^{31}P NMR spektroszkópia alkalmazása üdítőital foszfortartalmának meghatározására

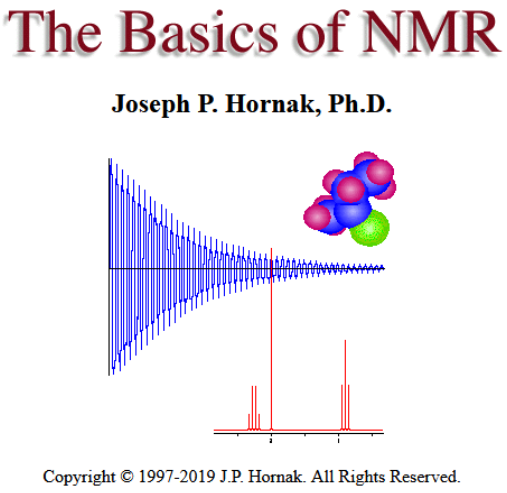
MŰSZERES ANALITIKA GYAKORLAT – NMR

GYAKORLAT LEÍRÁSA

KÉSZÍTETTÉK: KOVÁCS DÁNIEL, SZABÓ CSENGE LILLA, BODOR ANDREA

Ajánlott irodalom

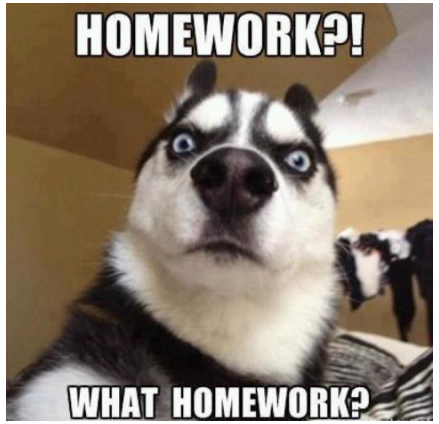
P. J. Hore: Mágneses magrezonancia. Nemzeti Tankönyvkiadó, 2004



J. P. Hornak: The Basics of NMR. e-könyv

https://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/

A sikeres gyakorlat érdekében…

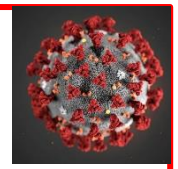


Kérjük, hogy a gyakorlatra felkészülten érkezzetek! A diasorban szerepelnek **zöld színnel** kiemelt és **„Warning! Házi feladat”** ábrával jelölt kérdések, amiket otthon kell megválaszolni.

Az NMR-készülék **erős mágneses térrel** üzemel! Pacemakerrel vagy fémprotézissel belépni szigorúan tilos! Kérjük, hogy akinek pacemakere vagy fémprotézise van, előre jelezze azt a gyakorlatvezetőknek!

A gyakorlaton maszk viselése kötelező!

Kérjük, hogy ügyeljetek a biztonságos távolság (1,5 m) betartására!



A gyakorlat célja, módszerek áttekintése

- Analitikai módszerfejlesztés

Milyen módszereket ismerünk foszforsav meghatározáshoz?

H_3PO_4

Savas karakter (H^+) - titrálás

Klasszikus

Műszeres

Foszfátcsoport (PO_4^{3-}) tulajdonságai

Klasszikus

Műszeres
(az NMR-en kívül…)

Írj példát a 4 feltüntetett kategóriára. Hogyan végeznéd el a kísérletet? Mik az egyes módszerek **előnyei** és **hátrányai**? Mi okozhat zavarást az egyes módszereknél?

Melyik módszert választanád, ha kólában kell foszforsavat meghatároznod? Miért?

