminové a hypotermické účinky. Používá se u všech typů parkinsonského syndromu, a to především tam, kde je silně vyznačen třes.

Na základě vzniku barevných kationradikálů při oxidačních procesech se využívá fenothiazinových derivátů jako již zmíněných redox indikátorů. A to zejména při titracích ionty Ce^{4+} , BrO_3^- , VO_3^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, chloraminem T a bromsukcinamidem^{23,24}.

Barevných produktů oxidace se dále využívá ve spektrofotometrii. 2,10-deriváty byly použity při stanovení iontů, např. Ce^{4+} , Fe^{3+} , Au (III), Os (VI, VIII), $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, $\text{MnO}_4^{-24,26}$.

Barevných komplexů některých kovů s fenothiazinem i jeho deriváty se užívá pro spektrofotometrické stanovení těchto kovů (především platinových). Ukázalo se, že kovy v nižším oxidačním stupni, např. Pd (II) a Ru (III), poskytují při stanovení s deriváty fenothiazinu barevné komplexy; naproti tomu kovy ve vyšším oxidačním stupni, např. Ce (IV), Os (VI), Os (VIII), komplex netvoří a jejich stanovení je založeno pouze na vzniku barevného kation radikálu při redox reakci. V některých případech dochází ke spojení obou reakcí (nejprve proběhne redox reakce a pak komplexotvorná reakce se stanovovaným kovem v nižším oxidačním stupni), což bylo prokázáno při reakci Pt (IV) s chlorpromazinem²⁶.

Zájem o fotochemické reakce fenothiazinových derivátů je iniciován dvěma základními faktory. První je dán jejich farmakologickým působením a s tím související fotosensitivitou kůže a očních tkání pozorovaných u pacientů léčených většími dávkami fenothiazinových farmak. Dalším důvodem pro studium fotooxidace je možnost využití některých derivátů fenothiazinu při přeměně sluneční energie.

2.2.3 Analýza fenothiazinových derivátů

Se zvyšujícím se využitím fenothiazinových derivátů v lékařství docházelo k rozvoji mnoha metod pro jejich stanovení jak v čisté formě, tak ve farmaceutických přípravcích. Oficiální metodami uvedenými v Britském lékopise pro fenothiaziny jsou potenciometrická titrace v nevodném prostředí nebo spektrofotometrie v UV oblasti²⁵. Metody používané k analýze fenothiazinových derivátů je možno rozdělit do skupin.

1) Spektrometrické metody – UV - VIS, FIA

Basavaih a kol.³⁰ se zabývali spektrofotofotochemickým stanovením derivátů fenothiazinu v kyselém prostředí v přítomnosti $\text{Cr}^{\text{VI}+}$ a příslušného indikátoru. Za těchto podmínek došlo k oxidaci fenothiazinů, což umožnilo i spektrofotofotochemické stanovení. Důraz byl kladen na koncentraci H_2SO_4 . Při nízké koncentraci způsobuje H_2SO_4 zpomalení reakce, v opačném případě pak barevnou nestálost vzniklých kationradikálů. Další spektrofotometrická stanovení fenothiazonových derivátů po jejich oxidaci byla provedena J.Karpinskou a kol.³¹, Basavaihem a kol.²⁵.

FIA (flow injection analysis) je vzhledem ke své univerzálnosti, jednoduchosti a nízké ceně často používanou metodou ke stanovení derivátů fenothiazinu. V posledních letech byla publikována řada prací³²⁻³⁶. FIA stanovení jsou založena na chemické oxidaci fenothiazinových derivátů s využitím těchto oxidačních činidel (Ce^{4+})³⁷⁻⁴⁰, $(\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3)^{41}$, $(\text{MnO}_4^-)^{42}$ nebo na fotochemické oxidaci⁴³⁻⁴⁹ s fluorimetrickou nebo fotometrickou detekcí. Např. v práci⁴³ byly studovány fotochemické reakce tří derivátů fenothiazinu (chlorpromazin, promethazin a perfenazin) a srovnány s chemickými oxidačními procesy. Detekční limity se pohybovaly v rozmezí 20-50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2) Chromatografické metody- HPLC, GC, TLC

HPLC technika je vysoce selektivní a citlivou metodou pro stanovení fenothiazinů, jejími hlavními nevýhodami jsou zejména drahé vybavení a vysoká spotřeba rozpouštědel. Spojení LC-ES-MS bylo využito v práci⁵⁰, ve které autoři studovali separaci fenothiazinových derivátů v myším séru.

V práci⁵¹ byla metodou RP-HPLC studována enantioseparace fenothiazinových derivátů za použití detektoru s diodovým polem. Separaci fenothiazinových derivátů HPLC technikou se dále zabýval D.De Orsi a kol.²⁵.

Pro separaci a detekci fenothiazinů byla využita rovněž tenkovrstvá chromatografie (TLC)²³ a plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)⁴⁶.

3) Elektrochemické metody

Stanovení fenothiazinových derivátů byla provedena diferenční pulsní voltametrií (DPV), diferenční pulsní polarografií (DPP), diferenční pulsní stripping voltametrií (DPSV) a elektroforézou²⁵.

Voltmetrické metody jsou sice méně selektivní než HPLC a ve srovnání s FIA technikou i přístrojově a experimentálně náročnější.

Dále byla vypracována vážková stanovení (s kyselinou wolframofosforečnou, s kyselinou molybdátotofosforečnou) a řada titračních stanovení jako organická báze s kyselinou chloristou v bezvodém prostředí a titrační stanovení oxidimetrická ve vodném prostředí²⁶.

2.3 Statistické zpracování výsledků

2.3.1 Šum

Šum oscilující kolem základní linie je charakterizován frekvencí a amplitudou. Vzhledem k nahodilé povaze šumu je v dostatečně dlouhém časovém intervalu součet pozitivních a negativních výchylek roven nule. Šum, jehož suma je nulová v časovém intervalu našeho pozorování, se označuje jako tzv. bílý šum. Šum, jehož suma je nenulová, je tzv. náhodný šum měření, a šum, jehož suma vykazuje časovou závislost v následných intervalech pozorování, se označuje jako drift⁵².

2.3.2 Kalibrace

Kalibrace je empirický postup zjištění závislosti mezi měřenou veličinou a požadovanou informací. Uplatňuje se nejčastěji v instrumentální analýze, když se z velikosti měřeného signálu hledá odpovídající obsah stanovované složky (analytu).

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

2.3.3 Bodové odhady

K vyhodnocení dat byly použity⁵³:

Aritmetický průměr:

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

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

Odhad směrodatné odchylky:

Nejlepší mírou přesnosti série paralelních stanovení je odhad směrodatné odchylky. Určuje se jako odmocnina čtverců odchylek děleného počtem měření, které je zmenšeno o jednu (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.

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

2.3.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez důkazu a mez stanovitelnosti jsou základní charakteristiky metody stopové analýzy pro její použití při kvalitativní resp. kvantitativní analýze. Kvalitativně lze prokázat pouze takové množství analytu, které odpovídá minimálnímu signálu, právě rozlišitelnému od šumu nulového vzorku nebo slepého pokusu y_0 .

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 (3σ) signálu nulového vzorku⁵².

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 (10σ) signálu nulového vzorku.

Prakticky se mez detekce a mez stanovitelnosti určuje takto: za podmínek konkrétní spektrometrické metody se změří desetkrát nejtěsněji za sebou signál téhož nulového vzorku a vypočítá se standardní směrodatná odchylka σ v tomto souboru měření. Současně se sestrojí kalibrační přímka pro uvažované vzorky v oboru nízkých koncentrací a mez detekce, resp. mez stanovitelnosti se určí z této přímky jako koncentrace analytu odpovídající signálu 3σ resp. 10σ .

3 Experimentální část

3.1 Stanovení derivátů fenothiazinu fotočkovou oxidací

3.1.1. Přístrojové vybavení

- peristaltická pumpa firmy Cole-Parmer (Chicago, USA)
- dávkovací ventil 5125 (Rheodyne, USA)
- hadičky Tygon (Cole Parmer) různých průměrů pro čerpání kapalin
- smyčky pro dávkování příslušného objemu vzorku (100 μl ; 250 μl ; 500 μl ; 1000; μl) tvořené teflonovými kapilárami vnitřního průměru 0,5 mm.
- fotoreaktor - tvořen teflonovou kapilárou (Supelco, USA) vnitřního průměru 0,5mm a délky (1-3m), která je šroubovicovitě obtočena kolem nízkotlaké, 8W rtuťové výbojky. Kapilára je udržována v konstantní vzdálenosti od výbojky díky křemenné trubici připevněné na výbojce a pomocí plastových distančních sloupků.
- plastová injekční stříkačka
- Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 (Aminco, USA) jako detektor, vybavený průtokovou křemennou kyvetou o vnitřním objemu 110 μl a tloušťky absorbující vrstvy 1 cm.

3.1.2 Použité chemikálie

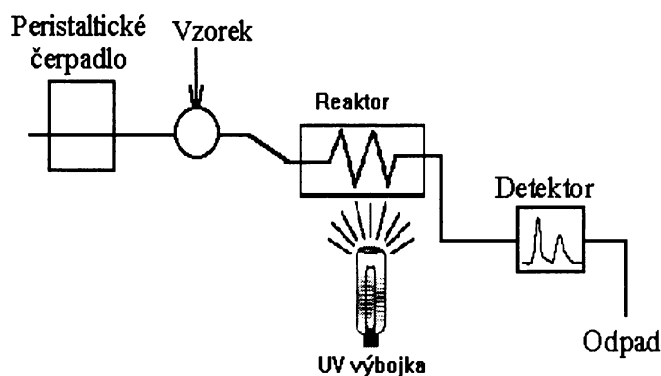
- Chlorpromazin hydrochlorid: Základní roztok o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,1777 g chlorpromazin hydrochloridu (LPC Chemical Dyes; $M_r = 355,47$) v deionizované vodě a doplněním na objem 100 ml. Roztok byl skladován v chladu a chráněn před světlem.
- Diethazin hydrochlorid: Základní roztok o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,1674 g diethazinu hydrochloridu (Léčiva; $M_r = 334,91$) v deionizované vodě a doplněním na objem 100 ml. Roztok skladován v chladu a za

světla.

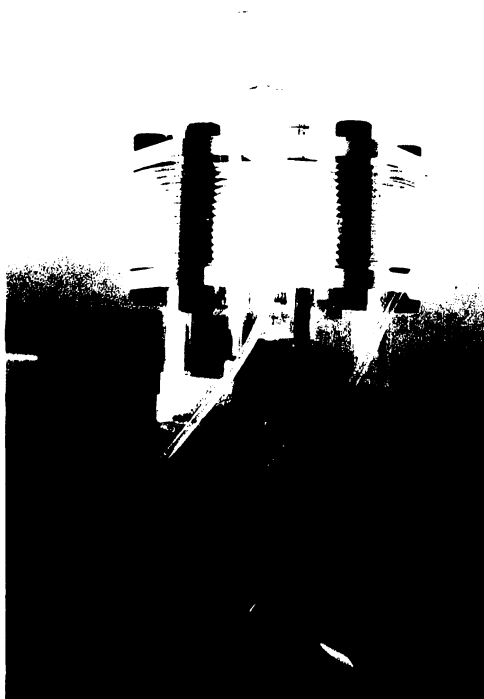
- Kyselina chlorovodíková 37% (Merck, SRN)
- Hydroxid sodný (Lachema Brno; $M_r = 39,99$)
- Lékové formy: Pflgomazin (Egis Pharmaceuticals; Budapešť; Hungary)
 - Červené tablety: 20 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě
 - Žluté tablety: 100 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě
- Deparkin (Léčiva, Praha; 50 mg diethazin hydrochloridu v 1 tabletě)

3.1.3 Popis zapojení aparatury

Pro stanovení derivátů fenothiazinu fotochemickou oxidací byla použita klasická aparatura pro průtokovou injekční analýzu (obr.6). Pomocí dvoupolohového ventilu s vyměnitelnou smyčkou je do proudu nosného toku (deionizované vody) nadávkován roztok derivátu fenothiazinu v kyselině chlorovodíkové. V reakční cívce fotoreaktoru vzniká po absorpci UV záření, emitovaného nízkotlakou rtuťovou výbojkou ($\lambda_{em} = 254$ nm), barevný radikálkationt, produkt fotooxidace.



Obr. 6: Aparatura pro FIA stanovení fenothiazinových derivátů po jejich fotochemické oxidaci



Obr. 7: Fotoreaktor – nízkotlaká rtuťová výbojka s křemennou trubicí a teflonovou kapilárou.

3.2 Stanovení derivátů fenothiazinu chemickou oxidací

3.2.1 Přístrojové vybavení

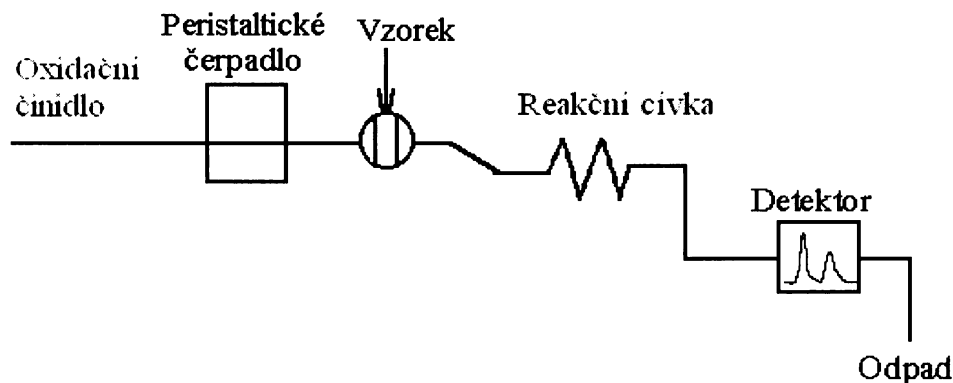
- peristaltická pumpa firmy Cole-Parmer (Chicago, USA)
- dávkovací ventil 5125 (Rheodyne, USA)
- hadičky Tygon (Cole Parmer) různých průměrů pro čerpání kapalin
- smyčky pro dávkování příslušného objemu vzorku (100 μ l; 250 μ l; 500 μ l; 1000; μ l) tvořené teflonovými kapilárami vnitřního průměru 0,5 mm.
- reakční cívka tvořena teflonovými kapilárami různých délek (20 cm; 40 cm; 60 cm; 80 cm; 100 cm)
- plastová injekční stříkačka
- Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 (Aminco, USA) jako detektor, vybavený průtokovou křemennou kyvetou o vnitřním objemu 110 μ l a tloušťky absorbující vrstvy 1 cm.

3.2.2 Použité chemikálie

- Chlorpromazin hydrochlorid: Základní roztok o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,1777 g chlorpromazin hydrochloridu (LPC chemical Dyes; $M_r = 355,47$) v deionizované vodě a doplněním na objem 100 ml. Roztok byl skladován v chladu a chráněn před světlem.
- Diethazin hydrochlorid: Základní roztok o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,1674 g diethazinu hydrochloridu (Léčiva; $M_r = 334,91$) v deionizované vodě a doplněn na objem 100 ml. Roztok byl také skladován v chladu a chráněn před světlem.
- Síran ceričitý $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$: základní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 3,3210 g síranu ceričitého (Laborchemie Apolla) a doplněním na objem 100 ml.
- Manganistan draselný KMnO_4 : základní roztok o koncentraci $6 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 5g manganistanu draselného (Lachema; Brno) a doplněním na objem 500ml.
- Kyselina sírová (Merck; SRN)
- Lékové formy: Pflgomazin (Egis Pharmaceuticals; Budapešť; Hungary)
 - Červené tablety: 20 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě
 - Žluté tablety: 100 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě
 - Deparkin (Léčiva, Praha; 50 mg diethazin hydrochloridu v 1 tabletě)

3.2.3 Použitá aparatura

Pro stanovení derivátů fenothiazinu po jejich předchozí chemické oxidaci byla použita opět aparatura pro průtokovou injekční analýzu, která se od aparatury pro fotochemické stanovení liší absencí fotoreaktoru. Roztok vzorku je injektován přímo do proudu reagentu - oxidantu, který obsahuje roztok síranu ceričitého nebo manganistanu draselného v kyselině sírové. V reakční cívce vzniká produkt chemické oxidace, jímž je barevný radikálkation, který je detekován v průtokové kyvetě spektrofluorimetru.



