

STATISTIKA

VALIDACIJA

Validacija (vrednotenje) – podpomenka: analitika

KLASIFIKACIJA ANALIZNIH METOD:

1. Klasične metode (kvalitativna, kvantitativna analiza)

- gravimetrija
- volumetrija

***VOLUMETRIJA:** je klasična analitska tehnika, pri kateri **merimo volumen**. Osnovni postopek je titracija. Pri titraciji merimo volumen raztopine s točno določeno koncentracijo (standardna raztopina ali titrant), da lahko določimo koncentracijo našega analita z znanim volumnom. Med titracijo potekajo kemijske reakcije med analitom in standardno raztopino (direktna titracija) ali med analitom in dodanim reagentom v presežku (indirektna titracija). Glede na vrsto kemijske reakcije, ki poteka med analitom in standardno raztopino poznamo več vrst titracij: nevtralizacijsko, obarjalno, kompleksometrično in oksidacijsko-redukcijsko (redoks) titracijo. Potek titracije prikažemo s titracijskimi krivuljami. Konec titracije zaznamo s spremembo barve, npr. zaradi indikatorja ali z merjenjem potenciala raztopine analita...

***INDIKATORJI** so organske spojine, ki reagirajo s kovinskimi ioni in dajejo obarvane kelate. Ti kelati so slabše obstojni kot kelati kovine z EDTA. Torej se z dodatkom standardne raztopine sprošča indikator in po ekvivalentni točki, ko so vsi ioni kovine vezani na EDTA, dobimo barvo prostega indikatorja. Indikatorji so največkrat šibke organske kisline ali baze, pri katerih je konjugirana kislina/baza drugače obarvana (fenolftalein – kislina brezbarvna, konjugirana baza pa vijola).

***GRAVIMETRIJA:** je analitska tehnika, pri kateri stabilno trdno spojino z znano stehiometrijo tehtamo – **merimo maso**. Obarvanje, čistost, sušenje in segrevanje, tehtanje analita (določanje količine). Pogosto se uporablja kot referenčna metoda.

*Poznamo tudi TERMOGRAVIMETRIJO (instrumentalna, termična metoda, ki obravnava spremembe pri segrevanju – izgubo mase, v povezavi z razgradnjo snovi, hlapenjem komponent in reakcij z atmosfero).

2. Instrumentalne metode

- spektroskopske !
- elektroanalitske
- separacijske !
- termogravimetrične

- fiziološke metode

ANALIZNA METODA:

- selektivna
- splošna

***SELEKTIVNA:** določanje samo 1 vrste (specifičnih) analitov

***SPLOŠNA:** določamo lahko vse vrste analitov

Absorbanco imajo praktično vse snovi (UV-VIS METODA: splošna metoda), fluorescence pa ne (specifična analitska metoda).

***FLUORESCENCA:** fluoresciranje pomeni sprejemanje fotonov krajših valovnih dolžin (večja energija) in oddajanje fotonov daljših v.d. (nižja energija). Obratno bi to bil perpetuum mobile.

***ELEKTROANALITSKE METODE:** temeljijo na opazovanju oksido-redukcijskih pojavov na elektrodi (potenciometrija, potenciometrične titracije, elektrogravimetrija, polarografija in voltometrija (voltometrične titracije) in elektrolitske lastnosti raztopin (konduktometrija - merjenje električne prevodnosti, konduktometrične titracije, merjenje dielektrične konstante..).

Večinoma imajo vse snovi specifične oksido-redukcijske potenciale (splošna?) + nimajo vse..? (specifična). Oksidanti/reducenti.

***SEPARACIJSKE METODE:** najbolj uporabljena je KROMATOGRAFIJA (HPLC - Kromatografija visoke ločljivosti in UHPLC).

Poznamo več separacijskih metod:

- ekstrakcija
- kromatografija
- masna spektrometrija
- elektroforeza

Značilnost molekul kot osnova separacijskih metod:

Polarnost: - Tekočinska kromatografija

- Plinska kromatografija

Ionski značaj: - Ionsko-izmenjevalna kromatografija

- Elektroforeza

- Masna spektrometrija

Velikost (masa): - Dializa in ultrafiltracija

- Izključitvena kromatografija

- Ultracentrifugacija

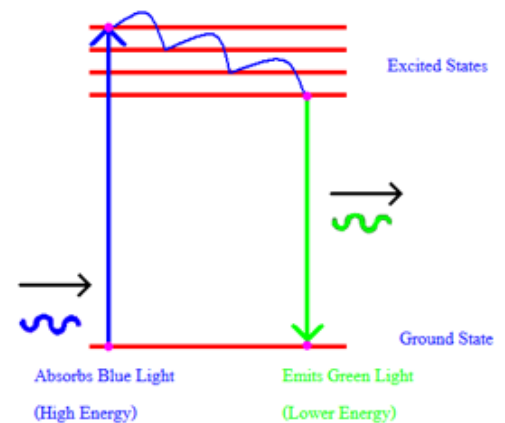
Oblika: - Afinitetna kromatografija

- Imunokemične metode

- Encimske metode

***KROMATOGRAFIJA** pomeni "zapis barv". Beseda je izpeljana iz grških besed – chromos pomeni barva, grafein pa pisati. Prvi je to metodo leta 1903 uporabil ruski botanik M. Cvet za ločevanje zmesi barvil v zelenih rastlinah. Ko nanese vzorec se komponente ločujejo.

Je družina tehnik analitične kemije za ločevanje zmesi. Poznamo analitično (za identifikacijo snovi) in preparativno (kolonalno) kromatografijo; tankoplastno... Najpogosteje uporabljena tankoplastna kromatografija je normalnofazna, poznamo pa tudi reverznofazno kromatografijo.



Princip kromatografskih separacij:

- porazdelitvena kromatografija
- adsorptivna kromatografija
- gelska (size-exclusion)
- velikostno izključitvena kromatografija
- ionska izmenjava
- kolonska kromatografija, tenkoplastna kromatografija

Delitev glede na stacionarno fazo:

- papirna
- kolonalna

Delitev glede na mobilno fazo:

- HPLC: high performance (=pressure) liquid chromatography. Je tekočinska kroma. visoke ločljivosti.
- LC: liquid chromatography. Je tekočinska kromatografija.
- GC: gass chrom. Je plinska kromatografija.
- SFC: Je superkritična tekočinska kromatografija

Pri ločevanju s kromatografijo imamo dve fazi stacionarno in mobilno.

Dokler tekočina teče po koloni zaradi gravitacijske sile, je to klasična metoda (samo na koncu uporabimo napravo, za detekcijo), ko pa so potrebni visoki pritiski (do 10 atm; zaradi ločevanja zelo majhnih delcev, ki potujejo skozi zelo majhne pore), gre za instrumentalno metodo.

Manjša velikost delcev → višja učinkovitost (in ločljivost?)

krajša kolona → višja učinkovitost

Gaussova krivulja: ploščina pomeni št. Delcev, "peak" (vrh) pa ?

***ANALITSKI INSTRUMENTI** so naprave, ki merijo fizikalne iz. Kemične lastnosti proučevane snovi oz. merijo neko lastnost, ki omogoča karakterizacijo snovi.

***ANALITSKI SIGNAL:** Fizikalne lastnosti analita (prevodnost, električni potencial, UV-vis absorpcija, transmitanca ...) imenujemo analitski signal.

***INSTRUMENT** za kemijsko analizo pretvori analitski signal (merjeno fizikalno lastnost ali njeno spremembo) v prepoznavno/zaznavno obliko. Predstavlja '**komunikacijski sistem/napravo**' med opazovanim/preučevanim sistemom in znanstvenikom.

ELEMENTI SPLOŠNEGA (TIPIČNEGA) INSTRUMENTA ZA ANALIZO:

izvor → detektor → procesor → prikaz

***SIGNAL** je odziv instrumenta na določen stimulus. Ta je običajno fizikalna količina oz. njena sprememba. Kot signal lahko označimo tudi vsako meritev na instrumentu.

