

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH
Prírodovedecká fakulta
Ústav chemických vied



PRAKTIKUM Z NUKLEÁRNEJ MAGNETICKEJ
REZONANCIE

Časť 2: Kvantitatívna analýza a fyzikálno-chemické štúdie
s využitím NMR spektroskopie

Mária Vilková – Zuzana Kudličková – Ján Elečko

Košice 2025

Táto publikácia bola vytvorená v rámci projektu KEGA 008UPJŠ-4/2023.

Praktikum z nukleárnej magnetickej rezonancie

Časť 2: Kvantitatívna analýza a fyzikálno-chemické štúdie s využitím NMR spektroskopie
Skriptum

Autori:

doc. RNDr. Mária Vilková, PhD.

Laboratórium NMR, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ v Košiciach

RNDr. Zuzana Kudličková, PhD.

Laboratórium NMR, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ v Košiciach

RNDr. Ján Elečko, PhD.

Laboratórium NMR, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ v Košiciach

Recenzenti:

doc. Ing. Tibor Liptaj, CSc.

Centrálne laboratória, FCHPT STU v Bratislave

Ing. Michal Šoral, PhD.

Chemický ústav SAV, v. v. i., Bratislava

Tento text je publikovaný pod licenciou Creative Commons 4.0 CC BY NC ND - CC Attribution - NonCommercial - No-derivates 4.0



Za odbornú a jazykovú stránku tejto publikácie zodpovedajú autori. Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Umiestnenie: www.unibook.upjs.sk

Dostupné od: 30.10.2025

ISBN 978-80-574-0459-0 (e-publikácia)

POĎAKOVANIE

Tento vysokoškolský učebný materiál vznikol s podporou grantovej agentúry KEGA 008UPJŠ-4/2023 (Inovácia vzdelávania predmetov NMR spektroskopie v študijnom odbore chémia), za čo vyjadrujeme úprimné poďakovanie. Poskytnutý grant nám umožnil venovať sa príprave tohto materiálu, ktorý bude slúžiť na prehĺbenie odborných vedomostí študentov a podporí ich akademický rast. Podpora grantovej agentúry bola neoceniteľná pri realizácii tejto publikácie a prispela k obohateniu vzdelávacieho procesu na Prírodovedeckej fakulte UPJŠ v Košiciach.

OBSAH

PodĎakovanie	3
Zoznam obrázkov	7
Zoznam schém.....	8
Zoznam tabuliek	9
PREDSLOV	10
1 Stanovenie rozdeľovacieho koeficienta pomocou NMR	11
1.1 Úvod	11
1.2 Úlohy	12
1.3 Materiál a metódy.....	13
1.4 Experimentálna časť.....	13
1.4.1 Príprava vzoriek – metóda 1	13
1.4.2 Príprava vzoriek – metóda 2	14
1.5 Výsledky a diskusia.....	15
1.6 Spracovanie ^1H NMR spektier v programe MestreNova.....	15
1.7 Stanovenie rozdeľovacieho koeficienta log P	16
1.8 Záver.....	17
2 Stanovenie hodnôt pK_a aminokyselín pomocou NMR.....	19
2.1 Úvod	19
2.1.1 Vodné roztoky.....	19
2.1.2 Význam hodnôt pK_a a pH	22
2.1.3 Princíp stanovenia hodnôt pK_a pomocou ^1H NMR	23
2.2 Úlohy	24
2.3 Materiál a metódy.....	25
2.4 Experimentálna časť.....	25
2.4.1 Príprava roztokov HCl a KOH potrebných pre úpravu pH roztokov aminokyselín	25
2.4.2 Príprava referenčného štandardu TSP/ D_2O pre NMR merania	26
2.4.3 Príprava roztokov aminokyselín s rozsahom pH 0,5–14,0.....	26
2.5 Výsledky a diskusia.....	26
2.5.1 Spracovanie spektier PRESAT v programe MestreNova.....	27
2.5.2 Stanovenie hodnôt pK_a použitím programu Excel.....	28
2.6 Záver.....	34
3 Vplyv substituentov na ^1H a ^{13}C NMR chemické posuny vybraných atómov chalkónov	35
3.1 Úvod	35
3.1.1 Tienenie jadier	35
3.1.2 Spôsoby prenosu efektu substituentov.....	35

3.1.3	Korelačná analýza	37
3.1.4	Konvencie a definície	38
3.2	Úlohy	38
3.3	Materiál a metódy	39
3.4	Experimentálna časť	40
3.4.1	Syntéza chalkónov	40
3.5	Výsledky a diskusia	41
3.5.1	Spracovanie NMR spektier v programe MestreNova	41
3.5.2	Štúdium vplyvu substituentov na ^{13}C NMR chemické posuny	41
3.6	Záver	49
4	Stanovenie enantiomérmeho nadbytku	50
4.1	Úvod	50
4.1.1	Metódy stanovenia enantiomérmeho nadbytku	50
4.1.2	Stanovenie enantiomérmeho nadbytku pomocou Bull-Jamesovej sústavy	54
4.2	Úlohy	57
4.3	Materiál a metódy	57
4.4	Experimentálna časť	58
4.4.1	Príprava zásobných roztokov	58
4.4.2	Stanovenie enantiomérmeho nadbytku chirálnych primárnych amínov pomocou kalibračnej krivky	58
4.5	Výsledky a diskusia	59
4.5.1	Spracovanie NMR spektier v programe MestreNova	59
4.5.2	Kvantitatívna analýza a stanovenie enantiomérmeho nadbytku	61
4.6	Záver	64
5	Vplyv substituentov, teploty a rozpúšťadla na keto-enol rovnováhu 1,3-dikarbonylových zlúčenín	65
5.1	Úvod	65
5.1.1	Keto a enol forma v NMR spektrách	65
5.1.2	Polarita keto a enol formy	66
5.1.3	Faktory ovplyvňujúce keto-enol rovnováhu	67
5.1.4	Stanovenie štandardnej Gibbsovej energie	68
5.1.5	Štúdium závislosti tautomérmeho rovnovážnej konštanty K_T od teploty, stanovenie zmeny entalpie ΔH^0 a zmeny entropie ΔS^0	69
5.1.6	Stanovenie permitivity (dielektrickej konštanty) zmesi rozpúšťadiel a solvatačnej Gibbsovej energie $\Delta\Delta G^0$	70
5.2	Úlohy	71
5.3	Materiál a metódy	72

5.4	Experimentálna časť.....	73
5.4.1	Príprava vzoriek na analýzu pre úlohu 1–3.....	73
5.4.2	Príprava vzoriek na analýzu pre úlohu 4.....	73
5.5	Výsledky a diskusia.....	74
5.5.1	Priradenie chemických posunov vodíkom a atómom uhlíka vybraných 1,3-dikarbonylových zlúčenín pomocou NMR spektroskopie	74
5.5.2	Stanovenie rovnovážnych konštánt K_T a výpočet štandardných Gibbsových energií ΔG^0 tautomerizácie 2,4-pentándiónu, benzoylacetónu a dibenzoylmetánu v deuterovaných rozpúšťadlách C_6D_6 , $CDCl_3$, acetón- d_6 a DMSO- d_6 s rôznou polaritou	75
5.5.3	Štúdium teplotnej závislosti rovnovážnej konštanty K_T tautomerizácie 2,4-pentándiónu, benzoylacetónu a dibenzoylmetánu a stanovenie zmeny entalpie ΔH^0 a zmeny entropie ΔS^0 tohto procesu pomocou van't Hoffovej analýzy.....	77
5.5.4	Stanovenie rovnovážnych konštánt K_T a výpočet solvatačných Gibbsových energií $\Delta \Delta G^0$ tautomerizácie 2,4-pentándiónu v zmesiach deuterovaných rozpúšťadiel $CDCl_3$ a DMSO- d_6 s kontinuálne sa meniacim molárnym pomerom a vypočítanou permitivitou ϵ	81
5.6	Záver.....	86
6	Literatúra	87
7	Prílohy	92
7.1	Prístroje a softvér.....	92
7.2	Kalibrácia pH metra.....	93
7.3	Fosfátový tlmivý pufer	93
7.4	Vplyv substituentov na 1H a ^{13}C NMR chemické posuny vybraných atómov chalkónov	94
7.4.1	NMR spektrá chalkónov 3a–g.....	94
7.4.2	Výsledky regresnej analýzy.....	101
7.5	Stanovenie enantioméneho nadbytku	104

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1.	Schematické znázornenie stanovenie rozdeľovacieho koeficienta log P metódou 1.	14
Obrázok 2.	Schematické znázornenie stanovenia rozdeľovacieho koeficienta log P metódou 2.	15
Obrázok 3.	Štruktúry analyzovaných zlúčenín: vanilín, kyselina acetylsalicylová a kofeín.	15
Obrázok 4.	PRESAT spektrá glycínu s pH 0,73–11,08.	27
Obrázok 5.	Štruktúry aminokyselín spolu s číslovaním atómov.	27
Obrázok 6.	Tabuľka vytvorená v programe Excel a modul Solver.	30
Obrázok 7.	Nastavenie úlohy optimalizácie v module Solver.	30
Obrázok 8.	Nastavenie premenných pre výpočet hodnoty pK_{a1}	31
Obrázok 9.	Optimalizované hodnoty vypočítaných chemických posunov.	31
Obrázok 10.	Optimalizované hodnoty vypočítaných chemických posunov.	32
Obrázok 11.	Rezonančné štruktúry fluórbenzénu.	36
Obrázok 12.	Polárne efekty substituenta fluóru.	36
Obrázok 13.	Príklad výpočtu chemického posunu substituentov (SCS).	38
Obrázok 14.	Výber metódy pre analýzu údajov.	43
Obrázok 15.	Výber údajov pre vstupnú oblasť Y, X.	44
Obrázok 16.	Štruktúra (S)- a (R)-ibuprofénu.	50
Obrázok 17.	Vzťah medzi enantiomérmi a diastereoizomérmi.	51
Obrázok 18.	Štruktúry niektorých zlúčenín používaných ako chirálne solvatačné činidlá (CSA).	52
Obrázok 19.	Stanovenie chiralít a priradenie R/S deskriptorov atropoizomérnych biarylov.	56
Obrázok 20.	Štruktúra a reaktivita borónových kyselín ako Lewisových kyselín.	56
Obrázok 21.	Reakcia medzi vodou a borónovou kyselinou.	56
Obrázok 22.	Porovnanie ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) spektier (R)-BINOL-u, 2-FPBA, (R)-MBA, (S)-MBA a kalibračných vzoriek.	60
Obrázok 23.	Porovnanie ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) spektier kalibračných vzoriek. Farebne sú rozlíšené signály patriace aldimínovému, benzylovému vodíku a metylovým vodíkom.	61
Obrázok 24.	Keto-enol tautóméria 1,3-dikarbonylových zlúčenín a vznik intramolekulových vodíkových väzieb.	65
Obrázok 25.	Keto-enol tautóméria 1,3-dikarbonylových zlúčenín a vznik intermolekulových vodíkových väzieb.	66

