

Gyógyszerbomlás sebességének vizsgálata

Elméleti alap: P.W. Atkins: *Fizikai Kémia*, 26.1–3 (4. kiadás), vagy 25.1–3 (6. kiadás) fejezetek.

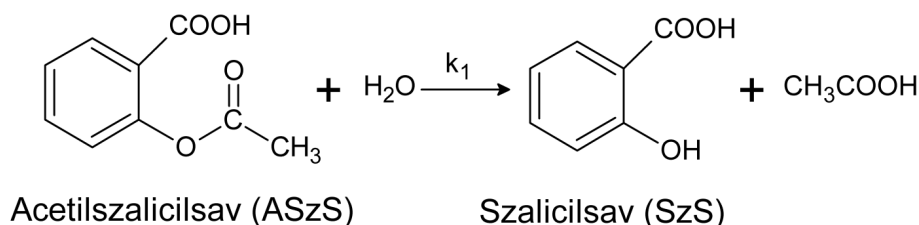
Gyakorlat típusa: Egyéni.

Gyakorlat célja: Az egyik legelterjedtebb láz- és fájdalomcsillapító vegyület, az acetilszalicilsav¹ hidrolízisének kinetikai tanulmányozása vizes oldatban.

1. Bevezetés

A nyírfa kérgét már az ókorban is használták láz és fájdalom csillapítására. Mint sokkal később kiderült, a kéreg szalicilsav tartalma a hatóanyag. Ennek tartós, vagy nagy adagban történő használata azonban súlyos gyomorbántalmakat, fekélyt okoz. A 19. század végén a Bayer cégnél kísérletezték ki, hogy ha nem közvetlenül szalicilsavat, hanem ennek ecetsavval képzett észterét, az acetilszalicilsavat használják gyógyszerként, akkor a mellékhatások jelentősen csökkenthetők. Magyarországon a Kalmopyrin, Istopirin, Aspirin és ASS a legismertebb gyógyszerek, amelyek ezt a hatóanyagot tartalmazzák, de a világon több, mint 200 szabadalmaztatott gyógyszer létezik ilyen hatóanyaggal.

Az acetilszalicilsav szilárd állapotban évekig eltartható vegyület. Vizes oldatban azonban nem stabil, a vízzel reakcióba lépve lassan, órák alatt elbomlik szalicilsavra és ecetsavra az 1. ábrán látható egyenlet szerint:



1. ábra. Acetilszalicilsav vizes közegben történő bomlása.

Ha ez a lassú hidrolízis a gyomorban következik be, akkor hosszú ideig olyan szalicilsav koncentrációt biztosít a szervezetben, amely már csillapítja a lázat és a fájdalmat, de elég kicsi ahhoz, hogy a mellékhatások sokkal kisebb mértékben jelentkezzenek.

A hidrolízis sokkal gyorsabban megy végbe lúgos közegben, ahol a reakciópartner a víz helyett / mellett a hidroxidion. Erősen lúgos ($pH > 13$) oldatokban a hidrolízis egy óra alatt teljesen lejátszódik, ezért ilyen oldatokban történő vizsgálatokkal célszerű a hatóanyagtartalmat meghatározni.

A gyakorlat során a hidrolízist enyhén lúgos körülmények között és az emberi testnél magasabb hőmérsékleten vizsgáljuk azért, hogy a munkát a rendelkezésre álló idő alatt be lehessen fejezni. Az emberi szervezetben a hidrolízis savas körülmények között megy végbe és nemcsak a gyomorsav, hanem enzimek is katalizálják. A valós „alkalmazásban” a hidrolízis kicsit lassabban megy végbe, mint a gyakorlaton.