Kako izbiramo inštrument? Glede na:

- zahtevano natančnost in preciznost
- koliko analita(vzorca) imamo na voljo
- koncentracijski rang analita (mikro/mili litri)
- katere komponente vzorca bodo moteče (motijo analitiko substance, interferenca)

- fizikalne in kemične lastnosti vzorca (kaj je v matriksu vzorca – (l), (s)...)
- število vzorcev za analizo

Ph METER:

- izvor signala: H⁺ ioni
- delovanje: kot potenciometer → meri električni potencial. Ima stekleno elektrodo, ki jo pomočimo v vzorec (imeti mora še referenčno elektrodo, za primerjavo). Na konici ima membrano (steklena), ki je zelo občutljiva na koncentracijo H⁺ (sestava: porozno steklo, v katerem je elektrolitski ključ). Primerja (detektor) potenciala na referenčni elektrodi in na tej pomočeni v vzorec → razlika med njima je pH (elektrodni potencial)
- procesor ta el. Potencial prikaže kot številko (digitalen) ali kot odkon kazalca (analogen)

Meja med klasično in instrumentalno analizo je danes zabrisana (avtomatizacija klasičnih metod). Klasične metode so zamudne, so pa še danes pomembne - služijo za umerjanje sodobnih instrumentalnih metod.

TOČNOST IN NATANČNOST

***TOČNOST**: pomeni ujemanje meritve z dejansko vrednostjo; accuracy

***NATANČNOST**: pomeni sipanje podatkov (SD, koeficient variabilnosti itd. podajanje); precision

KRITERIJ ZA IZBIRO USTREZNE ANALITSKE METODE (+merilo kakovosti):

***NATANČNOST (precision)**: absolutna SD, relativna SD, koeficient variance in varianca

***BIAS**: absolutna sistemska napaka, relativna sistemska napaka

***OBČUTLJIVOST (sensitivity)**: umeritvena(kalibracijska) občutljivost in analitska občutljivost

***MEJA DETEKCIJE (detection limit)**: blank + 3·SD(blank)

***KONCENTRACIJSKO OBMOČJE (concentration range)**: concentration limit of quantitation (LOQ) to conc. Limit of linearity (LOL)

***SELEKTIVNOST (selectivity)**: koeficient selektivnosti. Ne bomo posebej obravnavali.

DEFINICIJE:

***NATANČNOST**: Randomizirana (slučajna) napaka: s(SD), RSD, Sm, CV, s²

ICH: Natančnost analitne metode izraža ujemanje (stopnjo razpršenost) med serijami meritev večih vzorcev enega samega homogenega vzorca, pod predpisanimi pogoji. Natančnost lahko obravnavamo na treh nivojih: ponovljivost, srednja (vmesna) natančnost (interday, intraday) in obnovljivost (bolj robusten parameter; na daljši čas).

Natančnost naj bi bila preiskovana ob uporabi homogenih, avtentičnih vzorcev. Če ni možno obdržati homogenega vzorca, lahko uporabimo umetno pripravljene vzorce (enaki, le da je konc. znana) ali raztopino vzorca.

Natančnost je običajno izražena kot varianca, SD, koeficient variacije serije meritev ...

- **PONOVLJIVOST (repeatability)**: predstavlja natančnost pod enakimi operacijskimi pogoji v kratkem časovnem intervalu. Pomenu tudi "inter-assay" – ponovljivost znotraj časa postopka (npr. inter-day; validacija traja skoraj en teden)

- **SREDNJA NATANČNOST (intermediate precision)**: izraža variacije znotraj laboratorija: različni dnevi, osebje, oprema)

- **OBNOVLJIVOST (reproducibility)**: izraža natančnost med laboratoriji (kolaborativne študije, po navadi za standardizacijo metodologije)

***BIAS**: sistemska napaka (oseba, instrument, metoda)

***OBČUTLJIVOST:** Osnovni parameter za občutljivost je naklon umeritvene krivulje (NE POMENI najmanjšo možno konc., ki jo lahko zazna). Večji kot je naklon umeritvene krivulje, bolj je metoda občutljiva. Aparat. Calibrational sens.: (=naklon UK); Analytical sens.: $Y = m/Ss$

***DETECTION LIMIT (LOD):** meja detekcije ali meja zaznavnosti. Pomeni občutljivost aparata (JE najnižja možna koncentracija, ki jo aparat še lahko zazna/loči. Tudi "sensitivity". S to metodo pa ne moremo določati točne koncentracije.

$S_m = \text{odziv}$; ENAČBE

Vedno naredimo UMERITVENO KRIVULJO.

$\text{odziv} = c \cdot k + n$

ICH: meja detekcije določene analitske metode je najnižja količina analita v vzorcu, ki je lahko zaznana, ampak ne nujno točno kvantificirana.

***SLEPI VZOREC:** je brez preiskovane substance/komponente, sicer pa ima isto strukturo itd. kot preiskovani vzorec.

***KONCENTRACIJSKO OBMOČJE:** meja določljivosti; često najnižja koncentracija v umeritveni krivulji.
 $LOQ = 10 \cdot S_{bi}$

***SELEKTIVNOST:** neka metoda je lahko zmožna ločevati med različnimi analiti.
selektivnostni koeficient za B, glede na A; ENAČBE

***LOL (limit of linear response) in LOD?:** limita koncentracija (najmanjša, ki jo še lahko določimo)?

***LOQ:** spodnja koncentracija, meja, ki jo še lahko določimo, kvantitativno ovrednotimo (meritev sme odstopati le za določen procent - +-2% je še ok, +-5% pa je veliko).

ICH: kvantitacijska meja (quantitation limit) analitične metode je najnižja količina analita v vzorcu, ki je še kvantitativno določljiva s primerno natančnostjo in točnostjo. LOQ je parameter kvantitativnih testov za male količine sestavin v matriksu in je uporabljen predvsem za določitev nečistot in degradacijskih produktov.

***LINEARNOST (linearity):** predpogoj, da se sploh lahko izdelava umeritvena krivulja (Beer-Lambertov zakon). Delavno območje je vedno linearno.

ICH: linearnost analitske metode je njena sposobnost (v določenih mejah), da pridobi/poda rezultate testov, ki so direktno proporcionalni koncentraciji (količini) analita v vzorcu.

UMERITVENA KRIVULJA

- temelji na linearni regresiji najmanjših kvadratov
- KONCENTRACIJSKO OBMOČJE, v katerem je metoda uporabna (linearnost!)

DRUGI KARAKTERISTIKE, POMEMBNE PRI IZBIRI ANALITSKIH METOD:

- hitrost
- enostavnost in priročnost (natančnost in točnost)
- zahteva usposobljenosti delava
- cena in razpoložljivost opreme
- cena na vzorec

Literatura: Scoop: Principles of analysis... (sensitivity tu pomeni "meja detekcije")

ICH (International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

***VALIDACIJA:** je priznanje ali potrditev veljavnosti ali zakonitosti; overitev.

Je dokumentiran postopek, s katerim omogočamo in nadziramo preizkušamo in potrjujemo, da določena metoda, material, proces, analizni postopek, instrument, čistilni postopek idr. Daje zanesljive in točno določene rezultate. Preverjamo tudi, če je metoda namenu primerna in cenovno ugodna. + validacija prostora. Z validacijo metode dokažemo, da daje ustrezne rezultate.

***VALIDNOST:** veljavnost

***OBMOČJE (range):**

- za vsebnost substance (80-120% testne konc.)
- enakomernost vsebnosti (70-130% testne konc.)
- testi sproščanja, "disolucijski testi" (+-20% specificiranega območja)
- določanje nečistot (od "napovedane stopnje" nečistote do 120% specificirane vrednosti)

Gre dejansko za območje linearnosti. Izpolnjeni morajo biti pogoji: točnost, natančnost, linearnost.

ICH: območje analitske metode je interval med zgornjo in spodnjo koncentracijo (količino) analita v vzorcu (vključno s temi koncentracijami), za katerega je bilo demonstrirano, da ima analitska metoda primerno stopnjo natančnosti, točnosti in linearnosti.

***MEJA DETEKCIJE (zaznavnosti), DL:**

- na osnovi "vizualne ocene"
- glede na razmerje signal-šum (cca. 2-3)
- glede na SD odziva in naklon umeritvene krivulje

***LIMITA (meja) DOLOČLJIVOSTI (quantitation limit):**

- vizualno
- razmerje signal:šum
- glede na SD ($QL = 10\sigma/S$)

***ROBUSTNOST:** je 'trdnost'. Pove nam, kako majhne spremembe vplivajo na rezultat (npr. menjava osebe, ...). Bolj kot je metoda robustna, manj vplivajo spremembe na rezultat.

- "validity of the procedure is maintained whenever used"

- stabilnost raztopine analita; čas ekstrakcije (analize)

npr.HPLC (spremenljivke): pH v mobilni fazi, sestava MF, različne kolone (dobavitelji, serije), T, pretok
Namensko spreminjamo parametre in merimo odziv.

