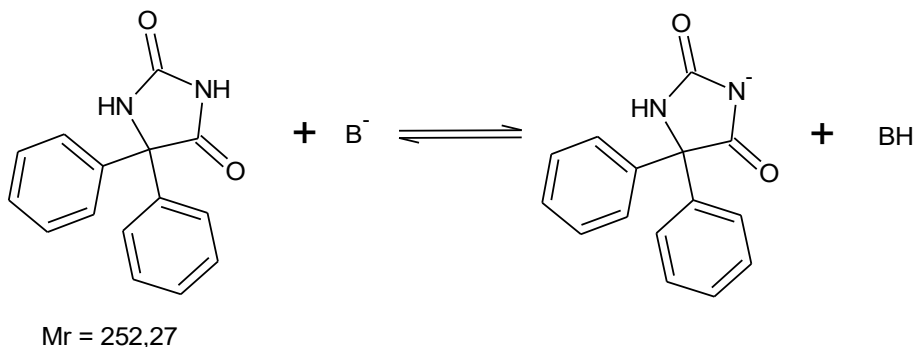


## Úloha č.6: Stanovení $pK_a$ fenytoinu

Úkol: 1. Stanovit  $pK_a$  5,5-difenylyhdantoinu s využitím spektrofotometrie v UV oblasti

2. Kolik procent fenytoinu bude v ionizované formě
- a) v žaludku při  $pH=1$
  - b) v tenkém střevě při  $pH=5,5$
  - c) v krevní plazmě při  $pH=7,4$  ?



### Princip metody

Pro disociaci slabých kyselin, mezi něž se řadí i klasické antiepileptikum fenytoin, platí Hendersonova-Hasselbachova rovnice, kterou lze psát ve tvaru

$$pK_a = pH + \log \left( \frac{[HA]}{[A^-]} \right), \quad [1]$$

kde  $[HA]$  je rovnovážná koncentrace nedisociované formy kyseliny a  $[A^-]$  rovnovážná koncentrace její disociované formy.

Spektrofotometrické stanovení disociační konstanty vyžaduje výrazné změny absorpčního spektra v závislosti na  $pH$ . Jako optimální vlnovou délku pro toto stanovení volíme takovou, při níž je největší rozdíl absorbancí spektra změřeného v silně kyselém a silně bazickém roztoku, t.j. mezi plně disociovanou a plně nedisociovanou formou sloučeniny. Změříme tedy absorbanci látky v plně disociované formě (v naší úloze v roztoku  $NaOH$  o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ ) a ve formě, kde je disociace zcela potlačena (v našem případě v roztoku  $HCl$  o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ ). Pro absorbanci látky platí Lambert-Beerův zákon

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l, \quad [2]$$

kde  $A$  je absorbance,  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient,  $c$  koncentrace látky a  $l$  délka vrstvy, kterou záření prochází, t.j. v praxi šířka kyvety. Pro absorbanci fenytoinu v plně disociované formě, t.j. v roztoku silné baze lze psát

$$A_{A^-} = \varepsilon_{A^-} \cdot [A^-] \cdot l = \varepsilon_{A^-} \cdot c_F \cdot l, \quad [3]$$

kde  $c_F$  je celková koncentrace fenytoinu, protože veškerá látka je za těchto podmínek disociována, tzn.  $[A^-] = c_F$ . Pro absorpenci fenytoinu v plně nedisociované formě platí obdobně

$$A_{HA} = \varepsilon_{HA} \cdot [HA] \cdot l = \varepsilon_{HA} \cdot c_F \cdot l, \quad [4]$$

protože veškerá látka je v nedisociované formě, tzn.  $[HA] = c_F$ .

Změříme dále absorbance sady roztoků fenytoinu s pH odstupňovaným tak, aby v nejkyseljším z nich byla látka prakticky úplně ve formě HA a v nejbazičtější téměř zcela ve formě  $A^-$ . Pokud jsme schopni hodnotu  $pK_a$  nějak odhadnout, např. na základě analogií nebo výpočtem pomocí vhodného programu pro predikci disociačních konstant, měla by hodnota pH číselně odpovídající odhadu  $pK_a$  ležet přibližně ve středu intervalu pH měřených roztoků. Pro absorpenci každého takového roztoku platí

$$A = \varepsilon_{A^-} \cdot [A^-] \cdot l + \varepsilon_{HA} \cdot [HA] \cdot l \quad [5]$$

Řešením rovnic [2]-[5] dostaneme pro poměr rovnovážných koncentrací v měřených roztocích  $[HA] / [A^-]$

$$[HA] / [A^-] = (A_A - A) / (A - A_{HA}) \quad [6]$$

Dosažením vztahu [6] do rovnice [1] dostaneme pro hledané  $pK_a$  vztah

$$pK_a = pH - \log \left\{ (A_A - A) / (A - A_{HA}) \right\} [7]$$

## Postup

### 1. Příprava roztoků

Ze zásobních roztoků TRIS pufru o pH 7,8, 8,0, 8,2, 8,4, 8,6, 8,8 a 9,0 a koncentraci  $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$  připravíme ředěním destilovanou vodou sadu odpovídajících roztoků o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a objemu 100 ml. Ze zásobních roztoků připravíme rovněž roztoky hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  také v objemu 100 ml. Dále připravíme roztok fenytoinu v ethanolu o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  takto: na analytických vahách odvážíme množství fenytoinu potřebné k přípravě 100 ml roztoku, v kádince mícháním tyčinkou rozpustíme asi v 80 ml ethanolu, přeneseme kvantitativně do odměrné baňky a doplníme ethanolom do 100,00 ml. Zůstane-li část krystalů v 80 ml ethanolu nerozpuštěná, zfiltrujeme směs přes papírový filtr do odměrné baňky na 100 ml a filtr promyjeme malým objemem ethanolu rovněž do odměrné baňky, objem doplníme do 100,00 ml. Z tohoto roztoku odpipetujeme  $9 \times 0,5 \text{ ml}$  do 9 odměrných baněk na

