

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

Chemiczna stabilność leków jest ważnym terapeutycznym problemem. W przypadku chemicznej niestabilności leku terapeutyczny efekt nie może być w pełni zrealizowany. Dekompozycja leku może prowadzić do powstawania toksycznych produktów, które mogą być niebezpieczne dla pacjenta. Koncerny farmaceutyczne muszą wybierać dawkowanie i warunki przechowywania tak, żeby możliwa do przyjęcia (generalnie 90 – 95 % wielkości) zawartość leku w produkowanych specyfikach, była obecna w możliwym do przyjęcia czasie. Hydroliza leków może być istotnym czynnikiem ich niestabilności. Na przykład w wyniku hydrolizy kwasu acetylosalicylowego (potocznie nazywanego aspiryną, ASA) powstają produkty: kwas salicylowy i kwas octowy. Reakcja ta jest reakcją drugiego rzędu ponieważ jest zależna nie tylko od stężenia aspiryny, ale też od pH.

Przy pH = 7,5 wyrażenie na szybkość hydrolizy aspiryny może być zapisane następująco:

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

gdzie:

[A] - stężenie aspiryny

K - stała szybkości reakcji drugiego rzędu

[OH<sup>-</sup>] - stężenie jonów hydroksylowych

t - czas

Roztwór jest buforowany tak, że stężenie jonów hydroksylowych pozostaje stałe i wyrażenie można przedstawić w postaci :

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

gdzie: C = niezmiennione stężenie jonów hydroksylowych

Wobec tego stała drugiego rzędu może być sprowadzona do stałej pierwszego rzędu i powyższe wyrażenie sprowadzone do wyrażenia zapisanego niżej:

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

gdzie:

$$K_{app} = KC$$

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

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

gdzie:

$A_t$  = ilość leku pozostająca po czasie  $t$

$A_o$  = początkowa ilość leku

$K_{app}$  = pozorna stała reakcji I rzędu

$t$  = czas reakcji

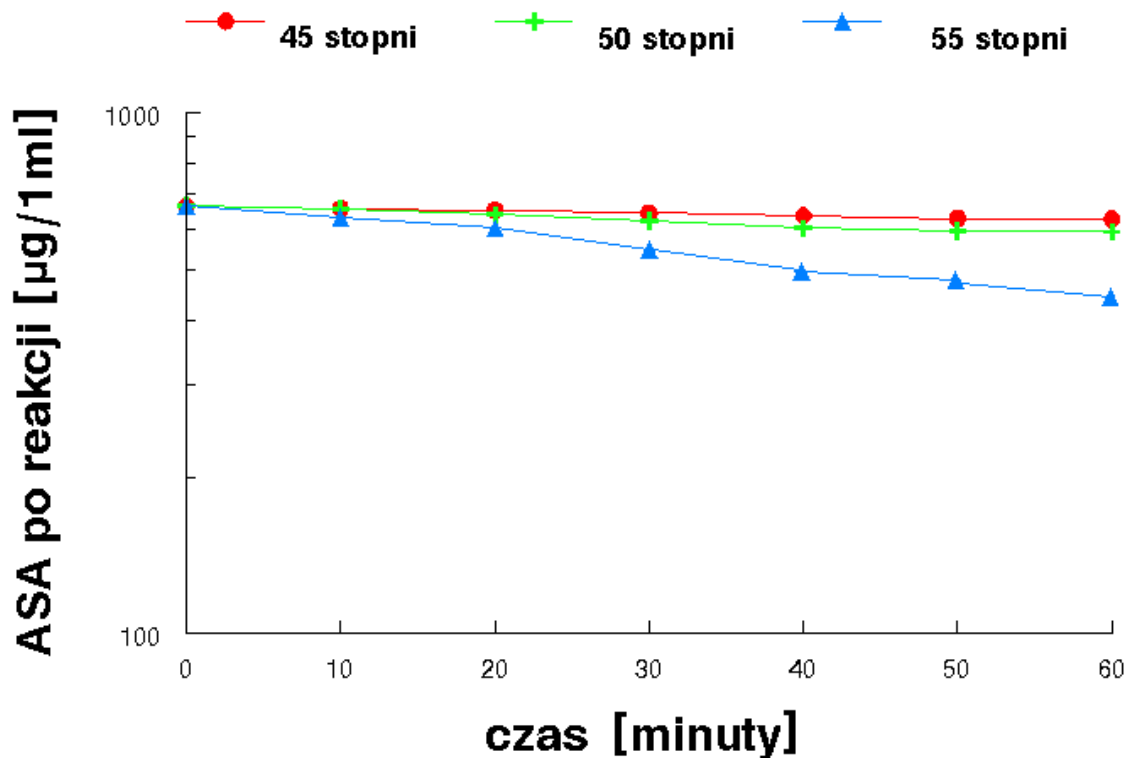
Jest to równanie typu:  $y = mx + b$

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 do kwasu salicylowego, możemy określić ilość mg aspiryny ulegającej rozkładowi przypadającej na każdy mg powstającego kwasu salicylowego:

$$1 \text{ mg kw. salicyl.} \times \frac{180,15 \text{ g/mol aspiryny}}{138,12 \text{ g/mol kw. salicyl.}} = 1,304 \text{ mg ASA}$$

Zatem każdy miligram 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 ilości 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:

$$K_{app} = A e^{-E_a/RT}$$

gdzie:

$K_{app}$  = pozorna stała szybkości reakcji

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

$A$  = współczynnik częstotliwości

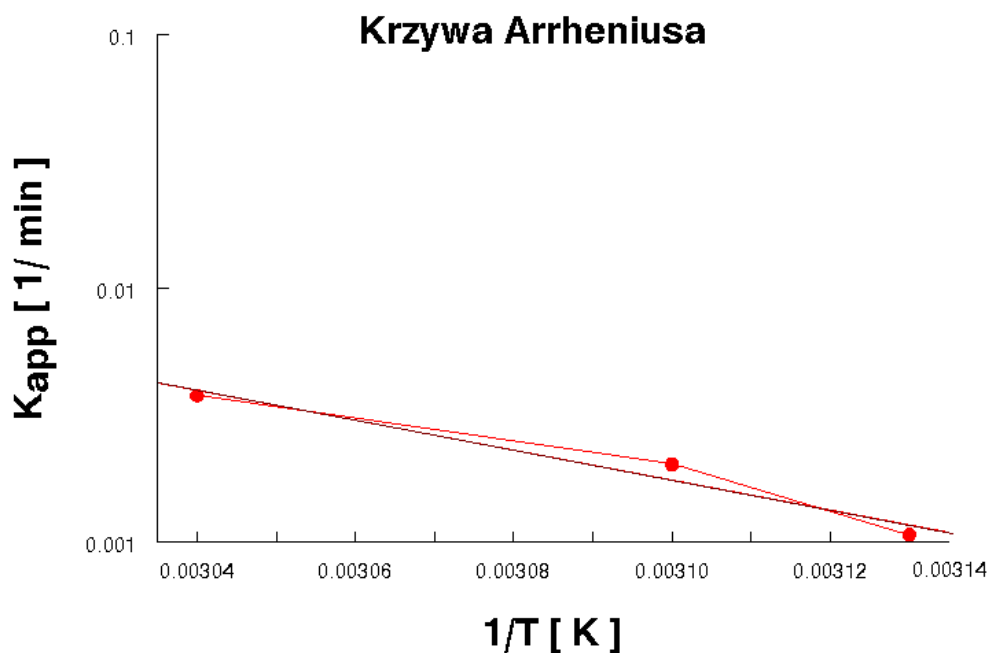
$T$  = temperatura (°K)

$E_a$  = energia aktywacji reakcji

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  $\text{pH} = 7,5$  w temperaturze pokojowej zachodzi powoli. Szybkość tej reakcji jest znacznie większa w temperaturze  $50^\circ\text{C}$  i powyżej tej temperatury. Aby przyspieszyć hydrolizę aspiryny - dla zbadania stałej szybkości tej reakcji pomiary będą prowadzone w temperaturach:  $45^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  i  $55^\circ\text{C}$ .