ICH: robustnost analitskega postopka je njegova izmerjena zmožnost, kapaciteta, da ostane nespremenjena ob malih, namernih variacijah v parametrih metode in da predstavlja njeno zanesljivost med normalno uporabo.

***SST (system suitability testing):**

- oprema, elektronika, analitska metoda in vzorci za analizo sestavljajo "integralni sistem", ki ga evaluiramo v celoti

***ANALITSKI POSTOPEK (analytical procedure):** ICH: se nanaša na način izvedbe analize. Natančno opisuje korake, potrebne za izvedbo vsakega analiznega testa. Lahko vključuje, ni pa omejeno na: vzorec, referenčni standard, priprava reagentov, uporaba aparatov, oblikovanje kalibracijske krivulje, uporaba formul za računanje... SST (system suitability test).

***SPECIFIČNOST (specificity):** ICH: je zmožnost nedvoumne (enolične) ocene analita v prisotnosti

komponent, ki jih lahko pričakujemo v njem. Običajno to vključuje: nečistote, degradacijske produkte, matriks... Pomanjkanje specifičnosti posamezne analitske metode je lahko kompenzirano z drugimi podpornimi analitskimi postopki. SPECIFIČNOST: SELEKTIVNOST (specifičnost pomeni ločiti eno komponento med ostalimi; selektivnost pa ločiti med več komponentami).

Definicija ima te posledice:

- identifikacija (da se prepričamo o identiteti analita)
- test čistosti (da se prepričamo, da vse izvedene analitske metode dovoljujejo točno določitev nečistot analita – težke kovine, zaostanek topil, test sorodnih substanc...

Preizkus (assay) (vsebnost ali potencia): moč, da se zagotovi točen rezultat, ki dovoli točno izjavo o vsebnosti (ali potenci) analita v vzorcu.

***TOČNOST** (accuracy): Ujemanje med dejanskim stanjem in tem kar določimo.

ICH: Točnost analitskega procesa izraža ujemanje med vrednostjo (sprejeto kot konvencionalna prava vrednost ali referenčna vrednost) in najdeno vrednostjo (?).

BIOEKVIVALENČNE ŠTUDIJE: se uporabljajo za dokazovanje, da ima neko generično zdravilo enako biološko učinkovitost kot originalno zdravilo (merijo koncentracijo v plazmi po aplikaciji). Uporablja se tudi pri registraciji novih zdravil.

DOLOČITEV NAJBOLJ PRIMERNEGA TOPILA ZA EKSTRAKCIJO: da bo ekstrakcija čim bolj učinkovita. Reverzno fazna kolona: kolona je organska faza, ekstrahirat moremo z vodno fazo. Preverimo ali se to da: gostota mora biti večja od vode (primer: kloroform).

***INTRA-DAY PRECISION:** natančnost v enem dnevu

***INTER-DAY PRECISION:** natančnost- več dni

***INTERMEDIATE PRECISION:** širši pojem (različno v posameznih laboratorijih; ponavadi po: isti analitik, isti aparat)

***REPRODUCTABILITY:** natančnost med laboratoriji – se po navadi ne izvaja; se dela vse v 1 labu

TABELA

NALOGA 1: Imamo tip analitskega postopka – kaj želimo s tem postopkom doseči?

- Identifikacija naše snovi v vzorcu

- Vsebnost (potency content) – konc. / masa; nečistote (kvalitativno ali kvantitativno).

***"Limit":** meja, območje – ker so nečistote lahko prisotne v največ 0,5% vsebnosti; želimo vedeti samo če so, niso prisotne v teh mejah, ni potrebno določati točne konc.

NALOGA 2: Katere karakteristike moramo pri posamezni analitski metodi validirati?

- validiramo samo tiste, ki so prisotne (potrebne)

- IDENTIFIKACIJA: pogledamo samo, ali je analit v vzorcu ali ne. Ne zanima nas koliko ga je. Gre samo za potrjevanje prisotnosti ene substance, zato je pravi parameter (karakteristika) specifičnost (lahko bi bil tudi selektivnost v nekem drugem primeru).

Specifičnost (2) → pomanjkljivost specifičnosti ene metode je lahko kompenzirana s podporno/imi metodo/ami. Take metode, pri kateri je potrebna podporna metoda raje ne izberemo.

- VSEBNOST ANALITA: moramo imeti točen podatek o vsebnosti (količini). Pomembne karakteristike postopka so: natančnost (obnovljivost, srednja natančnost), specifičnost, linearnost, območje.

Specifičnost je pomembna, ker moramo analit najprej identificirati, šele nato določamo vsebnost.

NE POTREBUJEMO: meje detekcije in LOQ.

Meja detekcije ni pomembna, ker pride v poštev za majhne količine. V primerjavi z nečistotami je

vsebnost analita velika. Enako velja za LOQ.

srednja natančnost (1) → v primerih, ko je izvedena reproduktibilnost (obnovljivost), srednja natančnost ni potrebna. Zato, ker je reproduktibilnost bolj natančna.

- DOLOČANJE NEČISTOT: potrebujemo vse (specifičnost, meja detekcije, LOQ, linearnost, območje), RAZEN: točnost, natančnost.

Meja detekcije (3): je lahko zahtevana v nekaterih primerih.

Type of analytical procedure Characteristics	Identification	Testing for Impurities		Assay - dissolution (measurement only) - content/potency
		Quantitative	Limit	
Accuracy	-	+	-	+
Precision				
Repeatability	-	+	-	+
Interm. Precision	-	+(1)	-	+(1)
Specificity (2)	+	+	+	+
Detection Limit	-	-(3)	+	-
Quantitation Limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

- signifies that this characteristic is not normally evaluated

+ signifies that this characteristic is normally evaluated

(1) in cases where reproducibility (see glossary) has been performed, intermediate precision is not needed

(2) lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s)

(3) may be needed in some cases

Ph, pKa, pKb

DEFINICIJA KISLIN/BAZ



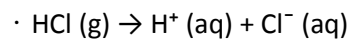


1) Arrheniusova definicija:

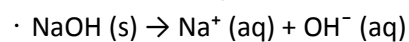
- kislina (K) \rightarrow odda proton (H^+)
- baza (B) \rightarrow odda hidroksidni ion (OH^-)

Problem: - amonijak ne odda OH^-
 - velja za vodne raztopine

Kislina so elektroliti, ki v vodni raztopini disociirajo vodikove ione :



Baze so elektroliti, ki v vodni raztopini disociirajo hidroksidne ione:

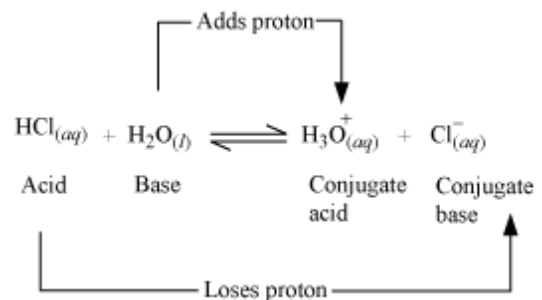
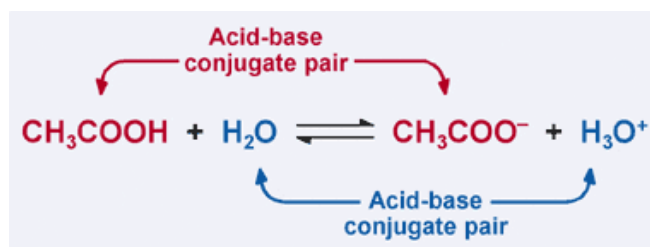


2) Brønsted–Lowryjeva teorija

- K \rightarrow odda H^+
- B \rightarrow sprejme H^+

Kislina so spojine , ki oddajo protone. Baze so spojine, ki vežejo protone.

Kislina vselej odda proton bazi. To reakcijo imenujemo **protolitska reakcija**, v njej sodelujeta dve kislini in dve bazi.



Ko snov odda proton, postane konjugirana baza; ko snov sprejme proton; postane konjugirana kislina. V raztopinah sta sprejemanje in oddajanje protonov v ravnotežju.

Ta definicija je za nas najbolj uporabna (apliciramo na vodne raztopine).

3) Lewisova definicija:

- K \rightarrow sprejme elektron (e^-)
- B \rightarrow odda e^-

Uporabna je za definicijo pri nukleofilih/elektrofilih.

