

2. vaja: KONSTANTA IONIZACIJE

Konstanta ionizacije predstavlja merilo kislosti oz. bazičnosti spojin (učinkovin). Namesto "konstanta ionizacije" se pogosto uporablja izraz "konstanta disociacije", vendar pomena obeh izrazov nista popolnoma enaka. Veliko večkomponentnih sistemov namreč lahko disociira (se loči - razdruži na komponente), ne da bi pri tem nastali ioni - tak primer je sistem encim-substrat, v nekaterih primerih pa lahko učinkovine ionizirajo (nastanejo ioni), ne da bi pri tem prišlo do disociacije, npr. dipolarni ioni (zwitterioni).

Ionizacija šibkih kislin je predstavljena v enačbi 1:



konstanta ionizacije K_a pa je definirana z enačbo 2:

$$K_a^T = \frac{a(\text{H}^+) \cdot a(\text{A}^-)}{a(\text{HA})} \quad (2)$$

Oznake $a(\text{H}^+)$, $a(\text{HA})$ in $a(\text{A}^-)$ pomenijo aktivnosti vodikovih ionov ter neionizirane in ionizirane oblike kisline. Konstanta ionizacije, izražena z enačbo 2 se zato imenuje tudi termodinamska konstanta ionizacije (K_a^T). V enačbi 3 so namesto aktivnosti uporabljene koncentracije, ki so označene z oglatimi oklepaji ($[\text{H}^+]$, $[\text{HA}]$, $[\text{A}^-]$), K_a^C pa pomeni koncentracijsko konstanto ionizacije:

$$K_a^C = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (3)$$

Z uporabo aktivnosti zajamemo medsebojne privlake med ioni in nepopolno hidratacijo ionov v raztopinah z visoko koncentracijo. Čim nižja je koncentracija, manjše so interakcije in pri neskončnem razredčenju postane koncentracijska konstanta ionizacije enaka termodinamski. Vendar pa lahko vseeno uporabljamo izraz za koncentracijsko konstanto ionizacije, kadar so koncentracije v raztopinah manjše kot 0,01 mol/l in so prisotni samo enovalentni ioni.

Konstanta ionizacije je odvisna od temperature, zato ob podatku za vrednost konstante vedno navajamo tudi temperaturo, pri kateri je bila določena.

DOLOČANJE KONSTANTE IONIZACIJE

Določanje konstante ionizacije temelji na neki lastnosti učinkovine (absorpcija svetlobe, porazdelitev med organsko in vodno fazo, topnost ...), ki je različna za ionizirano in neionizirano obliko. Izjema je potenciometrična metoda, kjer lahko koncentracije ionizirane in neionizirane oblike direktno izračunamo iz dobljenih eksperimentalnih rezultatov. Najpogosteje uporabljane metode so naslednje:

1. potenciometrična
2. spektrofotometrična
3. topnostna
4. porazdelitvena
5. HPLC
6. druge metode: konduktometrična, termometrična metoda, Ramanova spektrometrija...

1. POTENCIOMETRIČNA METODA

Postopek določanja poteka tako, da raztopino učinkovine, znane koncentracije, titriramo z močno kislino ali bazo in merimo razliko potencialov med elektrodo, katere potencial se spreminja s koncentracijo vodikovih ionov (običajno steklena elektroda) in referenčno elektrodo, s konstantnim potencialom (običajno kalomelova elektroda). Razlika potencialov je merilo za aktivnost vodikovih ionov v raztopini. Postopek običajno poteka tako, da s pH-metrom direktno merimo pH vrednost v raztopini po dodajanju močne kisline ali baze.

Optimalna koncentracija učinkovine je 0,01 mol/l. S potenciometrično metodo dobimo dobre rezultate za pKa vrednosti med 2,5 in 11, interval pa lahko nekoliko razširimo z upoštevanjem aktivnosti ali z uporabo drugih elektrod. Pravilo, ki se ga moramo pri potenciometričnih določitvah konstante držati, če želimo dobiti točne rezultate je, da mora biti vrednost pKa večja od negativnega logaritma koncentracije: $pK_a > -\log C$. Pri optimalni koncentraciji 0,01 mol/l lahko torej določamo vrednosti pKa večje od 2. Problem pri tej metodi lahko predstavljajo slabo topne učinkovine, s katerimi ne moremo doseči dovolj visoke koncentracije.

