^{31}P NMR spektroszkópia alkalmazása:
a) H_3PO_4 pK_a értékeinek meghatározására, b) üdítőital foszfor tartalmának meghatározására, c) pirofoszfát bomlásának követésére

Dr. Bodor Andrea

Bevezetés:

A ^{31}P könnyen mérhető NMR aktív atommag, mivel I=1/2, természetes előfordulása 100%, giromágneses állandójának értéke pedig $10{,}84 \cdot 10^7$ rad s^{-1} T^{-1}. Széleskörű alkalmazása van foszfor tartalmú szerves, fémorganikus vegyületek szerkezetének, dinamikájának jellemzésénél, biológiai rendszerekben nukleotidok, nukleinsavak jellemzésénél. A kémiai eltolódás értéke igen érzékeny a környezetében történő változásokra (pH, koordináció, ionerősség, stb.). Jelen gyakorlat elvégzésénél a pH és a környezet kémiai eltolódásra gyakorolt hatását illetve a ^{31}P spektrum kvantitatív jellegét aknázzuk ki három példán keresztül. A δ(ppm) – pH görbe alapján meghatározhatók a foszforsav pK_a savállandó értékei (a). A spektrum kvantitativitásából adódóan koncentráció meghatározás is lehetővé válik. Egy üdítőital foszfor tartalmát határozzuk meg kalibrációs görbe és standard addíció módszer alkalmazásával. (b) A koncentráció meghatározás egy másik alkalmazása a foszfor tartalmú szennyező kimutatása pirofoszfát oldatban. (c)

Megjegyzés: minden gyakorlaton két feladat elvégzésére kerül sor, viszont a hallgatónak az összes feltett kérdésre tudnia kell a választ.

a) H_3PO_4 pK_a értékeinek meghatározására

A protonálódasi és stabilitási állandók meghatározása klasszikusan pH-potenciometriás mérésekkel történik, ezen állandók meghatározásához ez a legpontosabb módszer. Egyes esetekben azonban nem alkalmazható (túl kevés anyag áll rendelkezésre, nincs megfelelő ionszelektív elektród, a pH tartomány szélső értékeinél vagyunk); ilyenkor más megoldást kell választani.

Az NMR spektroszkópia jó módszer lehet, hiszen a protonálódás/deprotonálódás; a koordináció egy adott NMR aktív mag kémiai környezetét nagymértékben befolyásolja, ami a kémiai eltolódás változásában tükröződik.

Ezt a tulajdonságot nagy sikerrel aknázzák ki többek között *in situ* pH mérésre. Így például a CF_3COOH ^{19}F kémiai eltolódása pH függő, hasonlóan a $(COOH)_2$ ^{13}C kémiai eltolódása, vagy a hisztidin ^{1}H kémiai eltolódása.

Feladat: a H_3PO_4 pK_{a1} és pK_{a2} értékének meghatározása. A pH = 1,5-3,5 (**I**) illetve pH = 5-8 (**II**) értéktartományban az alábbi két részecskével számolhatunk: H_3PO_4 és $H_2PO_4^-$ (**I**) illetve $H_2PO_4^-$ és HPO_4^{2-} (**II**). Az NMR spektrumban a két foszfortartalmú részecske közötti gyors H^+ csere eredményeképp csupán egy ^{31}P jelet detektálunk. Ennek a rezonancia jelnek a kémiai eltolódás értéke, illetve a jelszélessége pH függő.
Oldatok: 0,02 M HPO_4^{2-} és 0,02 M $H_2PO_4^-$ törzsoldat, HCl cc, NaOH, D_2O
Eljárás: A 0,02 M törzsoldatból készítsünk hat-nyolc különböző pH értékű oldatot a mérni kívánt tartományban, úgy, hogy főzőpohárba kimért 10 ml-es részeiben pH-t állítunk. 5mm-es NMR csőbe az így előállított oldatokból 600µl-t pipettázunk, majd minden mintához 60 µl D_2O-t mérjünk.

b) Üdítőital foszfor tartalmának meghatározására

Koncentráció meghatározás kétféleképpen valósítható meg: kalibrációs oldatsorozat készítéssel, illetve standard addíciós módszerrel. A mérés során mindig tartsuk szem előtt, hogy az oldatokról készítendő spektrumok paraméterei azonosak legyenek, ellenkező esetben az integrál értékek nem összevethetőek.
Oldatok: 80 mM H_3PO_4, vagy KH_2PO_4 törzsoldat, 1M KH_2PO_4 törzsoldat, üdítőital, D_2O.
Eljárás: Kalibrációs eljárásnál a rendelkezésre álló kb 80 mM koncentrációjú H_3PO_4, vagy hasonló koncentrációjú KH_2PO_4 törzsoldatból a 2-10 mM tartományban hígítási sort (6-7 minta) készítünk NMR csőben, úgy, hogy az össztérfogat 700 µl legyen. Ez tartalmazza a bemért törzsoldat térfogatát, 70µl D_2O-t és a 700 µl-ig való különbség pedig dH_2O.
Az üdítőital minta tartalmaz 630 µl üdítőt és 70µl D_2O-t.