Obr. 8: Aparatura průtokové injekční analýzy pro stanovení fenothiazinových derivátů chemickou oxidací

Absorbční spektra fenothiazinových derivátů byla měřena na spektrofotometru HP-8453 (Hewlet Packard, USA) s diodovým polem a zpracována v softwaru UV-VIS Chem ver. A.09.

3.3 Stanovení derivátů fenothiazinu elektrochemickou oxidací

3.3.1 Přístrojové vybavení

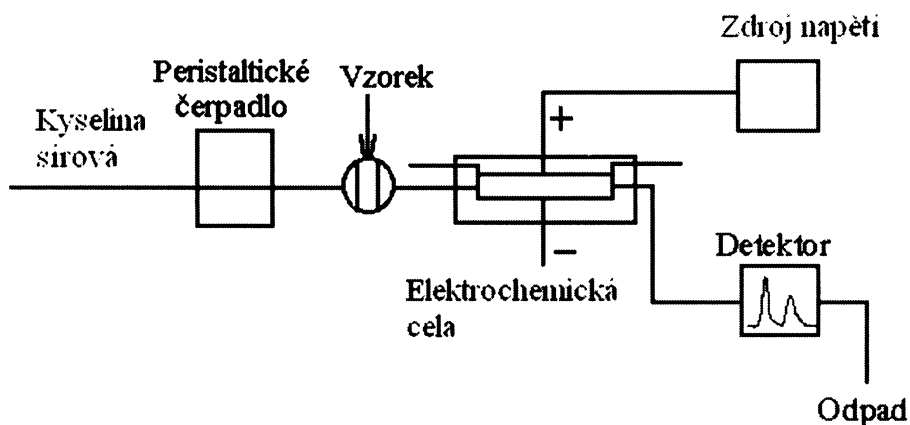
- peristaltická pumpa firmy Cole-Parmer (Chicago, USA)
- dávkovací ventil 5125 (Rheodyne, USA)
- hadičky Tygon (Cole Parmer) různých průměrů pro čerpání kapalin
- smyčky pro dávkování příslušného objemu vzorku (100 μl ; 250 μl ; 500 μl ; 1000 μl) tvořené teflonovými kapilárami vnitřního průměru 0,5 mm
- elektrochemická cela vnitřního objemu 0,3 ml se dvěma platinovými elektrodami a nafionovou membránou oddělující katodový a anodový prostor (viz. obr. 10)
- zdroj konstantního proudu LPS 303 (American Reliance, Taiwan)
- plastová injekční stříkačka
- Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 (Aminco, USA) jako detektor, vybavený průtokovou křemennou kyvetou o vnitřním objemu 110 μl a tloušťky absorbující vrstvy 1 cm.

3.3.2 Použité chemikálie

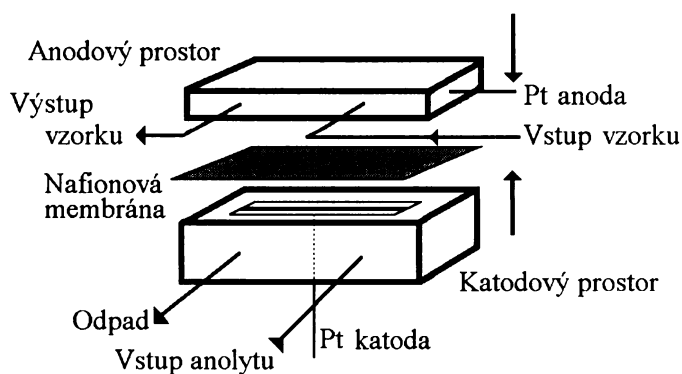
- Chlorpromazin hydrochlorid: Základní roztok o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,1777g chlorpromazin hydrochloridu (LPC Chemical Dyes; $M_r = 355,47$) v deionizované vodě a doplněním na objem 100ml. Roztok byl skladován v chladu a chráněn před světlem.
- Diethazin hydrochlorid : Základní roztok o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,1674 g diethazinu hydrochloridu (Léčiva; $M_r = 334,91$) v deionizované vodě a doplněn na objem 100 ml. Roztok byl také skladován v chladu a chráněn před světlem.
- Kyselina sírová: Základní roztok o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven naředěním (2,78 ml v 500 ml deionizované vody) koncentrované kyseliny sírové (95-97%; Merck).
- Lékové formy: Pflugomazin (Egis Pharmaceuticals; Budapešť; Hungary)
 - Červené tablety: 20 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě
 - Žluté tablety: 100 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě
 - Deparkin (Léčiva, Praha; 50 mg diethazin hydrochloridu v 1 tabletě)

3.3.3 Použitá aparatura

Pro stanovení derivátů fenothiazinu metodou průtokové injekční analýzy s elektrochemickou oxidací je v aparatuře umístěna elektrochemická cela, v jejímž prostoru dochází k oxidaci derivátu na barevný radikálkation. Napětí pro oxidaci derivátu je vkládáno na celu pomocí potenciostatu. Pro elektrochemickou oxidaci byl volen potenciál, při kterém dochází k oxidaci fenothiazinového derivátu pouze do prvního stupně (tj. na radikálkation).



Obr. 9: *Aparatura pro FIA stanovení fenothiazinových derivátů po jejich elektrochemické oxidaci*



Obr. 10: *Detailní schéma použité elektrochemické cely*

Cyklická voltametrie

Měření bylo realizováno na přístroji Eko-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, ČR) se sběrem dat softwarem Polar Pro v. 2.0 (Polaro-Sensors, ČR). Zapojení bylo dvouelektrodové. Jako elektrod bylo použito platinových plíšků rozměrů $1,5 \times 0,5$ cm. Měření probíhalo v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny sírové při laboratorní teplotě.

3.4 Stanovení chlorpromazinu a diethazinu ve farmaceutických přípravcích

3.4.1 Postup přípravy

Obsah chlorpromazinu byl stanoven v tabletách Pflegomazin (25 mg/tableta; 100 mg/tableta) a obsah diethazinu v tabletách Deparkinu (50 mg/tableta). Nejprve bylo zváženo pět tablet každého přípravku a z jejich hmotnosti potom vypočtena průměrná hmotnost tablety. Ve třecí byly misce rozetřeny vždy 3 tablety od každého přípravku na jemný prášek a naváženo množství odpovídající vždy cca. průměrné hmotnosti jedné tablety. Rozetřený prášek byl rozpuštěn v 10 ml deionizované vody a umístěn na 5 min do ultrazvukové lázně pro dokonalé rozpuštění aktivní látky. Takto připravené roztoky (suspenze) byly filtrovány v nálevce přes vatou do 25ml odměrné baňky. Doplněné odměrky s čirým roztokem byly skladovány v chladu a tmě.

Následně byly z těchto roztoků připraveny jejich naředěním roztoky o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Tyto roztoky byly poté analyzovány. Celkem byly k analýze použity vždy dva vzorky Pflegomazinu (100 mg/tab.), 2 vzorky Pflegomazinu (25 mg/tab.) a 2 vzorky Deparkinu (50 mg/tab.).

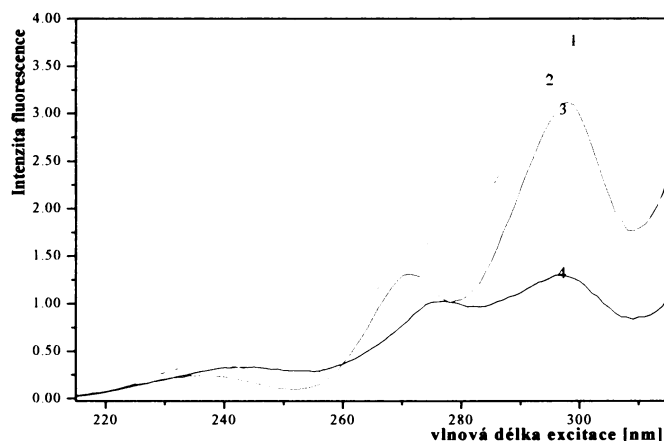
4 Výsledky a diskuse

4.1 Spektrofluorimetrické stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci technikou FIA

Stanovení je založeno na oxidaci derivátů fenothiazinu UV zářením, které je emitováno nízkotlakou rtuťovou výbojkou na červený (chlorpromazin) nebo růžový (diethazin) radikalkationt, který poskytuje výraznou fluorescenci. Roztok derivátu v HCl je injektován do nosného proudu a v reakční cívce fotoreaktoru vzniká po absorpci UV záření zmíněný radikalkation. Ten je poté spektrofluorimetricky detekován.

Experimenty ve stacionárním uspořádání

Nejprve byla proměřena ve stacionárním uspořádání fluorescenční excitační a fluorescenční emisní spektra chlorpromazinu a diethazinu. Dále pak byla proměřena spektra příslušných radikalkationtů. Tato měření byla nutná ke zjištění vhodných excitačních a emisních vlnových délek pro detekci v průtokovém uspořádání. Prakticky byla proměřena spektra obou derivátů před ozářením a po 70 minutovém přímém ozáření rtuťovou výbojkou.

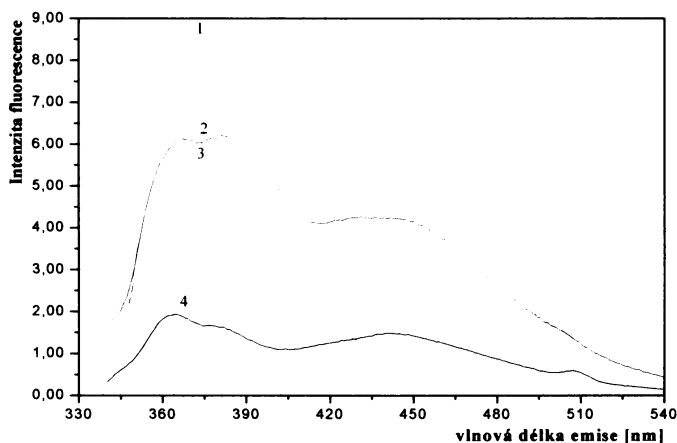


Obr. 11: Fluorescenční excitační spektra

$c_{\text{chlorpromazinu(diethazinu)}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $U_{\text{detektoru}} = 650 \text{ V}$; $v_{\text{scanu}} = 5 \text{ nm/s}$; 1 - chlorpromazin po 70 min ozáření. 2 - diethazin po 70 min ozáření. 3 - diethazin před ozářením. 4 - chlorpromazin před ozářením.

Na základě změřených excitačních spekter (obr. 11) je vidět, že nejlepší je zvolit excitační vlnovou délku maximálně $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$. Pro další experimenty však byla nakonec zvolena excitační vlnová délka $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$.

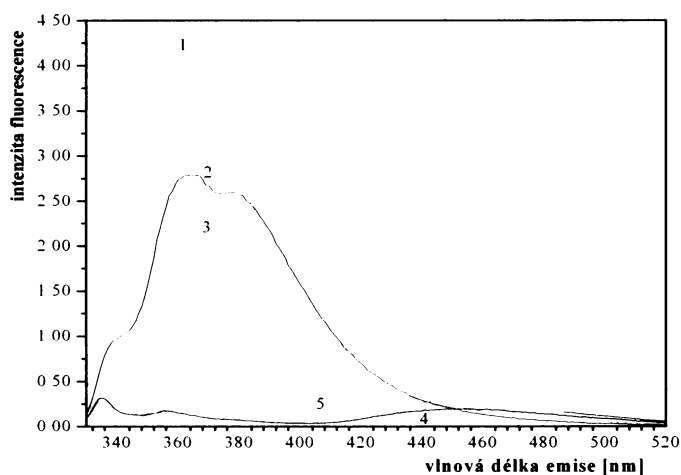
V emisních fluorescenčních spektrech (obr.12) jsou před ozářením dobře patrné píky při 450 nm, které odpovídají přirozené fluorescenci chlorpromazinu a diethazinu. Po ozáření jsou pak při 360 nm viditelné píky barevných radikalkationtů. Pro detekci byla nakonec vybrána emisní vlnová délka $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.



Obr. 12: Fluorescenční emisní spektra

$c_{\text{chlorpromazinu(diethazinu)}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$; $v_{\text{scanu}} = 5 \text{ nm/s}$; 1 - diethazin po 70 min ozáření. 2 - diethazin před ozářením. 3 - chlorpromazin po 70 min ozáření. 4 - chlorpromazin před ozářením.

Z literatury⁶⁶⁻⁷² je známo, že radikalkationt je stabilní v kyselém prostředí, proto byla dále sledována(obr.13) závislost intenzity fluorescence radikalkationtu koncentraci HCl v roztoku.



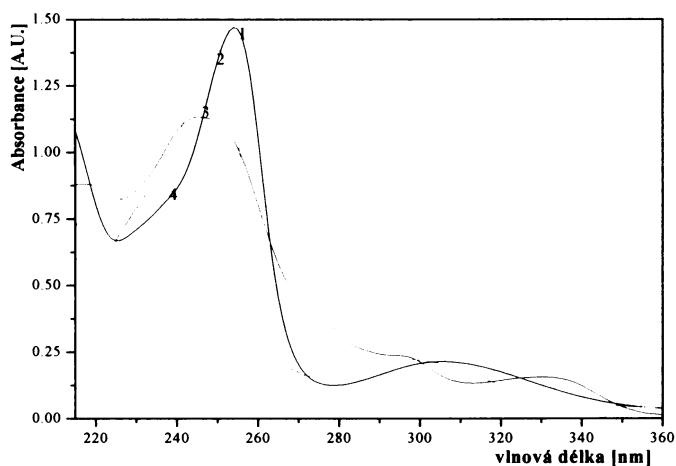
Obr. 13: Vliv koncentrace HCl v roztoku na intenzitu fluorescence vzniklého radikalkationtu chlorpromazinu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$; $U_{\text{detektoru}} = 650 \text{ V}$; $v_{\text{scanu}} = 5 \text{ nm/s}$; 1 - H_2O . 2 - $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HCl}$. 3 - $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HCl}$. 4 - $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HCl}$. 5 - $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HCl}$.

Z obrázku je patrné, že nejvyšší fluorescence je pozorována v roztocích s nízkou koncentrací HCl.

Pro kontrolu, že při fotooxidaci skutečně vzniká radikalkation, byly proměřeny absorpční spektra obou derivátů i jejich fotooxidačních produktů. Z absorpčních spekter (obr.14) vyplývá, že fotooxidačními produkty jsou opravdu radikalkationty.

Radikalkationty mají dvě absorpční maxima 280-300 nm v UV oblasti a 525-530 nm (chlorpromazin, diethazin) ve VIS^{23,55}.

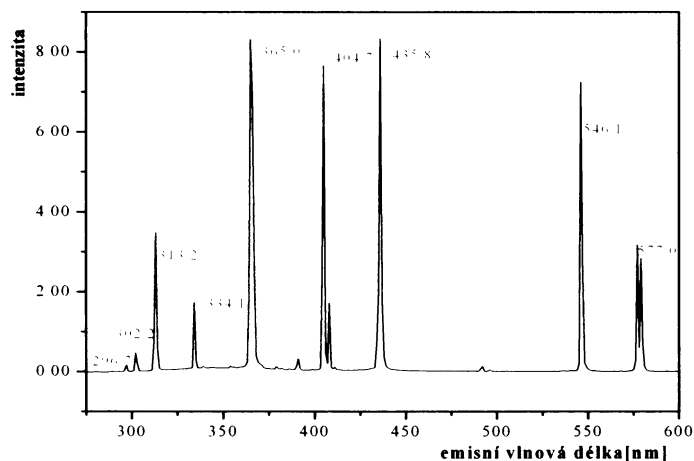


Obr. 14: Absorbční spektra

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; 1 - chlorpřomazin před ozářením. 2 - chlorpřomazin po 70 min ozářením. 3 - diethazin před ozářením. 4- diethazin po 70 min ozářením.