ZOZNAM SCHÉM

Schéma 1.	<i>Ionizácia glycínu.</i>	26
Schéma 2.	<i>Syntéza substituovaných chalkónov 3a–g.</i>	39
Schéma 3.	<i>Derivatizácia chirálneho sekundárneho alkoholu enantiomérne čistým chloridom Mosherovej kyseliny za vzniku diastereoizomérov.</i>	53
Schéma 4.	<i>Tvorba diastereoizomérnych iminoboronátových esterov na stanovenie enantiomérmeho nadbytku chirálneho amínu.</i>	55

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1.	Výpočet rozdeľovacieho koeficienta $\log P$ pre vanilín, kyselinu acetylsalicylovú a kofeín na základe integrálnych hodnôt ^1H NMR spektra.	16
Tabuľka 2.	Chemické posuny δ_{H} protónu H-2 glycínu v závislosti od pH roztoku a pK_{a} hodnoty vypočítané pre jednotlivé hodnoty pH.	28
Tabuľka 3.	Chemické posuny δ_{H} vodíka H-2 glycínu v závislosti od pH roztoku a výsledné pK_{a} hodnoty.	33
Tabuľka 4.	Porovnanie hodnôt pK_{a} glycínu získaných metódami NMR s hodnotami uvedenými v literatúre.	33
Tabuľka 5.	Navážky reaktantov pre syntézu substituovaných chalkónov 3a–g	41
Tabuľka 6.	Vybrané ^{13}C chemické posuny [δ , ppm] chalkónov 3a–g spolu s elektrónovými konštantami substituentov σ , σ_{R}^- , R^+ , R^- , F a R	42
Tabuľka 7.	Výsledky SSP analýzy ^{13}C NMR chemických posunov (ppm) uhlíka C=O pre chalkóny 3a–g	46
Tabuľka 8.	Výsledky DSP analýzy ^{13}C NMR chemických posunov (ppm) uhlíka C=O pre chalkóny 3a–g	47
Tabuľka 9.	Vzorky α -metylbenzylamínu so známym ee pre zostrojenie kalibračnej krivky.	59
Tabuľka 10.	Výpočet enantioméneho nadbytku ee (<i>R</i>)-diastereoizoméru na základe integrálnych hodnôt signálov imínových vodíkov (δ = 8,10 a 8,28 ppm).	62
Tabuľka 11.	^1H (600 MHz) a ^{13}C NMR (151 MHz) chemické posuny keto a enol foriem 2,4-pentándiónu, benzoylacetónu a dibenzoylmetánu v deuterovaných rozpúšťadlách.	75
Tabuľka 12.	Rovnovážne konštanty tautomerizácie K_{T} a štandardné Gibbsove energie ΔG^0 pre 2,4-pentándión (0,04 M) vo vybraných deuterovaných rozpúšťadlách pri teplote 25 °C.	76
Tabuľka 13.	Rovnovážne konštanty tautomerizácie K_{T} a štandardné Gibbsove energie ΔG^0 pre benzoylacetón (0,04 M) vo vybraných deuterovaných rozpúšťadlách pri teplote 25 °C.	76
Tabuľka 14.	Rovnovážne konštanty tautomerizácie K_{T} a štandardné Gibbsove energie ΔG^0 pre dibenzoylmetán (0,04 M) vo vybraných deuterovaných rozpúšťadlách pri teplote 25 °C.	76
Tabuľka 15.	Teplotná závislosť rovnovážnej konštanty K_{T} tautomerizácie 2,4-pentándiónu (0,04 M) v CDCl_3	78
Tabuľka 16.	Teplotná závislosť rovnovážnej konštanty K_{T} tautomerizácie benzoylacetónu (0,04 M) v CDCl_3	79
Tabuľka 17.	Teplotná závislosť rovnovážnej konštanty K_{T} tautomerizácie dibenzoylmetánu (0,04 M) v CDCl_3	79
Tabuľka 18.	Stanovenie rovnovážnych konštánt K_{T} a výpočet solvatačných Gibbsových energií $\Delta\Delta G^0$ tautomerizácie 2,4-pentándiónu v zmesiach deuterovaných rozpúšťadiel CDCl_3 a $\text{DMSO}-d_6$ s kontinuálne sa meniacim molárnym pomerom a vypočítanou permitivitou ϵ	84

PREDSLOV

Táto zbierka laboratórnych úloh je určená pre študentov chemických a príbuzných odborov, ktorí si chcú prehĺbiť svoje poznatky v oblasti aplikovanej jadrovej magnetickej rezonancie (NMR) a fyzikálnej chémie. Cvičenia boli koncipované tak, aby študentov nielen oboznámili s technikou NMR spektroskopie ako jedným z najdôležitejších analytických nástrojov v modernej chémii, ale aj umožnili pochopiť jej využitie pri kvantitatívnych a rovnovážnych štúdiách chemických systémov.

Zadania zahŕňajú rôzne prístupy k analýze látok v roztoku, od stanovenia rozdeľovacieho koeficienta, pK_a , až po sledovanie keto–enol rovnováhy, vplyvu substituentov či enantiomérmeho nadbytku. Všetky úlohy sú postavené na reálnych experimentoch, ktoré študent vykonáva sám alebo v malých skupinách a následne spracúva výsledky pomocou moderného softvéru (napr. MestreNova, Excel).

Cvičenia sú koncipované tak, aby podporili rozvoj praktických zručností pri spracovaní a analýze NMR spektier, schopnosť kvantitatívne analyzovať výsledky experimentov, chápať vzťah medzi molekulovou štruktúrou a fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ale hlavne kriticky myslieť pri interpretácii dát.

Vzhľadom na široký rozsah a rôznorodé metodické prístupy sú tieto skriptá vhodné nielen ako podpora výučby fyzikálnej chémie a analytickej chémie, ale aj ako vstupná brána do sveta výskumu založeného na spektroskopických a rovnovážnych metódach.

Veríme, že ponúkané experimentálne cvičenia budú pre študentov nielen prínosné, ale aj motivujúce pre ďalšie štúdium.

Autori

1 STANOVENIE ROZDEĽOVACIEHO KOEFICIENTA POMOCOU NMR

1.1 Úvod

Rozdeľovací koeficient (tiež distribučný koeficient) je fyzikálno-chemická veličina, ktorá vyjadruje rovnovážne rozdelenie látky medzi dve nemiešateľné fázy, zvyčajne vodnú a organickú fázu. Táto veličina je kľúčová pre pochopenie rozpustnosti látok v rôznych prostrediach a nachádza široké uplatnenie vo farmakológii, chemickom inžinierstve a environmentálnych vedách.

Rozdeľovací koeficient K_d je definovaný ako pomer celkových (ionizovaných aj neionizovaných) koncentrácií látky v organickej c_o a vodnej fáze c_w :

$$K_d = \frac{c_o}{c_w}$$

Pre vyjadrenie lipofility neionizovanej formy látky sa najčastejšie používa špecifický koeficient P , ktorý vyjadruje distribúciu látky medzi vodou a *n*-oktanolom:

$$P = \frac{c_o \text{ (neionizovaná forma)}}{c_w \text{ (neionizovaná forma)}}$$

Hodnota P je dôležitá najmä vo farmakológii, látky s vysokým P ($P > 1$, lipofilné) spravidla lepšie prenikajú cez biologické membrány, zatiaľ čo látky s nízkym P ($P < 1$, hydrofilné) sú rozpustnejšie vo vodných prostrediach.

Na jednoduchšie porovnanie hodnôt sa používa logaritmické vyjadrenie rozdeľovacieho koeficienta $\log P$:

$$\log P = \log \left(\frac{c_o}{c_w} \right)$$

Hodnoty $\log P$ sú rozhodujúce pri vývoji liečiv, predikcii environmentálneho správania sa látok a v analytických technikách. Látky s $\log P > 0$ sú lipofilné, zatiaľ čo látky s $\log P < 0$ sú hydrofilné. Ideálne hodnoty $\log P$ pre liečivá sa nachádzajú v rozmedzí 0,5–3,0, čo predstavuje vyváženú rozpustnosť vo vode a lipofilitu.

V environmentálnych vedách vysoké hodnoty P indikujú potenciál látky kumulovať sa v tukových tkanivách živočíchov, čo vedie k bioakumulácii a ekologickej toxicite. Rozdeľovací koeficient je tiež kľúčový v separačných technikách, ako je kvapalinová extrakcia a chromatografia.

Na experimentálne stanovenie P sa často používa „shake-flask“ metóda, kde sa látka rozdeľuje medzi dve nemiešateľné fázy. Na kvantifikáciu koncentrácie analytu vo fázach sa používajú metódy ako acidobázická titrácia, UV spektrofotometria alebo kvantitatívna ^1H NMR spektroskopia.[1,2]

Pre účely tohto cvičenia budú hodnoty $\log P$ stanovené meraním relatívneho množstva analytu vo vodnej fáze pred a po extrakcii do organickej fázy. Keďže pri extrakcii budú použité rovnaké objemy vodnej a organickej fázy, množstvo aj koncentrácia analytu sú v oboch fázach priamo úmerné integrálnej intenzite NMR signálov. Zároveň platí, že rovnovážna koncentrácia analytu v organickej fáze zodpovedá úbytku jeho koncentrácie vo vodnej fáze. Pôvodnú koncentráciu analytu označíme c_{wA} a koncentráciu vo vodnej fáze po extrakcii a dosiahnutí rovnováhy c_{wB} . Potom možno koncentráciu analytu v organickej fáze vyjadriť ako:[1]

$$\log P = \log \frac{c_o}{c_w} = \log \frac{c_{wA} - c_{wB}}{c_{wB}}$$

Keďže koncentrácia je priamo úmerná integrálnej intenzite NMR signálu tých istých vodíkov pred a po extrakcii ($c \propto \frac{I}{N}$, kde I je integrálna intenzita a N je počet vodíkov), predchádzajúci vzťah možno prepísať na tvar:[3]

$$\log P = \log \frac{c_o}{c_w} = \log \frac{I_o}{I_w} = \log \frac{I_{wA} - I_{wB}}{I_{wB}}$$

1.2 Úlohy

1. Stanovenie rozdeľovacieho koeficienta $\log P$ metódou 1

- Určte hodnotu $\log P$ medzi vodou a n -oktanolom pre tri vybrané zlúčeniny pomocou metódy 1.