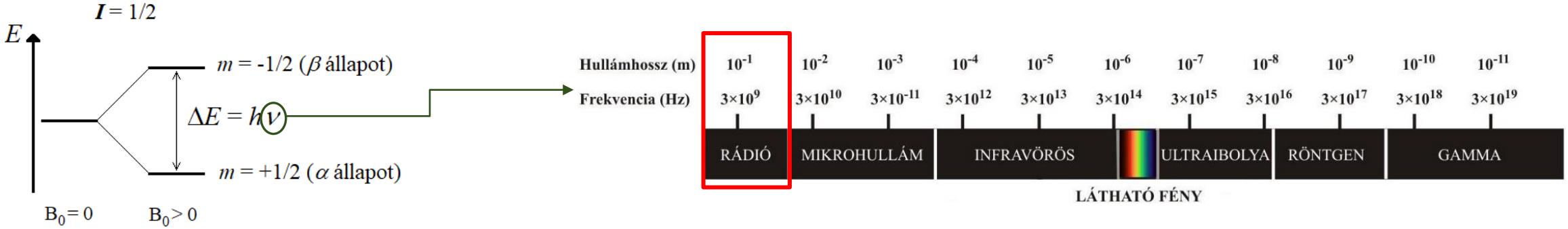
- Az NMR spektroszkópia alapjainak megismerése

NMR alapok I. – NMR-jelenség, aktív magok

Atommagok mágneses sajátságai ⟶ feltétel: atommag nem 0 magspinnel *(I)* rendelkezzen (páratlan p vagy n)

Mágneses térben az ***I*** magspinű magok spinje (2I+1) orientációt vehetnek fel ⟶ (2I+1) energiaszint

- ***I*** = 1/2 ⟶ 2 energiaszint, csak 1 átmenet lehetséges ⇒ oldat NMR-ben fontos magok **feles spinűek**!



- Felhasadás mértéke függ a mágneses tér erősségétől (B_0) és az atommag giromágneses együtthatójától (γ)

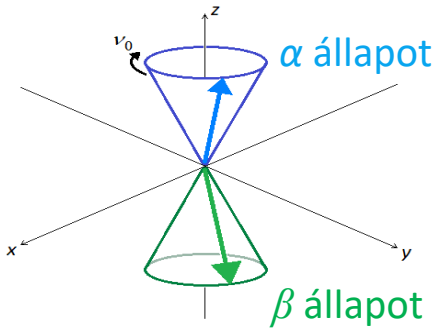
$$\Delta E = h\nu_0 = h\frac{\omega_0}{2\pi} = \frac{h}{2\pi}\gamma B_0$$

Atommag	γ / 10^7 rad/(T · s)	Természetes gyakoriság
^{1}H	**26,7**	**99,9 %**
^{13}C	6,7	1,1 %
^{15}N	-2,7	0,1 %
^{31}P	**10,8**	**100 %**
^{19}F	25,2	100 %

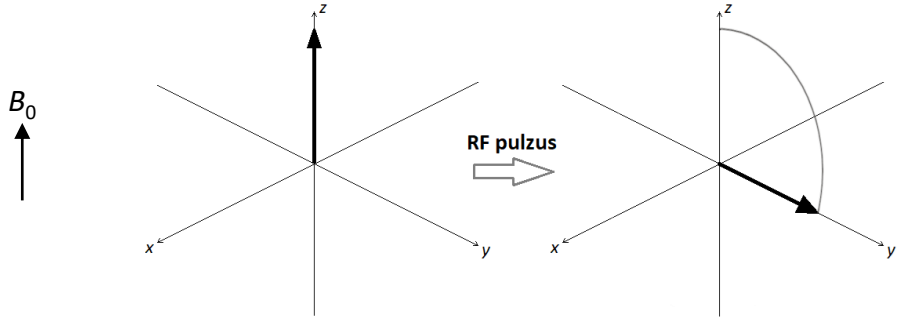
NMR alapok II. – vektormodell, a spektrum kialakulása

Vektormodell:

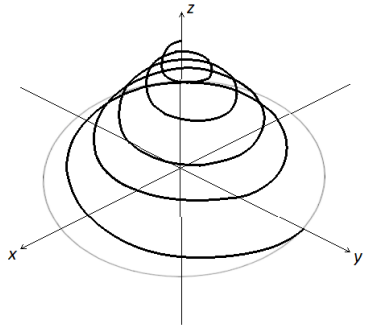
- A spin-impulzusmomentumok a B_0 tér (z-tengely) irányában orientálódnak → kúppalást mentén precesszió ν_0 frekvenciával
- α állapot energetikailag kedvezőbb → B_0 (z-tengely) irányú makroszkopikus mágnesezettség
- Rádiófrekvenciás gerjesztés (pulzus): a makroszkopikus mágnesezettség kibillen az xy síkba
- Relaxáció: exponenciálisan lecsengő rádiófrekvenciás sugárzás = **FID** (Free Induction Decay) ⇒ ezt mérjük
- Spektrum: az időfüggő FID **Fourier-transzformáció**ja → megadja, milyen frekvenciák fordulnak elő a FID-ben



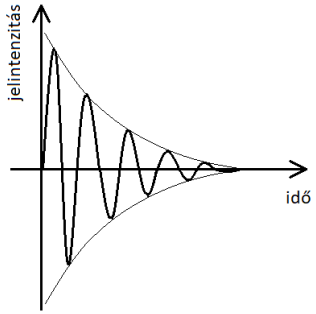
Spinek orientálódása B_0 térben



A z irányú makroszkopikus mágnesezettség kibillen az xy síkba



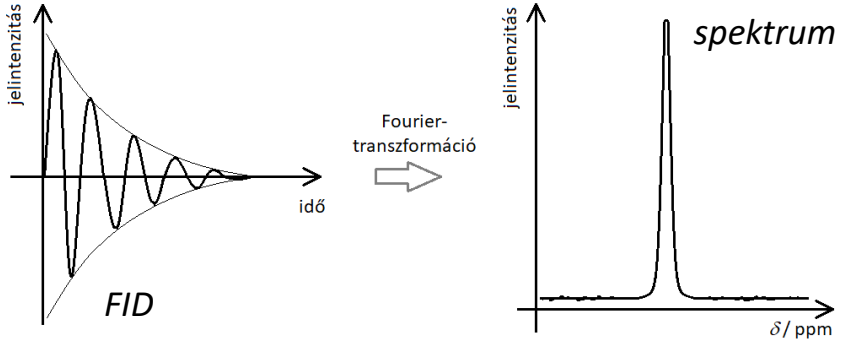
Relaxáció



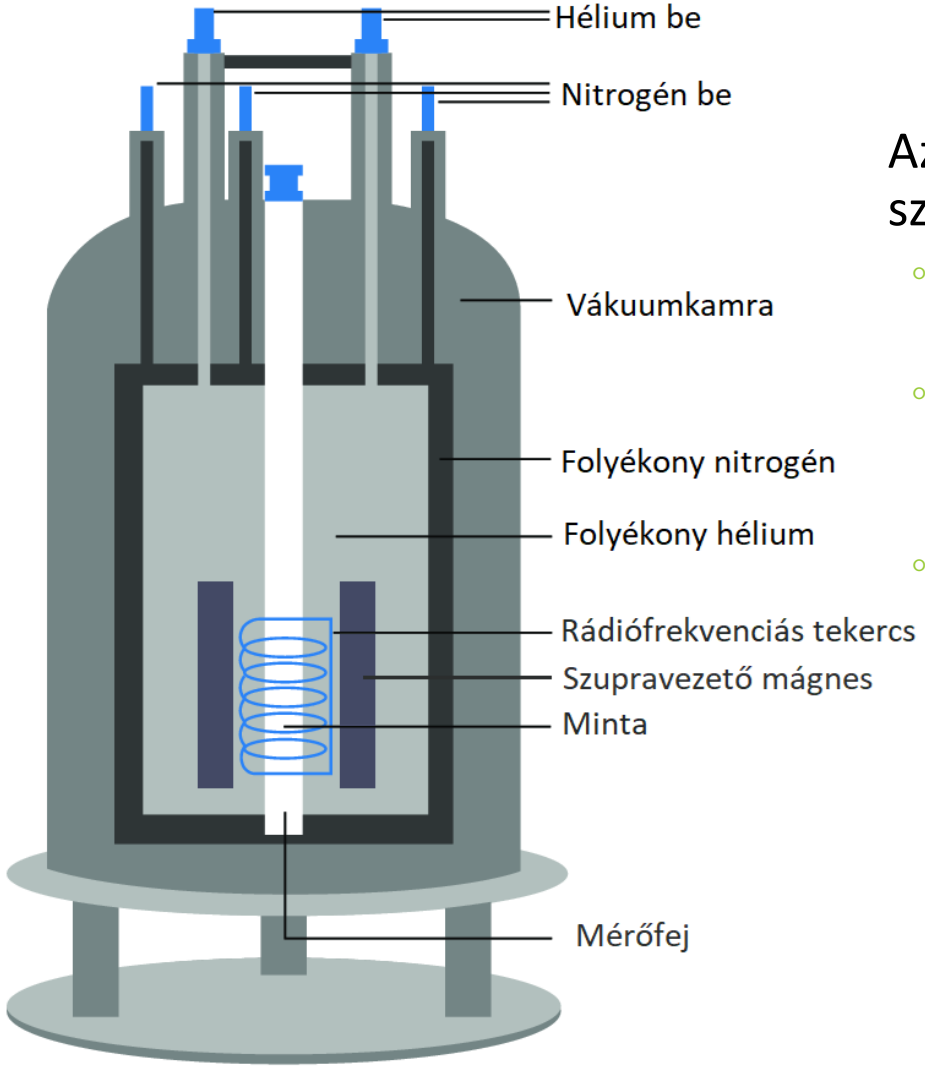
FID