Emisní spektrum použité nízkotlaké rtuťové výbojky

Pro charakterizaci použité rtuťové výbojky bylo proměřeno její emisní spektrum (obr.15), ve kterém převládají emisní čáry v UV oblasti.



Obr. 15: Emisní spektrum nízkotlaké rtuťové výbojky

$U_{\text{detektoru}} = 250 \text{ V}$; $v_{\text{scanu}} = 5 \text{ nm/s}$

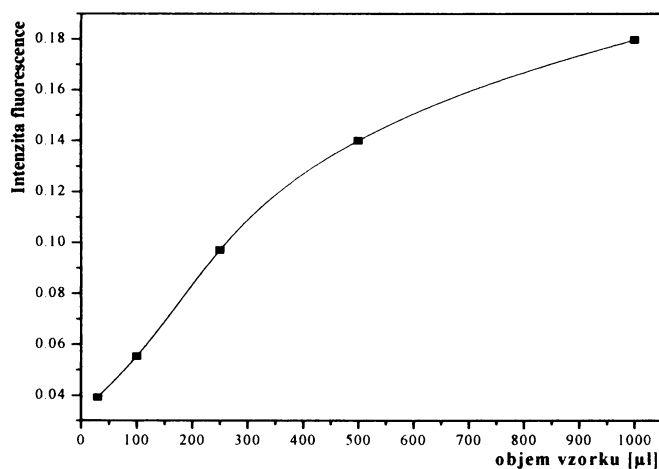
4.1.1 Optimalizace podmínek průtokového stanovení

Po nalezení vhodných detekčních podmínek ve stacionárním uspořádání bylo přistoupeno k optimalizaci vlastního průtokového stanovení. Při optimalizačních experimentech byla vždy vyhodnocována výška analytického FIA píku.

Velikost fluorescenčního signálu při FIA stanovení s fotooxidací obecně ovlivňuje několik parametrů. Především je to průtoková rychlost nosného toku, objem vzorku, délka reakční cívky a s tím související doba ozáření, koncentrace HCl a teplota.

Optimalizační měření byla prováděna na aparatuře zapojené podle obr.6. Zjištěné průtokové podmínky pro stanovení chlorpromazinu pak byly aplikovány i pro stanovení diethazinu. Experimenty byly prováděny s roztokem chlorpromazinu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Excitační vlnová délka byla $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$ a emisní vlnová délka $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.

Nejprve byl proměřen vliv dávkovaného objemu chlorpromazinu na velikost intenzity fluorescenčního signálu vzniklého radikalkationtu (obr. 16).



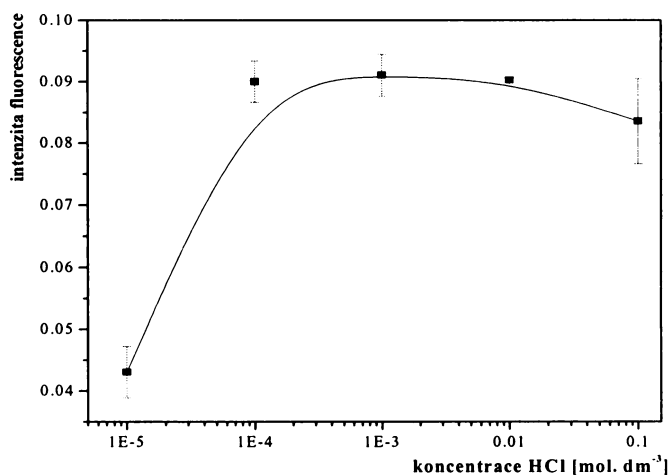
Obr. 16: Vliv dávkovaného objemu chlorpromazinu na intenzitu fluorescenčního signálu radikalkationtu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $v_{\text{H}_2\text{O}} = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $l_{\text{cívky}} = 1 \text{ m}$; $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$

Přestože se intenzita fluorescenčního signálu se zvětšujícím objemem vzorku stále zvyšuje, byla jako kompromis mezi dosaženou citlivostí a rozmytím píku zvolena jako výsledná hodnota 250 µl.

výsledná hodnota 250 μl .

Citlivost stanovení je ovlivněna, jak je patrné již z proměřených spekter (obr. 13), i koncentrací HCl v nosném proudu. Proto byl její vliv proměřen také v průtokovém uspořádání (obr. 17).

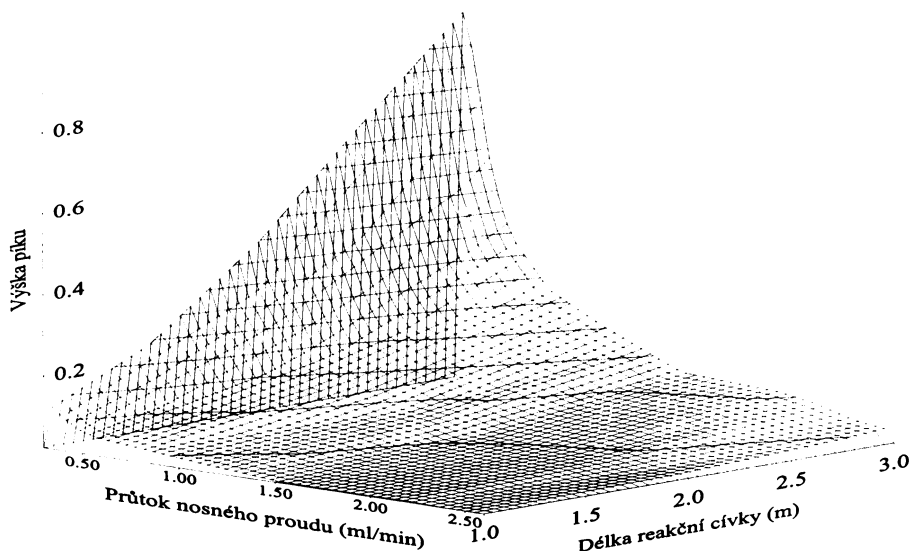


Obr. 17: Vliv koncentrace HCl na intenzitu fluorescence radikalkationtu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol. dm}^{-3}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \mu\text{l}$; $v_{\text{H}_2\text{O}} = 0,5 \text{ ml. min}^{-1}$; $l_{\text{civky}} = 1 \text{ m}$; $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$

Z této závislosti vyplývá, že nejvýhodnější je použít koncentraci HCl $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol. dm}^{-3}$.

Následně byl proměřen vliv průtokové rychlosti při různých délkách PTFE cívky (obr. 18.).



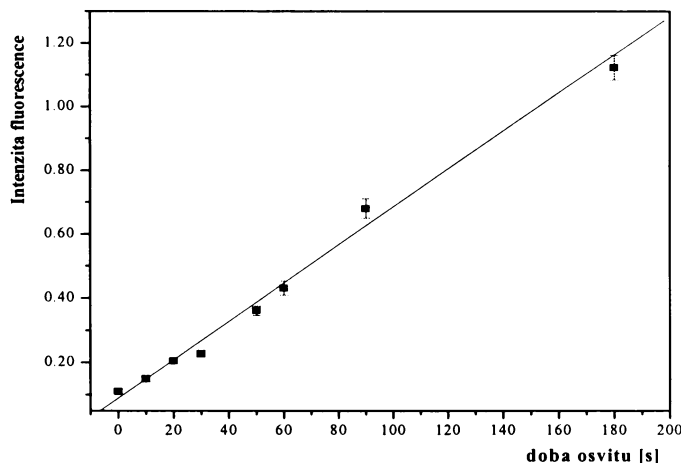
Obr. 18: Vliv průtokové rychlosti nosného proudu a délky reakční cívky na intenzitu fluorescence radikalkationtu

$C_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \text{ } \mu\text{l}$; $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.

Z výše uvedené závislosti je patrné, že pro nejúčinnější fotooxidaci je vhodné použít nejnižší průtokovou rychlost v kombinaci s nejdelší cívkou. Píky jsou však při příliš nízkých průtokových rychlostech nosného proudu již značně rozmyté a výbojka zároveň produkuje značné množství tepla, takže v souvislém toku kapaliny se začínají tvořit bublinky plynné fáze.

Z grafu je ale zřejmé, že ani při použití nejnižší průtokové rychlosti v kombinaci s nejdelší cívkou nebylo dosaženo maximální citlivosti stanovení. Proto jsem přistoupila při vypracování stanovení k metodě zastavování průtoku nosného proudu.

Ze znalosti délky použité PTFE reakční cívky, průtokové rychlosti, celkové doby analýzy, délky a vnitřního průměru hadiček vedoucích od fotoreaktoru do průtokové kyvety detektoru byla vypočtena doba, za kterou prostředek nadávkované zóny vzorku dorazí zhruba do poloviny délky reakční cívky fotoreaktoru (40s). V tomto momentě byl vždy průtok na různě dlouhou dobu zastavován. Odpovídající proměřená závislost je zobrazena na obr. 19.

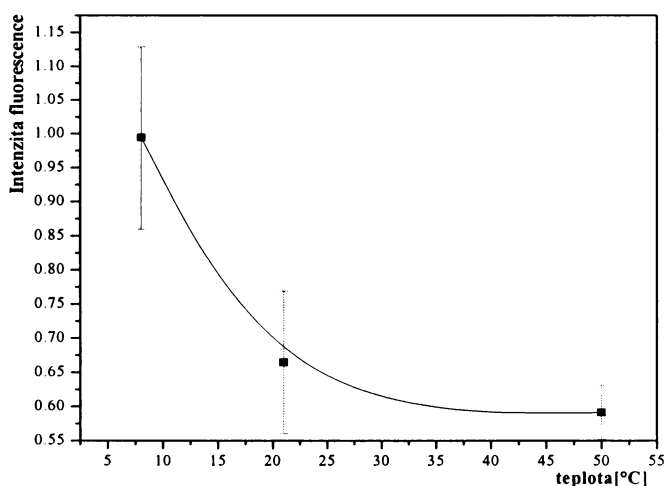


Obr. 19: Vliv doby osvitu na intenzitu fluorescence radikalkationtu.

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \text{ } \mu\text{l}$; $v_{\text{H}_2\text{O}} = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$; $l_{\text{civky}} = 1 \text{ m}$; $t_{\text{zastaveni}} = 40 \text{ s}$; $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.

Na základě uvedené závislosti byla zvolena doba osvitu 180 s jako kompromis mezi dosaženou citlivostí a dobou analýzy.

Významný vliv na citlivost fluorimetrického stanovení má obecně i teplota. Byl proto proměřen její vliv na intezitu signálu. Vzorčky derivátu a zásobní roztoky nosného proudu byly předem vytemperovány na požadovanou teplotu a bezprostředně poté bylo provedeno měření.



Obr. 20: Vliv teploty na intenzitu fluorescence vzniklého radikalkationtu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \text{ } \mu\text{l}$; $v_{\text{H}_2\text{O}} = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$; $l_{\text{civky}} = 2 \text{ m}$; $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.

Podle předpokladu fluorescenční signál s rostoucí teplotou klesá, protože vyšší

teplota urychluje oxidační proces a snižuje tak stabilitu vzniklého radikálkationtu (1. oxidační stupeň). Zároveň se se zvyšující se teplotou fluorescence snižuje vlivem růstu pravděpodobnosti kolizních deaktivací excitovaných molekul.

V dalších experimentech však bylo dále pracováno za laboratorní teploty, protože trvalé termostatování celého systému na nižší teplotu by bylo obtížně realizovatelné a dosažené zvýšení citlivosti by neodpovídalo vloženému úsilí.

Výsledné optimální parametry pro FIA fluorimetrické stanovení chlorpromazinu fotochemickou oxidací na radikálkation jsou uvedeny v Tab. 3:

Tab. 3 Optimální parametry pro FIA fluorimetrické stanovení chlorpromazinu po fotooxidaci na radikálkation

Parametr	Vybraná hodnota	
	Zastavování průtoku	Bez zastavování průtoku
<i>typ stanovení</i>		
objem vzorku, μl	250	250
koncentrace HCl, $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
průtoková rychlost, $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$	1,1	0,3
délka reakční cívky, m	1	3
doba oxidace, s	180	0
excitační vlnová délka, nm	254	254
emisní vlnová délka, nm	360	360

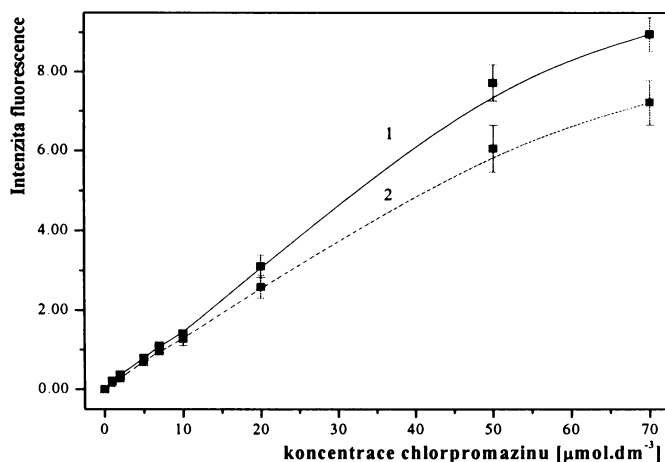
4.1.2 Kalibrační závislost pro stanovení chlorpromazinu fotooxidací

Za zjištěných optimálních podmínek pro stanovení chlorpromazinu v modu zastavovaného i nezastavovaného průtoku byly proměřeny odpovídající kalibrační závislosti (obr. 21) při napětí fotonásobiče 800V. Obě kalibrační závislosti byly proměřeny ve stejném koncentračním rozsahu $0 - 70 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($0 - 24,63 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Z kalibračních závislostí je vidět, že křivka pro zastavovaný průtok je lineární v rozmezí: mez stanovitelnosti – $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (mez stanovitelnosti – $17,74 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Z rovnice přímkové části kalibrace ($R = 0.9993$) byla určena citlivost metody: $0,123 \text{ dm}^3\cdot\mu\text{mol}^{-1}$. Křivka pro nezastavovaný průtok je opět lineární v rozmezí: mez

stanovitelnosti – $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (mez stanovitelnosti – $17,74 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Koeficient spolehlivosti přímkové části kalibrace je 0,9996 a citlivost $0,154 \text{ dm}^3 \mu\text{mol}^{-1}$.



Obr. 21: Kalibrační závislosti pro stanovení chlorpromazinu fotooxidací

1 – bez zastavování průtoku: $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \mu\text{l}$; $v_{\text{H}_2\text{O}} = 0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; $l_{\text{civky}} = 3 \text{ m}$; $U_{\text{detektoru}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.

2 – zastavovaný průtok: $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \mu\text{l}$; $v_{\text{H}_2\text{O}} = 1,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; $l_{\text{civky}} = 1 \text{ m}$; $t_{\text{osvitu}} = 180 \text{ s}$; $U_{\text{detektoru}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.

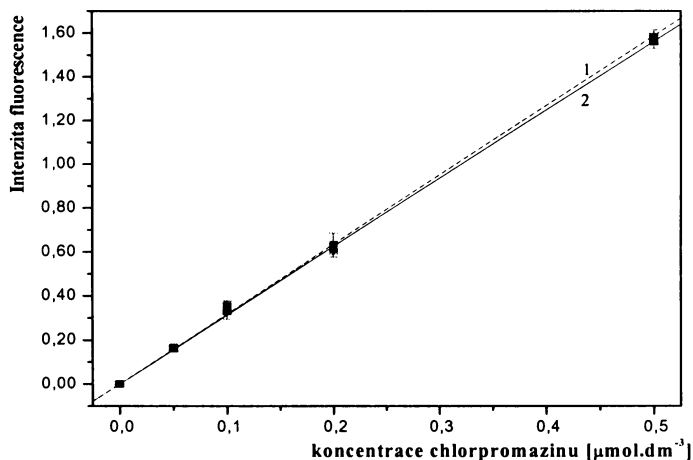
4.1.3 Charakteristiky FIA stanovení chlorpromazinu fotooxidací

Pro zjištění opakovatelnosti byla použita koncentrace chlorpromazinu v lineární části kalibrační závislosti - $20 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Významným parametrem, který ovlivňuje citlivost fluorimetrického stanovení, je zvolené napětí fotonásobiče spektrofluorimetru. S rostoucí hodnotou napětí se zvyšuje intenzita fluorescenčního signálu (tj. roste citlivost), ale také se zvyšuje i šum detektoru (tedy i šum měření a tím pádem se zhoršuje mez detekce a mez stanovitelnosti).

