

^1H NMR titrálások felvételének és kiértékelésének technikája

Mindazoknak, akik először próbálkoznak NMR titrálásokkal.

Készítette: Dr. Lázár István

DE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2006. január 16.

Milyen területeken látjuk hasznát az NMR titrálásoknak?

Két nagy területet lehet kiemelni, amelyekben különösen fontos a protonálódási állandók ismerete.

- Koordinációs kémia: az egész kutatási területen belül alapvető fontosságú a komplexképző vegyületek protonálódási tulajdonságainak minél szélesebb körű ismerete.
- Gyógyszerkutatás: bármilyen aminocsoportot vagy karboxilátcsoportot tartalmazó hatóanyag felszívódási tulajdonságait alapvetően meghatározzák az adott vegyület protonálódási tulajdonságai, így azok ismerete nélkülözhetetlen.

Milyen információkat nyerhetünk egy ^1H NMR titrálásból?

- Meghatározhatjuk az általunk vizsgált anyag lépcsőzetes protonálódási állandóit akkor is, ha nem áll rendelkezésünkre pontos pH-potenciometriás mérésekhez használható titráló berendezés és a számításhoz speciális számítógépes program.
- Meghatározhatjuk azt, hogy az egyes protonáltsági állapotokban (azaz pl. egy kiszemelt pH-n) a molekulán belüli protonálható csoportok (leggyakrabban az amino ill. karboxilát csoportok) melyike és milyen mértékben van protonálódva. Ennek a meghatározására a pH-potenciometria nem alkalmas.

Milyen további előnyei vannak az NMR titrálásoknak?

- A legnagyobb előnye az, hogy szennyezett anyagokat is használhatunk a titrálásokhoz, feltéve, ha a vizsgált komponens jelei elkülöníthetők a szennyezések jeleitől. Mivel a szintetikus kémiai munkák során a kutatások kezdetén az új vegyületek a leggyakrabban még csak szennyezett formában állnak rendelkezésre, jelentősen meggyorsíthatja az új ligandumok fejlesztését az, hogy nem kell az első eredményekre a megfelelő tisztasági fok eléréséig várni.
- Rendkívül fontos, hogy az NMR titrálásokhoz nem kell ismerni az illető anyag moláris tömegét, így teljesen ismeretlen anyagok esetén is tudunk protonálódási állandót meghatározni. Ennek különösen olyan esetekben van jelentősége, amikor az extrakciós tulajdonságok beállításához van szükségünk arra, hogy tudjuk, milyen pH-n milyen protonáltsági állapotban van a vizsgált komponensünk. (pl. a gyógyszeriparban vagy a környezeti analitikában)

- Olyan oldatok esetén is használható, amikor pl. magasabb hőmérsékleten, nagyon nagy ionerősség mellett kellene megtalálnunk azokat a körülményeket, amelyeken a kiválasztott komponensünk a szükséges protonáltsági állapotban van. Különösen fontos ez a technika akkor, ha nem tiszta vizes, hanem kevert oldószeres közegben dolgozunk, feltéve, ha az oldószer nem teszi lehetetlenné a mérést. Ilyen szélsőséges körülmények között a pH-metria csak nagy nehézségekkel használható.

Milyen hátrányai vannak az NMR titrálásoknak?

Igazi hátránya az, hogy egy drága NMR készüléket, valamint több óra folyamatos hozzáférést igényel. A kapott protonálódási állandók általában csak egy tizedes jegy pontosságúak, így pontos számításoknál nem helyettesíthetik a pH-potenciometriás eredményeket.

Szükséges anyagok, eszközök

- NMR készülék
- 5 mm-es tiszta, száraz NMR csövek (minden adatponthoz egy darab, azaz a teljes 2-12 pH tartományra kb. 0,5 pH egységenként felvéve 21 cső)
- pH mérő készülék (3 tizedesjegyes kijelzővel) - kis méretű, pontos, kombinált üvegelektóddal
- kalibráló oldatok a pH-mérő beállításához
- 5-10 ml térfogat befogadására alkalmas titráló edény (optimális esetben Ar vagy N₂ védőgáz atmoszférával is ellátható, de általában egy lezárható mintásüveg is megfelel)
- mágneses keverő készülék és a mintásüvegbe illő méretű, kis mágneses keverőbot
- D₂O
- ionerősség állításához anyag (NaCl, KCl, NaClO₄, Me₄NCl, stb.)
- Pasteur-pipetták gumi pipettalabdával, kihúzott végű vékony (2-3 mm) és nagyon vékony (1 mm) üvegbotok
- titráláshoz használható savak és lúgok, különböző koncentrációban (pl. kis üvegben legyen töményebb sav v. lúg, legyen kb. 1 M-os és kb. 0.1 M-os sav és lúg egyaránt)

