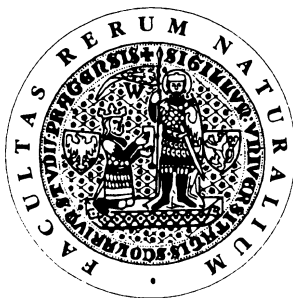


Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



**SIA spektrofotometrické stanovení
derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci**

Bakalářská práce
Klinická a toxikologická analýza

Michal Trejbal
Praha 2007

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

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

V Praze dne
22. 5. 2007

.....
Michal Hubík

podpis

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

Seznam zkratek a symbolů:

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
SFA	segmentovaná průtoková analýza
FIA	průtoková injekční analýza
SIA	sekvenční průtoková analýza
UV - VIS	ultrafialová – viditelná oblast
λ_{ex}	vlnová délka excitace
λ_{em}	vlnová délka emise
μ l	mikrolitr
s	sekunda
min	minuta
c	koncentrace
Obr.	obrázek
Tab.	tabulka
Graf.	graf
př.	příklad
např.	například

Obsah

1. Cíl práce	7
2. Teoretická část	8
2.1. Průtokové metody	8
2.1.1. Sekvenční injekční analýza (SIA).....	9
2.1.2. Využití SIA v praxi.....	10
2.2. Deriváty fenothiazinu	11
2.3. Statistické zpracování výsledků	12
2.3.1. Kalibrace	12
2.3.2. Bodové odhady	13
3. Experimentální část.....	14
3.1. Přístrojové vybavení.....	14
3.2. Fotoreaktor	14
3.3. Odstraňovač bublin	14
3.4. Zapojení aparatury	15
3.5. Použité chemikálie	15
3.6. Stanovení chlorpromazinu ve farmaceutickém přípravku.....	16
4. Výsledky měření a diskuse.....	16
4.1. Sestavení aparatury	17
4.2. Vytvoření ovládacího softwaru.....	17
4.3. Spektrometrické stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci technikou SIA	20
4.3.1. Optimalizace podmínek SIA stanovení	20
4.3.1.1. Vliv dávkovaného objemu vzorku	20
4.3.1.2. Vliv průtokové rychlosti nosného proudu	22
4.3.1.3. Vliv doby ozáření derivátu	23
4.3.2. Kalibrační křivka	24
4.3.3. Základní charakteristiky SIA stanovení derivátů fenothiazinu.....	25
4.3.3.1. Citlivost stanovení	25
4.3.3.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti	25
4.3.3.3. Opakovatelnost měření	25
4.3.4. SIA fluorimetrické stanovení chlorpromazinu po jeho fotooxidaci ve farmaceutickém přípravku.....	26

5. Závěr	28
6. Literatura	29

1. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo sestavit aparaturu pro sekvenční injekční analýzu (SIA) se spektrofluorimetrickou detekcí pro stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci a vytvořit ovládací software pro řízení celého analytického procesu od nadávkování vzorku až po registraci signálu. Druhým úkolem bylo nalézt optimální podmínky a zjistit základní charakteristiky SIA spektrofluorimetrického stanovení chlorpromazinu po jeho fotooxidaci. Další úkolem bylo stanovení chlorpromazinu po jeho fotooxidaci v léčebném přípravku.

2. Teoretická část

2.1. Průtokové metody

Průtokové metody v dnešní době nacházejí v analytické chemii stále větší zastoupení a především využití. Hlavní výhodou oproti běžnému manuálnímu procesu je snadná automatizace a z toho vyplývá, analýza velkého počtu vzorků za časovou jednotku. Ve srovnání s jinými automatizovanými procesy je v průtokových metodách možno pracovat s původními vzorky a upravovat je až přímo v systému. K dalším výhodám patří minimalizace spotřeby všech činidel, vysoká produktivita analýz, eliminace kontaktu pracovníka s toxickými látkami (př. rozpouštědla). Nevýhodou klasických průtokových metod (SFA, FIA) je menší flexibilita.

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

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

Chromatografické metody:

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

Průtokové metody analýzy:

- Sekvenční průtoková analýza (SFA)
- Průtoková injekční analýza (FIA)
- Sekvenční injekční analýza (SIA).

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

2.1.1. Sekvenční injekční analýza (SIA)

Sekvenční injekční analýza je průtoková metoda, která byla vyvinutá zdokonalením průtokové injekční analýzy¹ (FIA – Flow Injection Analysis), která opět umožňuje automatizaci složitých postupů sériových analýz velkého počtu vzorků. První zmínky o metodě pocházejí z 90.let; u zrodu SIA metody stál kolektiv analytiků v čele s J. Růžičkou².

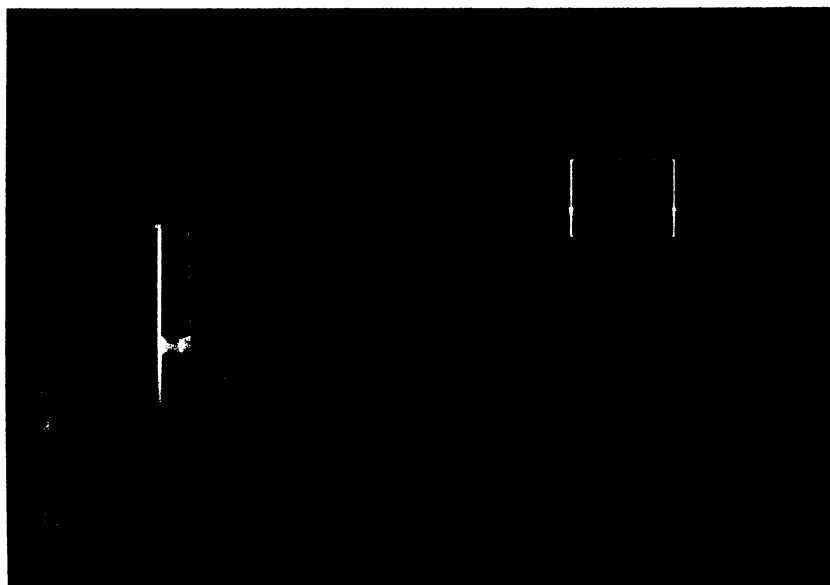
Významné rozdíly mezi technikou sekvenční injekční analýzy (SIA) a průtokové injekční analýzy (FIA) spočívá v geometrii nosného toku, kdy metoda FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco metoda SIA využívá změnu přímého a zpětného toku. Tím je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na produkt. U SIA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