2. Az értékeléshez szükséges egyenletek

A reakció vizes oldatban az acetilszalicilsavra (ASzS) nézve pszeudo-elsőrendűnek tekinthető mind a víz nagy feleslege, mind az állandó hidroxidion koncentráció miatt (mivel ez nem fogy a sztöchiometriai egyenlet szerint). Ezek miatt az ASzS koncentrációjára érvényes az elsőrendű sebességi egyenlet integrált és átrendezett alakja:

$$[\text{ASzS}]_t = [\text{ASzS}]_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (k = k_2 \cdot [\text{H}_2\text{O}]), \quad (1)$$

ahol k a pszeudo-elsőrendű sebességi együttható.

¹IUPAC neve 2-acetoxibenzoésav, néha helytelenül, de egyszerűen aszpirinnek is hívják.

A reakció során keletkező szalicilsav (SzS) a Fe(III)-ionokkal stabil, lila színű komplexet képez, amely a látható színek tartományban spektrofotometriásan detektálható. Elegendően nagy Fe(III)-koncentrációt és megfelelő pH-t alkalmazva az összes szalicilsav olyan komplexbe vihető, amely a fémiont és a ligandumot 1:1 arányban tartalmazza, így a Lambert–Beer törvény értelmében a t időpillanatban λ hullámhosszon mérhető abszorbancia (A_t^λ) arányos lesz a szalicilsav koncentrációjával:

$$A_t^\lambda = \epsilon_{\text{komplex}}^\lambda \cdot [\text{komplex}]_t \cdot l = \epsilon_{\text{komplex}}^\lambda \cdot [\text{SzS}]_t \cdot l, \quad (2)$$

ahol $\epsilon_{\text{komplex}}^\lambda$ a vas(III)-szalicilát komplex moláris abszorbanciája a használt hullámhosszon és l az optikai úthossz. Mivel a gyakorlatban csak egy hullámhosszon történnek a mérések, a továbbiakban a hullámhossz jelölését elhagyjuk az egyszerűbb egyenletek kedvéért.

Mivel a termék koncentrációját tudjuk követni a fényelnyelése alapján, ezért érdemes az (1) egyenletet átalakítani úgy, hogy abban csak a szalicilsav koncentrációk szerepeljenek. Az 1. ábrán bemutatott reakció egyenlet sztöchiometriája értelmében az acetilszalicilsav kezdeti koncentrációja megegyezik a szalicilsav végső koncentrációjával:

$$[\text{ASzS}]_0 = [\text{SzS}]_\infty,$$

valamint igaz az is, hogy a reakció bármely pillanatában az elreagálatlan acetilszalicilsav koncentrációja az

$$[\text{ASzS}]_t = [\text{SzS}]_\infty - [\text{SzS}]_t$$

összefüggéssel írható le. Ezeket az összefüggéseket az (1) egyenletbe helyettesítve kapjuk a

$$[\text{SzS}]_\infty - [\text{SzS}]_t = [\text{SzS}]_\infty \cdot e^{-k \cdot t}$$

kifejezést. Ebben a koncentrációkat abszorbanciákkal helyettesítve a (2) egyenlet alapján, majd a kapott összefüggés természetes alapú logaritmusát véve megkapjuk a mérések értékeléséhez használható összefüggést:

$$\boxed{\ln(A_\infty - A_t) = \ln A_\infty - k \cdot t}. \quad (3)$$

Ezen egyenlet alapján a reakció sebességi együtthatója a mért abszorbanciákból közvetlenül meghatározható, A_∞ pedig alkalmas a mérés pontosságának megítélésére. A (3) egyenletből az is látszik, hogy nem szükséges meghatározni sem a hatóanyag, sem a bomlástermék koncentrációját, elegendő az abszorbancia (mint koncentrációval arányos mennyiség) időbeli változását ismerni a kinetikai jellemzők meghatározásához.