KISLINE/BAZE

Konstanta:

$$K_a = \frac{[H_3O^+] \cdot [A^-]}{[HA]}$$

$$K_b = \frac{[HB^+][OH^-]}{[B]}$$

$$K_{eq} = \frac{[\text{products}]}{[\text{reactants}]} = \frac{[CH_3COO^-][H_3O^+]}{[CH_3COOH][H_2O]}$$

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

$$= (1 \times 10^{-7} \text{ M})(1 \times 10^{-7} \text{ M})$$

$$K_w = 1 \times 10^{-14} \text{ M}^2$$

Indikatorji: barva je odvisna od konstante kisline [K]; disociirane/nedisociirane kisline/baze različno absorbirajo/odbijajo svetlobo (obarvanost). So šibke K/B → pride do nepopolne disociiracije.

***MOČNE K/B:** popolnoma disociirajo oz. predpostavimo, da je disociacija 100%.

***ŠIBKE K/B:** okarakterizira jih konstanta reakcije (K_r) – pove, koliko disociirajo. Navadno je ravnotežje pomaknjeno k nedisociirani obliki - [HA]

NALOGA 1:

Baza ima pK_a = 10. Ali je relativno šibka/močna baza?

Baza ne more imeti pK_a – gre za konjugirano bazo (?)

pK_a = 10 → K_a = 10⁻¹⁰ → podano je za kislino

pK_b = 4 → K_b = 10⁻⁴ → podano za bazo

amonijak: pK_b = 4,7

O: Ni tako zelo šibka kislina. Je relativno močna šibka kislina; močnejša od amonijaka npr.

NALOGA 2:

Imamo sol NH₄Cl. Kakšno reakcijo bo dal amonijev klorid? Kislo ali bazično?

Gre za sol močne kisline in šibke baze, zato bo reakcija kislina.

K_a = [NH₃] [H⁺] / [NH₄⁺] = 5.69 · 10⁻¹⁰

NH₃ → K_a = K_w/K_b(NH₃) = 10⁻¹⁴/1,8 · 10⁻⁵ = 5,5 · 10⁻¹⁰

HCl → K_b = K_w/K_a(HCl) = 10⁻¹⁴/1,3 · 10⁶ = 7,6 · 10⁻²¹

} kaj pol s tem? K_b je dosti nižji od K_a, zato je reakcija kislina? :)

NALOGA 3:

Ali je 1M HCl pufer? Ima puferske lastnosti?

Da, je zelo dober pufer, ni pa fiziološki. Tudi 0,1M HCl je pufer, prisoten je v želodcu (je fiziološki).

pH

***pH:** je merilo za koncentracijo hidroksidnih ionov v raztopini, in s tem posledično za njeno kislost ali alkalnost. Pojem pH je uvedel danski kemik Søren Peder Lauritz Sørensen. Kratica pH je zložena iz Potenz (nemško potenca) in kemijske oznake za vodik, H:

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}_3\text{O}^+] \quad (\text{merjeno v toluenu?})$$

Podobno kot pH lahko vpeljemo pojem pOH.

$$\text{pOH} = -\log [\text{OH}^-]$$

zveza med pH in pOH je:

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14$$

TOPNOST

NEPOLARNA TOPILA lahko vsebujejo minimalne količine vode (10⁻³ mola npr.), tudi nekaj H₃O⁺. Se ne mešata oz. se lahko zelo malo.

EKSTRAKCIJA:

1) topili se ne smeta mešati! (z etanolom ne moremo ekstrahirati iz vodnih vzorcev; po navadi imamo vodne vzorce in izbiramo organska topila za ekstrakcijo)

- 2) koncentracijski gradient
- 3) priprava materiala...

TOPILO, TOPNOST: porazdeljevanje med fazami. Temelji na 2 prispevkih:

- 1) porušiti moramo kristalno strukturo (dati v tekočo fazo)
 - 2) interakcije med topilom in topljencem;
- podobno se topi v podobnem; topnost je povezana s kemijsko strukturo snovi

BaSO₃ → v vodi NI topen. Je sol – ima močno kristalno rešetko, ki je ni možno razbiti, zato snov ni topna ne v vodi ne v olju (ni niti hidrofilen niti lipofilen).

pH okolja in pKa

pH vode + sol NaCl = pH ostane enak

NaCl je sol močne kisline in močne baze. Sol je nevtralna.

$$pK_a = -\log_{10} K_a$$

Voda + NH₄Cl = kislina reakcija, pH se zniža

NH₄Cl je sol šibke baze in močne kisline. Sol je kislina.

Voda je bolj bazična, če je trda. Ca²⁺ in Mg²⁺ dajeta bazično reakcijo.

Destilirana voda z raztopljenim CO₂ je bolj kislina. Nastaja ogljikova kislina.

TITRACIJA

***Titracija** je volumetrična kvantitativna metoda kemijske analize. Z njo določamo koncentracije znanih snovi. Pri kislinsko-bazni titraciji (nevtralizacijski titraciji) določamo koncentracijo znanih kislin in baz.

Pribor, ki ga potrebujemo za titracijo:

- **bireta,**
- **pipeta** in
- **erlenmajerica.**

Potrebujemo še raztopine:

- **standardna raztopina** kisline (ali baze), s katero določamo neznano koncentracijo baze (ali kisline); standardna raztopina je tista, ki ima zelo natančno določeno koncentracijo,
- **vzorec** znane kisline (ali baze)
- **kislinsko-bazni indikator.**

Osnova titracije je reakcija nevtralizacije, to je reakcija med kislino in bazo, med katerima nastane raztopina soli in voda.

Ekvivalentna točka je stanje sistema pri titraciji, v katerem smo z dodano standardno raztopino titranta k vzorcu dosegli popolno nevtralizacijo baze ali kisline v vzorcu.

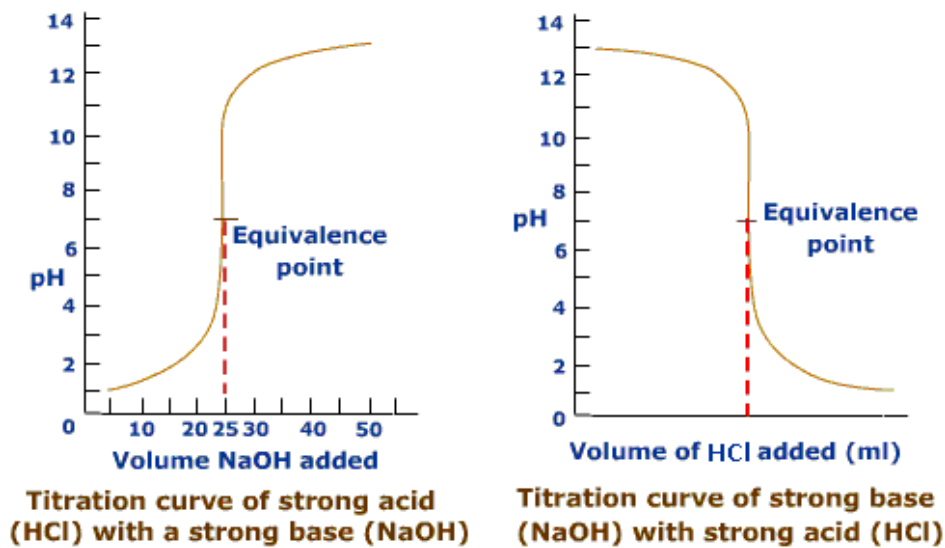
Izračun koncentracije baze (ali kisline) v vzorcu nam omogoča natančno ugotovljena prostornina titranta (ekvivalentna prostornina), natančno znana koncentracija titranta, natančno izmerjena prostornina vzorca in znano razmerje množin obeh reaktantov, v katerem zreagirata.

Ekvivalentno točko lahko ugotovljamo še:

- z merjenjem **pH** vzorca med titracijo,
- z merjenjem temperature vzorca,
- z merjenjem prevodnosti.

Titracijska krivulja je krivulja, ki jo dobimo z merjenjem pH v odvisnosti od prostornine dodane baze h kislini oziroma od prostornine dodane kisline k bazi. Ekvivalentno točko določimo iz titracijske

krivulje grafično. Ekvivalentna prostornina titranta sovpada s sredino strmega dela titracijske krivulje.



Sredina strmega dela titracijske krivulje sovpada s pH je 7. Indikator, ki ga uporabljamo pri titraciji, mora spremeniti barvo v območju pH, ki sega v strmi del krivulje

To bi veljalo npr. za reakcijo $1M NaOH + 1M HCl \rightarrow NaCl + H_2O$

Ekvivalentna točka: $c [HCl] = c [NaOH]$
 $V [NaOH] = V [HCl]$ } če je molarost (M) obeh enaka

Kaj se zgodi s pH, če dodamo več kisline ali več baze? Postane bolj kisel/bazičen – izračunamo konc. presežka ionov in nato pH celotne raztopine.