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

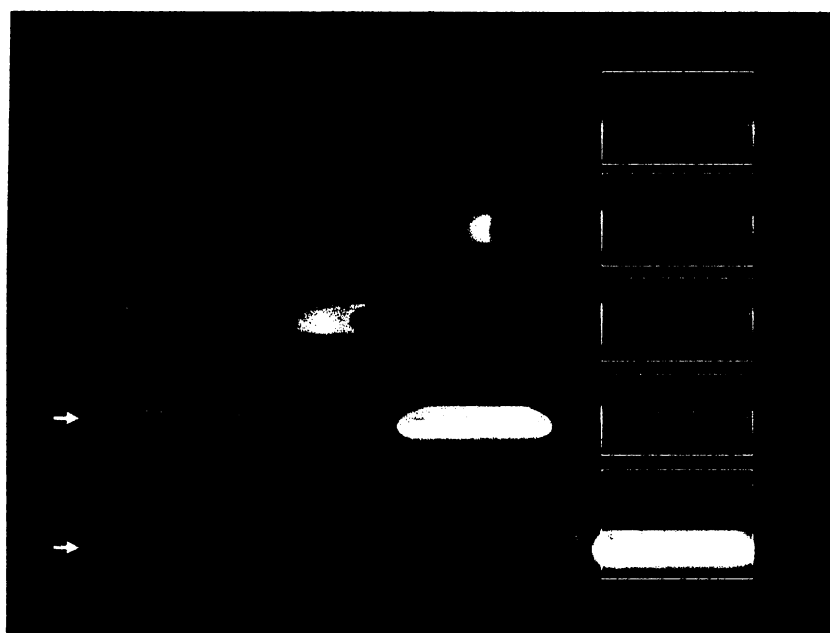
Hlavními charakteristickými rysy techniky SIA jsou oddělené měřicí cykly. Zóny činidla, nosného toku a vzorku jsou postupně dávkovány do jednobanálního systému s použitím vícecestného (často 6, 8 či 10 cestného) selekčního ventilu a pístového čerpadla (obr.1). Pomocí selekčního ventilu jsou řazeny zóny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

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

parametrů měření pomocí klávesnice počítače beze změn konfigurace SIA systému. Nevýhodou SIA oproti FIA je nižší frekvence dávkování vzorku³.



Obr. 1: Schématické uspořádání sekvenční injekční analýzy



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

2.1.2. Využití SIA v praxi

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

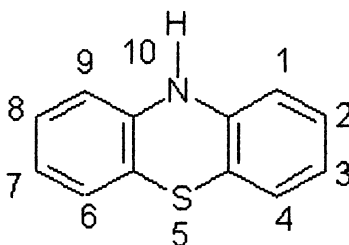
Z anorganických iontů byly ve vodě stanoveny ionty vápenaté (Ca^{2+}) souběžně s hořečnatými (Mg^{2+})⁴, s využitím tvorby barevných komplexů se spektrofotometrickou detekcí⁵, dále byly stanoveny ionty železité (Fe^{3+})^{6,7} a ionty zinečnaté (Zn^{2+})⁸.

Z aniontů byly současně stanoveny chloridy a fluoridy^{9,10}, dusitany s dusičnany se spektrofotometrickou detekcí¹¹ a sírany pomocí srážecí reakce s barnatými ionty¹². Fosfáty byly analyzovány samostatně¹³ nebo současně s křemičitany¹⁴. Dále je možno určit sulfoamidy¹⁵. Technikou SIA lze též stanovit i stopová množství těžkých kovů v různých mocnostvích (vanadu¹⁶, molybdenu¹⁷ a chromu¹⁸). Kadmium, měď, rtuť, indium, olovo, cín a thalium byly analyzovány metodou SIA za pomoci elektrochemické detekce.

Hlavní aplikace SIA techniky u farmaceutické analýzy, kde se používá pro stanovení warfarinu¹⁹, diclofenalu¹⁹, thiaminu¹⁹ v léčebných přípravcích za pomoci spektrofluorimetrické detekce.

2.2. Deriváty fenothiazinu

Důležitou vlastností derivátů fenothiazinu je jejich antidepresivní aktivita²⁰. Ve farmakologii jsou důležitou skupinou neuroleptik a antialergetik.



Obr.3: Molekula fenothiazinu

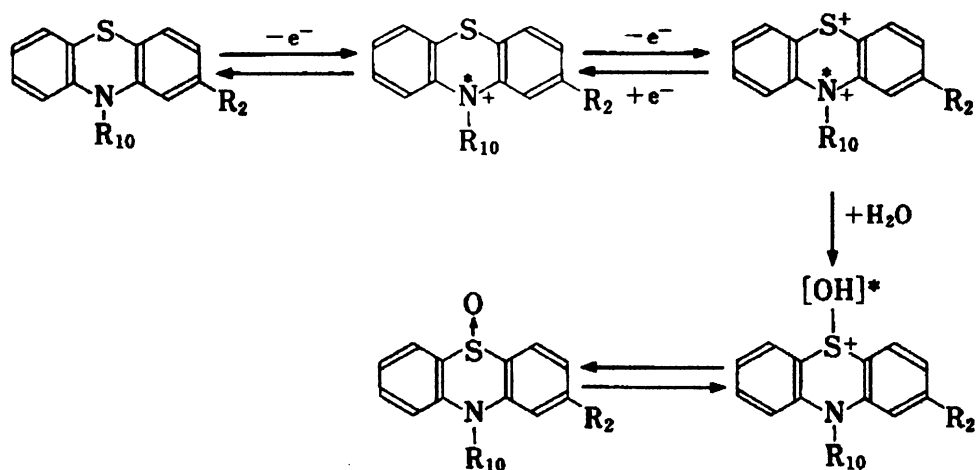
Často využívané deriváty jsou substituovány v poloze 10 (antihistaminika a antiparkinsonika), popřípadě v poloze 2 a 10 (neuroleptika)²¹.

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 1.

Tab. 1: 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

Nejdůležitější chemickou vlastností fenothiazinových derivátů je jejich schopnost se oxidovat řadou oxidačních činidel např. [Ce(SO₄)₂, NH₄VO₃, K₂Cr₂O₇, KBrO₃, KIO₃, KIO₄, NaNO₂, H₂O₂, aj.] nebo vlivem UV záření. Oxidační reakce fenothiazinových derivátů jsou znázorněny schématem na obr.4. Během prvního kroku jsou deriváty fenothiazinu reverzibilně oxidovány za vzniku barevného radikalkationtu, stabilního v silně kyselém prostředí. Radikalkation je v druhém kroku ireverzibilně oxidován na bezbarvý sulfoxid²¹.