Egy pszeudo-elsőrendű reakciót az így meghatározott sebességi együttható egyértelműen jellemez. Egy reakció sebességének jellemzésére azonban sokszor használják – szemléletessége miatt – a felezési időt ($t_{1/2}$) is, amely azt az időtartamot adja meg, amely alatt a reaktáns kezdeti koncentrációja a felére csökken². Az elsőrendű sebességi együttható és a felezési idő között egyértelmű összefüggés van, ami az (1) egyenlet segítségével könnyen levezethető. Ha a reaktáns fele fogyott el, akkor $[\text{ASzS}]_t = [\text{ASzS}]_0/2$. Ezt behelyettesítve az (1) egyenletbe, majd kifejezve az időt a következő összefüggéshez jutunk:

$$\boxed{t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}}. \quad (4)$$

A reakció sebességi együtthatóját több hőmérsékleten is meghatározva, a reakció aktiválási energiája (E_a) és az A -val jelölt ún. preexponenciális tényező³ is számítható az Arrhenius-egyenlet alapján (R az egyetemes gázállandó):

$$k_T = A \cdot e^{-E_a/(R \cdot T)}.$$

²Ez a definíció elsőrendű reakcióra egyértelmű, több reaktáns esetében azonban nem. Ilyenkor arra a reaktánsra vonatkozik, amelyik – a reakció sztöchiometriáját is figyelembe véve – a legkisebb mennyiségben van jelen.

³Az irodalomban mind az abszorbanciát, mind a preexponenciális tényezőt kizárólagosan nagy A betűvel jelölik. A leírásban a preexponenciális tényezőt a megkülönböztethetőség kedvéért félkövéren írjuk.

Két hőmérsékleten (T_1 és T_2) meghatározva a reakció sebességi együtthatójának értékeit (k_{T_1} és k_{T_2}), az aktiválási energiára és a preexponenciális tényezőre a következő összefüggéseket kapjuk (ld. még a második megjegyzést):

$$E_a = \frac{R}{\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}} \cdot \ln \frac{k_{T_1}}{k_{T_2}} \quad \text{és} \quad A = \frac{(k_{T_1})^{(T_1/(T_1-T_2))}}{(k_{T_2})^{(T_2/(T_1-T_2))}} \quad \left(= k_T \cdot e^{E_a/(R \cdot T)} \right) \quad (5)$$

3. A gyakorlat kivitelezése

A gyakorlat során egy adott hőmérsékleten vizsgáljuk egy gyógyszertablettában található acetilszalicilsav bomlását. Az alkalmazandó hőmérsékletet a gyakorlatvezető adja meg 53–58 °C között. Amennyiben a gyakorlatvezető mást nem mond, a hőmérséklet 55 °C. A reakcióelegyből megadott időpontokban mintát veszünk, a minta szalicilsavtartalmát Fe(III)-komplexszé alakítjuk és mérjük az így kapott oldatok abszorbananciáit 552 nm-en. Amennyiben a gyakorlatvezető mást nem mond, a mintavételek hozzávetőleges időpontja a reakció indítása utáni 10., 20., 30., 40., 50., 60. és 70. perc.

Állítsuk be a termosztátot a kijelölt hőmérsékletre. Miközben a termosztát eléri a beállított hőmérsékletet, 50 cm³ HCO₃⁻ / CO₃²⁻ puffert készítünk, melynek pH-ja 9,7–10,3 (az alkalmazandó pH-t a gyakorlatvezető adja meg) és a Na₂CO₃ bemért tömege 0,5–1,0 g között változik (gyakorlatvezető adja meg) a megfelelő pufferkapacitás biztosításához. Számítsuk ki a bemérendő vegyszerek tömegét, ha a puffer oldat pH-ja a Henderson–Hasselbalch képlet szerint függ az alkotók koncentrációjától:

$$pH = pK_s + \lg \left(\frac{[\text{konjugált bázis}]}{[\text{gyenge sav}]} \right),$$

ahol $K_s (= 4,688 \times 10^{-11})$ a sav disszociációs állandója és a szögletes zárójelek bemérési koncentrációk. Mind a két sót ugyanabba a 25–100 cm³-es főzőpohárba mérjük, majd minél kevesebb vízben feloldjuk, átmoszuk egy 50 cm³-es mérőlombikba, végül jelre töltjük.