Po titraciji pH ni nikoli 14, se pa tej vrednosti asimptotično približuje (vedno je not še nekaj H^+ ionov).

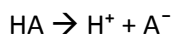
Koncentracija korelira aktivnost. $a \sim \gamma c$

γ = aktivnostni koeficient

pri visoki konc. interakcije motijo aktivnost. Zato morajo biti koncentracije nizke.

NALOGA: ?

- 1) znana konc., neznana snov = kislina
- 2) določimo konstanto ionizacije: izmerimo pH



$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \qquad K_a = \frac{x^2}{c}$$

$$K_a = \frac{[H^+]^2}{[HA]} \qquad x = \sqrt{K_a c}$$

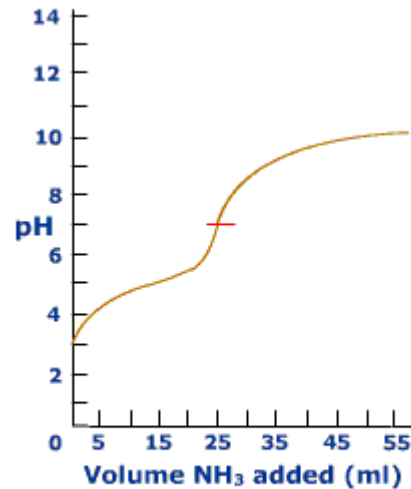
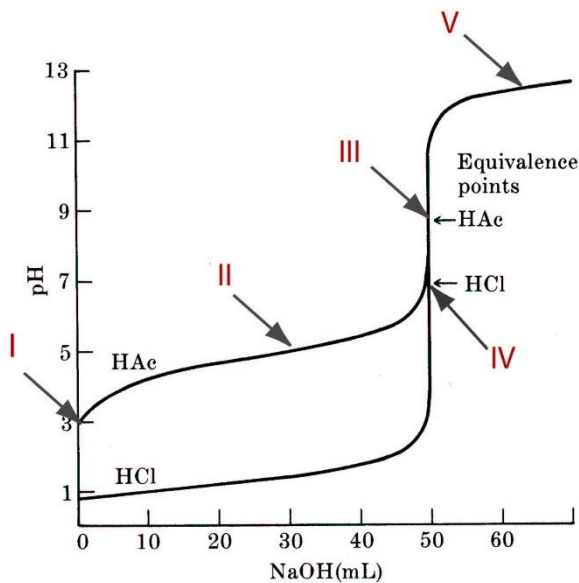
NALOGA 2: K 100mL kisline smo dodali 200mL NaOH in izmerili pH = 13. Izračunaj pKa.

$10^{-pH} = 10^{-13} = c [OH^-]$ Ne bi mogli dobiti $c[H^+]$...?

Pri titraciji šibkih kislin/baz dobimo drugačno krivuljo (bolj položno, drugačna ekvivalentna točka ...)

Titrali bi npr. oetno kislino (HAc) z močno bazo. $1M HAc + 1M NaOH$ volumna sta enaka

$c(\text{HAc}) = c(\text{NaOH})$
 $V(\text{HAc}) = V(\text{NaOH})$

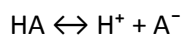


Titration curve of weak base (NH_4OH) and weak acid (CH_3COOH)

KONSTANTA DISOCIACIJE, IONIZACIJSKA KONSTANTA

***KONSTANTA IONIZACIJE** (K_a) 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):

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

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 (3) :

$$K_a^c = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

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, NMR, 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:

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

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

2. SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA

Beer-Lambertov (absorbcijski) zakon:

Pravi, da je absorbanca A premo sorazmerna koncentraciji:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon l c$$

- A je absorbanca,

- ϵ je absorptivnost ($\text{Lcm}^{-1}\text{g}^{-1}$) ali molarni absorpcijski koeficient, ki je karakterističen za določeno

snov in se spreminja z valovno dolžino

- **b** je dolžina svetlobne poti (cm)

- **c** je koncentracija izražena v (g/l)

Absorbanca je enaka negativnemu logaritmu propustnosti:

$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{P}{P_0}\right)$$

Intenziteta monokromatske svetlobe pri potovanju skozi raztopino eksponentno pojemata z razdaljo, absorbanca pa je linearno sorazmerna dolžini poti svetlobe skozi raztopino

Frakcija (F) – F_i = ionizirane oblike? F_M =

$$F_i = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]} \quad F_M = \frac{[HA]}{[A^-] + [HA]}$$

$$A_i = \epsilon_1 \cdot F_i \cdot c_{tot} \cdot l$$

$$A_M = \epsilon_2 \cdot F_M \cdot c_{tot} \cdot l$$

SPEKTROFOTOMETRIJA

***KROMOFOR:** je del v molekuli, odgovoren za absorbanco (skupina ali predel v molekuli barvila s šibko vezanimi elektroni, ki absorbirajo svetlobo v vidnem delu spektra in s tem pripomorejo k obarvanosti). Njihove lastnosti so odvisne tudi od okolja; različni kromoforji imajo razl. lastnosti npr. kje imajo absorbanco (max A) in koliko svetlobe absorbirajo.

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I}$$

Table 1: Chromophore structures

Chromophore	System	λ_{max} (nm)	Molar extinction (ϵ)
Benzene		184	46700
Naphtalene		220	112000
Anthracene		252	199000
Pyridine		174	80000
Quinoline		227	37000
Ethylene	C = C	190	8000
Acetylide	C \equiv C	175 – 180	6000
Ketone	C = O	195	1000
Thioketone	C = S	205	Strong
Nitrile	C \equiv N	160	–
Nitroso	N = O	302	100
Nitro	NO ₂	210	Strong
Amino	NH ₂	195	2800
Thiol	SH	195	1400
Halide	Br, etc.	208	300

Table 2: Chromophore behaviour in an homologous series (C₆H₅-R) at > 190 nm

Substituent	λ_{max} (nm)	Molar extinction (ϵ)
H	203,5	7400
CH ₃	206,5	7000
Cl	209,5	7400
OH	210,5	6200
OCH ₃	217	6400
CN	224	13000
COO ⁻	224	8700
COOH	230	11600
NH ₂	230	8600
NHCOCH ₃	238	10500
COCH ₃	245,5	9800
NO ₂	268,5	7800

***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

GRAF 1:

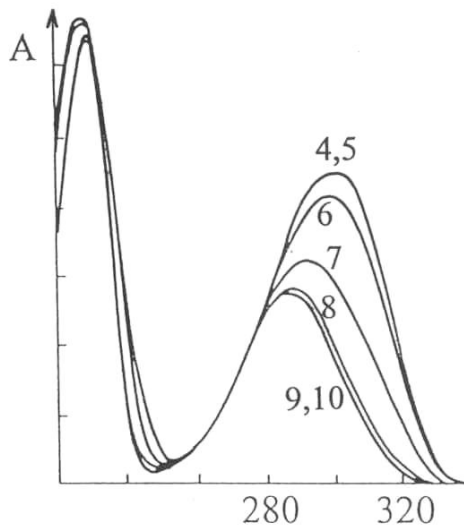
- če bo snov bazična → bo pri pH ↑ od 10 POPOLNOMA NEIONIZIRANA (NEDISOCIIRANA)
→ bo pri pH ↓ od 4 POPOLNOMA IONIZIRANA (DISOCIIRANA)
- če je snov kislina → bo pri pH ↑ od 9 POPOLNOMA IONIZIRANA (DISOCIIRANA)
→ bo pri pH ↓ od 4 POPOLNOMA NEIONIZIRANA (NEDISOCIIRANA)

ZA IZRAČUN pKa UPORABIMO ENAČBO:

$$\frac{K}{H^+} = \frac{A^-}{HA}$$

Analitska valovna dolžina → tam, kjer je razlika največja, tam bo **pKa**

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



Vrednost pKa izračunamo po naslednjih enačbah, kjer je A absorbanca učinkovine v pufru določene pH vrednosti, A_N absorbanca neionizirane in A_I absorbanca ionizirane oblike.

učinkovina je **šibka kislina**: $pKa = pH + \log \frac{A_I - A_N}{A - A_N}$

učinkovina je **šibka baza**: $pKa = pH + \log \frac{A - A_N}{A_I - A_N}$

Pri pH 4 in 5 ter 9 in 10 je tako majhna sprememba absorbance, da ni zaznavno.