Proto byla při určení meze detekce a meze stanovitelnosti nastavena hodnota napětí na 1000V a byly proměřeny dvě kalibrační závislosti (obr. 22) v oblasti nízkých, ještě měřitelných koncentrací chlorpromazinu, $0 - 0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($0 - 0,18 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Meze detekce a meze stanovitelnosti byly také určeny z výše uvedených kalibračních závislostí. Při napětí 1000V již nebylo možné proměřit kalibrační závislosti v tomtéž koncentračním rozsahu tj. ($0 - 70 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) jako při napětí 800V, protože by signál překročil maximální měřitelnou hodnotu.

překročil maximální měřitelnou hodnotu.



Obr. 22: Kalibrační závislosti pro určení mezí detekce a mezí stanovitelnosti při napětí detektoru 1000V

1 – bez zastavování průtoku: $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \mu\text{l}$; $v_{\text{H}_2\text{O}} = 0,3 \text{ ml.min}^{-1}$; $l_{\text{civky}} = 3 \text{ m}$; $U_{\text{detektoru}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.

2 – zastavovaný průtok: $c_{\text{HCl}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \mu\text{l}$; $v_{\text{H}_2\text{O}} = 1,1 \text{ ml.min}^{-1}$; $l_{\text{civky}} = 1 \text{ m}$; $t_{\text{osvitu}} = 180 \text{ s}$; $U_{\text{detektoru}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$.

Tab. 4 Charakteristiky FIA fluorimetického stanovení chlorpromazinu po jeho fotooxidaci

Parametr <i>typ stanovení</i>	Hodnota			
	<i>Zastavovaný průtok</i>		<i>Nezastavovaný průtok</i>	
U, V	800V	1000V	800V	1000V
citlivost, $\text{dm}^3 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$	0,1230	3,1225	0,1543	3,1744
koeficient spolehlivosti	0,9993	0,9999	0,9996	0,9997
opakovatelnost, %	3,54	3,20	6,08	5,32
LDR, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	0,081-17,74	0,017-17,74	0,031-17,74	0,087-17,74
mez detekce, $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,0690	0,0140	0,0258	0,0070
mez stanovitelnosti, $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,2290	0,0479	0,0859	0,0246
mez detekce, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	0,024	0,005	0,009	0,002
mez stanovitelnosti, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	0,081	0,017	0,031	0,087
absolutní mez detekce*, ng	6,11	1,28	2,29	0,65
absolutní mez stanovitelnosti*, ng	20,31	4,25	7,63	2,18

* dávkovaný objem 250 μl

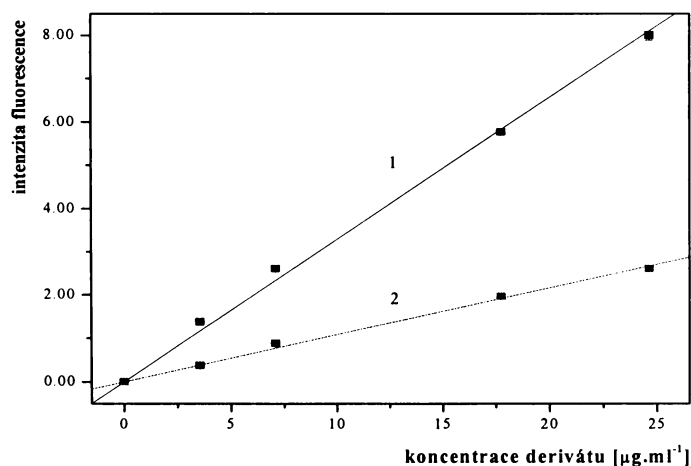
Z tabulky je zřejmé, že větší citlivosti a lepších detekčních limitů je dosaženo pokud není průtok zastavován a je použita větší hodnota napětí detektoru.

4.1.4 FIA fluorimetrické stanovení chlorpromazinu a diethazinu po jejich fotooxidaci

Ve vzorcích tablet Deparkinu a Pflegomazinu, připravených postupem uvedeným v experimentální části práce (oddíl 3.4), bylo ověřeno obsahové množství diethazinu resp. chlorpromazinu. Za zjištěných optimálních podmínek byly při nezastavovaném průtoku, u kterého bylo dosaženo větší citlivosti, proměřeny kalibrační závislosti pro oba deriváty (obr. 23).

Kalibrační závislost chlorpromazinu má směrnici $0,3286 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ a koeficient spolehlivosti 0,9983, kalibrační závislost diethazinu $0,1082 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ a koeficient spolehlivosti 0,9984. Všech šest analyzovaných vzorků bylo naředěno na přibližnou

koncentraci $5.10^{-5} \text{ mol. dm}^{-3}$ ($17,74 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$) a třikrát opakovaně proměřeno. Výsledky jsou shrnuty v Tab 5.



Obr. 23: Kalibrační závislosti chlorpromazinu a diethazinu pro jejich stanovení ve farmaceutických přípravcích

1 - kalibrační závislost chlorpromazinu; 2 - kalibrační závislost diethazinu

$v = 2 \text{ ml.min}^{-1}$; $V_{\text{vzorku}} = 250 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{\text{HCl}} = 1.10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $l_{\text{civky}} = 3 \text{ m}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$

Tab. 5 Stanovení chlorpromazinu a diethazinu ve farmaceutických přípravcích

Vzorek	nominální hodnota (mg)		nalezená hodnota (mg)	
	CPZ	DEZ	FIA metoda*	Referenční metoda†
Pflegomazin (100mg/tab.)	100,0	-	$93,02 \pm 0,74$	$96,4 \pm 0,48$
Pflegomazin (25mg/tab.)	25,0	-	$23,34 \pm 0,12$	$23,75 \pm 0,07$
Deparkin (50mg/tab.)	-	50,0	$46,31 \pm 0,39$	$49,95 \pm 0,11$

* průměr ze tří stanovení derivátu získaných technikou FIA s fotooxidací

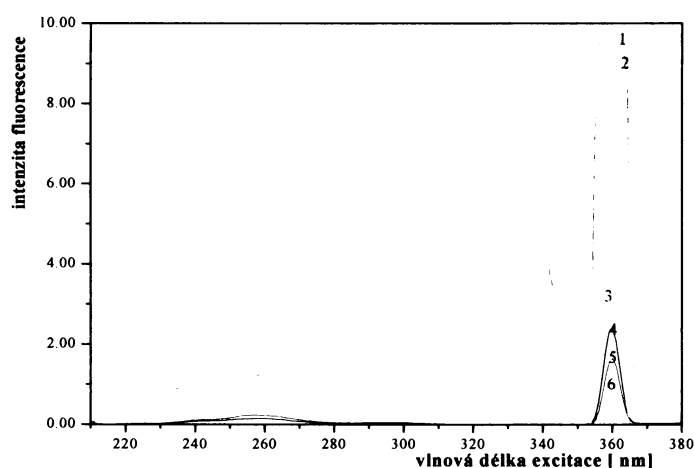
† průměr ze tří stanovení získaných spektrofotometricky v UV oblasti

4.2 FIA spektrofluorimetrické stanovení derivátů fenothiazinu po jejich chemické oxidaci

V další části diplomové práce byla místo fotooxidace vzorku derivátu sledována možnost on-line oxidace chemicky pomocí silného oxidačního činidla.

V tomto případě byl derivát injektován do proudu oxidačního činidla ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; KMnO_4) připraveného v prostředí kyseliny sírové. Také v tomto případě vzniká barevný radikalkation, který je spektrofluorimetricky detekován (ověřeno níže).

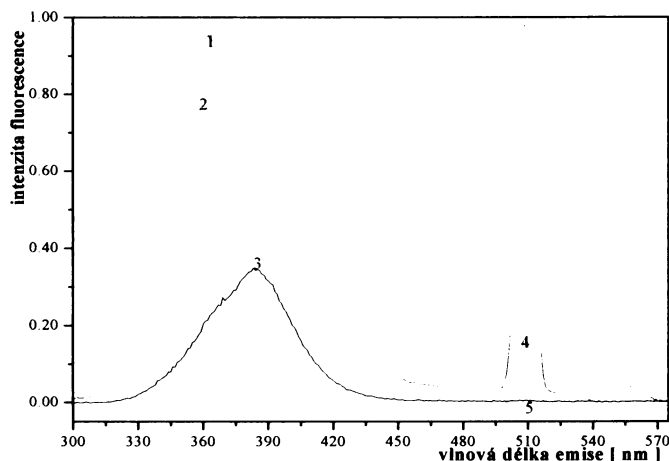
I v tomto případě bylo nutné ověřit, zda zvolené vlnové délky pro excitační i emisní monochromátor nastavené pro fotooxidaci jsou vhodné i v případě chemické oxidace. Proto byly opět ve stacionárním uspořádání proměřeny fluorescenční excitační (obr. 24) a fluorescenční emisní (obr. 25) spektra obou derivátů ve směsi s okyselenými oxidačními činidly.



Obr. 24: **Fluorescenční excitační spektra**

$\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$; $U_{detektoru} = 800 \text{ V}$; $v_{scanu} = 5 \text{ nm/s}$; 1 - $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ chlorpromazin; $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ KMnO_4 ; $1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$. 2 - $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ diethazin; $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3} \text{KMnO}_4$; $1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$. 3 - $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3} \text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. 4 - $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ chlorpromazin; $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3} \text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; $1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$. 5 - $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ diethazin; $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3} \text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; $1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$. 6 - $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3} \text{KMnO}_4$

Na základě výše uvedených fluorescenčních excitačních spekter bylo zjištěno, že excitační spektra obou derivátů se při použití různých oxidačních činidel liší. Podobně spektra obou derivátů oxidovaných jedním činidlem jsou mírně odlišná. Proto byla i v tomto případě, stejně jako v případě fotooxidace, jejichž excitační spektra jsou obdobná, zvolena pro další měření vlnová délka excitace 254 nm.



Obr. 25: Fluorescenční emisní spektra

$\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$; $U_{detektoru} = 800 \text{ V}$; $v_{scanu} = 5 \text{ nm/s}$. 1 - $1.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ chlorpromazin; $2.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ KMnO_4 ; 1 mol.dm^{-3} H_2SO_4 ; 2 - $1.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ diethazin; $2.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ KMnO_4 ; 1 mol.dm^{-3} H_2SO_4 ; 3 - $1.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ chlorpromazin; $1.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; 1 mol.dm^{-3} H_2SO_4 . 4 - $2.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ KMnO_4 . 5 - $1.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$

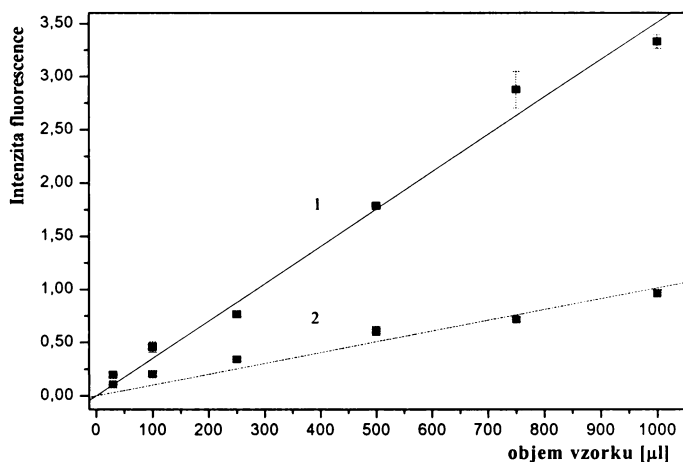
Z emisních spekter obou derivátů fenothiazinu s oběma použitými oxidačními činidly (KMnO_4 , $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) je vidět, že při chemické oxidaci jsou maxima produktů oxidace - radikalkationtů – obou derivátů nepatrně posunuta podle použitého činidla: 359 nm (KMnO_4) a 385 nm ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$). Pro další měření byly proto pro obě oxidační činidla používány uvedené různé vlnové délky.

4.2.1 Optimalizace podmínek FIA stanovení

Podobně jako v případě fotooxidace, byla i v případě chemické oxidace nejdříve provedena optimalizační měření. Byl sledován vliv objemu vzorku, průtokové rychlosti oxidačních činidel – nosného proudu, délky reakční cívky, koncentrace obou činidel a i koncentrace kyseliny sírové.

Optimalizační pokusy a následné stanovení byly prováděny na aparatuře, která je zobrazena na obr. 8. Při optimalizačních měřeních byl používán roztok chlorpromazinu o koncentraci $1.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$. Vlnové délky nastavené na spektrofluorimetru jsou: $\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} = 359 \text{ nm}$ (KMnO_4) a $\lambda_{em} = 385 \text{ nm}$ ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$).

Jako první byl u obou činidel proměřen vliv dávkovaného objemu chlorpromazinu na intenzitu fluorescenčního signálu vzniklého radikalkationtu.



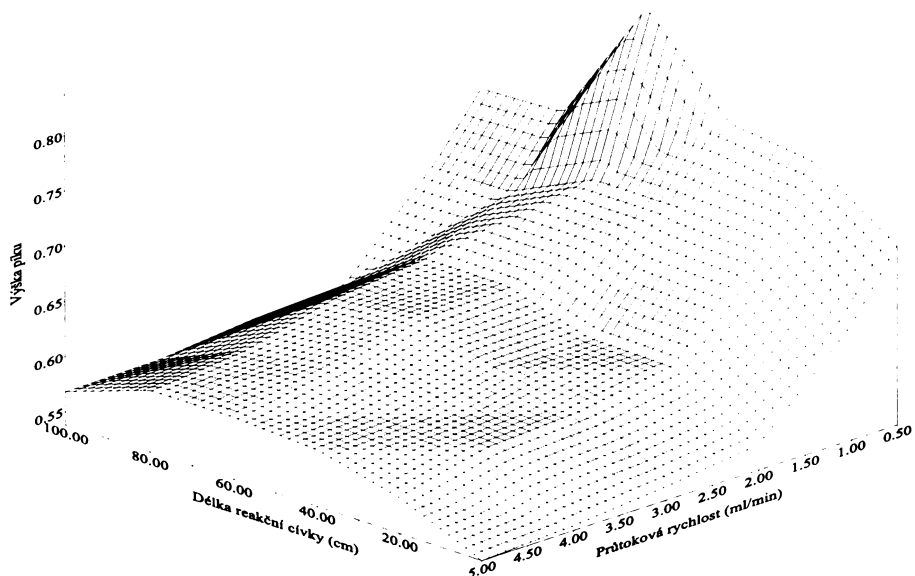
Obr. 26: Vliv dávkovaného objemu chlorpromazinu na intenzitu fluorescence radikalkationtu

1 - oxidační činidlo $Ce(SO_4)_2$: $c_{chlorpromazinu} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{Ce^{4+}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{H_2SO_4} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $l_{civky} = 60 \text{ cm}$; $U_{detektoru} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 385 \text{ nm}$
2 - oxidační činidlo $KMnO_4$: $c_{chlorpromazinu} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{MnO_4^-} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{H_2SO_4} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $l_{civky} = 60 \text{ cm}$; $U_{detektoru} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 359 \text{ nm}$

Z uvedených závislostí je patrné, že se zvyšujícím se objemem vzorku intenzita fluorescenčního signálu v obou případech v daném intervalu roste lineárně. Kompromis mezi dosaženou citlivostí a frekvencí analýzy byl pro obě činidla zvolen objem 500 μl který byl dále dávkován. Už z této závislosti plyne, že citlivost stanovení je větší za použití oxidačního činidla $Ce(SO_4)_2$.

