Ćwiczenie 7. Wyznaczanie stałej szybkości oraz parametrów termodynamicznych reakcji hydrolizy kwasu acetylosalicylowego (aspiryny).

Chemiczna stabilność leków decyduje o tym, czy lek zadziała skutecznie i bezpiecznie. Jeżeli substancja czynna ulega rozkładowi, lek może nie tylko tracić swoją moc (efekt terapeutyczny), ale dodatkowo powstający produkt uboczne mogą wykazywać działanie niekorzystne (toksyczne) dla pacjenta. Dlatego też firmy farmaceutyczne starają się tak opracować leki i określają warunki ich przechowywania, tak aby przez cały okres ważności w opakowaniu znajdowało się przynajmniej 90–95% deklarowanej dawki.
Jednym z najczęstszych procesów prowadzących do rozkładu leków jest hydroliza. Klasycznym jej przykładem jest rozpad kwasu acetysalicylowego (potocznie nazywanego aspiryną, ASA) w wyniku którego powstają: kwas salicylowy oraz kwas octowy. Reakcja ta przebiega według kinetyki reakcji drugiego rzędu ponieważ jest zależna zarówno od stężenia leku (aspiryny) oraz od pH (stężenia jonów wodorowych w roztworze). W silnie kwaśnym środowisku aspiryna jest stabilna chemicznie i praktycznie nie ulega hydrolizie. Natomiast w środowisku lekko zasadowym ulega dość szybkiemu rozkładowi, w zależności od stężenia leku i jonów hydroksylowych [OH^-]. Przy pH = 7,5 wyrażenie na szybkość hydrolizy aspiryny może być zapisane następująco:

$$-\frac{d[A]}{dt} = K \cdot [A] \cdot [OH^-]$$

gdzie:
[A] - stężenie aspiryny
[OH^-] - stężenie jonów hydroksylowych
K - stała szybkości reakcji drugiego rzędu
t - czas

Jeżeli będziemy prowadzić reakcję w środowisku o stałym pH (bufor utrzymuje stałe pH), to stężenie jonów hydroksylowych pozostaje stałe ([OH^-] = C) i równanie można przedstawić w postaci :

$$\frac{-\mathrm{d}[\mathrm{A}]}{\mathrm{dt}} = \mathrm{KC}\ [\mathrm{A}]$$

gdzie: C = niezmienione stężenie jonów hydroksylowych

Jeśli stężenie jonów hydroksylowych będzie stałe, to możemy sprowadzić to równanie do kinetyki reakcji pseudo-pierwszego rzędu i powyższe wyrażenie sprowadzić do wyrażenia:

$$\frac{-\mathrm{d}[\mathrm{A}]}{\mathrm{dt}} = \mathrm{K_{app}}\,[\,\mathrm{A}\,]$$

gdzie: $K_{app} = K\ C$

Z powyższego wyrażenia wynika, że rozkład aspiryny w roztworze buforowanym o pH = 7,5 może być opisany za pomocą kinetyki reakcji pierwszego rzędu. Reakcja jest reakcją pierwszego rzędu i stała szybkości reakcji zależy od stężenia tylko jednego reagenta -

w tym wypadku aspiryny. Scałkowana forma równania na szybkość reakcji pierwszego rzędu przedstawia się następująco:

$$ln\ A_t = ln\ A_o - K_{app}\ t$$

Równanie to można przedstawić w postaci wyrażenia na stałą szybkości reakcji

$$K_{app} = \frac{1}{t} ln \frac{A_o}{A_t} \qquad \text{lub} \qquad K_{app} = \frac{2{,}303}{t} \lg \frac{A_o}{A_t}$$

gdzie:

A_t = ilość leku pozostająca po czasie t — K_{app} = pozorna stała reakcji I rzędu