Disociirana in nedisociirana oblika spojine imata razl. absorbance.

$$F_i = \frac{K_a}{([H^+] + K_a)} \quad F_i = \frac{1}{1 + [H^+]/K_a} \left(\frac{[HA]}{[A^-]} = \frac{[H^+]}{K_a} \right)$$

$$F_m = \frac{[H^+]}{([H^+] + K_a)} \quad F_m = \frac{1}{1 + [A^-]/HA} \left(\frac{[A^-]}{HA} = \frac{K_a}{[H^+]} \right)$$

$A = (\epsilon_i \cdot F_i + \epsilon_m \cdot F_m) \cdot c_{tot}$; ista celica, $l = konst.$

ker je: $\epsilon = A / c \rightarrow$

$$\epsilon = \frac{\epsilon_i K_a}{[H^+] + K_a} + \frac{\epsilon_m [H^+]}{[H^+] + K_a} \quad \text{če je } c_{tot} = konst. \rightarrow$$

$$A = \frac{A_i K_a}{[H^+] + K_a} + \frac{A_m [H^+]}{[H^+] + K_a}$$

$$A[H^+] + AK_a = A_i K_a + A_m [H^+]$$

$$AK_a - A_i K_a = A_m [H^+] - A[H^+]$$

$$K_a = \frac{[H^+][A_M - A]}{A - A_i}$$

$$pK_a = pH + \log \frac{A - A_i}{A_M - A} \quad \text{za kisline}$$

$$pK_a = pH + \log \frac{A_M - A}{A - A_i} \quad \text{za baze}$$

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**:

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

$$pK_a = pH - \log ((S/S_0) - 1) \quad (9)$$

učinkovina je **šibka baza**:

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

$$pK_a = pH + \log ((S/S_0) - 1) \quad (11)$$

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

- metoda topnosti (fazna ravnotežja) – logP:

$$S'_0 = [HA] + [A^-] \quad [A^-] = \frac{K_a [HA]}{[H^+]} \Rightarrow S'_0 = [HA] + (K_a [HA]) / [H^+] \Rightarrow$$

$$S'_0 = S_i (1 + 10^{pH - pK_a})$$

S'_0 – določena topnost pri nekem pH

S_i – intrinzična topnost

$$pK_a = pH - \log\left(\frac{S'_0}{S_i} - 1\right) \quad \text{za kisline}$$

$$pK_a = pH + \log\left(\frac{S'_0}{S_i} - 1\right) \quad \text{za baze}$$

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 pufrnih raztopin z različnimi pH.

Konstanto ionizacije izračunamo po enačbah (kjer sta P pravi in P_n navidezni porazdelitveni koef.):
učinkovina je **šibka kislina**:

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

učinkovina je **šibka baza**:

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

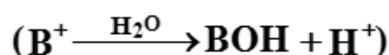
- pK_a izračun iz porazdelitvenega koeficienta (P) – fazno ravnotežje →

$$P = \frac{c_0}{c_w} = \frac{c_0}{[HA]} \quad K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \Rightarrow \frac{K_a}{[H^+]} = \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$P_{nav} = \frac{c_0}{[HA] + [A^-]} \quad \frac{P}{P_{nav}} = \frac{c_0([HA] + [A^-])}{[HA]c_0}$$

$$P = P_{nav} \left(1 + \frac{[A^-]}{[HA]}\right) = P_{nav} \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]}\right) \quad \text{za kisline}$$

$$P = P_{nav} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right) \quad \text{za baze}$$



Enačbe za linearno regresijo:

$$y = n + k \cdot x$$

$$\frac{1}{P_{nav}} = \frac{1}{P} + \frac{K_a}{P} \cdot \frac{1}{[H^+]} \quad \text{za kisline}$$

$$\frac{1}{P_{nav}} = \frac{1}{P} + \frac{1}{P \cdot K_a} \cdot [H^+] \quad \text{za baze}$$

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 (14):

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

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

- pK_a izračun iz HPLC parametrov

$$K_R = c_s / c_m = e^{-(\Delta G_R^0 / RT)}$$

K_R – ravnotežna konstanta, ki opisuje dinamično ravnotežje med stacionarno in mobilno fazo

ΔG_R^0 – standardna prosta entalpija za prehod spojine iz mobilne v stacionarno fazo

c_s, c_m – ravnotežni koncentraciji spojine v stacionarni in mobilni fazi

Retencijski (prej: kapacitivni) faktor: $k' = (t_R - t_0) / t_0$

$$k' = \frac{k_n' + k_i' \cdot K_a / [H^+]}{1 + K_a / [H^+]} \quad \text{za kisline}$$

$$k' = \frac{k_n' + k_i' \cdot [H^+] / K_a}{1 + [H^+] / K_a} \quad \text{za baze}$$

k_n' in k_i' – retencijska faktorja molekularne (neionizirane) in ionizirane oblike

6. KONDUKTOMETRIJA

stopnja ionizacije $\alpha = \frac{\Lambda_c}{\Lambda_\infty}$

Λ_c – ekvivalentna (molarna) prevodnost pri neki koncentraciji

Λ_∞ – ekvivalentna (molarna) prevodnost pri neskončnem razredčenju, uporabna za zelo šibke kisline, $pK_a \approx 11 - 14$

$$K_a = \frac{\alpha^2 c}{1 - \alpha}$$

DOLOČANJE pKa - povzetek, kar je na ppt

- **potenciometrična titracija** (zelo nizke conc, 0.001 – 0.01M;
pH merimo, izračun s Henderson – Hasselbalchovo enačbo); lahko tudi iz pH in konc. same razt.
Za območje $2,0 < pKa < 11$ (netočnost steklene elektrode)

- **spektrofotometrične metode:**

Beerov zakon: $A = A_i + A_m$
analitska λ

- **metoda topnosti** (fazna ravnotežja) – $\log P$

- **konduktometrija**

- **porazdelitvena metoda**

Izračun porazdelitvenega koeficienta

Kakšen je porazdelitveni koeficient oktanol/voda?

Pomembno je za absorbcijo, prehod učinkovin skozi kožo. Bolj lipofilne substance lažje prehajajo čez kožo.

ORGANSKA FAZA = pogosto oktanol.

PUFRI

1M HCl \rightarrow v kri (pH = 7,4): DISOCIIRA
 \rightarrow v želodec (pH = 1): NE DISOCIIRA

KISLINA:

pH < pKa \rightarrow NE disociira (če damo kislino v kisel medij)

pH > pKa \rightarrow disociira (če damo kislino v bazičen medij)

pH = pKa \rightarrow ionizirana in neionizirana oblika sta v ravnovesju (enako zastopani) - razmerje 1:

NALOGA: Izračunaj pH:

- 5mL 0,1M HCl + 100mL vode \rightarrow pH = 2,3

$$\frac{0,005 \cdot 0,1}{0,1} = 0,005 \quad -\log(0,005) = \text{pH} = 2,3$$

- 5mL 0,1M HCl + 100mL HCl \rightarrow pH = 0,019 (majhna razlika – samo za 2/100 !)

$$\frac{0,005 \cdot 0,1 + 0,1 \cdot 1M}{0,105} = 0,9571 \quad -\log(0,005) = \text{pH} = 0,019$$

pH vode = 7

pH 0,1M HCl = 1

pH 1M HCl = 0

***PUFER:** snov, ki uravnava kislost oziroma bazičnost raztopin oz. raztopine, ki nasprotujejo spremembi pH ob dodatku manjših količin kislin ali baz.

Če k raztopini pufru dodamo majhno količino baze ali kisline, se pH raztopine skoraj ne spremeni. Pufri so običajno **raztopine zmesi šibkih kislin in soli teh kislin z močnimi bazami ali zmesi šibkih baz in soli teh šibkih baz z močnimi kislinami.**

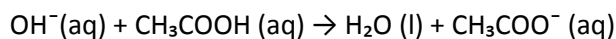
Pufer ima sposobnost sprejemanja protonov (v primeru dodatka kisline) in oddajanja protonov (v primeru dodatka baze).

Pufre delimo na kisle in bazične. **Kisli pufri** ($\text{pH} < 7$) so sestavljeni iz šibke kisline in njene ustrezne soli. **Bazični pufri** ($\text{pH} > 7$) so sestavljeni iz šibke baze in njene ustrezne soli.