Az atommagokat körülvevő elektronok a B_0 mágneses teret kismértékben árnyékolják → elektronfelhőtől (kémiai környezettől) függő jeleltolódás = **kémiai eltolódás (δ):**

- $\sim 10^{-6} \cdot \nu_0$ nagyságrendű → ppm-ben adjuk meg: ν_0-tól független
- „Csupasz" atommagot nem tudjuk mérni → referencia (0 ppm):
  - ^{1}H és ^{13}C NMR-ben: tetrametil-szilán (TMS)
  - ^{31}P NMR-ben: 85 % H_3PO_4 (külső referencia)



NMR-alapok III. – a műszer felépítése



Az NMR „lelke” a szupravezető mágnes:

- Folyékony héliumba (4,2 K) merül
- További 2 réteg hűtés: folyékony nitrogén + vákuum
- A mágneses tér erősségét jellemzően nem Teslában adjuk meg, hanem a proton rezonanciafrekvenciájá val jellemezzük

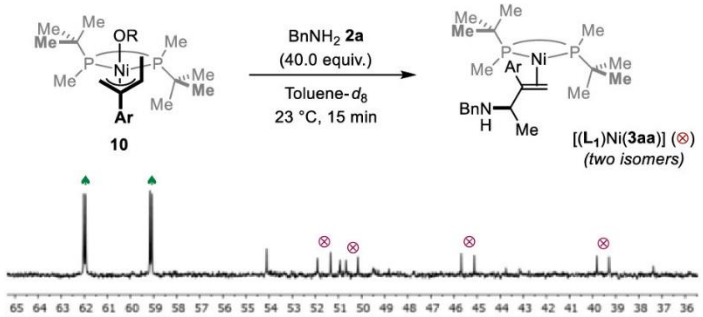
*Az ELTE gyakorlatain használt **250 MHz-es (balra)** és 700 MHz-es (jobbra) NMR készülékek*

D. Antcliffe, A. C. Gordon, *Crit. Care*, 2016

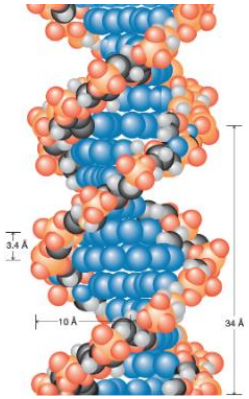
^{31}P NMR áttekintés és alkalmazási területek