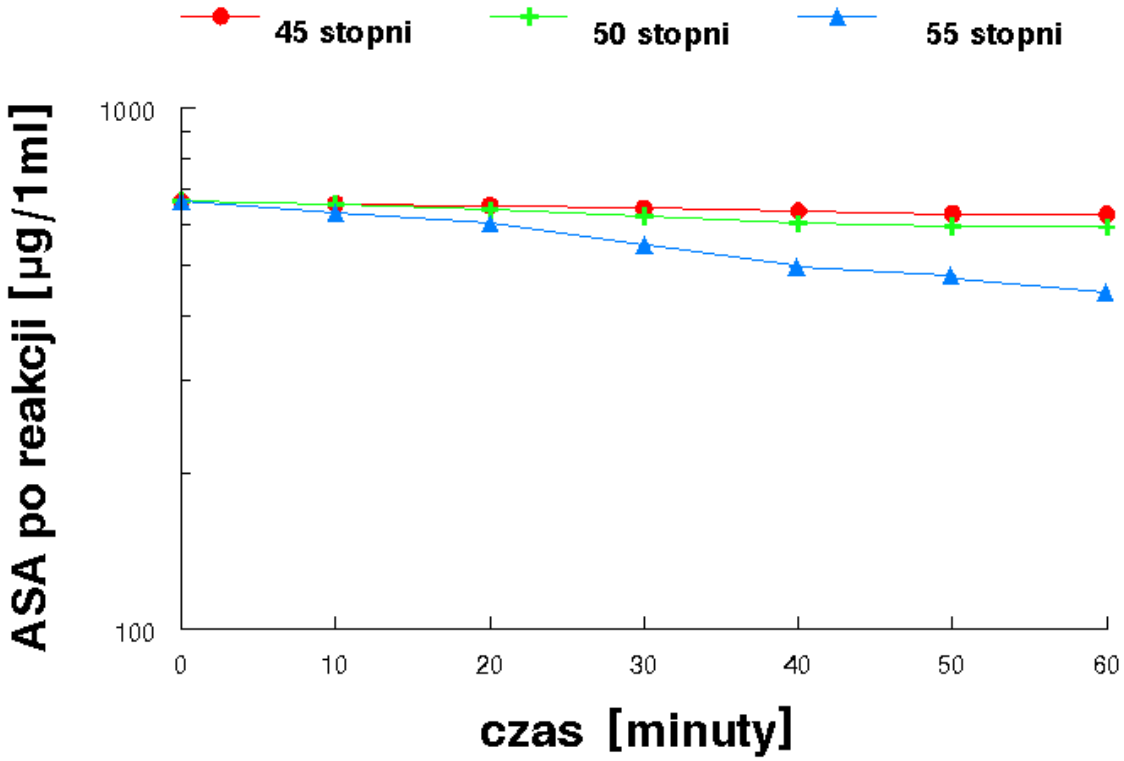
A_o = początkowa ilość leku — t = czas reakcji

Jest to równanie typu: y = mx + b

gdzie:

m = nachylenie krzywej — b = punkt przecięcia osi y

Dla hydrolizy aspiryny w buforowanym roztworze (pH=7, 5), półlogarytmiczna krzywa zależności stężenia aspiryny, która jeszcze nie uległa rozkładowi od czasu jest linią prostą o współczynniku nachylenia równym: $-K_{app}$ (ryc. 1).



Ryc 1. Kinetyka degradacji aspiryny.

Eksperymentalnie określona stała szybkości reakcji pierwszego rzędu (K_{app}) może być sprowadzona do rzeczywistej stałej dla reakcji drugiego rzędu poprzez wyrażenie:

$$K_{app} = K[OH^-]$$

Degradacja aspiryny, zachodząca zgodnie z kinetyką reakcji „pseudo" pierwszego rzędu w buforowanym roztworze o pH = 7,5 może być kontrolowana spektrofotometrycznie

przez pomiar wzrostu stężenia kwasu salicylowego. Jeden mol kwasu salicylowego powstaje wskutek degradacji jednego mola aspiryny. Używając stosunku ciężarów cząsteczkowych aspiryny (180 u) do kwasu salicylowego (138 u), możemy określić ilość mg aspiryny ulegającej rozkładowi przypadającej na każdy mg powstającego kwasu salicylowego:

$$1 \text{ mg kw. salicyl.} \times \frac{180{,}16 \text{ g/mol aspiryny}}{138{,}12 \text{ g/mol kw. salicyl}} = 1{,}304 \text{ mg ASA}$$