Obr.4: Schéma oxidačního procesu derivátů fenothiazinu

2.3. Statistické zpracování výsledků

2.3.1. Kalibrace

Kalibrace je empirický postup zjištění závislosti mezi měřenou veličinou a požadovanou informací. Uplatňuje se často v instrumentální analýze, kdy se z velikosti

měřeného signálu hledá odpovídající obsah stanovované složky (analytu).

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

2.3.2. Bodové odhady

K vyhodnocení dat byly použity²²:

Aritmetický průměr:

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

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

Směrodatná odchylka:

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

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

Relativní směrodatná odchylka:

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

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

3. Experimentální část

3.1. Přístrojové vybavení

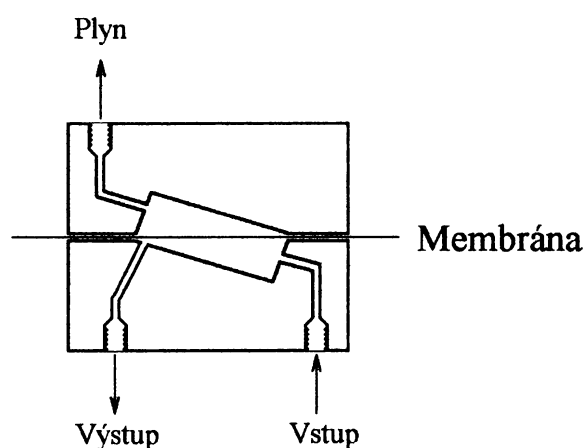
- Spektrofluorimetr Hitachi F-1050 (Tokyo, Japan) jako detektor, vybavený průtokovou křemennou kyvetou o objemu 10 μl
- Programovatelné pístové čerpadlo 74901-05 Cole-Parmer (USA)
- Osmicestný selekční ventil Vici-Valco C25-3188 EMH (Valco, USA)
- Třicestný přepínací ventil Cole-Parmer (USA)
- Teflonové spojovací kapiláry o vnitřním průměru 0,5 mm (Supelco, USA) příslušných délek

3.2. Fotoreaktor

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



Obr. 5: Fotoreaktor (nezakrytý)



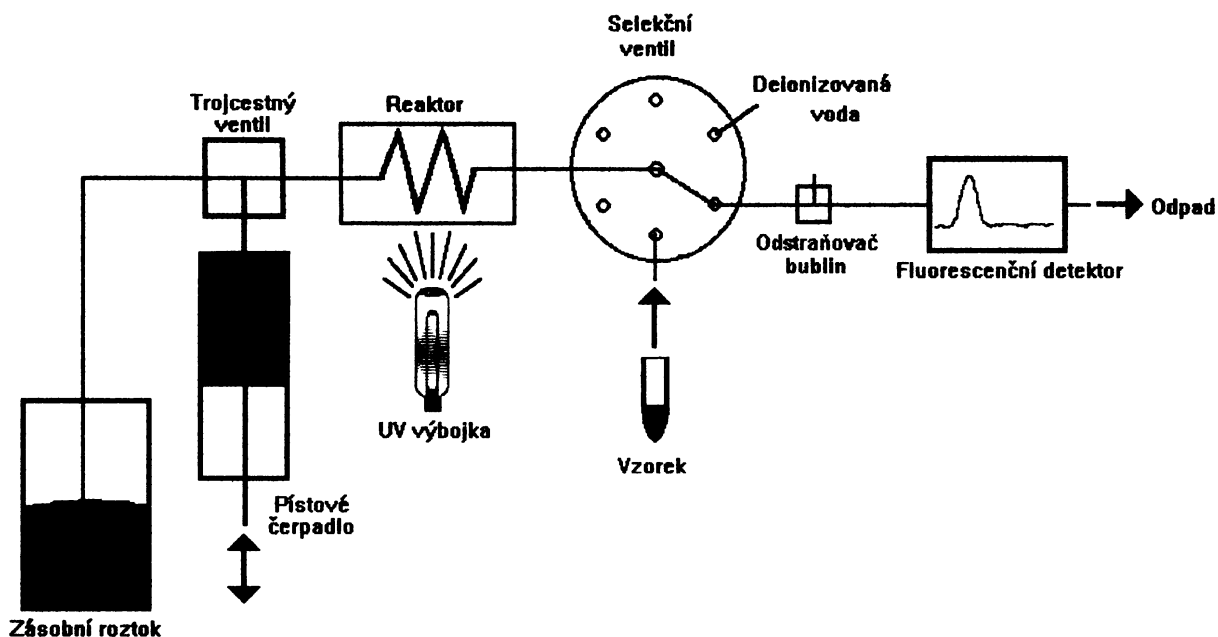
Obr. 6: Odstraňovač bublin

3.3. Odstraňovač bublin

Odstraňovač bublin (obr. 6) vlastní konstrukce vychází z konstrukce membránových separátorů fází, používaných při extrakčních průtokových stanoveních (vnitřní objem 100 μl). Je tvořen dvěma kusy teflonového bloku navzájem spojených přes teflonovou membránu.

3.4. Zapojení aparatury

Pro spektrofluorimetrické stanovení derivátů fenothiazinu fotochemickou oxidací byla sestavena klasická aparatura pro sekvenční injekční analýzu (obr.7), která se skládá z pístového čerpadla, selekčního a přepínacího ventilu, detektoru, reaktoru s reakční cívkou, odstraňovače bublin, spojovacích kapilár a řídicího počítače.



Obr. 7: Aparatura pro sekvenční injekční analýzu

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

3.5. 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.
- Kyselina chlorovodíková 37 % (Merck, SRN)

- Deionizovaná voda byla připravena přístrojem Milli Q^{plus} firmy Millipore (USA).
- Lékové formy: Plegomazin (Egis Pharmaceuticals; Budapest; Hungary)
 - Červené tablety: 25 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě
 - Žluté tablety: 100 mg chlorpromazin hydrochloridu v 1 tabletě

3.6. Stanovení chlorpromazinu ve farmaceutickém přípravku

Obsah chlorpromazinu byl stanoven v tabletách Plegomazin (25 mg chlorpromazinu v tabletě; 100 mg chlorpromazinu v tabletě). Nejprve bylo vždy zváženo pět tablet Plegomazinu (25 mg/tableta i 100 mg/tableta) a z jejich hmotnosti byla vypočtena průměrná hmotnost jedné tablety. Poté byly ve třecí misce rozetřeny vždy 3 tablety na jemný prášek. Navážené množství odpovídalo vždy 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 připravený roztok (suspenze) byl filtrován v nálevce přes vatou do 25 ml odměrné baňky. Doplněná odměrná baňka s čirým roztokem byla skladována v chladu a tmě.