A kapott gyógyszertabletta kb. 100 mg hatóanyag tartalmú részét dörzsmozsárban *gondosan* elporítjuk, majd főzőpohárban kevés vízben oldjuk úgy, hogy az összes térfogat 16–19 cm³ között legyen. Az acetilszalicilsav kioldása nem gyors folyamat, ezért az elegyet legalább 10 percig intenzíven keverni kell egy üvegbot segítségével. A tableta szárazanyag tartalma nem oldódik fel teljesen, ezért az oldatot szűrőpapíron keresztül szűrjük bele egy 25 cm³-es mérőlombikba, hogy az oldhatatlan anyag ne okozzon hibát az abszorbancia mérés során⁴.

Ha a termosztát elérte a beállított hőmérsékletet, helyezzük bele a puffer-, valamint a gyógyszer törzsoldatot 10–15 percre. A hőmérséklet beállítását az oldatokban nagymértékben meggyorsíthatjuk, ha az oldatokat 3–4 percenként megkeverjük. Amíg a törzsoldatok termosztálódnak, addig elkészítjük a t időpillanatig elbomlott acetilszalicilsav koncentrációjának meghatározásához szükséges oldatokat a következő módon: 7 db 25 cm³-es mérőlombik mindegyikébe pontosan (1) 0,50 cm³ 0,25 M sósav oldatot, valamint (2) 3,0 cm³ 0,10 M FeCl₃-oldatot mérünk. A lombikokat félig megtöltjük desztillált vízzel, és víz-jég keverékbe állítjuk (ld. még az első megjegyzést a leírás végén).

A törzsoldat teljes acetilszalicilsav tartalmának meghatározásához szükséges oldatot is elkészítjük. Egy 100 cm³-es mérőlombikba 0,3 cm³, 0,25 M NaOH-oldatot pipetázunk, majd ezt a lombikot is helyezzük a termosztátba.

Amikor letelt a törzsoldat termosztálásához szükséges idő, egy pipetta segítségével hozzáadunk 5,0 cm³ pufferoldatot a mérőlombikban lévő, gyógyszertablettából készült oldathoz és *homogenizáljuk azt*. A puffer hozzáadásával egyidőben elindítjuk a stoppert, ez lesz a reakció indulásának pillanata. A mérőlombikot nem

⁴Természetesen kevés hatóanyag így a főzőpohárban és a szűrőpapíron marad, de a kezdeti koncentrációt úgyis az elkészítendő törzsoldatból határozzuk meg, így a veszteség nem okoz hibát a kiértékelésben.

kell teljesen jelre tölteni, mert az értékeléskor nem a minták abszolút, hanem a relatív hatóanyagtartalma számít, de legalább 20–22 cm³-re lesz szükségünk, hogy az összes mintára maradjon elegendő oldat!

Rögtön ezután a törzsoldatból 2,00 cm³ mintát veszünk (*az oldatot nem emeljük ki a termosztátból!*), a mintát a lúgot tartalmazó 100 cm³-es lombikba folytatjuk, a lombik belső falára tapadt mintát 2–3 cm³ desztillált vízzel a lombik aljára mossuk úgy, hogy az összes minta összekeveredjen a lombikban lévő lúggal. A mérés végéig, kb. 70 percig a termosztátban hagyjuk ezt a lombikot, anélkül, hogy jelre töltenénk.

A törzsoldatból a fentebb megadott (vagy a gyakorlatvezető által kijelölt) időpontokban 2,00 cm³-es mintákat veszünk, ezeket az előkészített (jeges vízben álló, FeCl₃-ot és sósavat tartalmazó) 25 cm³-es mérőlombikokba mérjük, majd homogenizálva jelre töltjük őket. A 70 perc letelte után a 100 cm³-es lombikot is kiemeljük a termosztátból, jeges vízbe állítjuk, hozzáadunk először 2,0 cm³ 0,25 M sósavoldatot és másodszor 3,0 cm³ FeCl₃-oldatot⁵, homogenizáljuk, legvégül desztillált vízzel jelre töltjük. Még egyszer hangsúlyozva, ez utóbbi oldat segítségével határozzuk meg a törzsoldat acetilszalicilsav tartalmát t = 0 s időnél (ami megegyezik a reakció végén a szalicilsav tartalommal).