Zatem z każdego miligrama kwasu salicylowego powstaje wskutek degradacji 1,304 mg aspiryny. Ilość aspiryny w roztworze na początku doświadczenia jest znana (ilość mg w określonej objętości). Na podstawie ilości utworzonego kwasu salicylowego możemy wyznaczyć ile aspiryny uległo rozkładowi. Z kolei po określeniu ilość aspiryny, która uległa rozkładowi, z różnicy możemy wyznaczyć ilość aspiryny, która pozostała nierozłożona.

Kiedy powstają nowe leki jest wskazane określenie stabilności leku. Dla wielu leków określa się współczynnik tzw. T_{90} jako czas, w którym produkt zachowuje 90 % wyjściowej siły działania. Szczególnie interesująca jest stabilność leków w temperaturze pokojowej. Wpływ temperatury na pozorną stałą szybkości podaje równanie Arrheniusa:

$$K_{app} = A\, e^{-Ea/RT}$$

gdzie:

K_{app} = pozorna stała szybkości reakcji

A = współczynnik częstotliwości

E_a = energia aktywacji reakcji

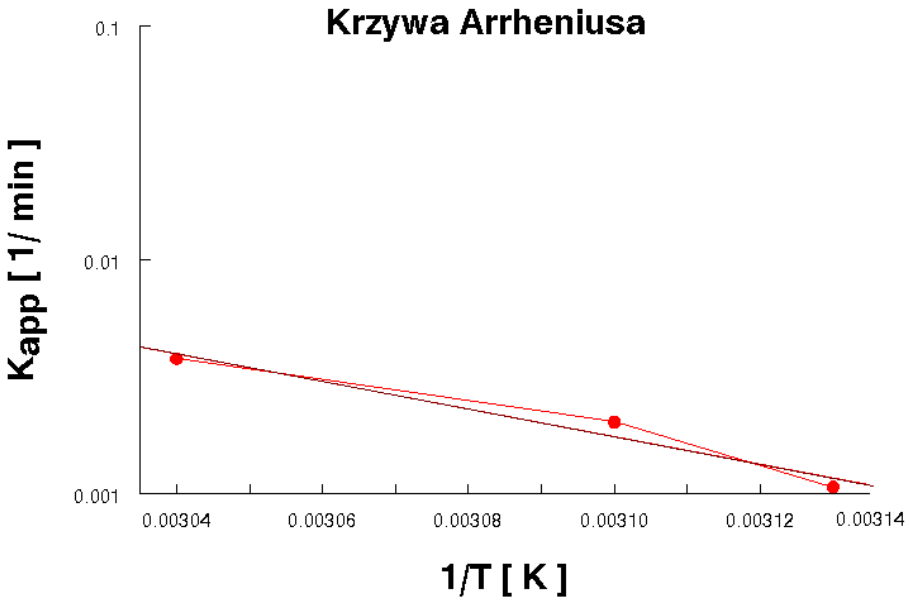
R = stała gazowa (1.987 cal / °K · mol)

T = temperatura (°K)

Równanie Arrheniusa może być przedstawione w postaci:

$$\ln K_{app} = \ln A - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T}$$

co obrazuje graficznie ryc. 2.



Ryc. 2. Krzywa Arrheniusa reakcji hydrolizy kwasu acetylosalicylowego.

Rozkład aspiryny w buforowanym roztworze o pH =7,5 w temperaturze pokojowej zachodzi powoli. Szybkość tej reakcji jest znacznie większa w temperaturze 50°C i powyżej tej temperatury. Dla zbadania stałej szybkości hydrolizy aspiryny wykonane zostaną pomiary w temperaturze pokojowej (~25 °C) oraz w łaźniach wodnych o temperaturze 45°C i 55°C.