Standard addíció módszerénél első mérendő minta a fentebb elkészített üdítőital. Ehhez adagolunk az 1M KH_2PO_4 törzsoldatból annyit, hogy egy-egy adagolás során az oldat foszfor koncentrációja kb 2mM értékkel nőjön. A térfogatváltozás elhanyagolható. Minden adagolás után felvesszük a ^{31}P spektrumot.

c) pirofoszfát bomlásának követése

A pirofoszfát bomlása során orto-foszfát képződik. A gyakorlat során a frissen feloldott pirofoszfát spektrumából számoljuk ki, mekkora a foszfát tartalom, illetve ez változik-e időben adott körülmények mellett?

Oldatok: Frissen készült kb 0,02 M törzsoldat, a szilárd vegyület $Na_4O_7P_2 \cdot H_2O$, D_2O.

Eljárás: A mérendő minta tartalmaz 630 µl törzsoldatot és 70µl D_2O-t. Ennek a spektrumát vesszük fel idő függvényében.

Készülék: 250 MHz Bruker Avance spektrométer, melyen a ^{31}P rezonancia frekvenciája 101,2 MHz. A méréshez a $^{1}H/^{13}C/^{19}F/^{31}P$ 5mm mérőfejet használjuk. A készülékről az ismertetőt a gyakorlatvezető tartja, a mérés a gyakorlatvezető jelenlétében és útmutatásával történik.

A mérendő mintát a mágnesbe helyezzük, a mérésekhez TOPSPIN programot indítjuk el. A mérési lépések sorrendje és a legfontosabb parancsok (ez utóbbiak ebben a leírásban dőlt betűvel vannak jelölve) a következők:

Mérést megelőző beállítások:

- 'lock'-olás a D jelére – *lock*
- hangolás a mért magra (jelen esetben ^{1}H, vagy ^{31}P) – *wobb*
- a tér homogenizálása, ún. 'shim' optimalizálás

Ezen előkészületeket követően először egy ^{1}H spektrum kerül felvételre.

eda – edit aquisition parameters - a paraméterek megadása, pulzusprogram: **zg**, vagy **zgig**

zg – zero go – mérés indítása

lb – line broadening – értéke ^{1}H mérésnél mindig < 1Hz, jellemzően 0,3 Hz, ^{31}P mérésnél 2-3Hz is lehet

em – exponential multiplication – simítófüggvény alkalmazása a megadott LB értékkel

ft – Fourier transzformáció, ennek eredménye lesz az NMR spektrum.

pk – phase correction – fázis korrekció

apk – automatic phase correction

abs – automatic baseline - alapvonal korrekció

Olvassuk le a ^{1}H jel/ek kémiai eltolódás értékét, hány jelet várunk?

Hasonló az eljárás az előre elkészített ^{31}P mérés esetében is. Azzal a különbséggel, hogy itt proton lecsatolt spektrumot veszünk fel zgig impulzusszekvencia használatával. Miért kell lecsatolást alkalmazni? (Ez elsősorban a ^{13}C méréseknél fontos).

Fázisolást és alapvonal korrekciót követően a *pp* – peak picking - parancsot kiadva (minden felkínélt opció OK) megtörténik a jelek kémiai eltolódásának kiiratása.
Majd az 'Analyis' menüpont 'Lineshape -> Lorentz/Gauss..' alpontjára klikkelve az adott jel félérték szélességét határozzuk meg Hz-ben. Figyelem! Az igazi érték az itt számolt LW –ből kivonva a simításhoz alkalmazott LB értéket.
A minta cseréjével (Lift off gomb: a sűrített levegő segítségével a minta kiemelkedik a mágnesből, ezt követően lehet finoman kiemelni) folytatódik a mérés.
Amennyiben nem kívánjuk az előbbi mérést felülírni, új kísérlet az '*edc*' parancs kiadásával hozható létre.

Kiértékelés:

(a) Mérési adatok:

pH	*δ (ppm)*	*LW (Hz)*

A *δ-pH* görbe inflexiós pontjának meghatározása adja a meghatározni kívánt pK_a értéket.
Milyen görbét illesztünk a mérési pontjainkra?
Tárgyalja a pH-potenciometriás mérés és az NMR-es mérés során meghatározott pK_a érték közötti eltérés okát, mik lehetnek a hibaforrások, miért?
A *LW-pH* görbe miért ezt a lefutást követi?
Felhasználva a protonálódási állandó, és a teljes foszfátkoncentráció összefüggéseit, vezesse le a δ-$[H^+]$ összefüggést. Ellenőrizze egy adott mérési pontra!

(b) Mérési adatok kalibrációs görbe esetében

Konc (mM)	*Integrál értéke*	*δ (ppm)*

Kalibrációs görbe felrajzolása, ennek alapján az üdítőital foszfor tartalmának meghatározása.

Mérési adatok, standard addíció módszere:

Hozzáadott c_p (mM)	*Integrál értéke*	*δ (ppm)*

Kalibrációs görbe felrajzolása, ennek alapján az üdítőital foszfor tartalmának meghatározása.

Mekkora a gyártó által megadott foszfor tartalom, milyen nagy az eltérés? Hasonlítsa össze a két módszer alapján kiszámolt eredményt! Jellemezze az adott módszer előnyeit!
Milyen más eljárással határozna meg foszfor tartalmat?
Mi a szervezet napi foszfor szükséglete, milyen mennyiségű üdítőital elfogyasztása fedezi ezt?

(c) Mérési adatok:

Idő (h)	*δ1 (ppm)*	*Integrál 1*	*δ2 (ppm)*	*Integrál 2*

Mekkora a szennyeződés mértéke %-ban kifejezve? Változik-e ez a gyakorlat során? Ha igen, mi ennek az oka?