Az így kapott 8 oldat abszorbanciáját megmérjük 552 nm-en a rendelkezésre álló spektrofotométerrel. A mérések során ugyanazt a küvettát használjuk. Előfordulhat, hogy a spektrofotométert többen is használják, ezért amikor szükséges, a küvettát desztillált vízzel megtöltve állítsuk be a nulla abszorbancia értéket a mérések előtt. A mérések előtt a küvettát háromszor mossuk át a mérendő oldattal. Amennyiben van rá idő, akkor a korábban vett minták abszorbanciáit a reakció közben is meg lehet mérni (ld. még az első megjegyzést a leírás végén). Mivel a mérendő oldatok hidegek, a küvetta külső fala bepárásodhat. Az esetlegesen lecsapódott párákat a mérés előtt papírvattával vagy tiszta pamutronggyal le kell törölni. A t-edik pillanatban vett mintából készített oldat mért abszorbanciáját a továbbiakban A_t^{mért}-vel jelöljük. Amennyiben A_t^{mért} eléri az 1–1,2 tartományt, az oldatot kétszeresére kell hígítani és újra megmérni az abszorbanciáját.

4. A mért adatok értékelése

- A mért adatokat, valamint a (3) egyenlet alkalmazásához szükséges számolásokat foglaljuk össze az 1. táblázat mintájának megfelelően.

1. táblázat. A mérési eredmények összefoglalása

$$T_{\text{mérés}} = \dots \text{ } ^\circ\text{C} = \dots \text{ } \text{K}, A_{\infty}^{\text{mért}} = \dots, A_{\infty} = \dots$$

Mintavétel pontos ideje	t (s)	A _t ^{mért}	A _t	ln(A _∞ – A _t)	k (s ⁻¹)

A táblázat kitöltése során ne feledkezzünk meg arról, hogy az abszorbancia mért értékei nem egyeznek meg a (3) egyenletben szereplő A_t értékekkel. Ez utóbbiak azt az abszorbancia értéket jelölik, amelyet akkor mérnénk, ha a reakcióelegyből vett mintában az összes szalicilsavat *hígítás nélkül* tudnánk komplexbe vinni. Ebből következik, hogy a mért abszorbancia értékekből (A_t^{mért}) a hígítás figyelembevételével A_t értékei könnyedén számíthatóak. A sebességi együttható pontonkénti értékeit a (3) egyenlet segítségével számítjuk ki, majd átlagoljuk azokat és számítsuk ki a szórásukat (ld. Függelék).

- Ábrázoljuk a transzformált mérési pontokat egy ln(A_∞ – A_t) – t diagramon. A linearizált mérési pontokra illesztett egyenes segítségével számítsuk ki a sebességi együttható értékét (k_T) szórásával együtt. Az illesztett egyenes paramétereit, valamint azok szórását az Excel LIN.ILL függvényének segítségével határozzuk meg (ld. Függelék). Az A_∞ értéket hasonlítsuk össze a mért A_t^{mért} értékből számított A_∞ értékekkel. A mérés megbízhatóságának becsléséhez vizsgáljuk meg az A_∞ értékek százalékos eltérését.

⁵Itt a sorrend fontos, mert ha a vas(III)-oldatot adjuk először a lúghoz, akkor nehezen visszaoldható csapadék válik ki.

- Előzetes mérési adatok alapján, a megadott pH-tartományon belül, a vizsgált reakció sebességi együtthatója 40 °C-on $k_{40} = 9,8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ -nak vehető. Számítsuk ki a reakció felezési idejét az adott körülmények között mindkét hőmérsékleten! Hányszorosára gyorsult a reakció a magasabb hőmérsékleten?
- A különböző hőmérsékleteken rendelkezésre álló sebességi együtthatók alapján számítsuk ki a reakció aktiválási energiáját és preexponenciális tényezőjét!