### **Wykonanie:**

Odczynniki:

- 90 mg aspiryny (ASA), które rozpuszczamy bezpośrednio przed ćwiczeniem w 5 ml wodorowęglanu sodu (12 mM  $\text{NaHCO}_3$ )
- 0,5 M. bufor tris – HCl o  $\text{pH} = 7,5$
- odczynnik Trindera (powinien być gotowy do użycia)  
Rozpuścić ogrzewając 40 g  $\text{HgCl}_2$  w 850  $\text{cm}^3$  wody. Po ostudzeniu dodać 120  $\text{cm}^3$  1 M. HCl oraz 40g  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ . Po rozpuszczeniu soli żelaza (III ) uzupełnić roztwór wodą do objętości 1  $\text{dm}^3$ . 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  $\text{cm}^3$ . 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 $\mu\text{g}$ ) | Pr. 2 (20 $\mu\text{g}$ ) | Pr. 3(40 $\mu\text{g}$ ) | Pr. 4 (80 $\mu\text{g}$ ) | Pr. 5 (100 $\mu\text{g}$ ) |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 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 kiuwet spektrofotometru wlać po 750  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 200  $\mu\text{l}$  przygotowanego roztworu kwasu salicylowego (z poszczególnych próbek 1-5) i po 50  $\mu\text{l}$  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:  $A=f(C_{\text{kw. salicylowego}})$ . Poszczególne próby będą zawierały kolejno: 10, 20 , 40, 80 i 100  $\mu\text{g}$  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: 3 części objętościowe roztworu ASA (np. 1,5 ml) do jednej części (np. 0,5 ml) buforu tris – HCl. Natychmiast po sporządzeniu wymieszać i z każdej probówki pobrać po 50  $\mu$ l, którą przenosimy do kuwety zawierającej 900  $\mu$ l H<sub>2</sub>O i 50  $\mu$ l odczynnika Trindera (czas t=0). Na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych ( $\lambda=530$  nm) określić stężenie kwasu salicylowego i ilość rozłożonej aspiryny w każdej próbce. Z różnicy rozpuszczonej rozłożonej ilości ASA wyliczyć stężenie początkowe w każdej próbce. Probówki zawierające mieszaniny ASA z buforem tris-HCl wstawiamy do inkubacji do łaźni wodnych o temperaturze: 45, 50 i 55 °C.

Z każdej mieszaniny (znajdującej się w różnych temperaturach) co 10 minut pobierać 50  $\mu$ l próby i dodawać ją do kuwety zawierającej 900  $\mu$ l H<sub>2</sub>O i 50  $\mu$ l odczynnika Trindera. Mierzyć absorbancję przy 530 nm. Wyniki pomiarów zestawić w tabeli (trzy oddzielne tabele dla każdej temperatury).

| Czas reakcji<br>t [min] | Absorbancja | Stężenie kw.<br>salicyl.<br>[ $\mu$ g] | Stężenie ASA<br>rozłożonego<br>[ $\mu$ g] | Stężenie ASA<br>pozostałego<br>(a-x) [ $\mu$ g] | Stała<br>szybkości<br>reakcji<br>k [ $\text{min}^{-1}$ ] |
|-------------------------|-------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 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 absorbancji, odczytać ilości  $\mu$ g kwasu salicylowego powstałego w wyniku rozkładu aspiryny i mnożąc przez 1,3 ustalić ilość  $\mu$ g ASA, która uległa rozkładowi. Z różnicy między początkowym stężeniem aspiryny w czasie „0” a stężeniem rozłożonego ASA po czasie t ustalić ilość aspiryny która nie uległa jeszcze rozkładowi.

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

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 ( $C = m / V$ ):

$$90 \text{ mg} / 5 \text{ ml} = 18 \text{ mg/ml.}$$

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:

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

Do dalszych pomiarów użyto 50  $\mu\text{l}$  tak przygotowanego roztworu, który finalnie rozcieńczono do objętości 1 ml (1000  $\mu\text{l}$ ). Zatem stężenie początkowe aspiryny wynosi:

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

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