Wykonanie:

Odczynniki:

- 90 mg aspiryny (ASA), które rozpuszczamy bezpośrednio przed ćwiczeniem w 5 ml wodorowęglanu sodu (12 mM $NaHCO_3$)
- 0,5 M. bufor tris – HCl o pH = 7,5
- odczynnik Trindera (powinien być gotowy do użycia)
  Rozpuścić ogrzewając 40 g $HgCl_2$ w 850 cm^3 wody. Po ostudzeniu dodać 120 cm^3 1 M. HCl oraz 40g $Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$. Po rozpuszczeniu soli żelaza (III) uzupełnić roztwór wodą do objętości 1 dm^3. Przygotowany roztwór jest trwały nieograniczenie.
- roztwór podstawowy kwasu salicylowego (1 mg/ml)
  Rozpuścić 0,5 g kwasu salicylowego w wodzie, w kolbie miarowej o poj. 500 cm^3. Przed uzupełnieniem roztworu wodą dodać kilka kropli chloroformu jako środka konserwującego. Roztwór jest trwały przy przechowywaniu w lodówce przez okres 6 miesięcy.

1. Sporządzenie krzywej wzorcowej kwasu salicylowego

Do pięciu probówek dodać kolejno roztwór podstawowego kwasu salicylowego i wody w objętościach podanych w tabeli poniżej:

	Pr. 1 (10 μg)	Pr. 2 (20 μg)	Pr. 3(40 μg)	Pr. 4 (80 μg)	Pr. 5 (100 μg)
Kwas salicylowy (ml)	0,25	0,5	1	2	2,5
Woda (ml)	4,75	4,5	4	3	2,5

Następnie, po wymieszaniu przygotować z nich próby do odczytu absorbancji. W tym celu do kuwet spektofotometru wlać po 750 μl H_2O, 200 μl przygotowanego roztworu kwasu salicylowego (z poszczególnych próbówek 1-5) i po 50 μl odczynnika Trindera. Za pomocą mieszadełka wymieszać zawartość, po czym odczytać absorbancję (A) przy 530 nm. Poszczególne próby powinny różnić się intensywnością zabarwienia i zmierzoną wartością absorbancji. Następnie sporządzić wykres zależności: A=f ($C_{kw.\ salicylowego}$). Poszczególne próby będą zawierały kolejno: 10, 20 , 40, 80 i 100 μg kwasu salicylowego w mililitrze.

2. Badanie rozkładu (hydrolizy) kwasu acetylosalicylowego (aspiryny)

Rozpuścić przygotowaną naważkę aspiryny w 5 ml wodorowęglanu sodu. Po dodaniu próbę należy wymieszać, pamiętając o tym aby co pewien czas ją odpowietrzać. W wyniku wytrząsania powstaje gazowy dwutlenek węgla, który powodując wzrost ciśnienia może doprowadzić do wyrzucenia cieczy z probówki. *UWAGA: zamkniętej szczelnym korkiem probówki nie należy zwracać w kierunku osób przebywających obok. Wzrost ciśnienia w przypadku braku odpowietrzania może spowodować wyrzut cieczy i korka.*

Przygotować 3 mieszaniny inkubacyjne dodając do każdej z nich: 1,5 ml roztworu ASA oraz 0,5 ml buforu Tris – HCl o pH = 7,5 (prowadzący może ustalić inne proporcje). Jedną probówkę zostawiamy w statywie (temperatura pokojowa), kolejną umieszczamy w łaźni ogrzanej wcześniej do temperatury 45°C, a ostatnią do łaźni o temperaturze 55°C.

Natychmiast po sporządzeniu wymieszać i z jednej z próbówek pobrać 50 *µl* roztworu, który następnie przenosimy do kuwety zawierającej 900 *µl* H_20 i 50 *µl* odczynnika Trindera (czas t=0). Wymieszać zawartość za pomocą szpatułki i dokonać odczytu na spektofotometrze przy 530 nm, stosując wodę jako próbę odniesienia (zerowanie). Na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych (λ=530 nm) określić stężenie kwasu salicylowego i ilość rozłożonej aspiryny w próbie. Z różnicy rozpuszczonej rozłożonej ilości ASA wyliczyć stężenie początkowe w próbie.