- ✓ I = 1/2 → ideális
- ✓ Rendkívül szelektív: csak a foszfort tartalmazó komponenseket méri (kóla: csak H_3PO_4)
- ✓ Viszonylag nagy giromágneses együttható → érzékeny
- ✓ Természetes gyakoriság 100 % → rövid mérési idő, kevés tranziens
- ✓ Kémiai eltolódás érzékeny a környezetben történő változásokra → pH, koordináció stb. változása követhető
- ✓ Jellemzően kevés különböző környezet, széles ppm-skála → kevés jelátfedés
- ✗ Költséges: magas beszerzési költség („hightech”), magas fenntartási költség (folyékony hélium hűtés)

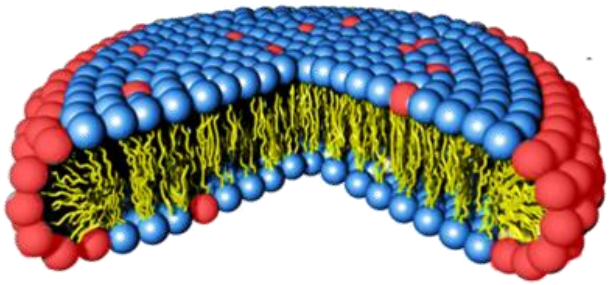
Alkalmazási lehetőségek:



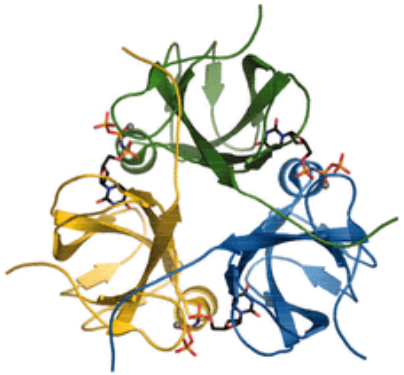
Foszfortartalmú szerves és fémorganikus vegyületek minőségi vizsgálata, reakciókinetika



DNS és RNS szerkezetének, dinamikájának jellemzése



Biológiai membránokban található foszfolipidek vizsgálata



dUTPáz, ATPáz és kináz funkciójú enzimek működése

G. Tran et al., J. Am. Chem. Soc., 2019
T. W. G. Solomons, *Organic Chemistry*, 12th ed., Wiley, 2016
D. E. Warschawski et al., BBA Biomembranes, 2011
O. Barabás et al., *Nucleic Acids Res.*, 2013

Analitika és NMR, pH mérés NMR csőben

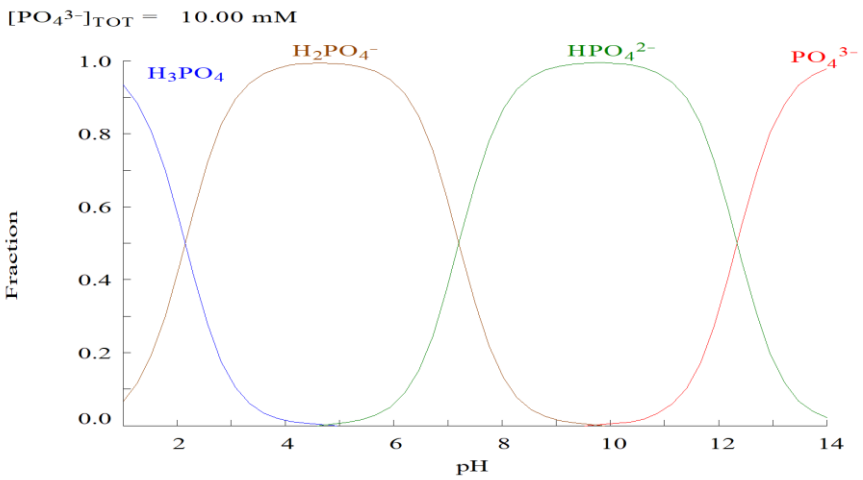
A foszforsav 3 értékű közepesen erős sav