2. Stanovenie rozdeľovacieho koeficienta $\log P$ metódou 2

- Určte hodnotu $\log P$ medzi n -oktanolom a vodou pre tie isté tri zlúčeniny pomocou metódy 2.

3. Porovnanie experimentálnych a teoretických hodnôt $\log P$

- Porovnajte hodnoty $\log P$ získané experimentálne pomocou oboch metód s vypočítanými alebo publikovanými hodnotami $\log P$.

1.3 Materiál a metódy

Chemikálie				
Názov	Molekulová hmotnosť	Čistota	Množstvo	Bezpečnostné upozornenia
vanilín	152,15 g.mol ⁻¹	99 %	2 mg	Podráždenie očí (kat. 2), H319
kyselina acetylsalicylová	180,16 g.mol ⁻¹	≥99 %	2 mg	Akútna toxicita (kat. 4), H302
koфеín	194,19 g.mol ⁻¹	≥99 %	2 mg	Akútna toxicita, (kat. 4), H302
deuterovaná voda (D ₂ O, 99,9 atom % D)	20,03 g.mol ⁻¹	-	1 ml	-
destilovaná voda	18,02 g.mol ⁻¹	-	9 ml	-
<i>n</i> -oktanol	130,23 g.mol ⁻¹	>99 %	4,2 ml	Podráždenie očí (kat. 2), H319

Laboratórne pomôcky		
Názov	Počet (ks)	Kapacita/rozsah
navažovačky	3	-
sklenená vialka	1	10 ml
sklenené vialky	3	5 ml
automatická pipeta	1	100–1000 µl
Eppendorfove mikroskúmavky	6	1,5 ml
NMR kyvety Wilmad	6	Ø 5 mm, pre 600 MHz NMR spektrometer

	Kvantitatívne NMR spektrá	
	¹ H NMR	PRESAT
teplota	25 °C	
rozpúšťadlo	DMSO-d ₆	
spektrálna šírka [ppm]	–1–16	
akvizíčný čas [s]	5,0	
relaxačná doba [s]	20,0	
počet skenov	16	32

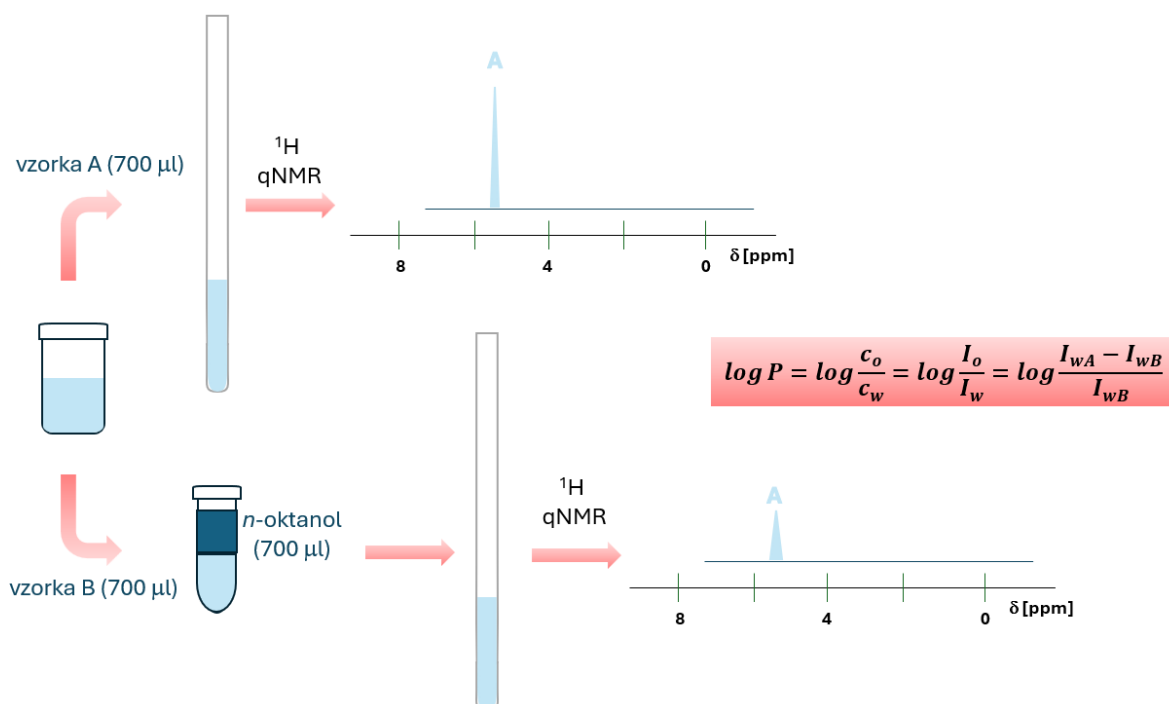
1.4 Experimentálna časť

1.4.1 Príprava vzoriek – metóda 1

Vzorka A: Analyzovanú látku (2 mg) dáme do 5 ml vialky a pridáme zmes H₂O/D₂O (90/10; 1,5 ml). Zmes pre lepšiu rozpustnosť vložíme do ultrazvukového kúpeľa na 5–10 min. pri teplote 30 °C. Zo zmesi odoberieme 700 µl do NMR kyvety. Takto pripravíme prvý roztok pre analýzu (Obrázok 1).

Vzorka B: Zo zmesi odoberieme 700 µl, vložíme do Eppendorfovej mikroskúmavky a pridáme rovnaké množstvo *n*-oktanolu (700 µl). Zmes pretrepávame minimálne 10 min., následne centrifugujeme 10 min. pri 2000 ot./min. Zmes necháme stáť 24 h, aby došlo

k ustáleniu rovnováhy. Po 24 h odoberieme zo zmesi 550 μl vodnej fázy do NMR kyvety a analyzujeme (Obrázok 1).[1]

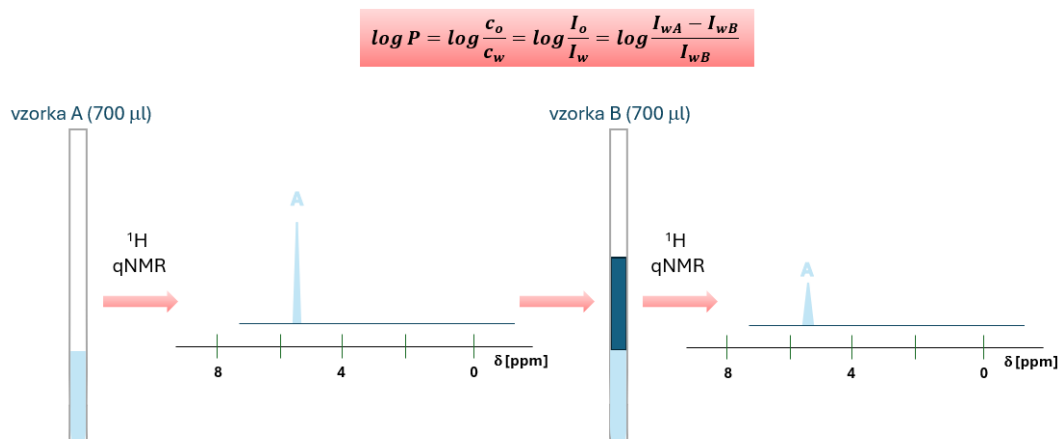


Obrázok 1. Schematické znázornenie stanovenie rozdeľovacieho koeficienta $\log P$ metódou 1.

1.4.2 Príprava vzoriek – metóda 2

Vzorka A: Analyzovanú látku (1 mg) dáme do 2 ml Eppendorfovej mikroskúmavky a pridáme zmes $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10; 700 μl). Po rozpustení v ultrazvukovom kúpeli (5–10 min. pri 30 $^\circ\text{C}$) preniesieme roztok do NMR kyvety a nameriame kvantitatívne ^1H NMR spektrum (Obrázok 2).

Vzorka B: K vodnému roztoku (vzorka A) pridáme *n*-oktanol (700 μl), pretrepávame 10 min. a necháme stáť 24 h, aby sa ustálila rovnováha. Po 24 h nameriame kvantitatívne ^1H NMR spektrum (Obrázok 2).[2]

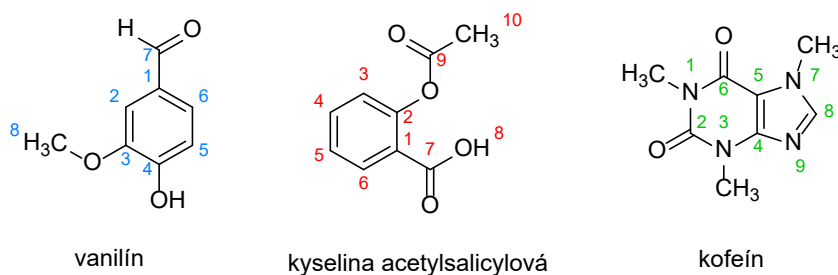


Obrázok 2. Schematické znázornenie stanovenia rozdeľovacieho koeficienta $\log P$ metódou 2.

1.5 Výsledky a diskusia

1.6 Spracovanie ^1H NMR spektier v programe MestreNova

Obidvoma spôsobmi (metóda 1 a metóda 2) sme pripravili vzorky A a B analyzovaných zlúčenín: vanilín, kyselina acetylsalicylová a kofeín (Obrázok 3) a namerali kvantitatívne ^1H NMR spektrá, ktoré sme spracovali v programe MestreNova. Referenčným signálom bol signál vody s chemickým posunom 4,79 ppm.



Obrázok 3. Štruktúry analyzovaných zlúčenín: vanilín, kyselina acetylsalicylová a kofeín.