Z każdej mieszaniny (znajdującej się w róznych temperaturach) co 10 minut pobierać 50 *µl* próby i dodawać ją do kiuwety zawierającej 900 *µl* H_20 i 50 *µl* odczynnika Trindera. Mierzyć absorbancję przy 530 nm. Wyniki pomiarów zestawić w tabeli (trzy oddzielne tabele dla każdej temperatury).

Czas reakcji t [min]	Absorbancja	Stężenie kw. salicyl. [µg]	Stężenie ASA rozłożonego [µg]	Stężenie ASA pozostałego (a-x) [µg]	Stała szybkości reakcji k [min^{-1}]
0					----------*
10					
20					
30					
40					
50					
60					

Stała szybkości określona jest równaniem: $$k = \frac{2{,}303}{t} \log \frac{a}{(a-x)}$$

Opracowanie wyników

1. Z krzywej wzorcowej, na podstawie pomiarów absorbancji, odczytać ilości µg kwasu salicylowego powstałego w wyniku rozkładu aspiryny i mnożąc przez 1,3 ustalić ilość µg ASA, która uległa rozkładowi. Z różnicy miedzy początkowym stężeniem aspiryny w

* Nie wyliczamy stałej szybkości w czasie 0. Potrzebujemy tylko wartości stężenia początkowego (a), do wyliczenia stałej szybkości reakcji w poszczególnych czasach.

czasie „0” a stężeniem rozłożonego ASA po czasie t ustalić ilość aspiryny która nie uległa jeszcze rozkładowi.

Ilość pozostałej aspiryny w czasie 0 odpowiada stężeniu początkowemu (a). Natomiast ilość pozostałej aspiryny w poszczególnych czasach odpowiada stężeniu, które pozostało w próbie (a-x).

Zakładając, że cała aspiryna rozpuściła się w roztworze, to jej stężenie wynosi (C = m / V):

90 mg / 5 ml = 18 mg/ml.

Tak przygotowaną próbę następnie rozcieńczono, zatem stężenie aspiryny należy wyliczyć z zależności $C_1V_1 = C_2V_2$. Przykładowo do 1,5 ml roztworu dodano 0,5 ml buforu:

$$C = \frac{1{,}5ml \cdot 18mg/ml}{(1{,}5ml + 0{,}5ml)} = 13{,}5mg/ml$$

Do dalszych pomiarów użyto 50 µl tak przygotowanego roztworu, który finalnie rozcieńczono do objętości 1 ml (1000 µl = 900 + 50 + 50). Zatem stężenie początkowe aspiryny wynosiłoby:

$$C = \frac{50\mu l \cdot 13{,}5mg/ml}{1000\mu l} = 0{,}675 \text{ mg/ml} = 675 \text{ µg/ml}$$

Pamiętajmy jednak, że już w trakcie rozpuszczania zaczyna ona ulegać hydrolizie i na wynik ostateczny wpłynie czas jaki potrzebny był na całkowite rozpuszczenie leku. Dlatego określamy stężenie powstałego kwasu salicylowego w czasie „0” i odejmujemy tą wartość od wyliczonej wartości 675 µg/ml.

2. Wyniki dla poszczególnych temperatur zestawić w tabelach (w sprawozdaniu powinny być trzy tabele – dla poszczególnych temperatur).

Wyznaczyć średnią stałą szybkości dla każdej temperatury – wartości zapisać pod tabelami.

3. Obliczyć energię aktywacji hydrolizy aspiryny i współczynnik temperaturowy (Q_{10})

$$Q = \frac{k_2}{k_1}$$

$$E_a = \frac{2{,}303\,R \cdot T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{k_2}{k_1} \quad \text{lub} \quad E_a = \frac{2{,}303\,R \cdot T_1 \cdot T_2}{10} \cdot \log Q_{10}$$

gdzie T_1, T_2 odnosi się do temperatury odpowiednio niższej (1) i wyższej (2), podobnie jak

k_1, k_2 – do średniej ze stałej szybkości rozkładu w temperaturze niższej (1) i wyższej (2)