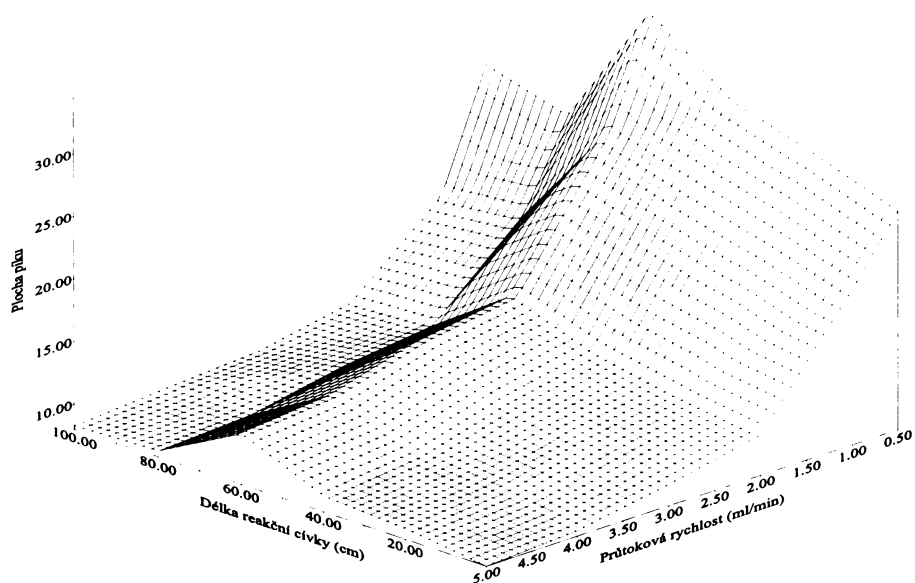
Dále byl u obou oxidačních činidel proměřen současný vliv parametrů: průtokové rychlosti a délky reakční cívky. U obou závislostí, pro oxidační činidlo Ce^{4+} (obr. 27) a pro oxidační činidlo $KMnO_4$ (obr. 28) byly vyhodnocovány plochy píků, protože v případě extrémních hodnot byly FIA píky natolik deformované že z vyhodnocených výšek nebylo možno určit optimální hodnoty obou proměřovaných parametrů.

Naměřená data byla zpracována v programu WinSurfer⁵⁴.



Obr. 27: Závislost ploch píků na délce reakční cívky a průtokové rychlosti (Ce^{4+})

$c_{chlorpromazinu} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{Ce^{4+}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{H_2SO_4} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $V_{chlorpromazinu} = 500 \mu\text{l}$ $U_{detektoru} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 385 \text{ nm}$

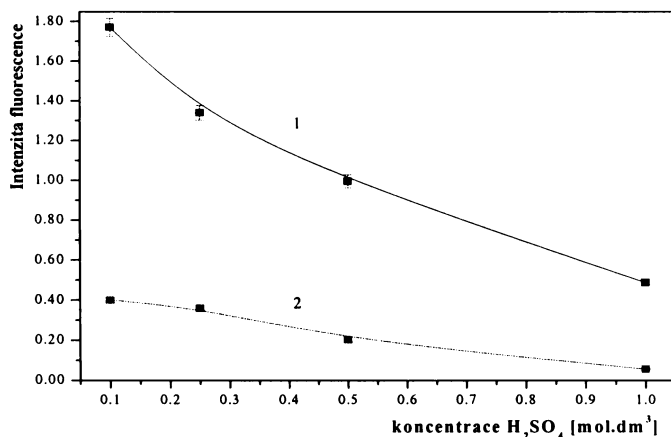


Obr. 28: Závislost ploch píků na délce reakční cívky a průtokové rychlosti ($KMnO_4$)

$c_{chlorpromazinu} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{MnO_4^-} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{H_2SO_4} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $V_{chlorpromazinu} = 500 \mu\text{l}$ $U_{detektoru} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 359 \text{ nm}$

Vyhodnocením proměřených závislostí byla určena stejná optimální hodnota průtokových rychlostí obou oxidační činidel ve směsi s H_2SO_4 : $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Při nižších průtokových rychlostech byly píky značně rozmyté a zároveň by se výrazně prodloužila doba analýzy. V obou případech pak jako optimální byla zvolena reakční cívka délky 60 cm.

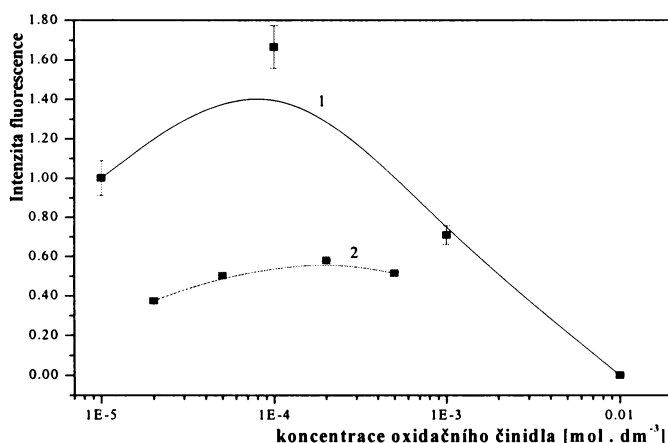
Následně byl při použití stejné koncentrace buď KMnO_4 nebo Ce^{4+} sledován vliv koncentrace přítomné H_2SO_4 na intenzitu fluorescence vznikajícího radikalkationtu .



Obr. 29: Vliv koncentrace H_2SO_4 na intenzitu fluorescence radikalkationtu

1 – oxidační činidlo $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$: $c_{\text{chlorpromazinu}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{\text{Ce}^{4+}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml. min}^{-1}$
 $l_{\text{civky}} = 60 \text{ cm}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $U_{\text{detektoru}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 385 \text{ nm}$
 2 - oxidační činidlo KMnO_4 : $c_{\text{chlorpromazinu}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{\text{MnO}_4^-} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml. min}^{-1}$
 $l_{\text{civky}} = 60 \text{ cm}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $U_{\text{detektoru}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 359 \text{ nm}$

Z proměřené závislosti vyplývá, že v případě obou oxidačních činidel je vhodná nízká koncentrace H_2SO_4 $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$.



Obr. 30: Vliv koncentrace oxidačního činidla na intenzitu fluorescence

1 – oxidační činidlo $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$: $c_{\text{chlorpromazinu}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml. min}^{-1}$
 $l_{\text{civky}} = 60 \text{ cm}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $U_{\text{detektoru}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 385 \text{ nm}$
 2 - oxidační činidlo KMnO_4 : $c_{\text{chlorpromazinu}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml. min}^{-1}$;
 $l_{\text{civky}} = 60 \text{ cm}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $U_{\text{detektoru}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 359 \text{ nm}$

Posledním proměřeným parametrem během optimalizace byly koncentrace obou

oxidačních činidel, KMnO_4 a $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, při optimálních hodnotách ostatních parametrů

Konečné optimální parametry pro stanovení chlorpromazinu chemickou oxidací na radikalkation pomocí techniky průtokové injekční analýzy jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6 Optimální parametry pro stanovení chlorpromazinu s chemickou oxidací

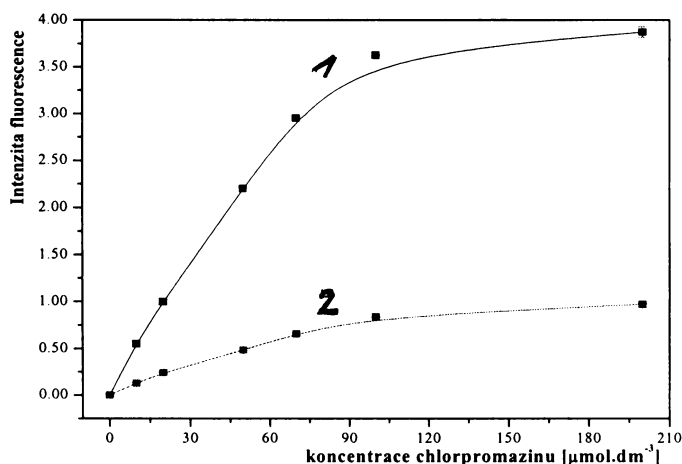
Parametr	Vybraná hodnota	
	KMnO_4	$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$
<i>oxidační činidlo</i>		
objem chlorpromazinu, μl	500	500
průtoková rychlost, $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$	2	2
délka reakční cívky, cm	60	60
koncentrace H_2SO_4 , $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,1	0,1
koncentrace oxidačního činidla, $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
excitační vlnová délka, nm	254	254
emisní vlnová délka, nm	359	385

4.2.2 Kalibrační závislosti FIA spektrofluorimetrického stanovení chlorpromazinu chemickou oxidací.

Za optimálních podmínek zjištěných v předešlé kapitole byly změřeny kalibrační závislosti pro stanovení chlorpromazinu v rozsahu $0 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($0 - 71,09 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Nejprve byly proměřeny kalibrační závislosti s použitím obou oxidačních činidel při shodné hodnotě napětí na detektoru 700V. Jelikož intenzita fluorescenčního signálu byla při použití Ce^{4+} větší než pro KMnO_4 , pro srovnání a zároveň zvýšení citlivosti stanovení s použitím KMnO_4 , byla proměřena ještě kalibrační závislost s použitím Ce^{4+} při $U_{\text{detektoru}} = 500 \text{ V}$ a s použitím KMnO_4 při $U_{\text{detektoru}} = 900 \text{ V}$.

Z kalibračních závislostí proměřených při napětí 700V (obr. 31) je vidět, že křivka v případě Ce^{4+} je lineární v rozmezí: mez stanovitelnosti – $70 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (mez stanovitelnosti – $24,63 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z rovnice přímkové části kalibrace ($R = 0,9962$) byla určena citlivost metody: $0,04356 \text{ dm}^3\cdot\mu\text{mol}^{-1}$. Křivka pro KMnO_4 je lineární ve stejném rozmezí, koeficient spolehlivosti přímkové části kalibrace je 0,9968 a citlivost $0,0096 \text{ dm}^3\cdot\mu\text{mol}^{-1}$.

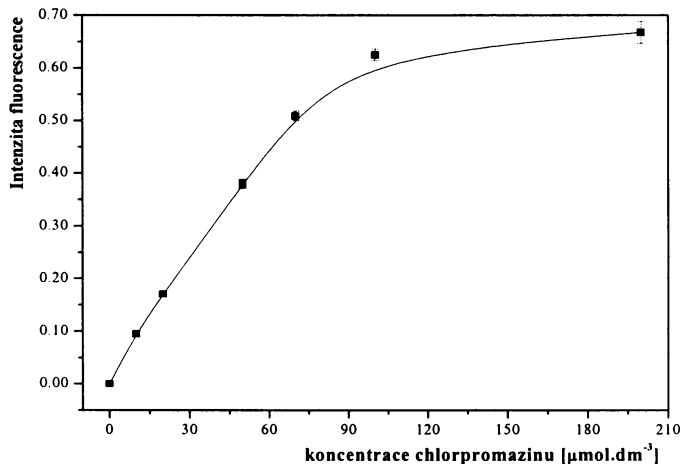


Obr. 31: Kalibrační závislosti pro stanovení chlorpromazinu chemickou oxidací při napětí detektoru 700V

1 – oxidační činidlo $Ce(SO_4)_2$: $c_{Ce^{4+}} = 1.10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{H_2SO_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml.min}^{-1}$
 $l_{civky} = 60 \text{ cm}$; $V_{chlorpromazinu} = 500 \text{ μl}$; $U_{detektoru} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 385 \text{ nm}$
2 - oxidační činidlo $KMnO_4$: $c_{KMnO_4} = 2.10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{H_2SO_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml.min}^{-1}$
 $l_{civky} = 60 \text{ cm}$; $V_{chlorpromazinu} = 500 \text{ μl}$; $U_{detektoru} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 359 \text{ nm}$

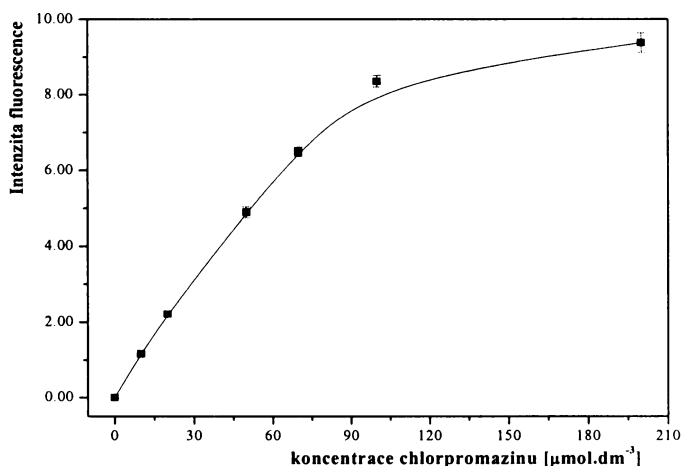
Z uvedených závislostí i zjištěných charakteristik dále vyplývá výrazně vyšší citlivosti stanovení v případě činidla $Ce(SO_4)_2$. Průběh kalibračních závislostí (tj. rychlé zakřivení) může být způsoben nedostatečnou koncentrací oxidačního činidla pro vyšší koncentrace derivátu.

Kalibrační křivky pro 500V (Ce^{4+}) a 900V ($KMnO_4$) jsou znázorněny na obr. 32 a na obr. 33. Odpovídající parametry těchto kalibrací a charakteristiky stanovení jsou shrnuty v Tab. 7.



Obr. 32: Kalibrační závislost pro stanovení chlorpromazinu oxidací $Ce(SO_4)_2$ při napětí detektoru 500V

$c_{Ce^{4+}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{H_2SO_4} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $l_{civky} = 60 \text{ cm}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$
 $U_{\text{detektoru}} = 500 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 385 \text{ nm}$



Obr. 33: Kalibrační závislosti pro stanovení chlorpromazinu oxidací $KMnO_4$ při napětí detektoru 900V

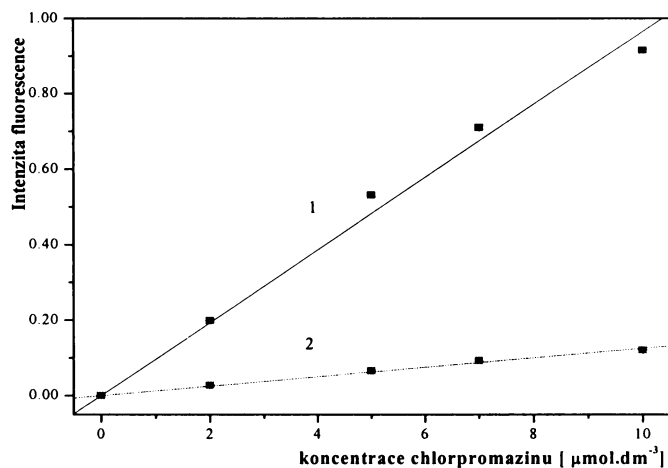
$c_{KMnO_4} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{H_2SO_4} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $l_{civky} = 60 \text{ cm}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$;
 $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 359 \text{ nm}$

4.2.3 Charakteristiky FIA spektrofluorimetrického stanovení chlorpromazinu s chemickou oxidací

Pro zjištění opakovatelnosti stanovení byla použita koncentrace chlorpromazinu z lineárních částí křivek $50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Při určení mezí detekce a mezí stanovitelnosti byly ještě proměřeny při napětí 700V dvě kalibrační závislosti (s Ce^{4+} a s $KMnO_4$) a také kalibrační závislosti při 500V (s Ce^{4+}) a při 900V ($KMnO_4$) v oblasti velmi nízkých, ještě měřitelných koncentrací chlorpromazinu, $0 - 10 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($0 - 3,55 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Na obr. 34 jsou znázorněny pro ilustraci kalibrační křivky měřené při 700V. Ve všech případech byla nejnižší dávkovaná koncentrace chlorpromazinu $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($1,78 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).