Pre kvantifikáciu je potrebný referenčný kvantitatívny štandard. Merania sme však uskutočnili bez použitia štandardu, pretože koncentrácia vody sa v priebehu meraní prakticky nemení a pred aj po ustálení rovnováhy je rovnaká a teda po nastavení rovnakých parametrov merania, môžeme signál vody použiť ako kvantitatívny referenčný signál.

1.7 Stanovenie rozdeľovacieho koeficienta $\log P$

Aby sme tieto predpoklady overili, vypočítame rozdeľovacie koeficienty $\log P$ pre analyzované zlúčeniny najprv použitím integrálnych hodnôt, pričom referenčnou hodnotou bude integrálna hodnota signálu vody (100 000) a následne pomocou relatívnych integrálov ($\frac{I_{\text{analyt}}}{I_{\text{voda}}}$).

Z kvantitatívnych ^1H NMR spektier sme odčítali integrálne hodnoty signálov pre vodné fázy pred (vzorka A) a po (vzorka B) ustálení rovnováhy s *n*-oktanolom. Na základe rozdielu integrálnych hodnôt I_A a I_B sme vypočítali hodnoty rozdeľovacieho koeficienta $\log P$ pre každú zlúčeninu a pre obe použité metódy (Tabuľka 1).

Integrálne hodnoty I_{wA} a I_{wB} získame integráciou kvantitatívnych ^1H NMR spektier vzorky A a B pre obidve metódy.

Tabuľka 1. Výpočet rozdeľovacieho koeficienta $\log P$ pre vanilín, kyselinu acetylsalicylovú a kofeín na základe integrálnych hodnôt ^1H NMR spektra.

		Metóda 1		Metóda 2		ref.	ADMET
		A	B	A	B		
Vanilín	<i>I</i>	72,54	4,24	119,26	6,77	1,18 [1] 1,17 [4]	1,20 ^a
	<i>I</i> _A – <i>I</i> _B	68,3		112,49			
	<i>log P</i>	1,21		1,22			
Kyselina acetylsalicylová	<i>I</i>	92,18	8,38	161,26	13,64	1,04 [1]	1,28 ^a
	<i>I</i> _A – <i>I</i> _B	83,8		147,62		1,20 [5]	
	<i>log P</i>	1,00		1,03		1,19 [6]	
Kofeín	<i>I</i>	28,29	16,88	70,53	37,14	-0,21 [1]	-0,12 ^a
	<i>I</i> _A – <i>I</i> _B	11,41		33,39		-0,13 [7]	
	<i>log P</i>	-0,17		-0,05			

^a<http://www.swissadme.ch/>

Z výsledkov (Tabuľka 1) vyplýva niekoľko dôležitých záverov týkajúcich sa fyzikálno-chemických vlastností skúmaných zlúčenín. Hodnota rozdeľovacieho koeficienta $\log P$ pre vanilín potvrdzuje jeho strednú lipofilitu, čo znamená, že táto zlúčenina má relatívne vyvážený pomer afinity k lipofilnej (nepolárnej) fáze a hydrofilnej (polárnej) fáze. Tento fakt korešponduje s referenčnými literárnymi údajmi a naznačuje, že vanilín môže byť dobre rozpustný v oboch prostrediach, čo má význam pre jeho biologickú dostupnosť a farmakokinetiku.

V prípade kyseliny acetylsalicylovej sa hodnota $\log P$ pohybuje približne okolo hodnoty 1, čo naznačuje jej amfifilnú povahu, teda schopnosť rozpúšťať sa v polárnych aj nepolárnych prostrediach. Táto vlastnosť je dôležitá pre jej farmaceutické využitie, pretože amfifilné zlúčeniny môžu lepšie prenikať biologickými membránami a zároveň zostať rozpustené v biologických tekutinách. Hodnoty namerané v experimente sú konzistentné s literatúrou, kde sa $\log P$ kyseliny acetylsalicylovej uvádza v rozmedzí 1,04 až 1,28, čo posilňuje dôveryhodnosť získaných výsledkov.

Naopak, kofeín vykazuje zápornú hodnotu $\log P$, čo potvrdzuje jeho hydrofilný charakter. To znamená, že kofeín má vyššiu afinitu k vodnému prostrediu než k lipidovému, čo ovplyvňuje jeho rýchle vstrebávanie a distribúciu v organizme, predovšetkým v polárnych tkanivách. Vypočítané hodnoty sú v súlade s publikovanými údajmi, ktoré sa pohybujú v rozmedzí od $-0,21$ do $-0,12$, čím sa potvrdzuje správnosť metodiky použitej na kvantitatívnu analýzu.

Porovnanie hodnôt $\log P$ získaných oboma metódami ukazuje ich vysokú vzájomnú zhodu, pričom rozdiely medzi nimi sú minimálne a neovplyvňujú závery o lipofilite jednotlivých zlúčenín. Táto konzistentnosť podčiarkuje spoľahlivosť a opakovateľnosť použitých postupov spracovania ^1H NMR spektier a ich vhodnosť pre kvantitatívnu analýzu rozdeľovacích koeficientov.

1.8 Záver

Toto cvičenie predstavuje dôležitý praktický krok v pochopení a aplikácii kvantitatívnej analýzy pomocou ^1H NMR spektroskopie, ktorá je dnes jednou z kľúčových metód v analytickej chémii a farmaceutickom výskume. Študenti si vďaka nemu môžu osvojiť nielen teoretické poznatky o rozdeľovacom koeficiente $\log P$, ktorý je základným parametrom ovplyvňujúcim farmakokinetiku a bioaktivitu látok, ale aj praktické zručnosti v príprave vzoriek, meraní a spracovaní kvantitatívnych NMR spektier pomocou softvéru MestreNova.

Výsledky cvičenia poukazujú na spoľahlivosť a presnosť dvoch odlišných metód, čo študentom zároveň umožňuje porozumieť dôležitosti správneho výberu a kontroly analytických postupov. Zároveň sa naučia interpretovať získané údaje v kontexte fyzikálno-chemických vlastností

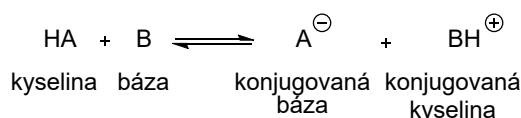
analyzovaných látok, čo je nevyhnutné pre ich ďalšie využitie vo vedeckom alebo priemyselnom prostredí.

Celkové porozumenie procesu od merania až po výpočet a interpretáciu rozdeľovacích koeficientov rozvíja analytické myslenie študentov a pripravuje ich na riešenie komplexných úloh v oblasti chemického výskumu, vývoja nových liečiv či hodnotenia environmentálnych dopadov látok. Toto praktické cvičenie tak významne prispieva k ich odbornému rastu a pripravenosti pre profesionálnu kariéru v chemických a farmaceutických disciplínach.

2 STANOVENIE HODNÔT pK_a AMINOKYSELÍN POMOCOU NMR

2.1 Úvod

Pravdepodobne najviac študovanými reakciami sú Brønstedove acidobázické reakcie (tiež nazývané Brønsted-Lowryho acidobázické reakcie). Brønstedova kyselina je definovaná ako donor protónov a Brønstedova zásada je akceptorom protónov. Presnejšie, Brønstedova kyselina je donormom hydrónov. Hydrón je všeobecný termín pre H^+ , protón ($^2H^+$ sa nazýva deuterón a $^3H^+$ sa nazýva tritón). Väčšina chemikov si tieto rozdiely uvedomuje, ale termíny nepoužíva, preto budeme používať naďalej výraz protón. Kyselina HA a báza B podľa Brønstedovej definície sú teda látky, ktoré vzájomne reagujú:



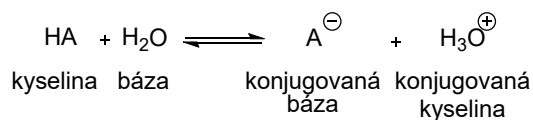
V rovnici sú kyselina (HA) a báza (B) znázornené všeobecne; môžu byť neutrálne alebo nabité (kladne či záporne). Po prenose protónu vzniká konjugovaná báza (A^-) a konjugovaná kyselina (BH^+), ktorých náboj sa oproti pôvodným druhom zmení o jednotku, tzn. kyselina stratí protón a získa záporný náboj, báza príjme protón a získa kladný náboj. Pri spätnej reakcii je A^- báza a BH^+ je kyselina.

Vo všeobecnosti platí, že kyselina musí mať labilnú väzbu s protónom a báza musí poskytnúť dva elektróny pre vznik väzby s protónom.

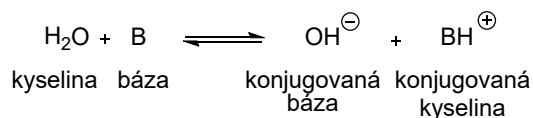
Mnohé rozpúšťadlá sú schopné prijať alebo odovzdať protón. Protónovaná forma rozpúšťadla sa označuje ako lyóniový ión a konjugovaná báza sa nazýva lyátový ión (napr. pre vodu je to hydróniový ión H_3O^+ a hydroxidový ión OH^-). Lyóniové a lyátové ióny sú solvatované. Predpokladá sa, že hydróniový ión je solvatovaný niekoľkými molekulami vody $H^+(H_2O)_n$. Celkovo je schopnosť rozpúšťadla prijať protón ovplyvnená jednak jeho vlastnými elektrónovými pomermi, ale aj tým, ako dobre solvatuje lyóniový ión.[8]

2.1.1 Vodné roztoky

Ak do vody pridáme kyselinu, zásadou bude voda:



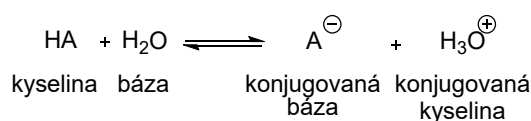
Ak do vody pridáme zásadu, voda bude kyselinou:



Tieto acidobázické reakcie sú rozhodujúce pre samotný život, pretože rozpúšťadlom v živých systémoch je voda.[8]

2.1.1.1 pK_a

Termodynamiku rovnice:



možno vyjadriť pomocou nasledujúcich vzťahov:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}][\text{H}_2\text{O}]}$$

Keďže rozpúšťadlo, voda, je vo veľkom nadbytku (55,5 M) a jeho koncentrácia sa pri reakcii výrazne nemení, začleňuje sa do konštanty kyslosti K_a :

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}][55,5]}$$

$$[55,5]K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

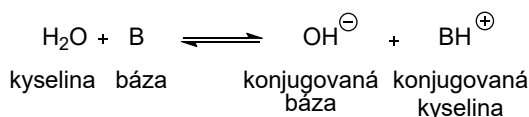
Hodnoty K_a odrážajú relatívnu stabilitu častíc na oboch stranách predchádzajúcej rovnice, preto ich môžeme použiť na vyvodenie záverov o sile kyseliny HA vzhľadom k H_3O^+ . Pre hodnoty K_a väčšie ako 1 platí, že HA je silnejšia kyselina ako H_3O^+ , teda HA odovzdáva svoj protón efektívnejšie ako H_3O^+ . Tiež platí, že A^- je slabšia báza ako H_2O , pretože protón je radšej naviazaný na molekulu vody ako na A^- . K presne opačným záverom dospejeme pre hodnoty K_a menšie ako 1.