$H_3PO_4 \rightleftharpoons H^+ + H_2PO_4^-$ $\quad pK_{a1} = 2{,}1$

$H_2PO_4^- \rightleftharpoons H^+ + HPO_4^{2-}$ $\quad pK_{a2} = 7{,}2$

} Vizes közegben mérhető

$HPO_4^{2-} \rightleftharpoons H^+ + PO_4^{3-}$ $\quad pK_{a3} = 12{,}4$ ⟶ Vizes közegben nem mérhető

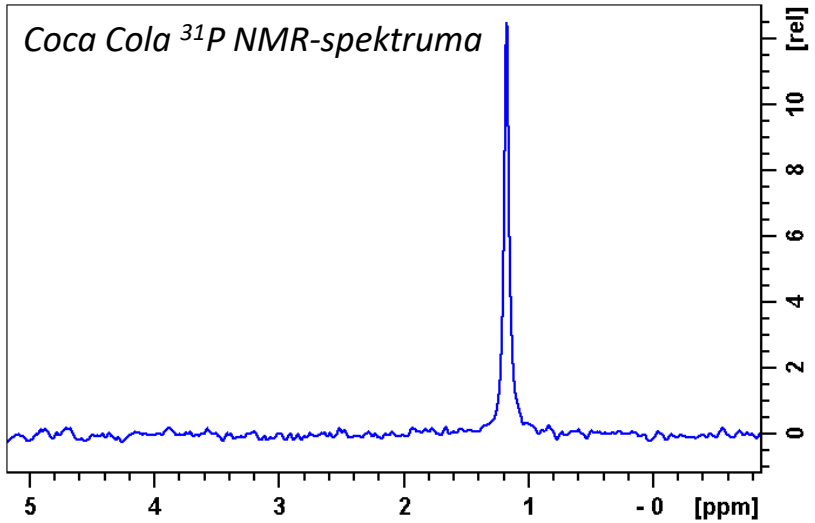


Vizes közegben tehát az alábbi specieszekkel számolhatunk:

- pH 1,5 – 3,5: H_3PO_4 és $H_2PO_4^-$
- pH 5,0 – 8,5: $H_2PO_4^-$ és HPO_4^{2-}

Az NMR-spektrumon 2 jelet várnánk… **DE!**

A specieszek egyensúlyi reakcióban egymásba alakulnak, a protoncsere gyors reakció → az NMR-spektrumon **1 JELET** (a jelen levő specieszek jeleinek súlyozott átlagát) látunk



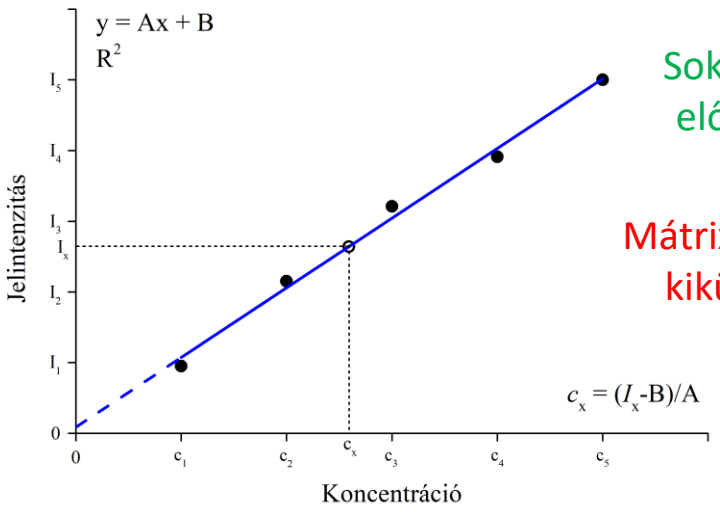
Mennyi a kóla pH-ja? Milyen specieszek vannak jelen a kólában?
Hogyan fog változni a foszfát kémiai eltolódása a pH növelésének/csökkentésének hatására? Emlékeztető: a 85 %-os H_3PO_4 0 ppm-nél ad jelet (referencia).