A titrálendő oldat előkészítése

A megfelelő pontosságú mérésekhez a titrálendő oldat ionerősségét állandó szintre kell beállítanunk, ugyanis az ionerősség változása pontosabb mérések esetén megengedhetetlen. Természetesen ha csak egy gyors, tájékozódó mérést akarunk végezni, akkor az ionerősség beállítását elhagyhatjuk, de ne feledjük, hogy az így kapott eredmények kevésbé pontosak lesznek, mint állandó ionerősség esetén. Az ionerősség állandóságához az szükséges, hogy a titrálni kívánt anyag koncentrációja egy tizede legyen az ionerősségnek, vagy még annál is kisebb. Ha elegendően nagy az ionerősség, akkor a titrálás során bekövetkező változás már elhanyagolható. Szélsőséges pH-n (pH 12 fölött, illetve pH 2 alatt) üvegelektóddal való mérés helyett inkább számítjuk a pH-t, de ehhez a pH-metriás titrálások és a pH számítások magasabb szintű ismeretére van szükség.

A gyakorlatban arra törekszünk, hogy minél kisebb anyagmennyiségből meg tudjuk határozni a protonálódási állandókat és a protonálódási mechanizmust. Egy a nagyobb ligandumoknál átlagosnak számító, kb. 400–500 g/mol moláris tömegű anyag esetén 1 mmol/dm³-esnél hígabb mintával nem érdemes próbálkozni, mert nem fog látszani az alapvonalon a minta jele, a 10 mmol/dm³ koncentráció sokkal kedvezőbb. A legkisebb oldattérfogat, amivel a titrálást általában el tudjuk végezni kb. 5 ml, de ezzel dolgozni még nehéz, nagyobb gyakorlatot igényel, ezért célszerűbb 10 ml-es induló térfogattal számolni. (A legnagyobb gyakorlattal és a legkisebb eszközökkel sem tudunk kb. 2,5 ml-nél kisebb térfogatban dolgozni). 10 ml titrálendő térfogatnál a vizsgálandó anyagunkból legalább 50 mg-ot kell feloldanunk, ez a létező legalsó határ, de minél többet oldunk fel, annál jobb. Az ionerősségnek legalább 0,1 M-nak kell lenni, de a szokásos pH tartományon kívüli méréshez legalább 1 M-os ionerősség szükséges.

Oldószerként 10-50% D₂O-tartalmú vizet használunk a leggyakrabban. 10%-nál kisebb deutériumtartalomnál az NMR készülék lock jelének az elvesztése fordulhat elő, míg 50%-nál nagyobb deutériumtartalomnál a pH és a pD között max. 0.4 egység különbség lehet, amit számításba kell venni. Akkor indokolt a mérést tiszta D₂O-ban végeznünk, ha a minta jelei olyan közel vannak a víz jeléhez, hogy másként nem láthatók. Ilyen esetben célszerű a titráló oldatokból is a perdeuteráltakat használnunk. Bár a tiszta D₂O-ban való titrálás néhány szempontból kedvező, magasabb költsége miatt csak indokolt esetben használjuk. Persze D₂O nélkül is lehet mérni, de ekkor nem lesz lock jel, aminek hiánya miatt csak rövidebb mérési ciklusokat célszerű használnunk. Ebben az esetben a mérés előtt a mintával megegyező

térfogatú D₂O-ra beshimmeljük készüléket, majd a shimelő D₂O-t az aktuális mintánkra kicseréljük és közvetlenül (további shimelés nélkül) felvesszük a spektrumot (a sweep-et ilyenkor a készüléken ki kell kapcsolni).