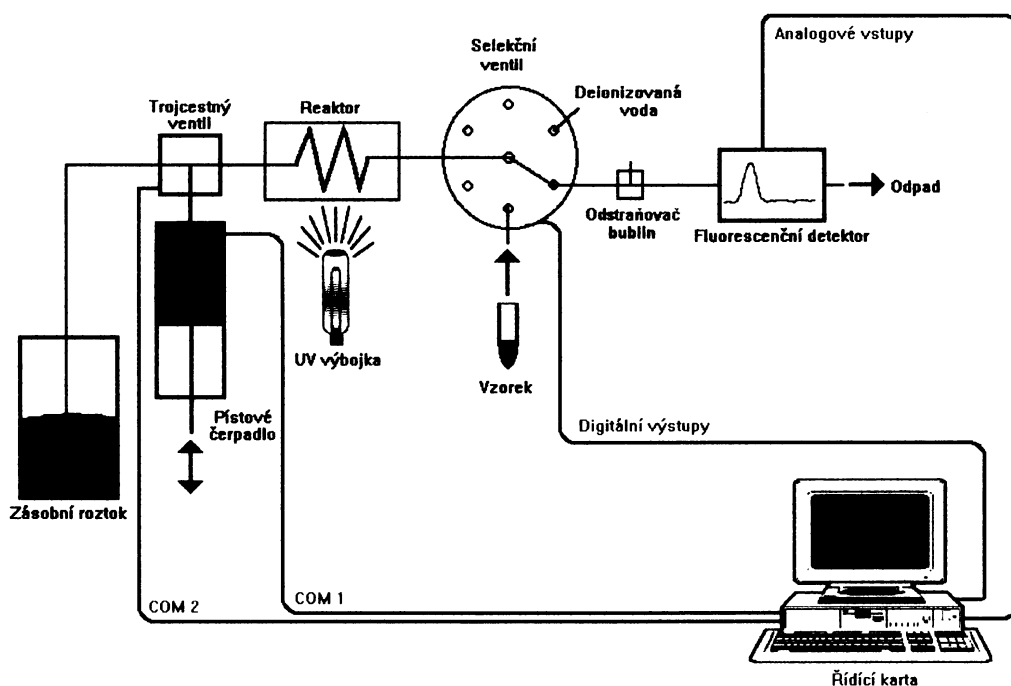
Z těchto roztoků byly připraveny roztoky o koncentraci přibližně přesně $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, které byly následně analyzovány. K analýze byly použity vždy dva vzorky Plegomazinu (100 mg/tab.) a 2 vzorky Plegomazinu (25 mg/tab.).

4. Výsledky měření a diskuse

Prvním úkolem bakalářské práce bylo sestavit aparaturu pro sekvenční injekční analýzu se spektrofluorimetrickou detekcí a vytvořit pro ni ovládací software. Druhým úkolem bakalářské práce pak bylo aplikovat tuto aparaturu pro analýzu derivátu fenothiazinu.

4.1. Sestavení aparatury

V aparatuře pro sekvenční injekční analýzu (obr. 8) bylo použito pístové čerpadlo pro zajištění toku všech roztoků i čerpání vzorků do systému. Jako selekční ventil byl použit osmicestný ventil. Na jednotlivé porty selekčního ventilu byly připojeny kapiláry pro přívod vzorku (chlorpromazinu), deionizované vody (promývací kapalina) a kapiláry pro transport do detektoru.



Obr. 8: Aparatura pro sekvenční injekční analýzu a její řízení

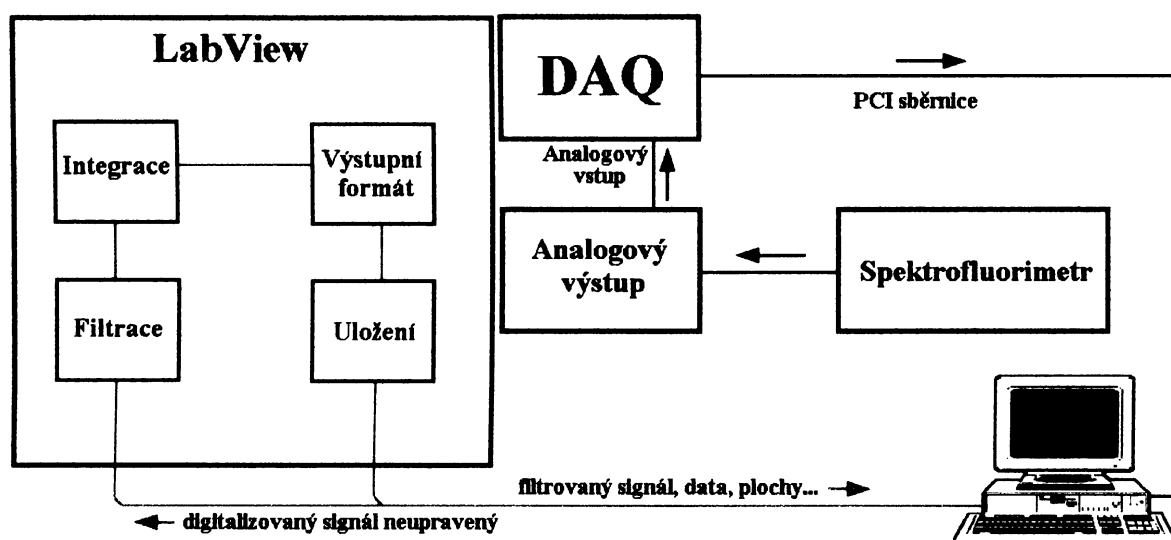
Fotoreaktor (obr. 5) byl tvořen teflonovou kapilárou, která byla šroubovicovitě obtočena kolem střednětlaké 35W rtuťové výbojky. Pro odstranění vzduchových bublin vzniklých v kapiláře fotoreaktoru byl zapojen debubler vlastní konstrukce (obr. 6), který

nám zaručoval, že se vzduchové bubliny nedostanou do průtokové kvyety spektrofluorimetrického detektoru a neznehodnotí nám analytický signál.