Megjegyzések:

1. Előfordulhat, hogy nem áll rendelkezésre elegendő számú 25 cm³-es mérőlombik a mintavételhez. Ekkor annyi befagyasztó oldatot készítünk elő, ahány lombik van, majd a mintavétel után azonnal mérjük az abszorbanciát és a felszabadult lombikban mosogatás után újabb befagyasztó oldatot készítünk elő.
2. A preexponenciális tényezőt több módon is ki lehet fejezni a sebességi együtthatók és a hőmérsékletek függvényében. Az (5) egyenletben megadott első forma előnye, hogy talán ez jegyezhető meg a legkönnyebben és látszik, hogy az aktiválási energiát nem kell kiszámítani **A** meghatározásához. Hátránya, hogy az **A** mértékegysége nehezen olvasható ki, azonban akár az Arrhenius-egyenlet eredeti formájából, akár a második formából egyértelműen látszik, hogy **A** mértékegysége megegyezik a sebességi együttható mértékegységével. Az első forma ritkán számolási nehézségekhez is vezet: kis sebességi együtthatók és nagy abszolút értékű kitevők (vagyis kicsi hőmérséklet változás) esetén mind a számláló, mind a nevező számértéke nagyobb lehet, mint 1×10^{100} , így a szokásos számológépek és táblázatkezelők nem tudják az eredményt kiszámítani.

Ellenőrző kérdések

1. Írja fel az acetilszalicilsav vizes hidrolízisének reakcióegyenletét, szerkezeti képleteket használva!
2. Vezesse le egy elsőrendű reakció integrált sebességi egyenletét!
3. Hogyan határozza meg a gyakorlat során a keletkező szalicilsav mennyiségét?
4. Definiálja a Lambert–Beer törvényt!
5. Milyen – sztöchiometriai megfontolásokból levezethető – összefüggések érvényesek a hidrolízis során az acetilszalicilsav és a szalicilsav koncentrációi között?
6. Milyen összefüggés segítségével és hogyan határozza meg a reakció pszeudo-elsőrendű sebességi együtthatóját adott hőmérsékleten?
7. Adja meg az Arrhenius-egyenletet!
8. Vezesse le az aktiválási energiát megadó képletet, ha ismert a reakció pszeudo-elsőrendű sebességi együtthatója két hőmérsékleten!
9. Váolja 4–5 mondatban (a vízzel való feltöltéssel bezárólag), hogyan fogja elkészíteni az acetilszalicilsav törzsoldatot!
10. Írja le 3–4 mondatban, milyen problémák merülhetnek fel az abszorbanciák meghatározásakor és hogyan tudjuk ezeket elkerülni!
11. Az egyik mérésorozat alatt egy sósavat és vas(III)-kloridot tartalmazó 25 cm^3 -es, majd egy lúgot tartalmazó 100 cm^3 -es mérőlombikba $2\text{--}2\text{ cm}^3$ mintát pipettázott ki egy hallgató. A jelre töltés után mindkét oldat abszorbanciáját $A_t^{\text{mért}} = 0,348$ -nak mérte. Mekkora az A_t értéke a mintavétel t időpillanatában és az A_∞ értéke a mérésorozatban?
12. Egy elsőrendű reakció sebességi együtthatójának értéke $3,97 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$. Mennyi idő alatt képződik az összes termék fele?
13. Egy elsőrendű reakció sebességi együtthatójának értékei 33 °C -on $1,7 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ és 45 °C -on $5,8 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$. Mekkora a reakció aktiválási energiája?
14. Mekkora a pH -ja annak a puffer oldatnak, amit $50\text{--}50\text{ cm}^3$ $0,7\text{ M NH}_3$ és $1,2\text{ M NH}_4\text{Cl}$ oldat összeöntésével állítunk elő? $K_b = 1,8 \times 10^{-5}$.