50 ml, které doplníme do 50,00 ml roztokem hydroxidu sodného, kyseliny chlorovodíkové a TRIS pufrů o pH 7,8 - 9,0 vždy o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ . Takto získáme sadu roztoků k měření. Podobně odpipetujeme  $9 \times 0,5$  ml ethanolu do odměrných baněk na 50 ml a doplníme výše zmíněnými roztoky NaOH, HCl a pufrů do 50,00 ml, čímž získáme sadu porovnávacích roztoků ("blanks").

#### 2a. Měření na jednoduchém UV-VIS spektrofotometru Jenway 6305

Zapneme spektrofotometr vypínačem vzadu a necháme proběhnout všechny testy. Zapneme počítač, přihlásíme se do Windows a spustíme software **63-Zero**. V záložce *Concentration-Method* zadáme vlnovou délku 236 nm a potvrdíme *Update Instrument*. Do prostoru pro kyvetu vložíme kyvetu naplněnou příslušným porovnávacím roztokem a v záložce *Measure* klikneme na *Cal to blank*. Je-li v okénku *Auto-read* jakékoli číslo, vymažeme ho. Pak vypláchneme kyvetu malým množstvím roztoku vzorku a naplníme kyvetu tímto roztokem. Kliknutím na *Read* změříme absorbanci. Dvojice porovnávací roztok-vzorek měříme zásadně v pořadí, jak jednotlivá pH následují po sobě, vzestupně nebo sestupně, ale pořadí důsledně zachováváme, a hodnoty absorbance ihned zapisujeme. Mezi měřeními po sobě jdoucích dvojic opakovaně proplachujeme kyvetu malým objemem následujícího porovnávacího roztoku. Takto postupně změříme všechny roztoky počínaje roztokem v kyselině, následují jednotlivá pH od nejnižšího po nejvyšší, a končíme roztokem v hydroxidu (nebo opačně, ale důsledně). **Bez dodržení pořadí pH se jednak budete těžko orientovat v naměřených hodnotách, ale rovněž bude větší chyba měření, způsobená změnou pH mícháním roztoků se zbytky předchozího.** Naměřená data lze vymazat pouze zavřením a novým otevřením **63-Zero**.

#### 2b. Měření na UV-VIS spektrofotometru Hewlett-Packard 8453

Po zapnutí spektrofotometru, počítače a monitoru se po nastartování Windows 3.11 objeví políčko, požadující jméno operátora a heslo. Zrušíme je položkou *Cancel*. Poklepáním na ikonu *Instrument I on line* v okně *HP UV-Visible ChemStation* spustíme program, ovládající spektrofotometr. Sledujeme hlášení v dolní části obrazovky. Svítí-li v pravém dolním rohu modré políčko s nápisem *busy*, počkáme s další činností, až zmizí. V položce *Instrument* horní nabídky zvolíme *Lamps* a přesvědčíme se, je-li zapnuta deuteriová výbojka, která je zdrojem ultrafialového záření (u *Deuterium lamp* musí být vybráno *ON*). Wolframovou žárovku vypneme nebo necháme vypnutou (*Tungsten lamp OFF*), k měření v UV oblasti ji nepotřebujeme. V položce *Task* zvolíme *Fixed wavelenghts* a v nabídce *Setup* vepíšeme do tabulky jedinou vlnovou délku 236 nm. Kliknutím zaškrtneme *Prompt for sample information*. Rozsah zobrazení spektra *Display spectrum* zvolíme od 220 do 320 nm. Volby potvrdíme tlačítkem *OK*.

Při vlastním měření vždy dvakrát vypláchneme kyvetu porovnávacím (slepým) roztokem, naplníme tímto roztokem a umístíme do držáku přístroje (není nutné kyvetu zcela zasouvat, špatně se pak vyndává) a přitáhneme páčkou po straně držáku. Kliknutím na tlačítko *Blank* změříme spektrum slepého roztoku, které se objeví na obrazovce v okně nadepsaném *Last blank spectrum*. Stejným způsobem změříme spektrum vzorku, jen klikneme na tlačítko *Sample* a do políčka *Name* v okně *Sample information*, které se následně objeví, zapíšeme pH pufru a potvrdíme *OK*. Takto změříme absorbance všech 9 roztoků proti jejich porovnávacím roztokům. Zvolením položky *File* a následně *Print report* → *Results* vytiskneme naměřená spektra a tabulku absorbancí. Nezapomeňte se zapsat do sešitu u přístroje.

### 3. Výpočet $pK_a$

Dosazením do vztahu [7] vypočteme hodnoty  $pK_a$  pro 7 pufrovaných roztoků a výslednou hodnotu  $pK_a$  získáme jako jejich průměr.

#### **Do protokolu uveďte:**

- systematický název fenytoinu
- navážku fenytoinu
- veškerá ředění
- výpočet jednotlivých hodnot  $pK_a$  a výslednou hodnotu
- výpočet % ionizované formy a) b) c)

Přiložte vytištěný záznam měření, byl-li pořízen.