Hodnoty K_a sa pohybujú od veľmi veľkých (10^{12}) po extrémne malé (10^{-50}), preto bola definovaná stupnica kyslosti nazývaná pK_a :

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

Silné kyseliny majú malé alebo záporné hodnoty pK_a a čím je kyselina slabšia, tým väčšia je jej hodnota pK_a .

Podobne môžeme uvažovať aj o zásadách:



A podobne odvodíme konštantu bázicity K_b :

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

Konštanta kyslosti K_a a konštanta bázicity K_b sú vo vzájomnom vzťahu:

$$K_w = K_a K_b$$

Kde K_w je heterolytická disociačná konštanta vody:

$$K_w = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14} \text{M}^2$$

Vďaka tomuto vzťahu, pK_a hodnoty pre kyseliny sú tiež indikátormi sily ich konjugovaných zásad.[8]

2.1.1.2 pH

Poloha acidobázickej rovnováhy vo vode nie je riadená len relatívnou acidobázickou silou kyselín a zásad, ale aj pH roztoku:

$$pH = -\log_{10} [\text{H}_3\text{O}^+]$$

pH roztoku súvisí s koncentráciou H_3O^+ v roztoku. Keďže ide o $\log_{10}$, rozdiel pH o jednotku odráža 10-násobný rozdiel v koncentrácii H_3O^+ . Kyslejšie roztoky majú nižšie pH , zatiaľ čo zásadité roztoky majú vysoké pH . Zmenou pH sa v skutočnosti mení rozsah protonácie kyselín a zásad v roztoku (protonačný stav). Tento jav popisuje Henderson-Hasselbalchova rovnica:

$$\begin{aligned} pK_a &= -\log \left(\frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right) \\ pK_a &= - \left(\log [\text{H}_3\text{O}^+] + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right) \end{aligned}$$

$$pK_a = -\log[H_3O^+] - \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pK_a = pH - \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$

Táto rovnica vyjadruje to, že ak máme kyselinu HA s $pK_a = 4,0$, pripravíme z nej zriedený roztok vo vode a upravíme pH roztoku na 3, potom $\frac{[A^-]}{[HA]} = \frac{1}{10}$, tzn., že v roztoku je 10-krát viac HA ako A^- . Alebo, ak pH upravíme na 7, potom $\frac{[A^-]}{[HA]} = 1000$, teraz je v roztoku 1000-násobne viac A^- ako HA. Nakoniec, ak sa pH rovná pK_a , potom $[A^-] = [HA]$.

Je to príklad toho, ako môžeme kontrolovať rozsah protonácie A^- fyzikálnou úpravou pH . Dôležitým faktom je to, že pH je upravené vzhľadom na pK_a konjugovanej kyseliny zásady A^- . pH teda poskytuje informáciu o schopnosti roztoku darovať protón častici A^- . Platí:

- a) **$pH = pK_a$** $\rightarrow$ roztok má rovnakú schopnosť protónovať konjugovanú bázu A^- ako kyselina HA protónovať rozpúšťadlo, a preto kyselina existuje vo forme $HA : A^- = 1 : 1$.
- b) **$pH > pK_a$** $\rightarrow$ roztok nemá dostatočnú donorovú schopnosť, aby protónoval konjugovanú zásadu, a preto kyselina HA existuje väčšinou vo forme konjugovanej zásady A^- .
- c) **$pH < pK_a$** $\rightarrow$ donorová schopnosť roztoku je dostatočná na protonáciu A^- , a preto kyselina HA existuje väčšinou vo forme HA [8].

2.1.2 Význam hodnôt pK_a a pH

Hodnoty pK_a kyselín a protonovaných zásad zohrávajú dôležitú úlohu v organickej syntéze, farmakochémii, materiálových vedách, potravinárskom priemysle. Reaktivita, konformácia, rozpustnosť a toxicita molekúl môžu byť ovplyvnené ich protonáciou. Pri objavovaní a vývoji liekov majú mimoriadny význam pre predikciu farmakokinetických a farmakodynamických vlastností, ako je prechod cez biologické membrány, interakcie s cieľovými molekulami alebo indukcia vedľajších účinkov. Je preto nevyhnutné poznať hodnotu pK_a syntetizovaných a študovaných molekúl.

Na stanovenie hodnôt pK_a sa používajú rôzne experimentálne metódy: UV-spektroskopia, potenciometrické merania, kapilárna elektroforéza, *in silico* predikcia a ďalšie.

Samozrejme, aj NMR spektroskopia je jednou z možností, keďže protonácia/deprotonácia funkčných skupín spôsobí zmenu elektrónovej hustoty v okolí jadier a teda aj zmenu chemických posunov jadier, ktorú je možné monitorovať ako funkciu pH. Zmenu chemických posunov možno pozorovať pre jadrá ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{11}B , ^{19}F alebo ^{31}P .

Keďže jadrá ^1H majú najvyšší prirodzený výskyt, čo priamo súvisí aj s citlivosťou experimentu, pre tieto experimenty nie je nutné príliš veľké množstvo vzorky a experimenty môžu byť uskutočnené v pomerne krátkom čase. Nevýhodou je, že vodíky vzdialenejšie od miesta protonácie/deprotonácie sú častokrát ovplyvnené minimálne. V takýchto prípadoch je potom spoľahlivejšie, ak sú sledované chemické posuny jadier ^{13}C alebo ^{15}N . Nízky prirodzený výskyt týchto dvoch izotopov nie je problémom, pretože namiesto priamo meraných ^{13}C a ^{15}N NMR spektier môžeme použiť nepriame heteronukleárne korelované experimenty $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC, $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC a $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC.

Experimenty HSQC, pri ktorých sú cez jednu väzbu korelované dve rôzne jadrá nie sú vhodné v prípade, ak dochádza k rýchlej protonácii/deprotonácii jadier ^{13}C a ^{15}N . V takýchto prípadoch je vhodnejšie použiť experimenty HMBC.

Keďže citlivosť NMR experimentov je pomerne nízka, je potrebná dostatočná koncentrácia vzorky v danom rozpúšťadle. Práve dostatočná koncentrácia analyzovanej vzorky je častým problémom u látok, ktoré majú veľmi nízku rozpustnosť v danom rozpúšťadle, napr. vo vode. V takýchto prípadoch sa používajú binárne, najčastejšie metanol–voda, alebo ternárne, metanol–voda–DMSO (resp. DMSO- d_6), systémy rozpúšťadiel. Štúdie ukázali, že ak sa použije systém obsahujúci nie viac ako 27 % DMSO, rozdiel hodnôt pK_a je $\pm 0,2$. Hodnoty pK_a získané v zmesiach rozpúšťadiel je vhodné korigovať.[9]

2.1.3 Princíp stanovenia hodnôt pK_a pomocou ^1H NMR

Pri titrácii kyseliny bázou sa mení relatívny pomer kyseliny HA a jej konjugovanej bázy A^- . Chemické posuny NMR aktívnych jadier závisia od chemického prostredia, vrátane protonačného stavu susedných kyslých alebo bázických miest. Preto postupná zmena pH spôsobuje zmeny v ich chemických posunoch. Túto závislosť môžeme analyzovať použitím Henderson-Hasselbachovej rovnice:[10,11]

$$\text{p}K_a = \text{pH} + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

Chemický posun vodíkov sa výrazne mení so zmenou náboja molekuly. Hlavným dôvodom tejto výraznej zmeny chemických posunov je zmena elektrónovej hustoty v okolí meraného jadra a zmena magnetickej anizotropie susedných väzieb. Ak je disociácia protónu rýchla na NMR časovej škále, v spektre pozorujeme jeden signál δ_{obs} , ktorý predstavuje priemer chemických posunov δ_{HA} a δ_{A^-} : [10,11]

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{HA}} P_{\text{HA}} + \delta_{\text{A}^-} P_{\text{A}^-}$$

kde P_{HA} a P_{A^-} sú mólové frakcie oboch foriem.

Závislosť δ_{obs} od $\text{p}K_a$ a pH roztoku možno potom vyjadriť vzťahom:

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{HA}} + \frac{\delta_{\text{A}^-} \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}$$

kde δ_{HA} je chemický posun protónovanej formy, δ_{A^-} je chemický posun neprotónovanej formy, P_{HA} je mólová frakcia protónovanej formy a P_{A^-} je mólová frakcia neprotónovanej formy. [10,11]

A závislosť K_a a pH od δ_{obs} môžeme vyjadriť pomocou vzťahov: [12]

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left(\frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{HA}}}{\delta_{\text{A}^-} - \delta_{\text{obs}}} \right)$$

$$\text{p}K_a = \text{pH} - \log \left(\frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{HA}}}{\delta_{\text{A}^-} - \delta_{\text{obs}}} \right)$$

2.2 Úlohy

1. Stanovenie hodnôt $\text{p}K_a$ vybraných aminokyselín pomocou ^1H NMR spektroskopie

- Pomocou ^1H NMR spektroskopie určte hodnoty $\text{p}K_a$ troch aminokyselín: glycínu, alanínu a kyseliny asparágovej.

2. Porovnanie experimentálnych hodnôt $\text{p}K_a$ s literárnymi údajmi

- Porovnajte hodnoty $\text{p}K_a$ stanovené metódou ^1H NMR s hodnotami získanými inými metódami uvedenými v odbornej literatúre.