Obr. 34: Kalibrační závislosti pro určení mezí detekce a stanovitelnosti

1 – oxidační činidlo $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$: $c_{\text{Ce}^{4+}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
 $l_{\text{civky}} = 60 \text{ cm}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 385 \text{ nm}$

2 - oxidační činidlo KMnO_4 : $c_{\text{KMnO}_4} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
 $l_{\text{civky}} = 60 \text{ cm}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 359 \text{ nm}$

Tab. 7 Charakteristiky FIA stanovení chlorpromazinu s chemickou oxidací

Parametr <i>Oxidační činidlo</i>	Hodnota			
	<i>Ce (SO₄)₂</i>		<i>KMnO₄</i>	
U, V	500V	700V	700V	900V
citlivost, dm ³ .μmol ⁻¹	0,0170	0,0965	0,0125	0,1292
koeficient spolehlivosti	0,9962	0,9972	0,9968	0,9954
opakovatelnost, %	2,41	2,33	2,18	2,29
lineární dynamický rozsah, μg.ml ⁻¹	0,15-24,63	0,12 -24,63	0,13-24,63	0,14-35,55
mez detekce, μmol.dm ⁻³	0,11	0,12	0,13	0,10
mez stanovitelnosti, μmol.dm ⁻³	0,43	0,33	0,38	0,40
mez detekce, μg.ml ⁻¹	0,05	0,03	0,04	0,04
mez stanovitelnosti, μg.ml ⁻¹	0,15	0,12	0,13	0,14
absolutní mez detekce*, ng	23,20	17,40	20,20	21,40
absolutní mez stanovitelnosti*, ng	57,90	77,20	67,40	71,40

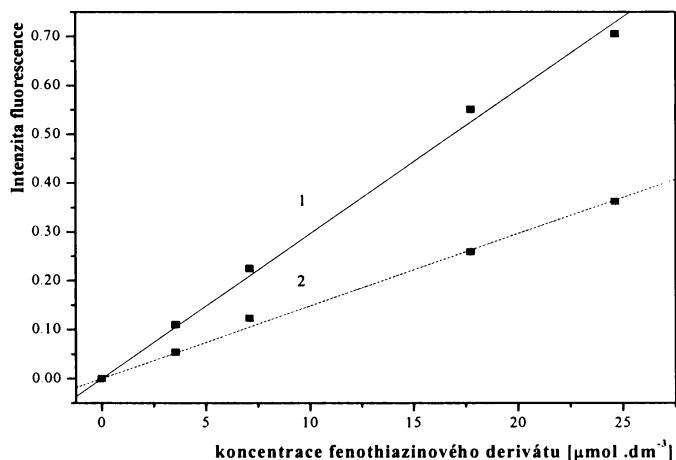
* dávkovaný objem 500 μl

Z hodnot citlivostí uvedených v tabulce při 700V je vidět, že Ce(SO)₄ je lepším oxidačním činidlem než KMnO₄.

4.2.4 Stanovení chlorpromazinu a diethazinu ve farmaceutických přípravcích

Ve stejných vzorcích tablet Deparkinu a Pflugomazinu, připravených postupem uvedeným v experimentální části práce (oddíl 3.4), byl ověřen obsah diethazinu resp. chlorpromazinu. K oxidaci byl použit Ce(SO₄)₂ a za uvedených optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti pro oba deriváty (obr. 35).

Kalibrační závislost chlorpromazinu má směrnici 0,0296 ml.μg⁻¹ a koeficient spolehlivosti 0,9983, závislost diethazinu má citlivost 0,0148 ml.μg⁻¹ a koeficient spolehlivosti 0,9985. Všech šest analyzovaných vzorků bylo naředěno na předpokládanou koncentraci 5.10⁻⁵ mol.dm⁻³ (17,74 μg.ml⁻¹) a proměřeno třikrát.



Obr. 35: Kalibrační závislosti chlorpromazinu a diethazinu pro jejich stanovení ve farmaceutických přípravcích

1 - kalibrační závislost chlorpromazinu; 2 - kalibrační závislost diethazinu

$v = 2 \text{ ml.min}^{-1}$; $V_{\text{vzoroku}} = 500 \mu\text{l}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $c_{\text{Ce}^{4+}} = 1.10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$; $l_{\text{civky}} = 60 \text{ cm}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 385 \text{ nm}$

Tab. 8 Stanovení chlorpromazinu a diethazinu ve farmaceutických přípravcích

Vzorek	nominální hodnota (mg)		nalezená hodnota (mg)	
	Chlorpromazin	Diethazin	FIA metoda*	Referenční metoda†
Pflegomazin (100mg/tab.)	100,0	-	95,30 ± 0,80	96,40 ± 0,48
Pflegomazin (25mg/tab.)	25,0	-	23,85 ± 0,08	23,75 ± 0,07
Deparkin (50mg/tab.)	-	50,0	48,95 ± 0,45	49,95 ± 0,11

* průměr ze tří FIA stanovení s chemickou oxidací derivátu fenothiazinu.

† průměr ze tří stanovení získaných spektrofotometricky

4.3 FIA spektrofluorimetrické stanovení derivátů fenothiazinu po jejich elektrochemické oxidaci

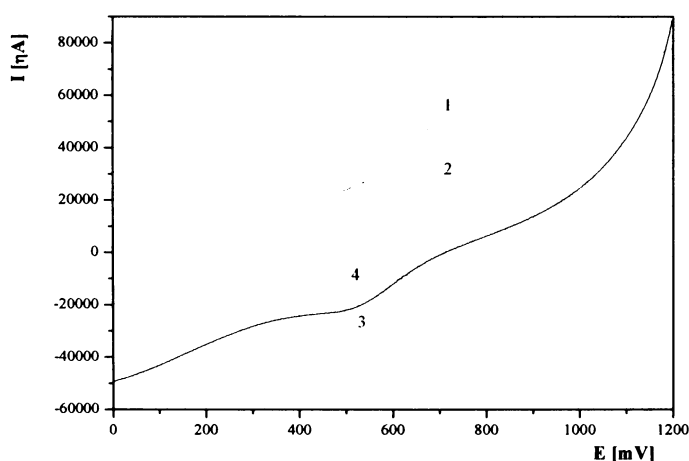
V poslední části diplomové práce byla místo chemické oxidace vzorku derivátu sledována možnost jejich on-line oxidace v průtokové elektrochemické cele.

V tomto případě byl derivát injektován do proudu kyseliny sírové a oxidován v elektrochemické cele na radikalkation, který byl následně detekován spektrofluorimetricky.

Stacionární experimenty

I v tomto případě bylo nutné ověřit, zda zvolené vlnové délky pro excitační i emisní monochromátor nastavené pro fotooxidaci nebo chemickou oxidaci jsou vhodné i v případě elektrochemické oxidace. Nakonec byla zvolena, stejně jako v předchozím případě, excitační vlnová délka 254 nm a emisní vlnová délka 360 nm.

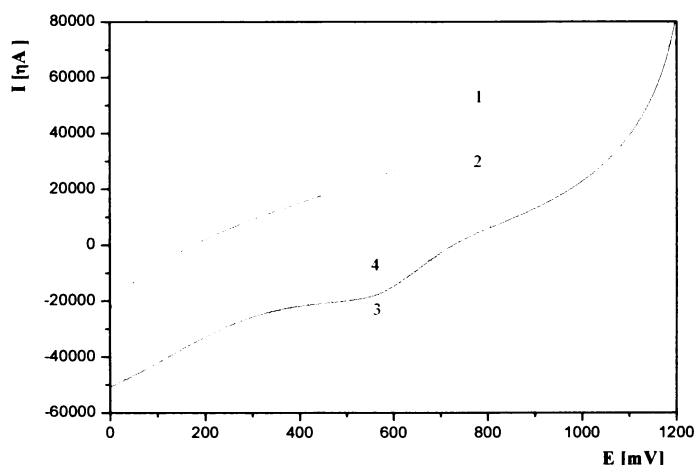
Před vlastním průtokovým měřením bylo potřeba zjistit oxidační potenciály chlorpromazinu a diethiazinu, při kterých je zajištěna oxidace jen do prvního stupně, tj. vzniká radikalkation. Proto byly proměřeny voltametrické křivky obou derivátů v prostředí kyseliny sírové metodou cyklické voltametrie (obr. 36 a obr. 37).



Obr. 36: Voltametrická křivka chlorpromazinu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $v_{\text{scanu}} = 100 \text{ mV/s}$

1(3) anodická (katodická) křivka chlorpromazinu; 2(4) anodická (katodická) křivka základního elektrolytu- H_2SO_4



Obr. 37: Voltametrická křivka diethazinu

$c_{\text{diethazinu}} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $v_{\text{scanu}} = 100 \text{ mV/s}$

1(3) anodická (katodická) křivka diethazinu; **2(4)** anodická (katodická) křivka základního elektrolytu-
 H_2SO_4

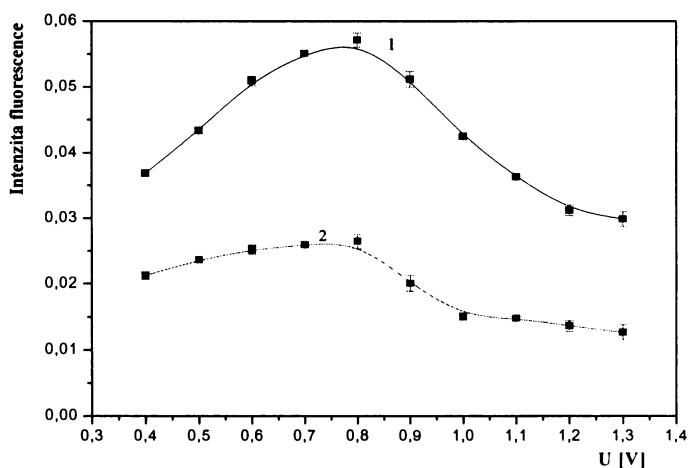
Ze získaných závislostí je patrné, že chlorpromazin a diethazin se za daných podmínek oxidují při zhruba stejných hodnotách potenciálu tj. 722mV a 755mV. Pro průtoková měření pak bylo mezi elektrody průtokové elektrochemické oxidační cely vkládáno napětí 800 mV.

4.3.1 Optimalizace FIA podmínek stanovení

Před vlastním stanovením chlorpromazinu a diethazinu je opět nutné provést řadu optimalizačních měření. V případě elektrochemické oxidace je to vliv vloženého napětí na platinové elektrody, velikost dávkovaného objemu vzorku, průtoková rychlost nosného toku (H_2SO_4) a koncentrace kyseliny sírové.

Optimalizační měření byla prováděna na aparatuře zapojené podle obr. 9 s celou o vnitřním objemu 280 μl a použitá koncentrace chlorpromazinu byla $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Nejprve bylo nutné znovu ověřit optimální hodnoty vloženého napětí mezi platinové elektrody oxidační cely při oxidaci chlorpromazinu a diethazinu v průtokovém uspořádání. Bylo tedy měněno napětí na laboratorním zdroji při zachování ostatních parametrů konstantních.

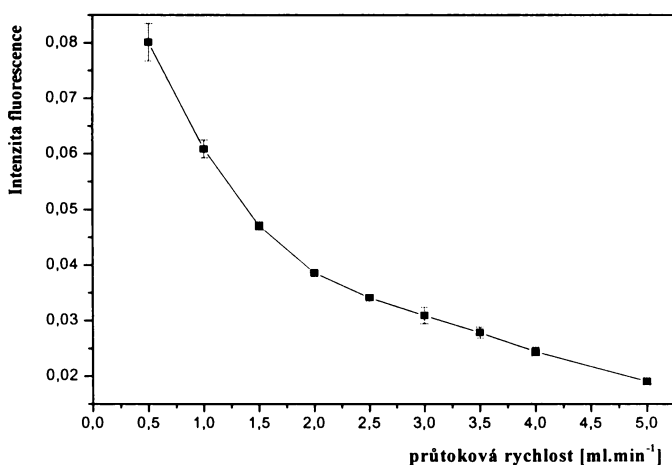


Obr. 38: Vliv vloženého potenciálu na výslednou intenzitu fluorescence

1 - chlorpromazin; 2 - diethazin; $V_{\text{chlorpromazinu (diethazinu)}} = 500 \mu\text{l}$; $c_{\text{chlorpromazinu (diethazinu)}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $v = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$

Na základě uvedené závislosti byla zvolena pro chlorpromazin i diethazin hodnota vloženého napětí 800 mV, při které je intenzita fluorescence maximální.

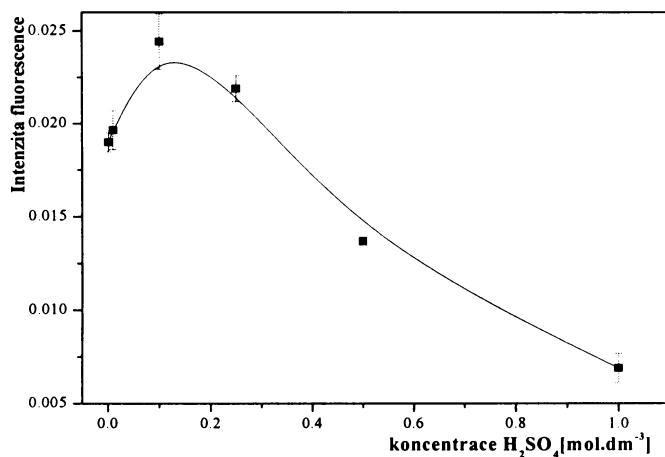
V další části pak byl hodnocen vliv průtokové rychlosti H_2SO_4 , který má významný vliv na dosaženou citlivost stanovení (obr. 39).



Obr. 39: Vliv průtokové rychlosti H_2SO_4 na intenzitu fluorescence radikalkationtu
 $c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$;
 $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $E = 0,80 \text{ V}$

Z uvedené závislosti opět vyplývá, že při vyšších průtokových rychlostech není derivátu poskytnuta dostatečně dlouhá doba na oxidaci. Proto, jako kompromis mezi dosaženou citlivostí a rozmytím píku při velmi nízkých průtokových rychlostech, byla vybrána průtoková rychlost $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

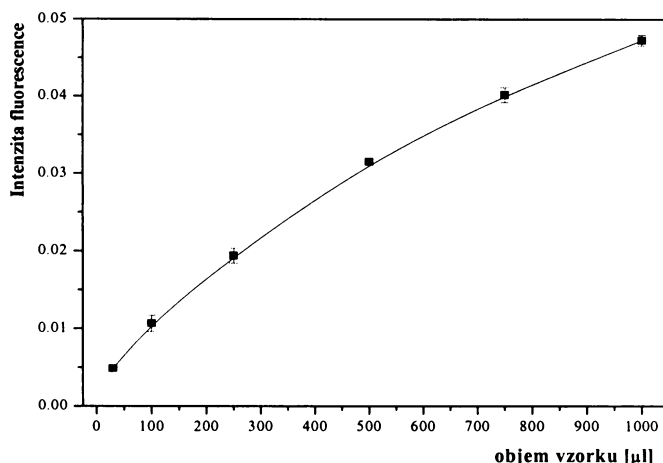
V další fázi byl hodnocen vliv koncentrace H_2SO_4 na intenzitu fluorescence vzniklého radikalkationtu (obr. 40).



Obr. 40: Vliv koncentrace H_2SO_4 na intenzitu fluorescence radikalkationtu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $v_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$;
 $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $E = 0,80 \text{ V}$

Z grafu vyplývá, že nejvýhodnější je použít koncentraci H_2SO_4 $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Následně byla proměřena závislost intenzity fluorescence radikalkationtu na objemu dávkovaného chlorpromazinu při konstantních hodnotách ostatních parametrů (obr. 41).