Analitikai meghatározás, a ^{31}P NMR-spektrum kvantitatív jellemzése

A jelintegrál egyenesen arányos a koncentrációval… DE: Mi az arányossági tényező?

$$I \overset{?}{\sim} c$$

Külső kalibráció



☺ Sok mintánál előnyösebb

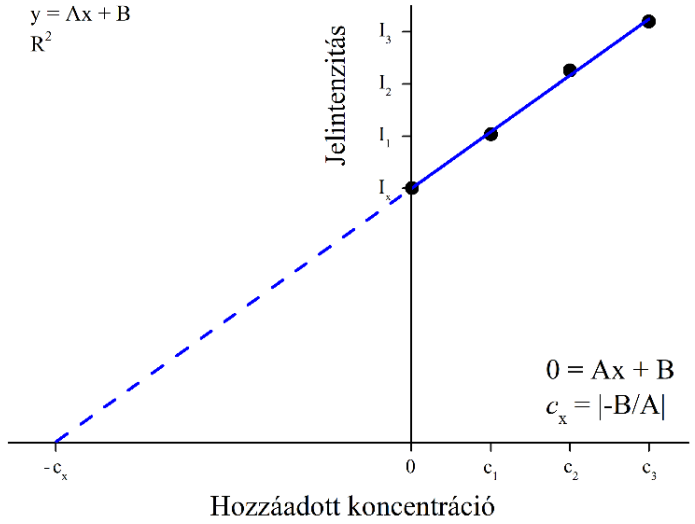
☹ Mátrixhatás nincs kiküszöbölve

- Oldatsorozat készítése: $c_1 \ldots c_5$
- Intenzitások mérése: $I_1 \ldots I_5$
- Egyenesillesztés a kalibrációs pontokra
- Ismeretlen I_x mérése, c_x számítása kalibrációs egyenesből

Standard addíció

☺ Mátrixhatást kiküszöböli

☹ Minden mintára külön kell



- Ismeretlen I_x mérése
- Ismeretlenhez kis mennyiségű (szilárd/nagyon tömény) standard adagolása → hígulás elhanyagolható
- Növelt koncentrációjú ismeretlen mérése: I_1
- Standard addíciójának ismétlése, újra mérés (min. 3 addíciós pont)
- Egyenesillesztés a mért pontokra
- c_x számítása az ***x*-tengely metszetéből**

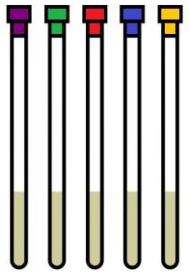
Felírható-e egyenes arányosság a jelintenzitás (csúcsmagasság) és a koncentráció között?

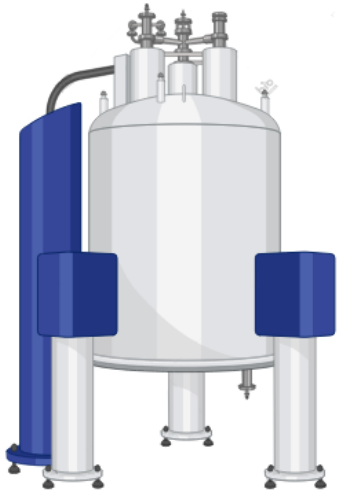
A gyakorlat menete

Otthon elvégzendő feladat: a kalibrációs oldatok elkészítéséhez szükséges bemérések kiszámolása (lásd: 12. dia)

Gyakorlaton elvégzendő feladatok:

1. Mintaelőkészítés:
   - Kalibrációs sorozat (5 db minta)
   - Kóla minta (1 db)
2. Kalibrációs oldatok és kóla minta mérése és a spektrumok kiértékelése
   - ^{1}H NMR spektrum az első kalibrációs oldatról
   - ^{31}P NMR spektrum minden mintáról
3. Standard addíció (3 pontos) végzése és az egyes pontok ^{31}P NMR spektrumának mérése, a spektrumok kiértékelése