4.2. Vytvoření ovládacího software

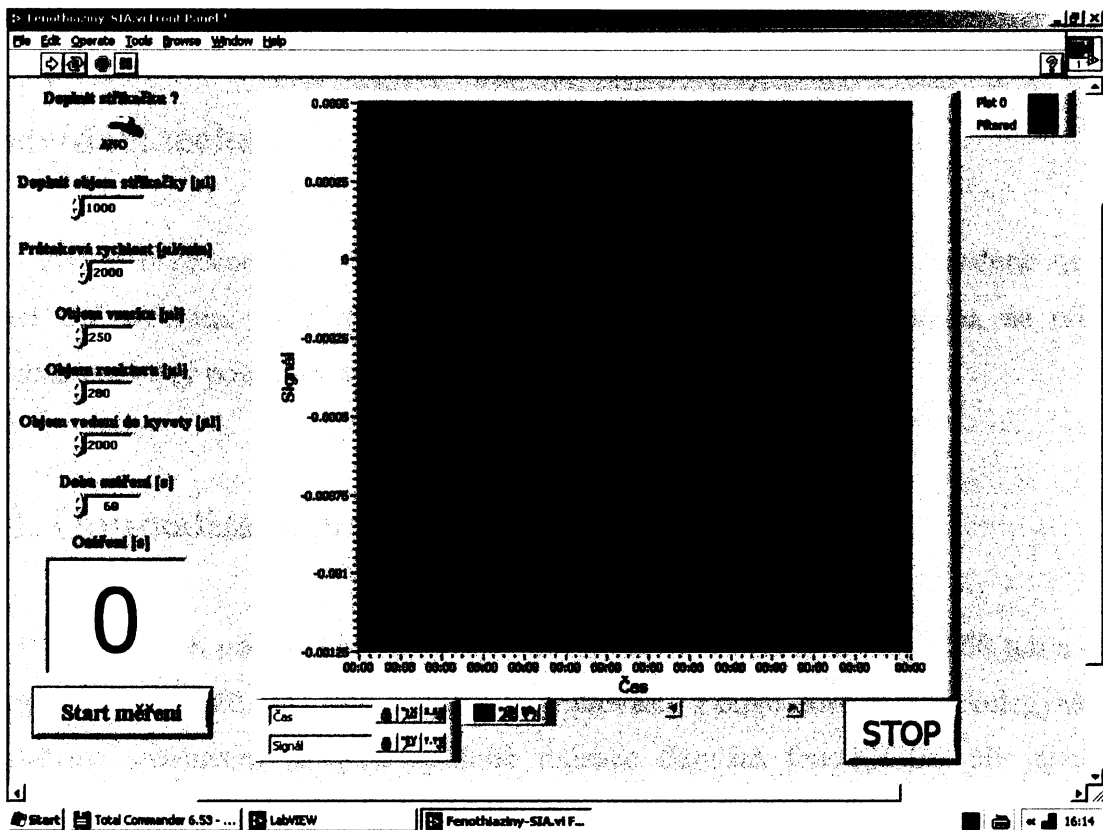
Metoda sekvenční injekční analýzy předpokládá přesné a opakovatelné dávkování objemů vzorků, transport reakční směsi do detektoru a propláchnutí aparatury. Tento postup se skládá z řady dílčích úkonů, které je nutné z důvodu reprodukovatelnosti provádět stále stejně. Proto je nutné použít pro řízení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

Pro řízení aparatury byl vytvořen vlastní program v grafickém programovacím prostředí LabView 7.1.(National Instruments, USA). Tento software umožňuje řízení (obr. 8) peristaltické pumpy (COM 1), selekčního ventilu (digitální výstupy řídicí karty), pomocného ventilu (COM 2) i řízení vlastní analýzy a sběr a zpracování dat ze spektrofluorimetrického detektoru (obr. 9).

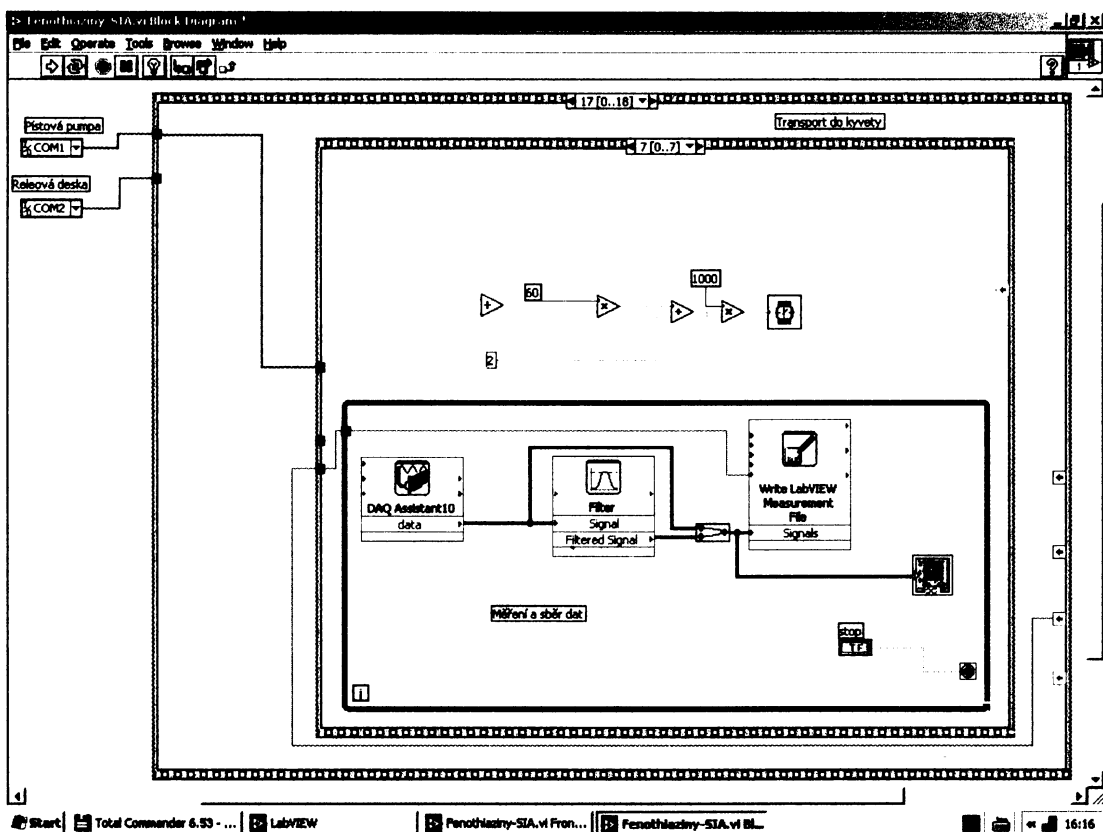


Obr. 9: Schéma zpracování výstupních dat ze spektrofluorimetru řídicím programem

Na obrázcích č. 10 a 11 je pro ilustraci uveden kontrolní panel virtuálního přístroje pro sekvenční injekční analýzu se spektrofluorimetrickou detekcí a výsek z odpovídajícího blokového schématu.