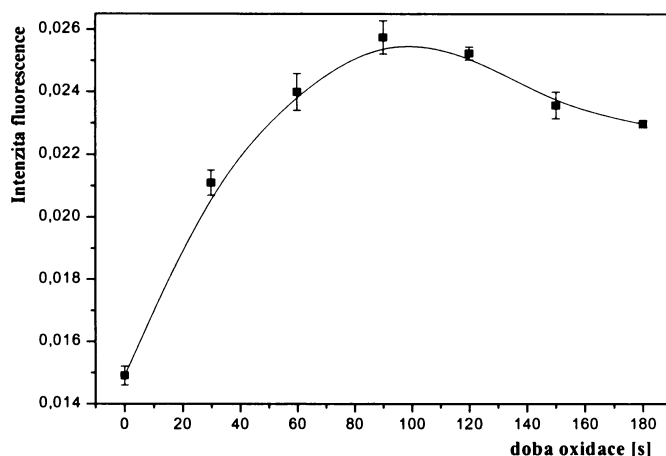
Obr. 41: Vliv dávkovaného objemu chlorpromazinu na intenzitu fluorescence radikalkationtu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $v_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $E = 0,80 \text{ V}$

Jako optimální byla opět vybrána hodnota 250 μl jako kompromis mezi dosaženou citlivostí a možnou frekvencí analýz. Především ale proto, aby při dávkování vzorku nebyl překročen vnitřní objem použité cely tj. 280 μl .

Pro dosažení vyšší citlivosti stanovení, stejně jako v případě fotooxidace, byl zastavován průtok nosného toku, aby se prodloužila doba oxidace derivátu uvnitř průtokové oxidační cely. V modu zastaveného průtoku byl dávkován objem 250 μl při průtokové rychlosti $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Objem vzorku 250 μl byl zvolen proto, aby nebyl překročen vnitřní objem anodového prostoru průtokové oxidační cely. V modu zastaveného toku se samozřejmě může oxidovat jen takové množství derivátu, které je v momentě zastavení průtoku uvnitř cely. Pro kontinuální oxidaci byl naopak dávkován objem vzorku 500 μl za použití poloviční průtokové rychlosti. Oba způsoby byly nakonec použity ke stanovení chlorpromazinu a vzájemně porovnány.

Na závěr optimalizačních experimentů byl tedy proměřen vliv doby oxidace (doba zastavení průtoku) na intenzitu fluorescence radikalkationtu (obr. 42). Ze znalosti objemu cely, průtokové rychlosti, celkové doby analýzy, délky a vnitřního průměru hadiček vedoucích z cely do průtokové květy detektoru, byla vypočtena doba, za kterou střed nadávkované zóny vzorku dorazí zhruba do poloviny cely. Po této době (20 s) byl průtok vždy na různě dlouhou dobu vypnut.



Obr. 42: Vliv doby oxidace na intenzitu fluorescence radikalkationu

$c_{\text{chlorpromazinu}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$; $v_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 2 \text{ ml.min}^{-1}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $E = 0,80 \text{ V}$

Z grafu je patrné, že maximální citlivosti je dosaženo po 90 s zastaveného průtoku, poté již intenzita fluorescenčního signálu klesá, což lze vysvětlit tím, že vzniklý radikalkation se dále oxiduje na sulfoxid, který již není fluorescenčně aktivní.

Konečné optimální parametry pro FIA spektrofluorimetrické stanovení chlorpromazinu po jeho elektrochemické oxidaci na radikalkation jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9 Optimální parametry pro FIA spektrofluorimetrické stanovení chlorpromazinu po jeho elektrochemické oxidaci

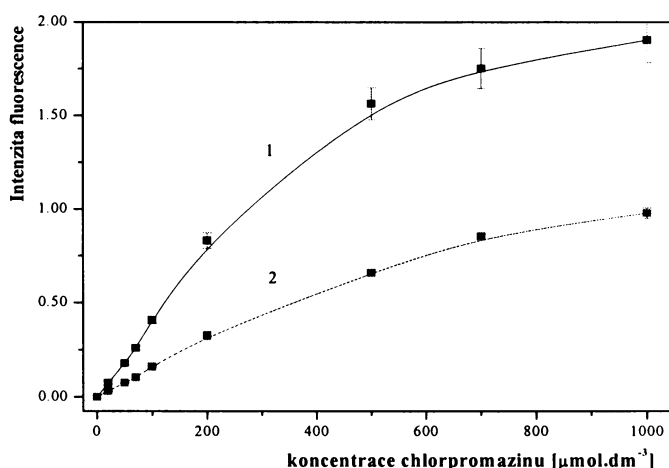
Parametr typ stanovení	hodnota	
	Zastavování průtoku	Bez zastavování průtoku
generační napětí, V	0,800	0,800
průtoková rychlost H ₂ SO ₄ , ml.min ⁻¹	2	1
koncentrace H ₂ SO ₄ , mol.dm ⁻³	0,1	0,1
objem chlorpromazinu, μl	250	500
doba oxidace, s	90	0
Excitační vlnová délka, nm	254	254
emisní vlnová délka, nm	360	360

4.3.2 Kalibrační závislost pro stanovení chlorpromazinu elektrochemickou oxidací

Za zjištěných optimálních podmínek byly proměřeny dvě kalibrační křivky, pro zastavování průtoku a bez zastavování průtoku, při shodném napětí detektoru 800 V. A poté tytéž kalibrační křivky s vyšší hodnotou napětí 1000V, aby bylo dosaženo vyšší citlivosti stanovení. Koncentrační rozsah byl u všech křivek stejný, 0 – 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (0 - 355,45 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Z kalibračních závislostí pro napětí 800 V (obr. 43) je vidět, že křivka pro zastavovaný průtok je lineární v koncentračním rozmezí: mez stanovitelnosti – 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (mez stanovitelnosti – 71,09 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z rovnice přímkové části kalibrace ($R = 0.9994$) byla určena citlivost metody: 0,0016 $\text{dm}^3\cdot\mu\text{mol}^{-1}$. Křivka pro nezastavovaný průtok je lineární také v intervalu: mez stanovitelnosti – 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (mez stanovitelnosti – 71,09 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Koeficient spolehlivosti přímkové části kalibrace je 0,9989 a citlivost 0,0041 $\text{dm}^3\cdot\mu\text{mol}^{-1}$.

Kalibrační křivky pro 1000V jsou znázorněny na obr. 44 a jejich parametry tj. citlivosti stanovení, koeficienty spolehlivosti i lineární dynamický rozsah jsou uvedeny v Tab. 10, ve které jsou uvedeny rovněž veškeré charakteristiky FIA stanovení chlorpromazinu s elektrochemickou oxidací.

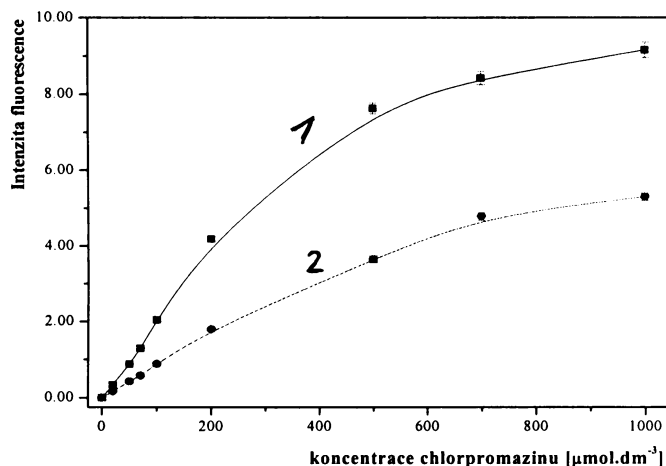


Obr. 43: Kalibrační závislosti pro stanovení chlorpromazinu elektrochemickou oxidací při napětí detektoru 800V.

1 - bez zastavování průtoku: $v_{H_2SO_4} = 2 \text{ ml.min}^{-1}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{H_2SO_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $E = 0,80 \text{ V}$

2 - zastavování průtoku: $v_{H_2SO_4} = 2 \text{ ml.min}^{-1}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{H_2SO_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $E = 0,82 \text{ V}$; $t_{\text{oxidace}} = 90 \text{ s}$

Z uvedených závislostí je patrné, že vyšší citlivosti je dosaženo pokud průtok není zastavován (byl dávkován dvojnásobný objem vzorku a oxidovalo se v tomto případě větší množství derivátu).



Obr. 44: Kalibrační závislosti pro stanovení chlorpromazinu elektrochemickou oxidací při napětí detektoru 1000V.

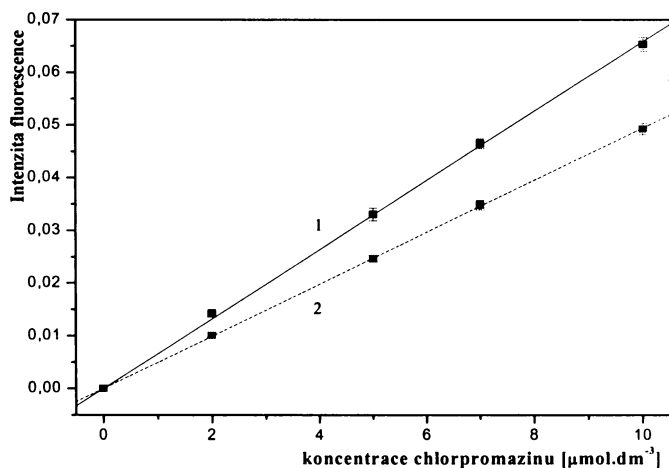
1 - bez zastavování průtoku: $v_{H_2SO_4} = 2 \text{ ml.min}^{-1}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{H_2SO_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 1000 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $E = 0,80 \text{ V}$

2 - zastavování průtoku: $v_{H_2SO_4} = 2 \text{ ml.min}^{-1}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{H_2SO_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 1000 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $E = 0,80 \text{ V}$; $t_{\text{oxidace}} = 90 \text{ s}$

4.3.3 Charakteristiky FIA spektrofluorimetrického stanovení chlorpromazinu elektrochemickou oxidací

Pro zjištění opakovatelnosti u výše uvedených kalibračních závislostí byla použita stejná koncentrace chlorpromazinu z lineárních částí křivek $100 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$.

Při určení mezí detekce a mezí stanovitelnosti byly ještě proměřeny pro obě hodnoty napětí 800 V a 1000 V vždy dvě kalibrační závislosti (zastavený a nezastavený průtok). Tyto kalibrační závislosti byly měřeny v oblasti velmi nízkých, ještě měřitelných koncentrací chlorpromazinu, $0 - 10 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ ($0 - 3,55 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$). Na obr. 45 jsou znázorněny pro ilustraci kalibrační křivky pro 800 V. Nejnižší dávkovaná koncentrace chlorpromazinu byla $5 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ ($1,78 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$).



Obr. 45: Kalibrační závislosti pro určení meze detekce a stanovitelnosti

1 - bez zastavování průtoku: $v_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1 \text{ ml.min}^{-1}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $E = 0,80 \text{ V}$

2 - zastavování průtoku: $v_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 2 \text{ ml.min}^{-1}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 250 \mu\text{l}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $E = 0,80 \text{ V}$; $t_{\text{oxidace}} = 90 \text{ s}$

Tab. 10 Charakteristiky FIA spektrofluorimetrického stanovení chlorpromazinu po jeho elektrochemické oxidaci

Parametr typ stanovení	Hodnota			
	Zastavovaný průtok		Nezastavovaný průtok	
U, V	800V	1000V	800V	1000V
citlivost, $\text{dm}^3 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$	0,0016	0,0087	0,0041	0,0202
koeficient spolehlivosti	0,9994	0,9995	0,9989	0,9991
opakovatelnost, %	2,35	2,40	2,01	2,40
lineární dynamický rozsah, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	0,29-71,09	0,37-71,09	0,27-71,09	0,24-71,09
mez detekce, $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,25	0,31	0,23	0,20
mez stanovitelnosti, $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,82	1,04	0,75	0,67
mez detekce, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	0,09	0,11	0,08	0,07
mez stanovitelnosti, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	0,29	0,37	0,27	0,24
absolutní mez detekce*, ng	22,08	27,73	40,40	35,90
absolutní mez stanovitelnosti*, ng	73,61	92,44	134,82	119,70

* dávkovaný objem-250 μl (zastavovaný průtok), 500 μl (nezastavovaný průtok)

Z Tab. 10. vyplývá, že nejvyšší citlivost vykazuje stanovení při nezastavovaném průtoku při napětí 1000V, při kterém bylo dosaženo rovněž nejnižšího detekčního limitu a limitu stanovitelnosti. Lineární dynamické rozsahy jsou u obou typu stanovení stejné.

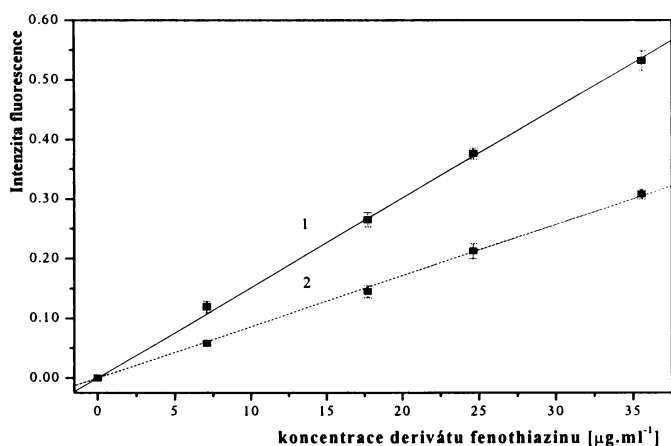
Stejně jako v předchozích dvou metodách je patrné, že pro vyšší hodnoty napětí roste citlivost stanovení, ale zároveň šum detektoru.

Jelikož ale v modu zastavovaného průtoku byl dávkován poloviční objem vzorku kvůli vnitřnímu objemu cely, myslím si, že by při větším objemu vzorku bylo zastavováním průtoku dosaženo vyšší citlivosti.

4.3.4 Stanovení chlorpromazinu a diethazinu ve farmaceutických přípravcích

Stejně jako v předchozích dvou metodách byly analyzovány tytéž vzorky tablet Deparkinu a Pflegomazinu, připravené postupem uvedeným v experimentální části práce (oddíl 3.4). Metodou nezastavovaného průtoku, za výše uvedených optimálních

podmínek, byly proměřeny dvě kalibrační závislosti, pro chlorpromazin a diethazin (obr. 46). Kalibrační závislost chlorpromazinu má směrnici $0,0151 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ a koeficient spolehlivosti $0,9996$, kalibrační závislost diethazinu směrnici $0,00858 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ a koeficient spolehlivosti $0,9995$. Všech šest analyzovaných vzorků bylo naředěno na koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($17,74 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a proměřeno třikrát.