Mintakészítés

Rendelkezésre áll:

- 0,08 M NaH_2PO_4 törzsoldat
- 1,00 M KH_2PO_4 törzsoldat
- Desztillált víz
- D_2O
- Kiforralt Coca Cola üdítőital

c / mM	$V_{NaH_2PO_4}$ / µl	V_{H_2O} / µl	V_{D_2O} / µl
2			
4			
6			
8			
10			

A táblázatban láthatók a szükséges kalibráló oldatok koncentrációi. A kalibrációs oldatokat a **0,08 M-os** törzsoldatból hígítjuk, **600 µl** végtérfogatúak és mindegyik **10 V/V% D_2O**-t tartalmaz. A kóla minta szintén 600 µl, és csak kiforralt Coca Colát, valamint 10 V/V% D_2O-t tartalmaz.

Standard addíció során az 1,00 M törzsoldatból 3-3 µl-es részleteket fogunk adagolni, majd a mintát homogenizáljuk.

Számítsd ki, mennyit kell bemérnünk az egyes kalibráló oldatokba az egyes összetevőkből!

A kitöltött táblázatot hozd magaddal a gyakorlatra!!!

Számítsd ki, mennyivel nő a koncentráció az egyes standard addíciós lépésekben! A hígulás elhanyagolható.

NMR mérés menete

Az NMR mérések a gyakorlatvezető jelenlétében és útmutatásával történnek.

Készülék: Bruker Avance 250 MHz spektrométer (^{31}P rezonanciafrekvencia: 101,2 MHz).
Vezérlőprogram: TOPSPIN 2.0

0. Megfelelő RF csatorna beállítása: $^{1}H/^{31}P$

1. Minta behelyezése a mágnesbe és új mérési fájl létrehozása: *zg* (1D proton), *zgig* (1D ^{31}P protonlecsatolással) pulzusprogramok

2. **Lock**: a mágneses tér időbeli változásait kompenzálja az oldószer deutériumjelének folyamatos monitorozásával → a lockoláshoz szükségünk van deuterált oldószerre!

3. **Shim**: a B_0 mágneses tér homogenitásának javítása → shim-tekercsek (elektromágnesek) segítségével végezzük (Z, Z^2, Z^3, X és Y geometria)

4. Mérés indítása

5. A FID Fourier-transzformációja, a kapott spektrum kiértékelése:
   - kémiai eltolódás és csúcsintenzitás
   - jelintegrál
   - félérték-szélesség

Jegyzőkönyv

A jegyzőkönyvnek az alábbiakat kell tartalmaznia:

1. Bevezetés: ^{31}P NMR (rövid elmélet, miért ezt a módszert választottuk? MAX. 1 oldal)
2. Mintaelőkészítés: anyagok, eszközök, eljárás leírása, bemérések táblázatosan
3. Mérés: készülék, vezérlőprogram, pulzusszekvenciák, legfontosabb beállítások
4. Adatok: kémiai eltolódás, intenzitás, integrál, félértékszélesség táblázatosan
5. Kiértékelés:
   - Kvalitatív értékelés (Miért 1 jel? Hogyan változik a kémiai eltolódás?) – ábrák mellékelése
   - Kalibráció és standard addíció intenzitásra ÉS integrálra (Σ 4 grafikon)
   - Kóla foszfátkoncentrációjának számítása mind a 4 módszer alapján
   - Eredmények összehasonlítása a Coca Cola irodalmi foszfortartalmával, lehetséges hibák értelmezése

A jegyzőkönyvben a **Házi feladat** kérdésekre adott válaszoknak szerepelniük kell!

A jegyzőkönyveket legkésőbb **1 héttel a gyakorlat után** kérjük a gyakorlatvezetőnek **emailben** elküldeni. **!**