2.3 Materiál a metódy

Chemikálie				
Názov	Molekulová hmotnosť	Čistota	Množstvo	Bezpečnostné upozornenia
glycín	75,07 g.mol ⁻¹	>99%	140 mg	-
alanín	89,09 g.mol ⁻¹	≥98%	140 mg	-
kyselina asparágová	133,10 g.mol ⁻¹	≥98%	140 mg	-
sodná soľ kyseliny 3-(trimetylsilyl)propiónovej-2,2,3,3-d ₄ (TSP)	172,27 g.mol ⁻¹	98 atom % D	1 mg	-
deuterovaná voda (D ₂ O)	20,03 g.mol ⁻¹	99,9 atom % D	1 ml	-
kyselina chlorovodíková	36,46 g.mol ⁻¹	37%	1 ml	Žieravosť kože (subkat. 1B), H314 Vážne poškodenie očí (kat. 1), H318 Toxicita pre špecifický cieľový orgán - jednorazová expozícia (kat. 3), H335
hydroxid draselný	56,11 g.mol ⁻¹	>85%	560 mg	Žieravosť kože (subkat. 1A), H314 Vážne poškodenie očí (kat. 1), H318
destilovaná voda			100 ml	-

Laboratórne pomôcky		
Názov	Počet (ks)	Kapacita/rozsah
navažovačky	3	-
kadička	3	10 ml
nastaviteľná automatická pipeta	1	1000 µl
Pasteurove pipety	10	-
odmerné banky	3	25 ml
skúmavky	30	5 ml
koaxiálna NMR kyveta Wilmad	1	60,0 µl
NMR kyvety Wilmad	7	Ø 5 mm, pre 600 MHz NMR spektrometer

	¹ H NMR	PRESAT
teplota	25 °C	
rozpúšťadlo	DMSO-d ₆	
spektrálna šírka [ppm]	-1-10	
akvizíčný čas [s]	5,0	
relaxačná doba [s]	5,0	
počet skenov	16	

2.4 Experimentálna časť

2.4.1 Príprava roztokov HCl a KOH potrebných pre úpravu pH roztokov aminokyselín

- 1,0 M roztok HCl: K destilovanej vode (11,0 ml) pridáme koncentrovanú HCl (1,0 ml).
- 0,1 M roztok HCl: K destilovanej vode (9,0 ml) pridáme 1,0 M roztok HCl (1,0 ml).

- c) 1,0 M roztok KOH: K destilovanej vode (10,0 ml) pridáme KOH (560 mg).
 d) 0,1 M roztok KOH: K destilovanej vode (9,0 ml) pridáme 1,0 M roztok KOH (1,0 ml).

2.4.2 Príprava referenčného štandardu TSP/D₂O pre NMR merania

Sodnú soľ kyseliny 3-(trimetylsilyl)propiónovej-2,2,3,3-d₄ (TSP, 1 mg) rozpustíme v D₂O (1 ml). Pripraveným roztokom naplníme koaxiálne NMR kyvety Wilmad.

2.4.3 Príprava roztokov aminokyselín s rozsahom pH 0,5–14,0

Každú z aminokyselín (140 mg) rozpustíme v destilovanej vode (25 ml). Do 25 skúmaviek (fľaštičiek) odoberieme po 1 ml z tohto zásobného roztoku.

Najprv odmeriame pH takto pripraveného roztoku v jednej zo skúmaviek a zapíšeme hodnotu. Potom upravíme pomocou 1,0 M HCl, 0,1 M HCl, 1,0 M KOH a 0,1 M KOH roztokov pH ostatných roztokov v skúmavkách tak, aby sa líšili medzi sebou o hodnotu 0,5 (rozsah pH bude 0,5–14,0).

Pri úprave pH roztokov dbáme na to, aby bol roztok miešaný pomocou magnetického miešadla. Elektróda sa však nesmie dotýkať magnetickej včielky, aby nedošlo k jej poškodeniu.

Alikvotnú časť (0,5 ml) takto pripravených roztokov preniesieme do 5 mm NMR kyviet Wilmad, vložíme koaxiálnu kyvetu, ktorá obsahuje roztok TSP v D₂O a nameriame sériu PRESAT spektier.

2.5 Výsledky a diskusia

Glycín má dve pK_a hodnoty, čo vyplýva z jeho amfotérnej povahy: obsahuje karboxylovú skupinu COOH a aminoskupinu NH₂ (Schéma 1).[13]

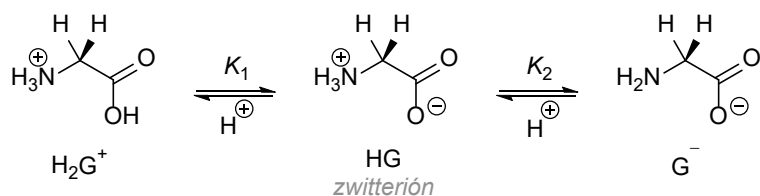


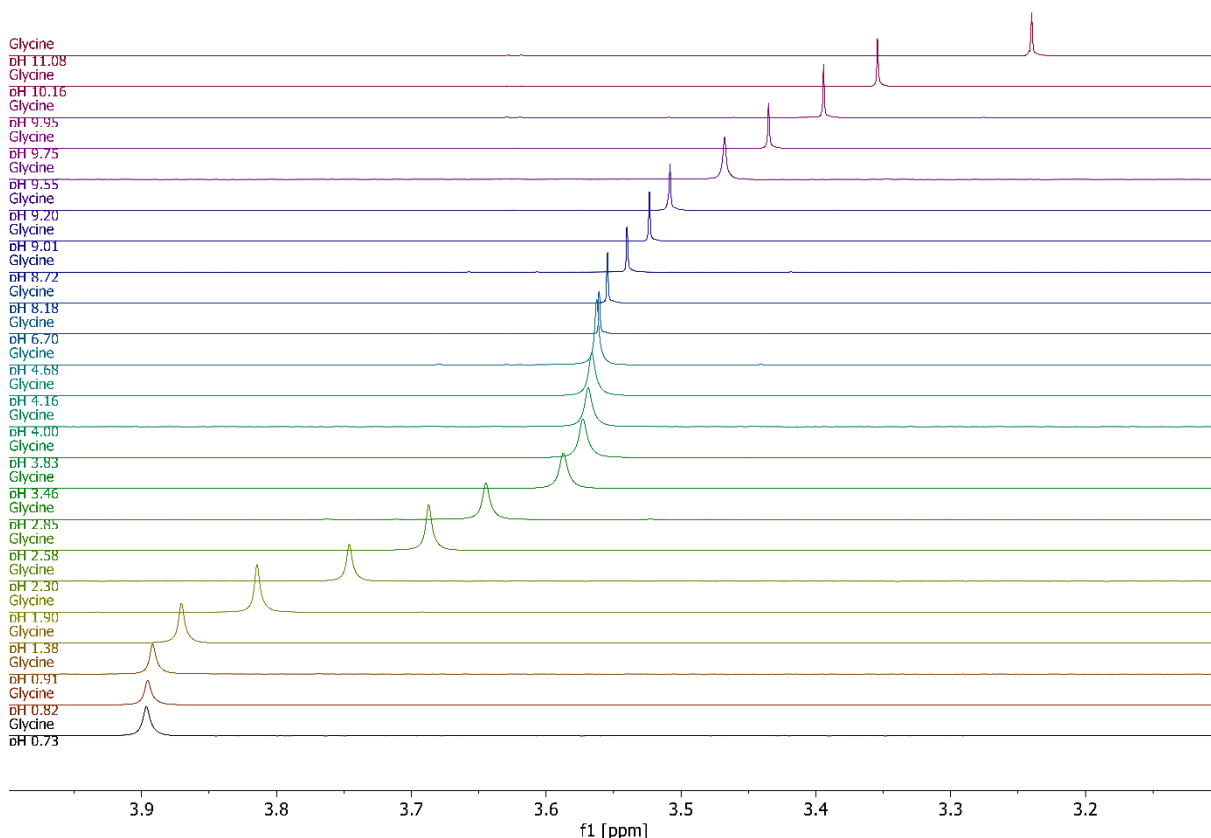
Schéma 1. Ionizácia glycínu.

V kyslom prostredí je glycín protónovaný (H₂G⁺) a postupným pridávaním bázy dochádza k deprotonácii. Získame titračnú krivku, ktorá znázorňuje závislosť zmeny chemického posunu

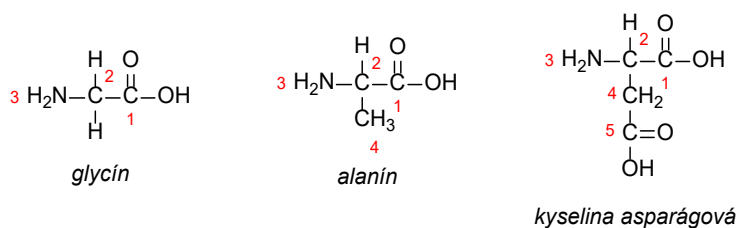
δ_{H} od pH prostredia. Zo získaných údajov môžeme stanoviť hodnoty pK_{a} pre obidve funkčné skupiny glycínu dvoma spôsobmi uvedenými nižšie.

2.5.1 Spracovanie spektier PRESAT v programe MestreNova

PRESAT spektrá série aminokyselín (Obrázok 4) spracujeme v programe MestreNova. Spektrá referencujeme na signál referenčného štandardu TSP ($\delta_{\text{H}} = 0,0$ ppm). Upravíme fázu a základnú líniu spektier. Chemické posuny jednotlivých vodíkov (glycín: H-2, alanín: H-2 a CH_3 -4, kyselina asparágová: H-2, H-4, Obrázok 5) ako aj hodnoty pH roztokov aminokyselín zapíšeme do tabuľky v programe Excel.



Obrázok 4. Časť PRESAT spektier (3,00–4,00 ppm) glycínu s pH 0,73–11,08.



Obrázok 5. Štruktúry aminokyselín spolu s číslovaním atómov.

