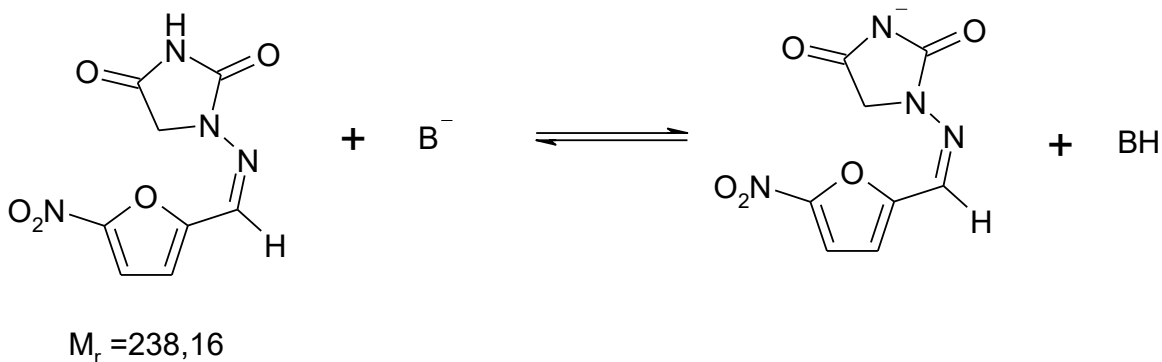


6. Stanovení „kyselé“ disociační konstanty nitrofurantoinu



Princip metody

Pro disociaci slabých kyselin, mezi něž se řadí i klasické chemoterapeutikum močových cest nitrofurantoin, tj. 1-[(5-nitrofuran-1-yl)methylenamino]imidazolidin-2,4dion, platí

Hendersonova-Hasselbachova rovnice, kterou lze psát ve tvaru

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

kde $[\text{HA}]$ je rovnovážná koncentrace nedisociované formy kyseliny a $[\text{A}^-]$ 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

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

kde A je absorbance, ε 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

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

kde c_{F} je celková koncentrace fenytoinu, protože veškerá látka je za těchto podmínek disociována, tzn. $[\text{A}^-] = c_{\text{F}}$. Pro absorbanci fenytoinu v plně nedisociované formě platí obdobně

$$A_{\text{HA}} = \varepsilon_{\text{HA}} \cdot [\text{HA}] \cdot l = \varepsilon_{\text{HA}} \cdot c_{\text{F}} \cdot l, \quad [4]$$

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

Změříme dále absorbance sady roztoků nitrofurantoinu s pH odstupňovaným tak, aby v nejkyseljším z nich byla látka prakticky úplně ve formě HA a v nejbazičtějším 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 absorbanci 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

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

Postup

1. Příprava roztoků

Ze základních roztoků fosfátových pufrů o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a pH 6,6 – 7,8 naředíme sadu pracovních roztoků pufrů o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$, na stejnou koncentraci naředíme roztok kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu sodného. Připravíme $100,00 \text{ ml}$ základního roztoku nitrofurantoinu v acetonu o koncentraci $0,005 \text{ mol.l}^{-1}$. Nitrofurantoin je v roztoku fotolabilní, proto chráníme odměrnou baňku se základním roztokem před světlem hliníkovou fólií a pracujeme co nejrychleji. Do sady 9 odměrných baněk odpipetujeme po $0,5 \text{ ml}$ základního roztoku nitrofurantoinu a doplníme baňku po rysku příslušným roztokem kyseliny, pufru nebo hydroxidu. Obdobně připravíme sadu porovnávacích roztoků („blanks“), pouze s tím rozdílem, že odpipetujeme po $0,5 \text{ ml}$ čistého acetonu.

2.

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 410 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* jakékoliv 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**.

Měření na UV-VIS spektrofotometru Hewlett-Packard 8453

Po zapnutí počítače se po nastartování Windows objeví políčko, požadující jméno operátora a heslo. Zrušíme je položkou *Cancel*. Jakmile se v dolní liště Windows objeví políčko *Bootup server*, zapneme spektrofotometr. Poklepáním na ikonu *HP UV-Visible Chem Station on line* 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, není-li zapnuta deuteriová výbojka, která je zdrojem ultrafialového záření, jež pro měření ve viditelné oblasti nepotřebujeme (u *Deuterium lamp* musí být vybráno *OFF*). Wolframovou žárovku zapneme nebo necháme zapnutou (*Tungsten lamp ON*). V položce *Task* zvolíme *Fixed wavelenghts* a v nabídce *Setup* vepíšeme do tabulky jedinou vlnovou délku 410 nm. Kliknutím zaškrtneme políčko *Prompt for sample information*. Rozsah zobrazení spektra *Display spectrum* zvolíme od 370 do 450 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 results* vytiskneme naměřená spektra a tabulku absorbancí. (Lze použít i ikonu s tiskárnou.)

3. Výpočet pK_a

Dosažením do vztahu [7] vypočteme hodnoty pK_a pro 7 pufovaných roztoků a výslednou hodnotu pK_a získáme jako jejich průměr.

Úkoly:

1. Stanovte pK_a disociace N-H imidazolidionového kruhu nitrofurantoinu.
2. Jaké bude procentuální zastoupení disociované formy látky v krevní plazmě při $pH = 7,4$?
3. Jaké bude procentuální zastoupení disociované formy látky v tenkém střevě při $pH = 8,0$?
4. K jaké další disociaci může ještě v organismu u nitrofurantoinu docházet ?