A potenciometriás titrálások során az ionerősség állításához és a titráláshoz általában tetrametil-ammónium-hidroxidot illetve annak sóját (TMAOH, TMACl) használják, mivel ezek nem képeznek komplexet a vizsgált anyagokkal. NMR titrálásoknál TMA-származékok csak akkor használhatók, ha a TMA metilcsoport jele nem fed át az anyagunk jelével. Primer, szekunder vagy tercier aminocsoportot tartalmazó anyagoknál erre gyakorlatilag nincs esély, így ilyen esetekben az ionerősség állítására és a titrálásra csak KCl, KClO₄, NaCl, NaOCl₄, esetleg KNO₃, valamint KOH, NaOH, HCl, vagy HClO₄ használható. Számolnunk kell azzal, hogy a káliumionoknak vagy a nátriumionoknak számottevő kölcsönhatása lehet a vizsgált anyagunkkal, ezért az eredmények publikálásakor mindig meg kell adnunk, hogy milyen anyagot használtunk az ionerősség beállítására és a titrálásra.

A szokásos titrálási pH-tartomány 2–12, ezen belül a pH-mérő által mutatott érték kis deutériumtartalmú oldatoknál közvetlenül, korrekció nélkül használható. Ha a pH tartományon kívül akarunk dolgozni, akkor pontosan ismert koncentrációjú savoldat vagy lúgoldat sorozatra (amelynek a deutériumtartalma ugyanannyi, mint amennyi a titrálendő mintában van) kiszámítjuk a $-\log[\text{H}^+]$ -t, majd a számított értékhez hozzárendeljük a pH-mérő által mutatott értéket, így egy adott körülményekre érvényes kalibráló görbét nyerünk. Ha állandó ionerősségen dolgozunk, akkor természetesen azt is be kell állítani, és a kalibráció során ugyanazt az ionerősséget kell használni, mint a mérés során.

A mérések menete

Az eddiek szerint elkészített, sav vagy lúg hozzáadásával valamely szélső pH-értékre állított mintába állandó kevertetés közben belemerítjük az elektródot és leolvassuk a pH-t. Kivesszük az első mintát. A pH-t állandó kevertetés közben folyamatosan állítjuk különböző töménységű savoldat (lúgos közegből indulva) vagy lúgoldat (savas közegből indulva) adagolásával. Max. 0,5+/-0,1 pH lépésként 400-600 mikroliter mintát veszünk az oldatból és tiszta, száraz NMR csőbe töltjük, majd felvesszük a spektrumot. A mérési jegyzőkönyvünkben rögzítjük a leolvasott pH-értéket, valamint az ahhoz a pH-hoz tartozó NMR spektrum azonosítóját (jelét, nevét, stb.), nehogy a munka végeztével minden adatunk meglegyen, csak éppen ne tudjuk,

hogy melyik mérési fájl melyik pH-hoz tartozik. Ezután a mintát visszaöntjük és a titrálást tovább folytatjuk. Egy anyag teljes ^1H NMR-es titrálási görbéjének a felvételéhez kb. 3-4 h folyamatos mérési idő szükséges.

Mit és hogyan számolhatunk ki egyetlen NMR titrálási görbéből?

Protonálódási állandók

Legyen a vizsgálandó anyagunknak n protonálódási állandója a teljesen deprotonált állapothoz képest (azaz legyen egy n értékű bázis). Az oldatban jelen lévő részecskék elektromos töltésének a jelölésétől a továbbiakban eltekintünk. A protonálódási állandók ekkor a szokásos módon definiálhatók, azaz :

$$K_1 = \frac{[\text{HA}]}{[\text{H}][\text{A}]} \quad \dots \quad K_n = \frac{[\text{H}_n\text{A}]}{[\text{H}][\text{H}_{n-1}\text{A}]}$$

Az oldatban jelen lévő részecskék:



Válasszuk ki egy olyan proton jelét, amelynek a kémiai eltolódása változik a pH-val (azaz pH-érzékeny). (Ha több ilyen proton is van, természetesen midegyikkel végigcsinálhatjuk az eljárást.) Az egyes protonált állapotokhoz rendelhető kémiai eltolódások legyenek a következők:



A kiválasztott pH-érzékeny hidrogénatom kémiai eltolódása a teljes pH-tartományban kifejezhető a következő képlettel:

$$\delta = \frac{\delta_0 + \sum_{i=1}^n \delta_i \cdot 10^{\left(\sum_{j=1}^i \lg K_j\right) - i \cdot \text{pH}}}{1 + \sum_{i=1}^n 10^{\left(\sum_{j=1}^i \lg K_j\right) - i \cdot \text{pH}}}$$

Az aktuális pH-hoz tartozó, a számításokhoz felhasználható kémiai eltolódás értékeket a titrálási görbéből olvashatjuk le, így (pH; $\delta_{\text{kísérleti}}$) összetartozó adatpárokhoz jutunk.

A kiértékeléshez egy olyan táblázatkezelő programra van szükségünk, amely képes sokváltozós optimumszámítás elvégzésére. Jelenleg a két legelterjedtebb program a *Microsoft Office Excel*, valamint a *WordPerfect Quattro* nevű programjai. (Az *Office* esetén a *Solver* modult alapállapotban nem telepíti a program, de a telepítő lemezen rajta van, így utólag installálható). A számítási feladat megoldására mindkettő alkalmas. A továbbiakban ezen programok valamelyikének használatát ismertnek tételezzük fel. A fenti képlet alapján a konkrét számolási módszert mindenkinek magának kell kidolgozni, az adatokat beírni, az optimalizációt lefuttatni.

Minden adatpárra a görbe alapján első közelítésben kezdő δ_i és $\lg K_i$ értékeket választunk, majd azok felhasználásával kiszámítjuk a $\delta_{\text{számított}}$ értékét. A $\delta_{\text{számított}}$ és a kísérleti $\delta_{\text{kísérleti}}$ adatok eltéréseinek négyzetösszegét minimalizáljuk vagy a *Solver*, vagy az *Optimizer* funkciók felhasználásával. Az illesztett paramétereknek célszerű először vagy csak a protonálódási állandók logaritmusait, vagy csak a δ_i értékválasztani, majd elfogadható közelítés esetén ezeket együttesen is illesztjük.

A számítást az NMR spektrumban található minden egyes pH-érzékeny protonra célszerű külön-külön el végezni, majd a kapott $\log K$ értékek átlagolásával adjuk meg az elfogadásra kerülő értékeket. Természetesen ha egy protonnak nincs pH-függése, akkor arra nem lehet állandót sem számítani.

A $\log K$ értékek felhasználhatók a részecskeeloszlási diagram megalkotásához, a δ_0 és δ_n értékek pedig a protonálódási mechanizmusnál adják meg a teljesen deprotonált és a teljesen protonált forma kémiai eltolódását.

Részecskeeloszlási diagram számítása

Az egyes részecskékre vonatkozó móltörtek a pH függvényében megadhatók a következő képlettel. A számításhoz felhasználjuk az előzőekben kapott $\log K$ értékeket.

$$x_{H_m A} = \frac{10^{\left(\sum_{j=1}^m \lg K_j\right) - m \cdot pH}}{1 + \sum_{i=1}^n 10^{\left(\sum_{j=1}^i \lg K_j\right) - i \cdot pH}}$$

A kapott értékeket a pH függvényében ábrázolva kapjuk meg az egyes állapotokhoz tartozó részecskeeloszlási diagramot.

Protonálódási mechanizmus

Minden pH-érzékeny proton jelenél szükséges a δ_0 és δ_n értéke, amit az előző számításból is meg lehet adni, de a görbéből is meg lehet becsülni. A részleges protonáltságokhoz tartozó δ_i értékek azt mutatják meg, hogy hol, milyen pH-nál vannak ezek az állapotok, mert erre szükség van a számítás során. Ennél a számításnál százalékos eloszlásban kapjuk meg azt, hogy egy kiválasztott protonáltsági állapotnál az egyes protonálódási helyek átlagosan milyen mértékben protonáltak. A protonálódási mechanizmus számítása meghaladja ennek a bevezetőnek a célkitűzéseit, ezért azoknak, akik ezzel foglalkozni szeretnének, figyelmébe ajánljuk a következő irodalmat:

Desreux, J. F., Merciny, E., Loncin, M. F. *Inorg. Chem.* 20 **1981** 987-991