Obr. 10: Kontrolní panel virtuálního přístroje pro sekvenční injekční analýzu



Obr. 11: Výsek z odpovídajícího blokového schématu

4.3. Spektrometrické stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci technikou SIA

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

4.3.1. Optimalizace podmínek SIA stanovení

Při detekčních podmínkách byla použita excitační vlnová délka $\lambda_{ex}= 250$ nm a emisní vlnová délka $\lambda_{em}= 360$ nm. Tyto hodnoty byly převzaty z diplomové práce²³ kolegyně, která se zabývala srovnáním různých způsobů oxidace derivátů fenothiazinu při jejich FIA stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí.

Po nastavení detekčních podmínek bylo přistoupeno k optimalizaci vlastního průtokového SIA stanovení. Při optimalizačních experimentech byla vždy vyhodnocena výška analytického SIA píku.

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

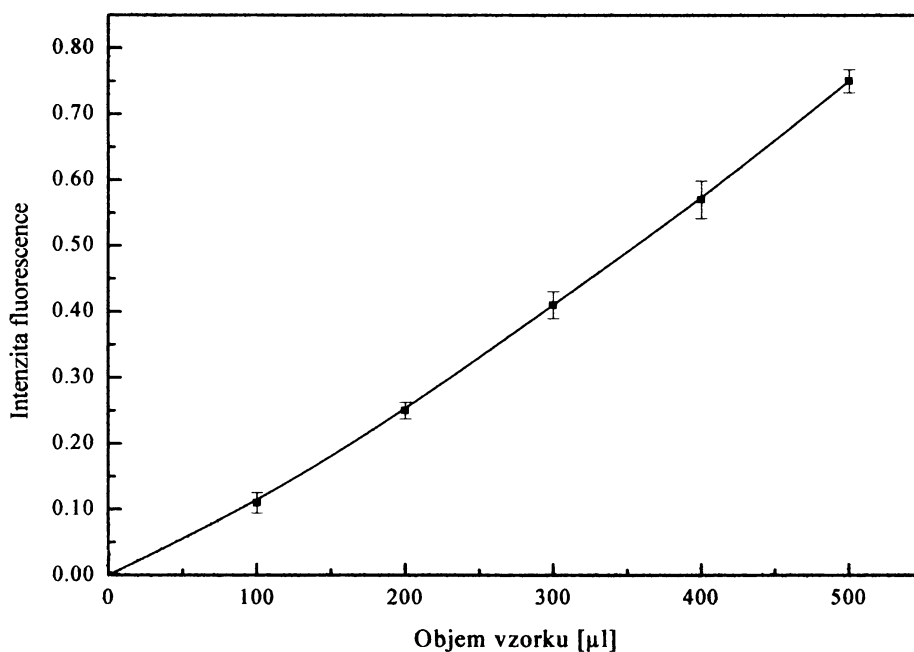
Optimalizační měření byla prováděna na aparatuře zapojené podle obr.8. K měření byl vybrán zástupce derivátů fenothiazinu - chlorpromazin. Experimenty byly prováděny s roztokem chlorpromazinu o koncentraci 1.10^{-6} mol.dm⁻³ v HCl o koncentraci 1.10^{-4} mol.dm⁻³.

4.3.1.1. Vliv dávkovaného objemu vzorku

Pro měření vlivu dávkovaného objemu vzorku na velikosti dosaženého SIA signálu byly nastaveny následující hodnoty v ovládacím software aparatury:

Tab. 2: *Nastavené parametry měření (vliv dávkovaného objemu vzorku)*

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	2000 μl
Průtoková rychlost	1500 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	500 μl 400 μl 300 μl 200 μl 100 μl 0 μl
Objem reaktoru	570 μl
Objem vedení do kyvety	1000 μl
Doba ozáření	120 s



Obr. 12: *Vliv velikosti dávkovaného objemu na dosažený signál*

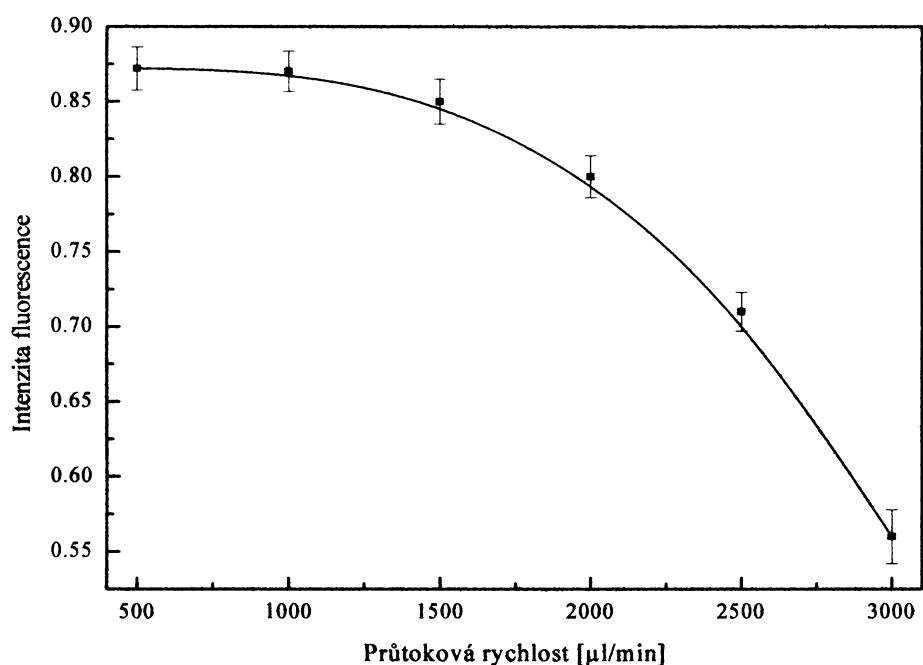
Z proměřené závislosti vyplývá, že nejvhodnější je dávkovat maximální objem 500 μl příslušného derivátu. Při použití většího množství derivátu by byl překročen vnitřní objem kapiláry fotoreaktoru a všechny vzorek by tak nebyl ozářen. Toto by také vedlo k prodloužení analýzy; pro další měření byl tedy dávkován objem 500 μl derivátu.