Računanje:

Iz začetne koncentracije učinkovine in dodatkov kisline ali baze pri titraciji izračunamo koncentraciji ionizirane in neionizirane oblike, vrednosti pH pa merimo med poskusom. Konstanto ionizacije lahko izračunamo z enačbo 4 ali 5:

$$\text{učinkovina je šibka kislina: } pK_a = pH + \log \left(\frac{[HA]}{[A^-]} \right) \quad (4)$$

$$\text{učinkovina je šibka baza: } pK_a = pH + \log \left(\frac{[BH^+]}{[B]} \right) \quad (5)$$

2. SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA

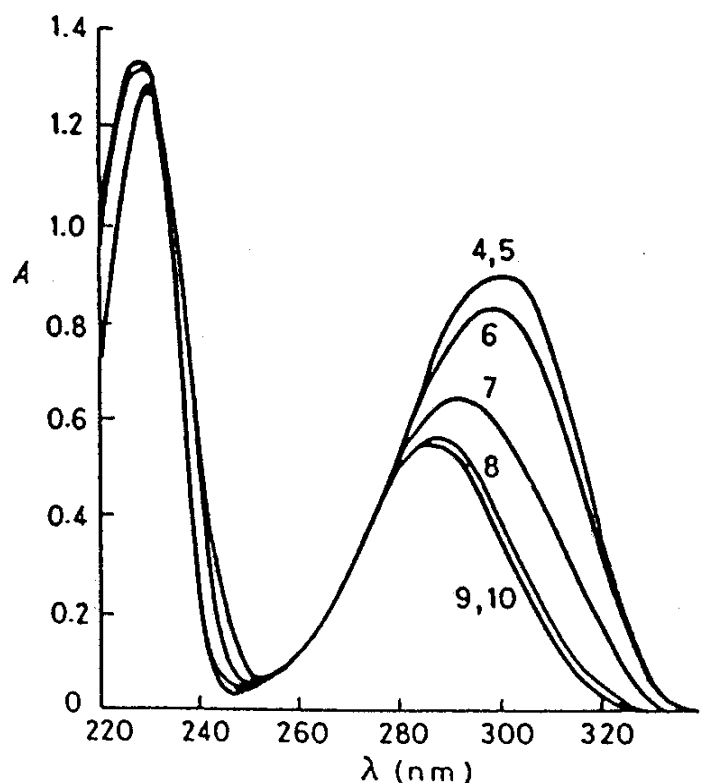
Spektrofotometrična metoda temelji na različni absorpciji svetlobe ionizirane in neionizirane oblike raztopljene učinkovine. Metodo lahko uporabimo, kadar:

- učinkovina absorbira svetlobo v UV ali vidnem področju, in
- se absorpcija molekularne oblike in iona razlikuje v valovni dolžini in / ali intenziteti

Postopek določanja poteka v naslednjih stopnjah:

1. posnamemo UV ali vidna spektra ionizirane in neionizirane oblike: učinkovino raztopimo v pufrih z dovolj nizko in z dovolj visoko pH vrednostjo, tako da je prisotna samo ionizirana ali neionizirana oblika
2. izberemo analitsko valovno dolžino, pri kateri je razlika med absorbancama ionizirane in neionizirane oblike največja
3. pripravimo raztopine učinkovine enakih koncentracij, v pufrih različnih pH vrednosti, in izmerimo absorbance pri izbrani valovni dolžini
 - najprej določimo približno vrednost konstante ionizacije, tako, da izvedemo meritve na širokem pH intervalu, med pH popolnoma ionizirane in pH popolnoma neionizirane oblike
 - pH interval zožimo na vrednosti: $\text{pH} = \text{pKa} \pm 0, 0.2, 0.4, 0.6$ in izmerimo absorbance.
4. izmerimo tudi absorbanci popolnoma ionizirane in popolnoma neionizirane oblike raztopinama iste koncentracije, pri isti valovni dolžini.

Na sliki so prikazani UV spektri bazične učinkovine pri različnih pH:



Iz spektrov je razvidno, da je učinkovina popolnoma protonirana pri pH 4, v neprotonirani obliki pa je pri pH 10. Analitska valovna dolžina je 310 nm.