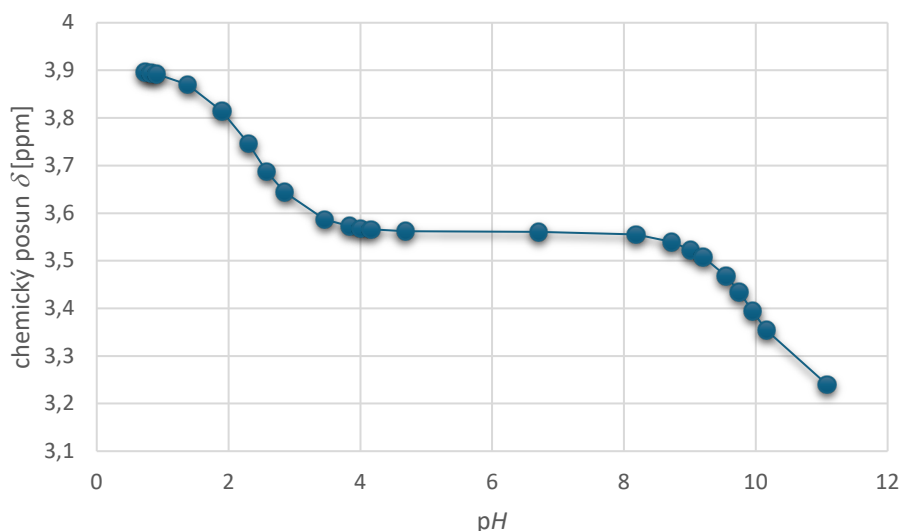
2.5.2 Stanovenie hodnôt pK_a použitím programu Excel

Metóda 1: V programe Excel vytvoríme tabuľku (Tabuľka 2) obsahujúcu hodnoty pH a nameraných chemických posunov vodíka H-2 glycínu. Zmena chemických posunov medzi po sebe nasledujúcimi meraniami nám pomôže určiť približné hodnoty pK_{a1} a pK_{a2} pre glycín.

Tabuľka 2. Chemické posuny δ_H vodíka H-2 glycínu v závislosti od pH roztoku a pK_a hodnoty vypočítané pre jednotlivé hodnoty pH .

pH	δ_{exp}	$\delta_{exp,n} - \delta_{exp,n+1}$	δ_{teor}	$(\delta_{exp} - \delta_{teor})^2$	
0,73	3,896		3,891347838	2,16426E-05	
0,82	3,895	0,001	3,890294889	2,21381E-05	
0,91	3,892	0,003	3,889008678	8,948E-06	
1,38	3,87	0,022	3,876176785	3,81527E-05	
1,9	3,814	0,056	3,838277458	0,000589395	
2,3	3,746	0,068	3,781044049	0,001228085	
2,58	3,687	0,059	3,729	0,001764	
2,85	3,644	0,043	3,678698054	0,001203955	
3,46	3,587	0,057	3,600901552	0,000193253	
3,83	3,573	0,014	3,579782232	4,59987E-05	
4	3,568	0,005	3,574233231	3,88532E-05	
4,16	3,566	0,002	3,570559946	2,07931E-05	$\sum (\delta_{exp} - \delta_{teor})^2$ 0,005182
4,68	3,562	0,004	3,564632148	6,92821E-06	
6,7	3,561	0,001	3,56081959	3,25478E-08	
8,18	3,555	0,006	3,555639669	4,09177E-07	
8,72	3,54	0,015	3,543149249	9,91777E-06	
9,01	3,523	0,017	3,527940058	2,44042E-05	
9,2	3,508	0,015	3,512535562	2,05713E-05	
9,55	3,468	0,04	3,469596133	2,54764E-06	
9,75	3,435	0,033	3,436816919	3,3012E-06	
9,95	3,394	0,041	3,4005	4,225E-05	$\sum (\delta_{exp} - \delta_{teor})^2$ 0,000665
10,16	3,354	0,04	3,362434497	7,11407E-05	
11,08	3,24	0,114	3,262153777	0,00049079	

Odhad hodnôt pK_{a1} a pK_{a2} môžeme urobiť tiež pomocou grafu závislosti chemických posunov vodíkov H-2 od pH prostredia (Graf 1). Odhadované hodnoty pK_{a1} (2,58) a pK_{a2} (9,95) zodpovedajú inflexným bodom sigmoidálnej krivky.



Graf 1. Grafické zobrazenie závislosti chemického posunu vodíka H-2 glycínu od pH roztoku.

Hodnota izoelektrického bodu pI pre glycín je 5,97. Je to pH , pri ktorom sa glycín nachádza vo forme zwitteriónu a navonok sa javí ako neutrálna molekula. Túto hodnotu pH môžeme považovať za hranicu medzi dvoma oblasťami, pre ktoré budeme počítat hodnoty pK_{a1} a pK_{a2} .

Pomocou vzorcov pre teoretický chemický posun, ktoré zohľadňujú rovnováhu medzi rôznymi formami glycínu, vypočítame predpokladané hodnoty a následne ich porovnáme s experimentálnymi údajmi (Tabuľka 2):

$$\delta_{\text{teor}} = \frac{\delta_{\text{H}_2\text{G}^+} + \delta_{\text{HG}} \cdot 10^{(pH - pK_{a1})}}{1 + 10^{(pH - pK_{a1})}}$$

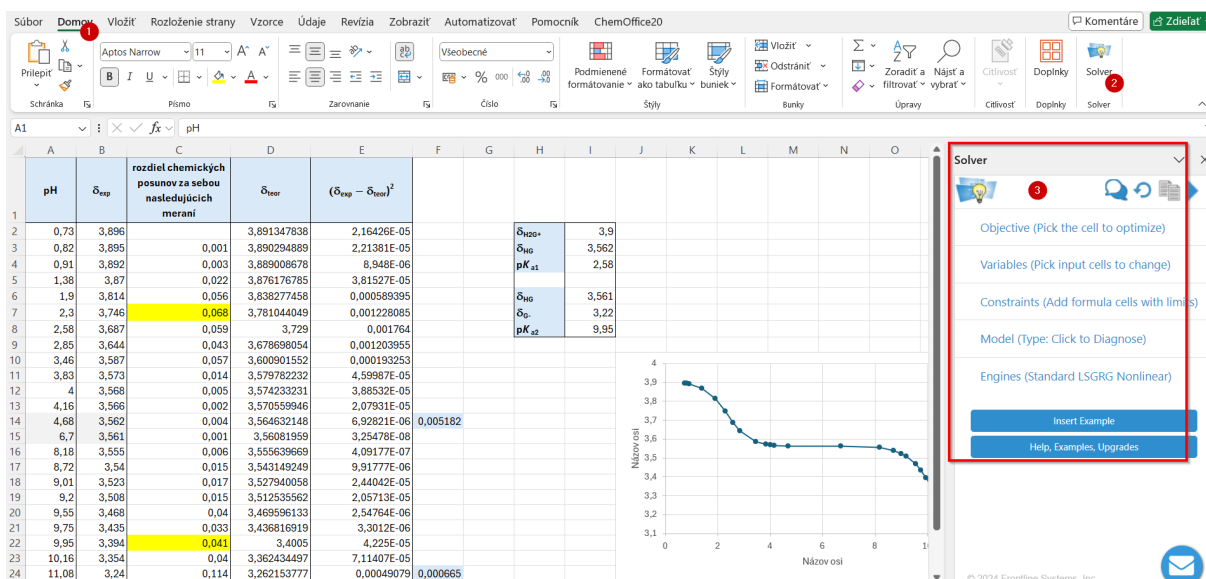
$$\delta_{\text{teor}} = \frac{\delta_{\text{HG}} + \delta_{\text{G}^-} \cdot 10^{(pH - pK_{a2})}}{1 + 10^{(pH - pK_{a2})}}$$

Následne vypočítame druhú mocninu rozdielu chemických posunov, čo predstavuje odchýlku medzi experimentálnou a teoretickou hodnotou chemického posunu (Tabuľka 2):

$$(\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{teor}})^2$$

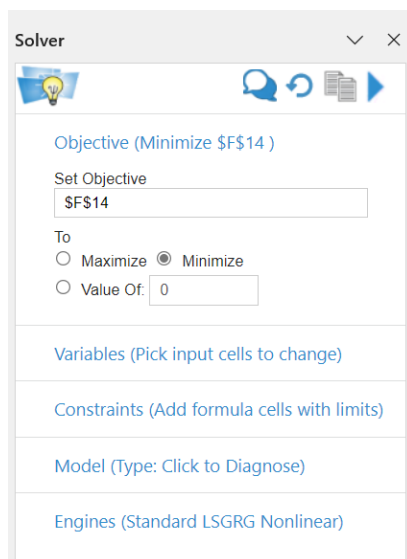
Rozdiely medzi nimi (odchýlky) minimalizujeme použitím modulu Solver, čím optimalizujeme hodnoty pK_a príslušných chemických posunov (Tabuľka 2).

Kvôli prehľadnosti je dobré zapísať si hodnoty $\delta_{\text{H}_2\text{G}^+}$, δ_{HG} , δ_{G^-} a pK_{a1} a pK_{a2} vedľa (Obrázok 6).



Obrázok 6. Tabuľka vytvorená v programe Excel a modul Solver.

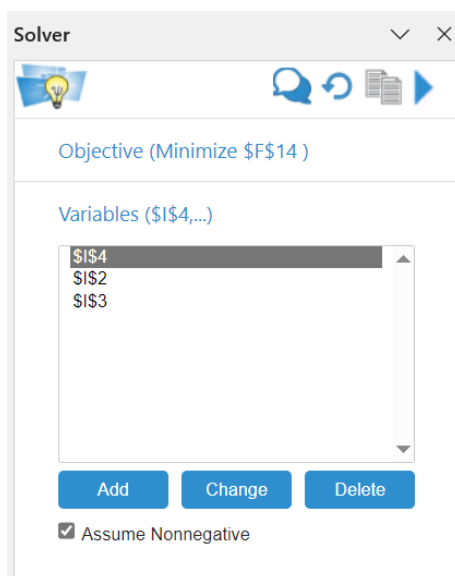
V okne modulu Solver klikneme na riadok *Objective*, následne do voľného riadka pod názvom *Set Objective* a potom na bunku F14, v ktorej máme hodnotu sumy odchýlok chemických posunov pre prvú oblasť. Z troch ponúkaných možností, ako má byť hodnota modifikovaná, vyberieme *Minimize* (Obrázok 7).



Obrázok 7. Nastavenie úlohy optimalizácie v module Solver.