4.3.1.2. Vliv průtokové rychlosti nosného proudu

Pro měření vlivu dávkovaného objemu vzorku na velikosti dosaženého SIA signálu byly nastaveny následující hodnoty v ovládacím software aparatury:

Tab. 3: *Nastavené parametry měření (vliv průtokové rychlosti)*

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	2000 μl
Průtoková rychlost	3000 $\mu\text{l}/\text{min}$ 2500 $\mu\text{l}/\text{min}$ 2000 $\mu\text{l}/\text{min}$ 1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$ 500 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	500 μl
Objem reaktoru	570 μl
Objem vedení do kyvety	1000 μl
Doba ozáření	120 s



Obr. 13: *Vliv velikosti průtokové rychlosti nosného proudu na dosažený signál*

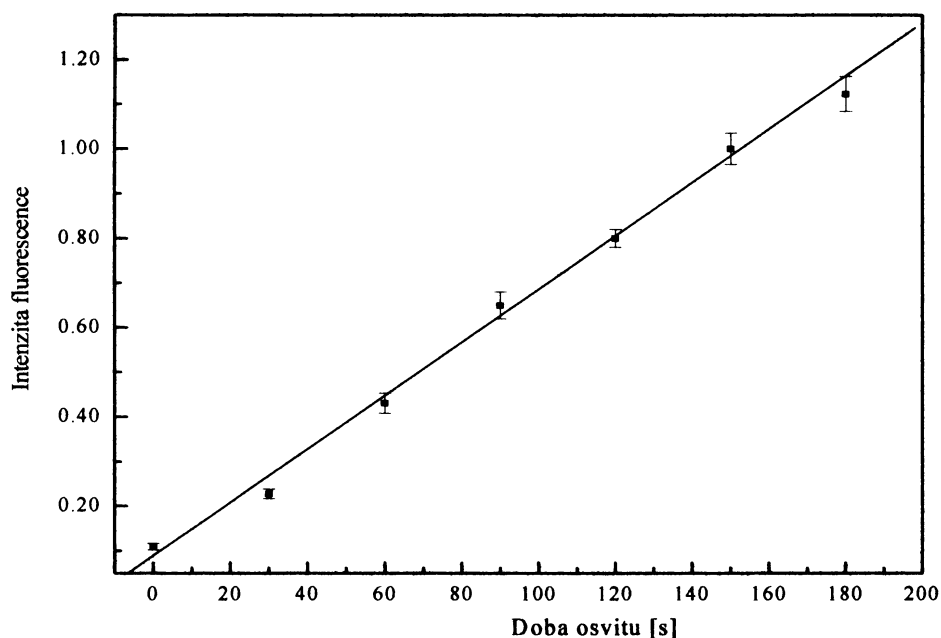
Z uvedené závislosti vyplývá, že nejvýhodnější je použít průtoková rychlost 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$.

4.3.1.3. Vliv doby ozáření derivátu

Pro měření vlivu doby ozáření na velikost dosaženého SIA signálu byly nastaveny následující hodnoty v ovládacím software aparatury:

Tab. 4: *Nastavené parametry měření (vliv doby ozáření)*

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	2000 μl
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	500 μl
Objem reaktoru	570 μl
Objem vedení do kyvety	1000 μl
Doba ozáření	180 s 150 s 120 s 90 s 60 s 30 s 0 s



Obr. 14: *Vliv doby osvitů na dosažený signál*

Z proměřené závislosti vyplývá, že nejvýhodnější je ozařovat derivát maximální dobu 180 s. Delší doba záření jednak neúměrně prodlouží dobu analýzy a jednak může dojít až

k oxidaci na sulfoxid, který není za daných podmínek fluorescenčně aktivní. Pro další měření byl tedy vzorek ozařován 180 s.

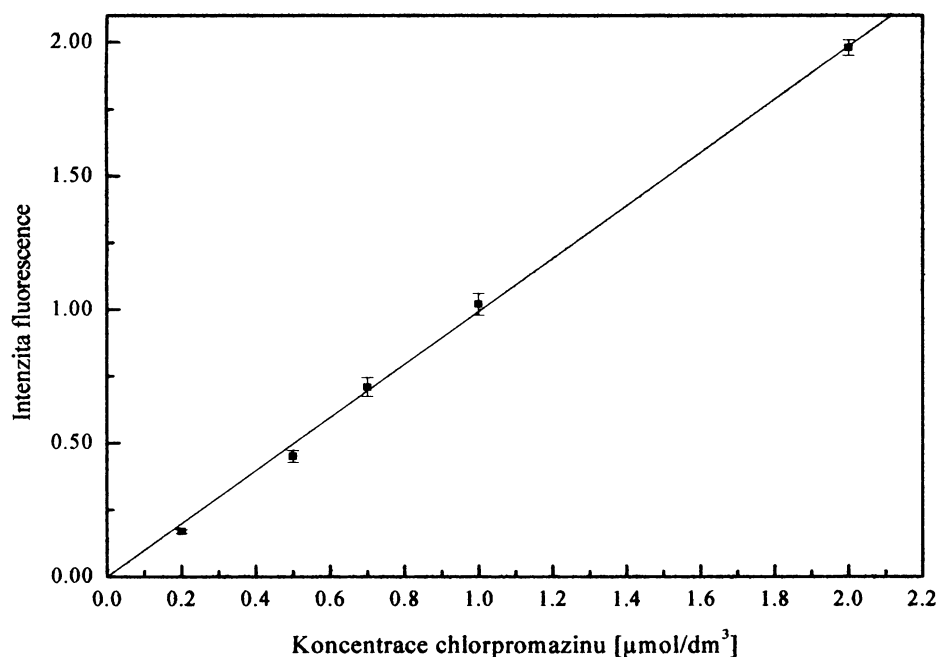
4.3.2. Kalibrační křivka

Ze zjištěných optimálních podmínek byla proměřena kalibrační křivka pro chlorpromazin v koncentračním rozsahu $2 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Po proměřování kalibrační závislosti byly nastaveny následující optimální hodnoty v ovládacím software aparatury:

Tab. 5: Nastavené optimální parametry pro SIA stanovení derivátů fenothiazinu

Doplnit stříkačku	Ano
Doplnit objem stříkačky	2000 μl
Průtoková rychlost	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
Objem vzorku	500 μl
Objem reaktoru	570 μl
Objem vedení do kyvety	1000 μl
Doba ozáření	180 s



Obr. 15: Kalibrační závislost stanovení chlorpromazinu

Kalibrační závislost je lineární v celém měřeném rozsahu.

4.3.3. Základní charakteristiky SIA stanovení derivátů fenothiazinu

V další části bakalářské práce byly určeny základní charakteristiky spektrofluorimetrického SIA stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci na barevný radikalkation. Byla určena citlivost stanovení jako směrnice kalibrační závislosti, mez detekce (3σ), mez stanovitelnosti (10σ) a opakovatelnost měření (určena jako relativní směrodatná odchylka – RSD (%)).

4.3.3.1. Citlivost stanovení

Citlivost stanovení chlorpromazinu SIA technikou se spektrofluorimetrickou detekcí byla určena z proměřené kalibrační závislosti jako její směrnice: $0,992 \text{ dm}^3/\mu\text{mol}$.