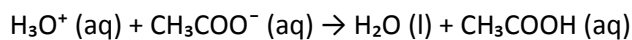
Pufri imajo pomembno vlogo v živih bitjih. Med drugim omogočajo tudi konstantno pH-vrednost krvi (normalna vrednost pH krvi je 7,4). Če se pH spremeni za več kot 0,4, ne nastopi smrt, kot je bilo napisano, kajti potem bi sedaj umrlo kak milijon ljudi. Možni vzrok spremembe pH krvi je lahko hitro globoko dihanje (hiperventilacija), npr. zaradi bolečine ali stresa.

PRIMER PUFRA: Ocetna kislina/natrijev acetat

Molekule očetne kisline (CH_3COOH) v pufru oddajo protone OH^- ionom in jih na ta način nevtralizirajo (nastane voda). Natrijev acetat (CH_3COONa) v vodni raztopini razpade na natrijeve in acetatne ione (Na^+ , CH_3COO^-). Acetatni ioni sprejmejo protone od oksonijevih ionov in jih na ta način nevtralizirajo (nastane voda).



Dodatek baze (hidroksidni ioni) nevtralizirajo molekule očetne kisline, ki oddajo protone. Prikazano ravnotežje omogoča, da ostane koncentracija hidroksidnih ionov kljub dodatku baze skoraj nespremenjena.



Dodatek kisline (oksonijevi ioni) nevtralizirajo acetatni ioni, ki sprejmejo protone. Prikazano ravnotežje omogoča, da ostane koncentracija oksonijevih ionov kljub dodatku kisline skoraj nespremenjena.

Henderson-Hasselbalchova enačba:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left(\frac{\text{neprotonirana oblika}}{\text{protonirana oblika}}\right)$$

$$\text{pH} = \text{pK} + \log\left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right) \qquad \text{pOH} = \text{pK}_b + \log\left(\frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}]}\right)$$

šibka kislina/sol:
$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\text{A}^-}{\text{HA}}$$

šibka baza/sol:
$$\text{pH} = \text{pK}_w - \text{pK}_b + \log \frac{\text{B}}{\text{HB}^+}$$

konc. razt.:

$$a = f \cdot c$$

a ...aktivnost

f ...aktivnostni koeficient

c ...molarlost

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{A^-}{HA} + \log f_{A^-}$$

Močne kisline so pufri – upirajo se spremembi pH

Želodec: starejši ljudje → 3,4 pH (upade moč pufra)

mlajši ljudje → 1,2 pH (razlike tudi pred/po obroku)

šibka kislina + H⁺ oz. + OH⁻ (spremeni se razmerje A⁻ / HA)

A + H⁺ → manjša razlika

A + OH⁻ → večji vpliv (bi se pretvoril v sol)

Debye-Hückel-ova enačba:

Za neidealne raztopine

$$\log f_{\pm} = -\frac{AZ_+Z_-\sqrt{\mu}}{1+\sqrt{\mu}}$$

A ...konst. (pri 25°C = 0,51 za vodo)

z₊, z₋ ...naboja ionov

μ ...ionska moč razt.

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

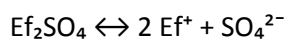
Na pH vpliva:

- dodatek nevtralnih soli, vode (spremeni μ)

- T (spremeni pK_w)

NALOGA: Izračunaj pH razt., ki vsebuje 0,1 M efedrina in 0,01 M efedrinijevega sulfata:

$$K_b = 2,3 \cdot 10^{-5}$$



$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[B]}{[HB^+]} = 14 - 4,63 + \log \frac{0,1}{0,02} = \underline{\underline{10,06}}$$

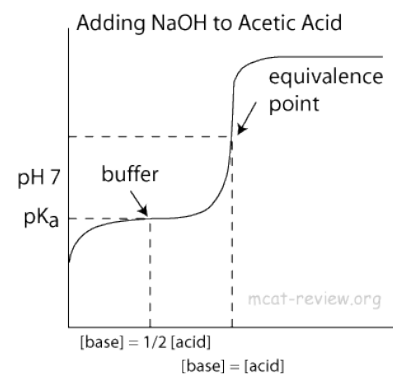
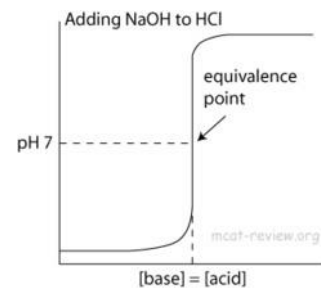
$$\mu \leq 0,02 \quad \rightarrow \quad \log \gamma_i (f_i) = -A z_i^2 \sqrt{\mu}$$

$$0,02 \leq \mu \leq 0,1 \quad \rightarrow \quad \log \gamma_i (f_i) = -A z_i^2 \sqrt{\mu} / (1 + a_i B \sqrt{\mu}) \quad a_i B \approx 1$$

a_i ~ 3-4 · 10⁻⁸ (srednji efektivni ionski premer; oz. koliko se ioni lahko približajo med sabo) pri 25°C

B ~ 0,33 · 10⁸ (konstanta, odvisna od lastnosti topila; vrednost je za vodo)

A = 0,51 za vodo (pri 25°C); parameter odvisen od dielektrične konst



Vse vrednosti (**a**, **A**, **B**) so odvisne od T.

$$pH = pK_a + \log(\text{sol}/\text{kisl}) - 0.51(2n-1)\nu\mu / (1 + \nu\mu)$$

n = ionizacija soli

***PUFRNA KAPACITETA**: Sposobnost pufrne raztopine, da nasprotuje spremembi pH.

1. van Slyke-ova enačba:

$$\beta = \frac{\Delta A(\Delta B)}{\Delta pH}$$

β ...pufrna kapaciteta

$\Delta A(\Delta B)$...dodatek kisline (baze) [mol/L]

ΔpH ...sprememba pH

NALOGA:

0,1 M pufer: Na-acetat + očetna kislina pKa = 4,76

Dodajamo NaOH

NaOH (moli)	pH	β
0	$pH = pK_a + \log(0,1/0,1) = 4,76$	$\Delta B/\Delta pH = 0,01/0,09 = 0,11$
0,01	$4,76 + \log(0,11/0,09) = 4,85$	$0,01/0,09 = 0,11$
0,02	$4,76 + \log(0,12/0,08) = 4,94$	$0,01/0,09 = 0,11$
0,03	= 5,03	= 0,10
0,04	= 5,13	= 0,09
0,05	= 5,24	

natančen izračun β :

2. van Slyke-ova enačba:

$$\beta = 2,303 \cdot c \cdot \frac{K_a [H_3O^+]}{(K_a + [H_3O^+])^2}$$

c ...celokupna koncentracija
pufra (kislina + sol)

max. β : ko je razmerje 1 oziroma $pH = pK_a$

$$\beta_{\max} = 2,303 \cdot c \cdot \frac{1}{4} = 0,576 \cdot c$$

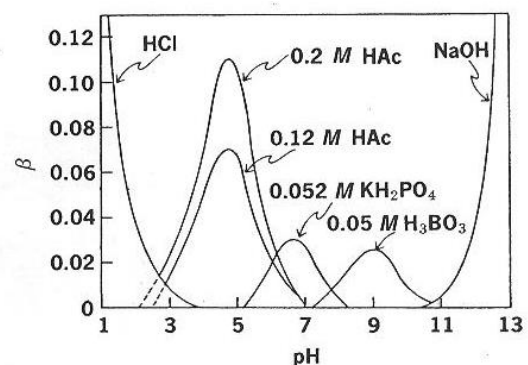
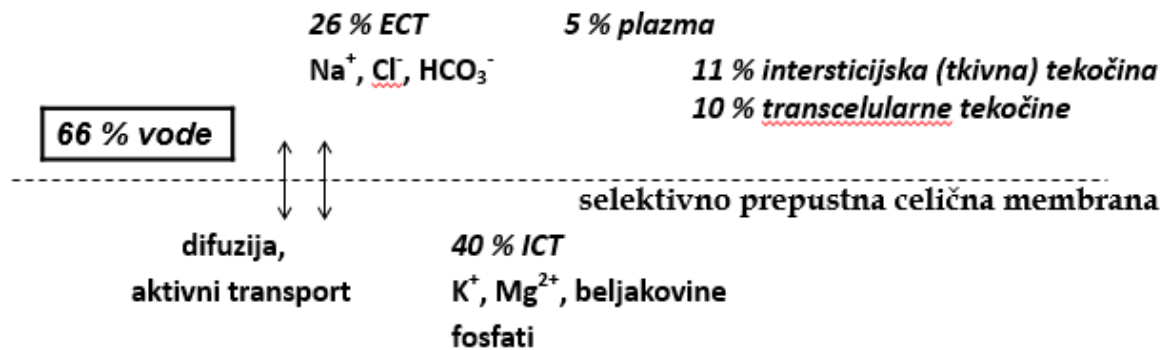


Fig. 9-4. The buffer capacity of several buffer systems as a function of pH. (Modified from R. G. Bates, *Electrometric pH Determinations*, Wiley, New York, 1954.)