Vrednost pKa izračunamo po naslednjih enačbah:

učinkovina je šibka kislina:

$$\text{pKa} = \text{pH} + \log \frac{A_I - A}{A - A_N} \quad (6)$$

učinkovina je šibka baza:

$$\text{pKa} = \text{pH} + \log \frac{A - A_N}{A_I - A} \quad (7)$$

kjer je A absorbanca učinkovine v pufru določene pH vrednosti, A_N absorbanca neionizirane in A_I absorbanca ionizirane oblike.

3. TOPNOSTNA METODA

Topnostna metoda temelji na različni topnosti ionizirane in neionizirane oblike učinkovine v vodnem mediju. To pomeni, da topnostno metodo lahko uporabljamo za določanje konstante ionizacije učinkovin, pri katerih je topnost odvisna od njihove ionizacije oz. od pH medija. Metoda je primerna za učinkovine, ki so zelo slabo topne.

Postopek izvedemo tako, da določimo topnost učinkovine v pufrih različnih pH vrednosti. Presežek učinkovine mešamo v pufru toliko časa, da se vzpostavi ravnotežje med raztopljeno in neraztopljeno učinkovino. Neraztopljeni del odfiltriramo, bistri nasičeni raztopini pa določimo koncentracijo učinkovine in pH. Postopek izvajamo pri konstantni temperaturi in ionski moči.

Vrednost pKa lahko izračunamo po naslednjih enačbah:

učinkovina je šibka kislina:

$$S = S_0 + (S_0 \cdot K_a \cdot (1/[H^+])) \quad (8)$$

$$\text{pKa} = \text{pH} - \log ((S/S_0) - 1) \quad (9)$$

učinkovina je šibka baza:

$$S = S_0 + ((S_0/K_a) \cdot [H^+]) \quad (10)$$

$$\text{pKa} = \text{pH} + \log ((S/S_0) - 1) \quad (11)$$

kjer pomeni S_0 topnost neionizirane oblike učinkovine in S topnost učinkovine pri določenem pH vodnega medija (za šibke kisline: $S = [HA] + [A^-]$)

4. PORAZDELITVENA METODA

Porazdelitvena metoda temelji na različnem porazdeljevanju ionizirane in neionizirane oblike učinkovine med organsko in vodno fazo. Običajno predpostavimo, da učinkovina ionizira v vodni fazi in da se v organsko fazo porazdeljuje samo neionizirana oblika. V vodni fazi imamo torej ravnotežje med ionizirano in neionizirano obliko, v organski pa imamo samo neionizirano obliko, ki je v ravnotežju z neionizirano obliko učinkovine v vodni fazi.

Postopek poteka tako, da določimo navidezni porazdelitveni koeficient učinkovine pri različnih pH vodne faze. Učinkovino raztopimo v vodni fazi (ali organski) in jo stresamo z organsko (vodno) fazo toliko časa, da se učinkovina porazdeli med obe fazi in se vzpostavi ravnotežje. Določimo ravnotežni koncentraciji učinkovine v organski in vodni fazi in izračunamo navidezni porazdelitveni koeficient za serijo pufrih raztopin z različnimi pH.

Konstanto ionizacije izračunamo po naslednjih enačbah:

učinkovina je šibka kislina:

$$pK_a = pH - \log \left(\frac{P}{P_n} - 1 \right) \quad (12)$$

učinkovina je šibka baza:

$$pK_a = pH + \log \left(\frac{P}{P_n} - 1 \right) \quad (13)$$

kjer sta P pravi in P_n navidezni porazdelitveni koeficient.

5. HPLC

HPLC metoda temelji na različnem porazdeljevanju ionizirane in neionizirane oblike učinkovine med stacionarno in mobilno fazo, pri čemer lahko pride do porazdelitve obeh oblik v obe fazi. Določamo kapacitivnost učinkovine pri različnih pH mobilne faze.

Za šibko kislino lahko izračunamo konstanto ionizacije s pomočjo naslednje enačbe:

$$k' = \frac{k_n' + k_i' \cdot (K_a/[H^+])}{1 + K_a/[H^+]} \quad (14)$$

kjer je k' kapacitivnost učinkovine, k_i' kapacitivnost ionizirane oblike in k_n' kapacitivnost neionizirane oblike.

LITERATURA:

A. Albert, E. P. Serjeant, The Determination of Ionization Constants, A Laboratory Manual, Chapman and Hall, London, New York, 1984.