Obr. 46: Kalibrační závislosti chlorpromazinu a diethazinu pro jejich stanovení ve farmaceutických přípravcích

1 - kalibrační závislost chlorpromazinu; 2 - kalibrační závislost diethazinu

$v_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $V_{\text{chlorpromazinu}} = 500 \mu\text{l}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $U_{\text{fotonásobiče}} = 800 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$; $E = 0,80 \text{ V}$

Tab. 11 Stanovení chlorpromazinu a diethazinu ve farmaceutických přípravcích

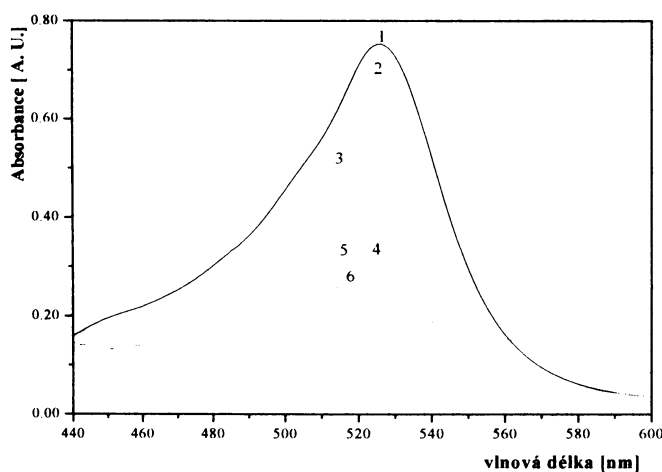
Vzorek	nominální hodnota (mg)		nalezená hodnota (mg)	
	Chlorpromazin	Diethazin	FIA metoda*	Referenční metoda†
Pflegomazin (100mg/tab.)	100,0	-	$96,32 \pm 1,11$	$96,40 \pm 0,48$
Pflegomazin (25mg/tab.)	25,0	-	$23,64 \pm 0,29$	$23,75 \pm 0,07$
Deparkin (50mg/tab.)	-	50,0	$47,55 \pm 0,52$	$49,95 \pm 0,11$

* průměr ze dvou stanovení získaných technikou FIA s elektrochemickou oxidací

† průměr ze dvou stanovení získaných spektrofotometricky

4.4 Srovnání fotooxidace, chemické a elektrochemické oxidace

Na závěr byly proměřeny absorpční spektra barevných produktů (radikálkationtů) fotooxidace, chemické a elektrochemické oxidace chlorpromazinu a diethazinu ve VIS a UV oblasti. (obr. 47 a obr. 48). Vzorky derivátů fenothiazinu nebyly injektovány, ale kontinuálně čerpány přímo z odměrných baněk buď ve směsi s oxidačním činidlem a kyselinou (v případě chemické oxidace) nebo s kyselinou (fotooxidace, elektrochemická oxidace). A to z toho důvodu, že k proměření spekter bylo potřeba získat větší množství barevných produktů, které byly takto kontinuálně generovány a jímány. To by nebylo možné získat injektováním pouze mikrolitrových množství derivátů. Oxidační produkty - radikálkationty - vzniklé oxidací chlorpromazinu měly ve všech případech červenou barvu a oxidační produkty - radikálkationty - vzniklé oxidací diethazinu měly růžovou barvu.



Obr. 47: Absorbční spektra radikálkationtů chlorpromazinu a diethazinu získaných fotooxidací, chemickou a elektrochemickou oxidací.

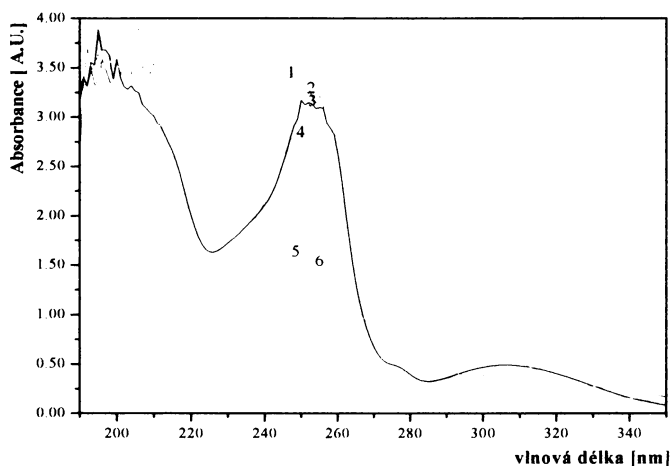
fotochemická oxidace: 2 – radikálkationt chlorpromazinu ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{HCl}$); 5 – radikálkationt diethazinu ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ diethazin; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{HCl}$)

chemická oxidace: 1 – radikálkationt chlorpromazinu ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Ce}^{4+}$; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$); 3 – radikálkationt diethazinu ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Ce}^{4+}$; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$)

elektrochemická oxidace: 4 – radikálkationt chlorpromazinu ($8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$); 6 – radikálkationt diethazinu ($8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$)

Z proměřených spekter vyplývá, že elektrochemickou, chemickou i fotooxidací obou

fenothiazinových derivátů vznikají tytéž produkty. Radikalkationty chlorpromazinu a diethazinu mají absorpční maximum ve viditelné oblasti zhruba u 525-530 nm , což je ve shodě s literaturou^{23, 55,56}(viz. obr. 47).



Obr. 48: Absorbční spektra oxidačních produktů chlorpromazinu a diethazinu získaných fotooxidací, chemickou a elektrochemickou oxidací.

fotochemická oxidace: 6 – radikalkationt chlorpromazinu ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{HCl}$); 5 – radikalkationt diethazinu ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{HCl}$)

chemická oxidace: 3 – radikalkationt chlorpromazinu ($8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Ce}^{4+}$; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$); 4 – radikalkationt diethazinu ($7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Ce}^{4+}$; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$)

elektrochemická oxidace: 1 – radikalkationt chlorpromazinu ($8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$); 2 – radikalkationt diethazinu ($7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorpromazin; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$)

Z absorpčního spektra proměřeného v UV oblasti je patrný jak pás vzniklého radikalkationtu, tak samotného derivátu fenothiazinu. Vzniklé radikalkationty mají v UV oblasti absorpční max. v oblasti 280-300 nm, což je rovněž ve shodě s literaturou⁵⁵ a deriváty fenothiazinu mají absorpční maximum u 250 nm²³.

Na závěr práce bylo provedeno také zhodnocení a vzájemné porovnání jednotlivých metod oxidace, tj. stanovení chlorpromazinu metodou FIA s fotooxidací, metodou FIA s chemickou oxidací a metodou FIA s elektrochemickou oxidací (Tab. 12). V případě fotooxidace a elektrochemické oxidace byly pro srovnání zvoleny hodnoty dosažené při nezastavovaném průtoku a při napětí detektoru 800V, protože v tomto modu bylo dosaženo větší citlivosti. Ze stejného důvodu byly v případě chemické oxidace zvoleny hodnoty dosažené při použití Ce^{4+} jako oxidačního činidla při napětí 700V.

Tab. 12 Srovnání stanovení chlorpromazinu metodou FIA s fotooxidací, chemickou a elektrochemickou oxidací

	FIA		
	<i>fotooxidace</i>	<i>chemická oxidace</i>	<i>elektrochemická oxidace</i>
mez detekce, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,009	0,03	0,08
mez stanovitelnosti, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,031	0,12	0,027
lineární dynamický rozsah, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,031-17,745	0,12-24,63	0,027- 71,09
citlivost, $\text{dm}^3\cdot\mu\text{mol}^{-1}$	0,15439	0,0965	0,0041
opakovatelnost, %	6,08	2,33	2,01

Z tabulky je patrné, že pro stanovení chlorpromazinu je nejvýhodnější metoda FIA s fotochemickou oxidací, která je nejcitlivější, přestože má nejmenší lineární dynamický rozsah. Nejméně vhodnou metodou je vzhledem k dosažené citlivosti FIA s elektrochemickou oxidací, která má ale zase největší lineární dynamický rozsah.

5 Závěr

Hlavním úkolem diplomové práce bylo vypracovat stanovení derivátů fenothiazinu technikou průtokové injekční analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí po jejich fotooxidaci, chemické a elektrochemické oxidaci a dosažené výsledky vzájemně porovnat.

Stanovení derivátů fenothiazinu bylo ve všech třech metodách založeno na vzniku červeného (chlorpromazin) a růžového (diethazin) radikalkationtu, který byl spektrofluorimetricky detekován při $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$. Tyto vlnové délky byly zjištěny proměřením absorpčních, fluorescenčních excitačních a fluorescenčních emisních spekter chlorpromazinu a diethazinu ve stacionárním uspořádání.

Pro stanovení chlorpromazinu technikou FIA s fotooxidací byla sestavena aparatura, provedena optimalizační měření a zvoleny optimální podmínky pro stanovení chlorpromazinu a diethazinu. Poté byly proměřeny kalibrace chlorpromazinu.

Nevýhodou této metody je především uvolňování plynné fáze z roztoku, k níž dochází při průchodu derivátu PTFE trubičkou umístěné okolo Hg výbojky. Ta při emitování UV záření produkuje značné množství tepla, které je příčinou tvorby bublin, zvláště při nižších průtokových rychlostech. To podstatně komplikovalo celé stanovení.

Pro stanovení derivátů fenothiazinu technikou FIA s chemickou oxidací byly použity dvě oxidační činidla, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ a KMnO_4 , s oběma byla provedena optimalizace parametrů a proměřeny kalibrace. Lepší citlivosti bylo dosaženo při použití Ce^{4+} iontů.

Nakonec byla pro stanovení fenothiazinových derivátů použita metoda FIA s elektrochemickou oxidací. Pro zjištění vhodných oxidačních potenciálů byly proměřeny voltametrické křivky, provedena optimalizace parametrů a nakonec provedena kalibrace chlorpromazinu.

Z porovnání všech tří uvedených metod vyplynulo, že nejlepší citlivosti a zároveň nejnižších detekčních limitů bylo dosaženo technikou FIA s fotooxidací. Naopak nejméně vhodná je z hlediska dosažených hodnot citlivosti a dosažených detekčních limitů metoda FIA s elektrochemickou oxidací. Má ale nejširší lineární dynamický rozsah. Rychlost analýzy a stabilita je srovnatelná pro chemickou a elektrochemickou oxidaci.

Dalším úkolem diplomové práce byla analýza farmaceutických přípravků, kterou byly ověřeny všechny uvedené metody. V tabletách přípravků Pflgomazin a Deparkin byly, po jejich úpravě před analýzou, stanoveny chlorpromazin resp. diethazin.

Nejpřesnější výsledky v porovnání se skutečným obsahem derivátů v tabletách a v porovnání s referenční (spektrofotometrickou) metodou byly dosaženy metodou FIA s elektrochemickou oxidací. Celkově se výsledné hodnoty všech tří metod mezi sebou shodují velmi dobře.

6 Literatura

1. Růžička J., Hansen E.H.: *Flow-injection analysis*, 2nd Ed. Wiley, New York (1988)
2. Valcárcel M., Luque de Castro M.D.: *Flow injection analysis*, Ellis Horwood Chichester (1987)
3. Růžička J., Hansen E. H.: *Flow Injection Analysis*. J. Wiley, New York (1988).
4. Růžička J., Marshall G. D.: *Anal. Chim. Acta* **237**, 329 (1990)
5. Gübeli T., Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Chem.* **63**, 2407 (1991)
6. Rius A., Callao M. P., Rius F. X.: *Anal. Chim. Acta* **316**, 27 (1995)
7. Rubí E., Jiménez M. S., Mirabó F. B., Forteza R., Cerda V.: *Talanta* **44**, 553 (1997)
8. Oliveira P., Masini J. C.: *Anal. Lett.* **34**, 389 (2001)
9. Costa R., Araújo A.: *Anal Chim. Acta* **438**, 227 (2001)
10. van Staden J.F., Tsanwani M.: Fresen J.: *Anal. Chem.* **371**, 376 (2001)
11. Alpizar J., Crespi A., Cladera A., Forteza R., Cerda V.: *Lab. Rob. Autom.* **8**, 165 (1996)
12. Oms M. T., Cerda A., Cerda V.: *Anal. Chim. Acta.* **315**, 321 (1995)
13. van Staden J. F., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta.* **331**, 271 (1996)
14. van Staden J. F., Taljaard R. E., Fresenius J.: *Anal. Chem.* **357**, 577 (1997)
15. van Staden J. F., Taljaard R. E.: *Mikrochim. Acta* **128**, 223 (1998)
16. van Staden J. F., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta.* **323**, 75 (1996)
17. Paseková H., Polašek M., Cigarro J.F. a kol.: *Anal. Chim. Acta.* **438**, 165 (2001)
18. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *J. Flow Inj. Anal.* **13**, 148 (1996)
19. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *Microchem. J.* **55**, 392 (1997)
20. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *Talanta.* **44**, 1563 (1997)
21. Pimenta A.M., Montenegro M.C.B.S.M., Araújo A.N., Martínéz Calatayud J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 25 (2006)
22. Curry S.M.: *Drug Psychiatry.* **3**, 489, (1985)
23. Karvinska J., Starczewska B., Puzanowska-Tarasiewicz H.: *Anal. Sci.* **12**, (1996)
24. Kalábová A.: Diplomová práce, Př.F UK, Praha, (1986)

25. Daniel D., Gutz I.G.B.: *Anal. Chim. Acta.* **494**, 216, (2003)
26. Rychlovský P. Diplomová práce, PŘ.F UK, Praha (1986)
27. Confer G.J.S.: *J.Photochem.Photobiol.* **52**, 489 (1990)
28. Gupta R.R.: *Chemical and Biological Aspets.* Elsevier, Amsterdam, 1988
29. Koutníková J.: Diplomová práce, PŘ.F UK, Praha, (2003)
30. Basavaiah K., Krishnamurthy G., Swamy J.M., *Chem Pharm Bull.* **47**, 1351, (1999)
31. Karpinska J., Koljo A., Grudniewska A., Puzanowska H.: *Pharmazi.* **51**, 950, (1996)
32. Michalowski J., Koljo A., Magnuszewska B., Trojanowicz M.: *Anal. Chim. Acta.* **289**, 339 (1994)
33. Koljo A., Wolyniec E., Puanowska-Tarasiewicz H.: *Anal.Lett.* **30**, 2733, (1997)
34. Koljo A., Calatayud J.M.: *Talanta.* **42**, 909, (1995)
35. Koljo A., Puzanowska-Tarasiewicz H.: *Anal.Lett.* **26**, 593, (1993)
36. Laasis B., Aaron J.J.: *Analysis.* **25**, 183, (1997)
37. Pérez- Luis.T., Martinou-Lozano C., Tomás V., Sidrach de Cardona C.: *Talanta.* **40**, 1361 – 1365, (1993)
38. Calatayud Martinez J., Sancho Garcia T., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **10**, 37-42, (1992)
39. Sultan S.M.: *Microchem.J.* **44**, 304-308, (1991)
40. Benito Gómez C., Calatayud Martinez J., Odtiž Pareso S.: *Anal.Chim.Acta.* **276**, 281-286, (1993)
41. Koupparis M.A., Barcuchová A., *Analyst.* **111**, 313-318, (1986)
42. Sultan S.M., Hassan A.M., Abulkibash A.M.: *Talanta.* **59**, 1073-1080, (2003)
43. Chen D., Rios A., Luque de Astro M.D., Valcarcel M.: *Analyst.* **116**, 171-176, (1991)
44. Chen D., Rios A., Luque de Castro M.D., Valcarcel M.: *Talanta.* **38**, 1227-1233, (1991)
45. Calatayud Martinez J., Benito Gomez C.: *Anal. Chim. Acta.* **256**, 105-111, (1992)
46. Laasis.B., Aaron J. J., Mahedero M.C.: *Anal. Chim. Acta.* **290**, 27-33, (1994)
47. Perez- Ruiz T., Martinez – Lozano C., Sanz A., San Miguel M.T.: *Lab. Autom. Inform. Management.* **34**, 149-158, (1999)
48. Laasis B., Aaron J.J., Mahedero M.C.: *Talanta.* **41**, 1985-1989, (1994)
49. Alwarthan A.A., Al-Tamrah A., Akel A.A.: *Anal.Chim. Acta .* **282**, 169-174, (1993)
50. Sauvage M.F., Marquet P., Rousseau A., Buxeraund J., *J.Liq. Chromatogr.* **21**, 3173 (1998)
51. Van Overbeke A.L., Bayens W.R.G., Beyart A., Aboul – Enaih H.Y.: *J.Liq.*

Chromatogr. **20**, 693, (1997)

52. Ševčík J.G.K.: Metodologie měření v analytické chemii, Univerzita Karlova, Vydavatelství Karolinum Praha 1996.
53. Čermáková, Feltl L. a kol.: Analytická chemie 1, SNTL, Praha 1980
54. Win Surfer, version 5.01: Golden Software, Inc. 1994
55. Minikata K.O., Suzuki O., Ishikawa Y., Seno H., Halada N.: *Forensic Sci.Int.* **52**, 199, (1992)
56. Hassan S.M., Belaf F., Ibrahim F., Aly F., *Anal.Lett.* **22**, 1485-1498, (1989)