4.3.3.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Pro zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti byla proměřena kalibrační závislost v oblasti nízkých, ještě měřitelných hodnot koncentrací chlorpromazinu. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny z výše uvedené kalibrační závislosti při dané nastavené měřicí přístrojové citlivosti. Byla 10 x změřena velmi nízká koncentrace chlorpromazinu ($1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a odečtené hodnoty intenzity fluorescence byly přepočteny přes danou kalibrační závislost na příslušné hodnoty koncentrace a ty byly statisticky zpracovány. Mez detekce byla určena jako trojnásobek směrodatné odchylky ($0,018 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a mez stanovitelnosti jako desetinásobek směrodatné odchylky ($0,060 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

4.3.3.3. Opakovatelnost měření

Určení opakovatelnosti je nezbytnou součástí každé analýzy. Náhodné chyby ovlivňují přesnost analýzy²⁴. Pro přesnost měření byly několikrát (10 x) změřena koncentrace $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

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

Opakovatelnost měření vyjádřená jako % RSD (na hladině 1.10^{-6} mol.dm⁻³) pro dané stanovení byla 2,7 %.

Dosažené základní charakteristiky stanovení jsou shrnuty v následující tabulce:

Tab. 6: *Základní charakteristiky spektrofluorimetrického SIA stanovení chlorpromazinu*

Parametr	Hodnota
citlivost, dm ³ .μmol ⁻¹	0,992
opakovatelnost, %	2,70
mez detekce, μmol.dm ⁻³	0,018
mez stanovitelnosti, μmol.dm ⁻³	0,060
absolutní mez detekce*, ng	3,2
absolutní mez stanovitelnosti*, ng	10,7

*dávkový objem 500 μl

4.3.4. SIA fluorimetrické stanovení chlorpromazinu po jeho fotooxidaci ve farmaceutickém přípravku

Ve vzorcích tablet Plegomazinu (25 mg chlorpromazinu v tabletě; 100 mg chlorpromazinu v tabletě), připravených postupem uvedeným v experimentální části práce (oddíl 3.6.), byl navrženou metodou ověřen obsah chlorpromazinu. Připravené vzorky byly naředěny na přibližnou koncentraci 5.10^{-5} mol.dm⁻³ a třikrát proměřeny. Výsledky stanovení jsou shrnuty v Tab. 7. Z tabulky je vidět velmi dobrá shoda výsledků získaných námi navrženou metodou a kontrolní spektrofotometrickou metodou v UV oblasti.

Tab. 7: Stanovení chlorpromazinu ve farmaceutickém přípravku

<i>Vzorek</i>	nominální hodnota (mg)	nalezená hodnota (mg)	
		<i>SIA metoda</i> [*]	<i>Referenční metoda</i> [†]
Plegomazin (100mg/tab.)	100,0	93,02 ± 0,74	93,4 ± 0,48
Plegomazin (25mg/tab.)	25,0	23,34 ± 0,12	23,75 ± 0,07

* průměr ze tří stanovení derivátu získaných technikou SIA s fotooxidací

† průměr ze tří stanovení získaných spektrofotometricky v UV oblasti

5. Závěr

V první části bakalářské práce byla sestavena aparatura pro sekvenční injekční analýzu. Skládala se z následujících komponent: osmicestý selekční ventil, třicestý přepínací ventil, programovatelné pístové čerpadlo, fotoreaktor (tvořený teflonovou kapilárou a střednětlakou 35 W rtuťovou výbojkou), teflonové spojovací kapiláry, odstraňovač bublin a spektrofluorimetr.

Pro řízení přístroje byl vytvořen vlastní program v grafickém programovacím prostředí LabView 7.1. Tento software nám umožnil řídit peristaltickou pumpu, selekční ventil, pomocný ventil i celou vlastní analýzu, sběr a zpracování dat ze spektrofluorimetrického detektoru.

Za pomoci této aparatury jsem stanovil derivát fenothiazinu - chlorpromazin. Byly optimalizovány podmínky průtokového stanovení chlorpromazinu a proměřena kalibrační závislost. Byly určeny základní charakteristiky stanovení této sloučeniny navrženou metodou.

Dalé jsem provedl analýzu léčiva ve farmaceutickém přípravku, kterou jsem ověřil touto metodou. V tabletě přípravku Plegomazin jsem stanovil chlorpromazin.

6. Literatura

1. Růžička J., Hansen E. H.: *Flow Injection Analysis*. J. Wiley, New York (1988).
2. Růžička J., Marshall G. D.: *Anal. Chim. Acta* **237**, 329 (1990)
3. Gübeli T., Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Chem.* **63**, 2407 (1991)
4. Rius A., Callao M. P., Rius F. X.: *Anal. Chim. Acta* **316**, 27 (1995)
5. Rubí E., Jiménez M. S., Mirabó F. B., Forteza R., Cerda V.: *Talanta* **44**, 553 (1997)
6. Oliveira P., Masini J. C.: *Anal. Lett.* **34**, 389 (2001)
7. Costa R., Araújo A.: *Anal. Chim. Acta* **438**, 227 (2001)
8. van Staden J.F., Tsanwani M.: Fresen J.: *Anal. Chem.* **371**, 376 (2001)
9. Alpizar J., Crespi A., Cladera A., Forteza R., Cerda V.: *Lab. Rob. Autom.* **8**, 165 (1996)
10. Oms M. T., Cerda A., Cerda V.: *Anal. Chim. Acta.* **315**, 321 (1995)
11. van Staden J. F., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta.* **331**, 271 (1996)
12. van Staden J. F., Taljaard R. E., Fresenius J.: *Anal. Chem.* **357**, 577 (1997)
13. van Staden J. F., Taljaard R. E.: *Mikrochim. Acta* **128**, 223 (1998)
14. van Staden J. F., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta.* **323**, 75 (1996)
15. Paseková H., Polašek M., Cigarro J.F. a kol.: *Anal. Chim. Acta.* **438**, 165 (2001)
16. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *J. Flow Inj. Anal.* **13**, 148 (1996)
17. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *Microchem. J.* **55**, 392 (1997)
18. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *Talanta.* **44**, 1563 (1997)
19. Pimenta A.M., Montenegro M.C.B.S.M., Araújo A.N., Martínéz Calatayud J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 25 (2006)
20. Curry S.M.: *Drug Psychiatry.* **3**, 489, (1985)
21. Karvinska J., StarczewskaB., Puzanowska-Tarasiewicz H.: *Anal. Sci.* **12**, (1996)
22. Čermáková, Feltl L. a kol.: *Analytická chemie 1*, SNTL, Praha (1980)
23. Mladá B., Diplomová práce, Př.F UK, Praha (2007)
24. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z. :*Základní analytická chemie* **182**, Karolinum, Praha (2002)