NALOGE

1. Izpelji enačbo, ki prikazuje odvisnost topnosti od pH za bazo (kislino)!
2. V litru puferne raztopine s pH 3 se raztopi 1,2 mg kisle učinkovine, če pa pH dvignemo na 5 se je v 1 litru raztopi 3,2 mg. pH raztopin se po dodatku učinkovine ne spremeni. Izračunaj konstanto ionizacije učinkovine in topnost njene neionizirane oblike! Molekulska masa učinkovine je 118.

(R: $S_0 = 1,18 \text{ mg/l}$; $pK_a = 4,77$)

3. Opiši princip določanja konstante ionizacije s topnostno metodo!
4. Kakšen je osnovni princip določanja konstante ionizacije s spektrofotometrično metodo? Navedi stopnje dela!
5. Pripravili smo raztopine kisle učinkovine enakih koncentracij v pufrih z različnimi pH in na spektrofotometru izmerili absorbance teh raztopin, ki so podane v tabeli. S pomočjo navedenih podatkov oceni interval v katerem leži pK_a in nato izračunaj točno vrednost pK_a !

pH	1	3	5	7	9
A	0,105	0,103	0,501	0,809	0,807

(R: Interval: 3-7; $pK_a = 4,89$; $A_I = 0,808$; $A_N = 0,104$; $A = 0,501$)

6. Iz 5 M raztopine HCl želimo pripraviti raztopino HCl s pH = 1,9. Katera od naslednjih redčenj so pravilna:
 - a) 25ml/100ml in 10ml/100ml
 - b) 5ml/10ml in 5ml/100ml
 - c) 1ml/100ml in 10ml/100ml in 25ml/100ml
 - d) 25ml/50ml in 5ml/10ml in 1ml/100ml
 - e) 2ml/10ml in 25ml/100ml in 10ml/100ml

(R: d)

7. Kako bi iz 1,12 mol/l raztopine učinkovine pripravili 4,48 mmol/l raztopino? Navedi dva načina redčenja ter vrsto in volumne uporabljene steklovine!

(R: npr.: $1/25 + 1/10$ ali $1/50 + 2/10$; 1 ml osnovne raztopine vzamemo s polnilno pipeto, damo v 25 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake, od te raztopine vzamemo 1 ml s polnilno pipeto, ...)

8. Konstanto ionizacije učinkovine, ki vsebuje kisle funkcionalne skupine smo določali s spektrofotometrično metodo in dobili rezultate, ki so prikazani v tabeli. Ugotovi koliko konstant ima učinkovina v testiranem pH območju in izračunaj njihove vrednosti!

pH	0,5	1	3	5	7	9	11	12
A	0,011	0,009	0,323	0,610	0,609	0,822	1,121	1,120

NAVODILA ZA EKSPERIMENTALNO DELO

1. Določanje konstante ionizacije borne kisline s potenciometrično metodo

Pripravimo 100 ml 10^{-2} M vodne raztopine H_3BO_3 ($M(\text{borne kisline})=61.8$) in ji izmerimo pH. Med mešanjem z magnetnim mešalom dodajamo po 0,1 ml 1M NaOH in po vsakem dodatku izmerimo pH vrednost. Postopek zaključimo po desetih dodatkih NaOH.

Konstanto izračunamo po Henderson-Hasselbachovi enačbi iz podatkov, ki jih dobimo po vsakem dodatku baze. Kot rezultat podamo povprečno vrednost konstante ionizacije.

2. Določanje konstante ionizacije diazepama s spektrofotometrično metodo

Pripravimo 25 ml $4 \cdot 10^{-3}$ M raztopine diazepama ($M(\text{diazepama})=284$) v metanolu. Po 1 ml te raztopine redčimo na 50 ml z 1M HCl in 0,1M NaOH, posnamemo UV spektra in iz spektrov določimo valovno dolžino, pri kateri bomo izvajali meritve. Nato redčimo po 1 ml osnovne raztopine do 50 ml s puferskimi raztopinami naslednjih pH vrednosti: 2.8, 3.1, 3.4, 3.8 in 4.2. Vsem vzorcem izmerimo pH na pH-metru in absorbance na spektrofotometru. Absorbanco protonirane oz. neprotinirane oblike določimo z redčitvijo 1 ml osnovne raztopine na 50 ml z 1M HCl in oz. 0,1M NaOH.

Konstanto ionizacije izračunamo za vsako meritev posebej in podamo rezultat kot povprečje vseh izračunanih vrednosti.