IZOTONIČNE IN PUFERNE RAZTOPINE



- PARENTERALNE RAZTOPINE:**
- sterilnost, apirogenost
 - izotoničnost, evhidričnost
 - zadostna količina tekočine, za kritje izgub
 - zadostna kalorična vrednost hranil
 - uravnava elektrolitskega, acido-baznega ravnotežja

APIROGENOST: odsotnost snovi, ki povzročajo dvig TT

IZOTONIČNOST: enak krvni tlak kot krvna plazma

EVHIDRIČNOST: pH podoben fiziološkemu

PUFRI V FARMACEVTSKIH IN BIOLOŠKIH SISTEMIH

FARMACEVTSKE PUFERNE RAZTOPINE:

- šibka kislina / sol (ocetna kislina / Na-acetat)
- šibka baza / sol (amoniak / amonijev klorid)
- dve soli večbaznih kislin (mono in dinatrijev fosfat)
- močna kislina / druga sol (HCl / boraks)

BIOLOŠKI PUFERNI SISTEMI:

- | | | | |
|------------------|--|--------------------|---------------------------------------|
| primarni: | - H_2CO_3 / HCO_3^- | sekundarni: | - hemoglobin |
| (plazma) | - H_3PO_4 / Na-fosfati | (eritrociti) | - H_3PO_4 / K-fosfati |
| | - beljakovine | | |

ZAHTEVE PRI PRIPRAVI PUFERNIH RAZTOPIN:

- fiziološka kompatibilnost
- fizikalna in kemična kompatibilnost
- izbira pH: kompromis med fiziološko kompatibilnostjo, terapevtsko učinkovitostjo, stabilnostjo pripravka
- pufrna β : pH blizu fiziološkega – velika, pH odstopa od fiziološkega- majhna

PREPARING A BUFFER SOLUTION

Adapted from Robinson, R. A., and Stokes, R. H., Electrolyte solutions, the measurement and interpretation of conductance, chemical potential, and diffusion in solutions of simple electrolytes, 2nd ed., rev. London, Butterworths, 1968.

Buffer solutions

A. 50 mL 0.2 M	KCl	+ volume indicated (in mL)	0.2 M HCl
B. 100 mL 0.1 M	potassium hydrogen phthalate	+ volume indicated (in mL)	0.1 M HCl.
C. 100 mL 0.1 M	potassium hydrogen phthalate	+ volume indicated (in mL)	0.1 M NaOH
D. 100 mL 0.1 M	KH ₂ PO ₄	+ volume indicated (in mL)	0.1 M NaOH
E. 100 mL 0.1 M	tris (hydroxymethyl) aminomethane	+ volume indicated (in mL)	0.1 M HCl
F. 100 mL 0.025 M	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O (borax)	+ volume indicated (in mL)	0.1 M HCl
G. 100 mL 0.025 M	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O (borax)	+ volume indicated (in mL)	0.1 M NaOH
H. 100 mL 0.05 M	NaHCO ₃	+ volume indicated (in mL)	0.1 M NaOH
I. 100 mL 0.05 M	Na ₂ HPO ₄	+ volume indicated (in mL)	0.1 M NaOH
J. 50 mL 0.2 M	KCl	+ volume indicated (in mL)	0.2 M NaOH

<u>Buffer A</u>		<u>Buffer B</u>		<u>Buffer C</u>		<u>Buffer D</u>		<u>Buffer E</u>	
<u>pH</u>	<u>volume</u>	<u>pH</u>	<u>volume</u>	<u>pH</u>	<u>volume</u>	<u>pH</u>	<u>volume</u>	<u>pH</u>	<u>volume</u>
1.00	134.0	2.20	99.0	4.10	2.6	5.80	7.2	7.00	93.2
1.10	105.6	2.30	91.6	4.20	6.0	5.90	9.2	7.10	91.4
1.20	85.0	2.40	84.4	4.30	9.4	6.00	11.2	7.20	89.4
1.30	67.2	2.50	77.6	4.40	13.2	6.10	13.6	7.30	86.8
1.40	53.2	2.60	70.8	4.50	17.4	6.20	16.2	7.40	84.0
1.50	41.4	2.70	64.2	4.60	22.2	6.30	19.4	7.50	80.6
1.60	32.4	2.80	57.8	4.70	27.2	6.40	23.2	7.60	77.0
1.70	26.0	2.90	51.4	4.80	33.0	6.50	27.8	7.70	73.2
1.80	20.4	3.00	44.6	4.90	38.8	6.60	32.8	7.80	69.0
1.90	16.2	3.10	37.6	5.00	45.2	6.70	38.6	7.90	64.0
2.00	13.0	3.20	31.4	5.10	51.0	6.80	44.8	8.00	58.4
2.10	10.2	3.30	25.8	5.20	57.6	6.90	51.8	8.10	52.4
2.20	7.8	3.40	20.8	5.30	63.2	7.00	58.2	8.20	45.8
		3.50	16.4	5.40	68.2	7.10	64.2	8.30	39.8
		3.60	12.6	5.50	73.2	7.20	69.4	8.40	34.4
		3.70	9.0	5.60	77.6	7.30	74.0	8.50	29.4
		3.80	5.8	5.70	81.2	7.40	78.2	8.60	24.4
		3.90	2.8	5.80	84.6	7.50	82.2	8.70	20.6
		4.00	0.2	5.90	87.4	7.60	85.6	8.80	17.0
						7.70	88.4	8.90	14.0
						7.80	90.6	9.00	11.4
						7.90	92.2		
						8.00	93.4		

<u>Buffer F</u>		<u>Buffer G</u>		<u>Buffer H</u>		<u>Buffer I</u>		<u>Buffer J</u>	
<u>pH</u>	<u>volume added</u>	<u>pH</u>	<u>volume added</u>	<u>pH</u>	<u>volume added</u>	<u>pH</u>	<u>volume added</u>	<u>pH</u>	<u>volume added</u>
8.00	41.0	9.20	1.8	9.60	10.0	10.90	6.6	12.00	12.0
8.10	39.4	9.30	7.2	9.70	12.4	11.00	8.2	12.10	16.0
8.20	37.6	9.40	12.4	9.80	15.2	11.10	10.2	12.20	20.4
8.30	35.4	9.50	17.6	9.90	18.2	11.20	12.6	12.30	25.6
8.40	33.2	9.60	22.2	10.00	21.4	11.30	15.2	12.40	32.4
8.50	30.4	9.70	26.2	10.10	24.4	11.40	18.2	12.50	40.8
8.60	27.0	9.80	30.0	10.20	27.6	11.50	22.2	12.60	51.2
8.70	23.2	9.90	33.4	10.30	30.4	11.60	27.0	12.70	64.4
8.80	19.2	10.00	36.6	10.40	33.0	11.70	32.4	12.80	82.4
8.90	14.2	10.10	39.0	10.50	35.6	11.80	38.8	12.90	106.0
9.00	9.2	10.20	41.0	10.60	38.2	11.90	46.0	13.00	132.0
9.10	4.0	10.30	42.6	10.70	40.4	12.00	53.8		
		10.40	44.2	10.80	42.4				
		10.50	45.4	10.90	44.0				
		10.60	46.6	11.00	45.4				
		10.70	47.6						
		10.80	48.5						

NALOGE:

1) Kako se spremeni pH raztopine:

- močne baze
- šibke baze
- pufru

kadar jo 10x redčimo s prečiščeno vodo ($\text{pH} = 7$). Začetni pH je 9.

2) Kako se spremeni pH raztopine:

- močne kisline
- šibke kisline (ocetna kislina; $\text{pK}_a = 4,72$)

kadar jo 10x redčimo s prečiščeno vodo ($\text{pH} = 7$). Začetni pH je 4,5.

3) Neka bazična spojina ima $\text{pK}_a=6,6$, raztopljena je v pufru s $\text{pH}=7,5$ (pH je konstanten). Izračunaj delež ionizirane in neionizirane oblike spojine v tem pufru.