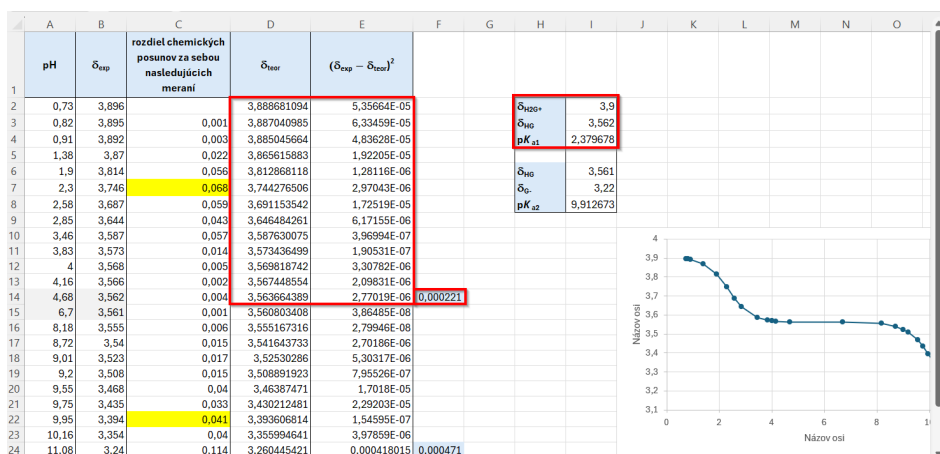
Kliknutím na položku *Variables*, zadáme premenné, ktoré majú byť optimalizované. Najskôr zoptimalizujeme hodnoty $\delta_{H_2G^+}$, δ_{HG} , pK_{a1} . Klikneme na tlačidlo *Add* a potom do voľného riadka pod nadpisom *Add/Edit Variable(s)* a následne na bunku, v ktorej sa nachádza

hodnota $\delta_{\text{H}_2\text{G}^+}$. Postup zopakujeme pre ďalšie dve hodnoty a klikneme na tlačidlo *OK*, potom na tlačidlo *Play* v pravom hornom rohu (Obrázok 8).



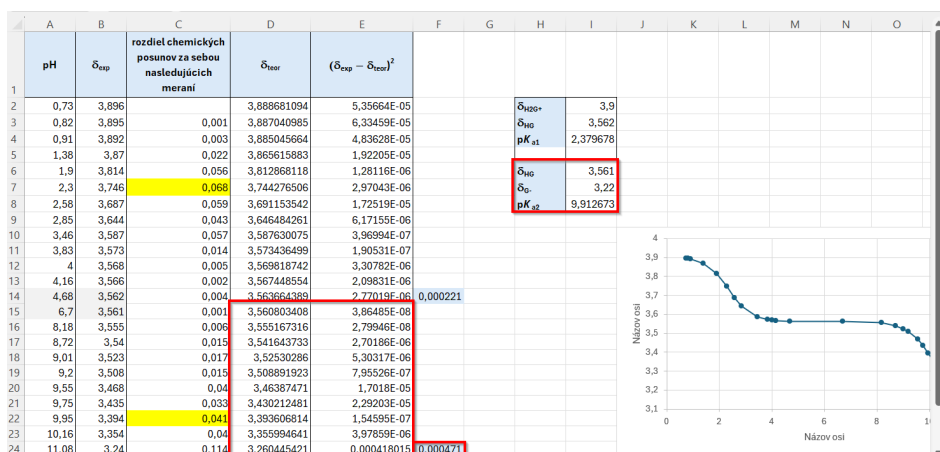
Obrázok 8. Nastavenie premenných pre výpočet hodnoty pK_{a1} .

Solver zoptimalizoval hodnotu sumy odchýlky pre prvú oblasť a hodnoty δ_{teor} , $(\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{teor}})^2$, $\delta_{\text{H}_2\text{G}^+}$, δ_{HG} , pK_{a1} .



Obrázok 9. Optimalizované hodnoty vypočítaných chemických posunov δ_{teor} , odchýlky $(\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{teor}})^2$ ako aj hodnoty $\delta_{\text{H}_2\text{G}^+}$, δ_{HG} a pK_{a1} .

Teraz je potrebné zoptimalizovať ešte hodnotu sumy odchýlky pre druhú oblasť a hodnoty δ_{teor} , $(\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{teor}})^2$, δ_{HG} , δ_{G^-} , pK_{a2} , pričom postupujeme rovnako (Obrázok 10).



Obrázok 10. Optimalizované hodnoty vypočítaných chemických posunov δ_{teor} , odchýlky $(\delta_{exp} - \delta_{teor})^2$ ako aj hodnoty δ_{HG} , δ_{G^-} a pK_{a2} .

Metóda 2: Alternatívnym riešením je vypočítať hodnoty pK_{a1} a pK_{a2} použitím vzťahov:

$$pK_{a1} = pH - \log \left(\frac{\delta - \delta_{H_2G^+}}{\delta_{HG} - \delta} \right)$$

$$pK_{a2} = pH - \log \left(\frac{\delta - \delta_{HG}}{\delta_{G^-} - \delta} \right)$$

Z vypočítaných hodnôt pK_a vyberieme tie, ktoré zodpovedajú pH s najvyšším rozdielom chemických posunov dvoch za sebou nasledujúcich meraní (Tabuľka 3).

Výsledky získané obidvoma metódami zapíšeme do tabuľky a porovnáme s hodnotami získanými NMR metódou a metódou potenciometrickej titrácie uvedenými v odbornej literatúre (Tabuľka 4).

Tabuľka 3. Chemické posuny δ_{H} vodíka H-2 glycínu v závislosti od pH roztoku a výsledné pK_a hodnoty.

pH	δ_{exp}	$\delta_{\text{exp},n} - \delta_{\text{exp},n+1}$	$(\delta - \delta_{\text{H}_2\text{G}^+})/(\delta_{\text{HG}} - \delta)^a$ resp. $(\delta - \delta_{\text{HG}})/(\delta_{\text{G}^-} - \delta)^b$	pK_a
0,73	3,896	0,001	0	-
0,82	3,895	0,003	0,003003003	3,342444234
0,91	3,892	0,022	0,012121212	2,826453949
1,38	3,87	0,056	0,084415584	2,453577369
1,9	3,814	0,068	0,325396825	2,387586688
2,3	3,746	0,059	0,815217391	2,388726564
2,58	3,687	0,043	1,672	2,356763727
2,85	3,644	0,057	3,073170732	2,362413312
3,46	3,587	0,014	12,36	2,367981529
3,83	3,573	0,005	29,36363636	2,362190163
4	3,568	0,002	54,66666667	2,262277407
4,16	3,566	0,004	82,5	2,243546051
4,68	3,562	0,001	-	-
6,7	3,561	0,006	-	-
8,18	3,555	0,015	0,019047619	9,900159303
8,72	3,54	0,017	0,07	9,87490196
9,01	3,523	0,015	0,134275618	9,882002839
9,2	3,508	0,04	0,197761194	9,903858924
9,55	3,468	0,033	0,407894737	9,939451898
9,75	3,435	0,041	0,646153846	9,939664066
9,95	3,394	0,04	1,084415584	9,91480425
10,16	3,354	0,114	1,815789474	9,900934506
11,08	3,24	3,240	-	-

^aPlatí pre výpočet pre pH v rozsahu 0,73–4,68.^bPlatí pre výpočet pre pH v rozsahu 6,7–11,08.**Tabuľka 4.** Porovnanie hodnôt pK_a glycínu získaných metódami NMR s hodnotami uvedenými v literatúre.

Aminokyselina	pK_a (NMR metóda 1)	pK_a (NMR metóda 2)	pK_a (NMR metóda, literatúra [14])	pK_a (potenciometria, literatúra [13])
glycín	2,38	2,39	2,92	2,39
	9,91	9,94	9,65	9,77

Výsledky tohto cvičenia jasne demonštrujú ionizačné vlastnosti glycínu, ktorý je amfotérnou molekulou s karboxylovou ($-\text{COOH}$) a aminoskupinou ($-\text{NH}_2$). Práve tieto funkčné skupiny sú zodpovedné za dve charakteristické hodnoty pK_a , ktoré definujú acidobázickú rovnováhu tejto aminokyseliny.

Experimentálnym stanovením závislosti chemického posunu vodíka H-2 glycínu od pH sme získali údaje potrebné na výpočet týchto hodnôt pomocou dvoch metód – optimalizáciou odchýlok v programe Excel (Solver) a priamym výpočtom z rovníc.

V kyslom prostredí je glycín prítomný vo forme katiónu H_2G^+ a postupnou deprotonáciou cez zwitterión HG prechádza na anión G^- v zásaditom prostredí. Táto zmena sa odráža v titračnej krivke ako inflexné body, ktoré zodpovedajú hodnotám $\text{p}K_a$.

Hodnoty $\text{p}K_{a1}$ (2,58) a $\text{p}K_{a2}$ (9,95) odhadnuté z grafu sigmoidálnej krivky korelujú s hodnotami vypočítanými metódou optimalizácie a literatúrou, čím potvrdzujú presnosť použitých postupov.

2.6 Záver

Toto cvičenie umožňuje študentom získať praktické skúsenosti pri využití ^1H NMR spektroskopie pri štúdiu ionizačných vlastností aminokyselín na príklade glycínu. Študenti si osvoja spracovanie NMR spektier, analyzovanie zmien chemických posunov v závislosti od pH prostredia a výpočet hodnôt $\text{p}K_a$ pre jednotlivé ionizovateľné skupiny molekuly.

Postupy zahŕňajú použitie špecializovaného softvéru MestrelNova na spracovanie spektier a programu Excel na vykonanie matematickej optimalizácie a výpočet teoretických hodnôt chemických posunov. Študenti získajú skúsenosti s aplikáciou fyzikálno-chemických zákonitostí, ktoré im umožnia určiť $\text{p}K_a$ hodnoty pomocou dvoch rôznych metód.

Práca s modernými experimentálnymi a analytickými nástrojmi predstavuje základnú kompetenciu pre chemikov a biochemikov. Schopnosť stanoviť ionizačné konštanty a pochopiť ich vzťah k štruktúre a vlastnostiam molekúl má široké uplatnenie v biochemickom výskume, farmaceutickom priemysle a analytickej chémii. Cvičenie preto prispieva k rozvoju nielen teoretických poznatkov, ale aj praktických zručností, ktoré sú nevyhnutné pre ďalšiu profesionálnu kariéru v oblasti chémie a biotechnológie.

3 VPLYV SUBSTITUENTOV NA ^1H A ^{13}C NMR CHEMICKÉ POSUNY VYBRANÝCH ATÓMOV CHALKÓNOV

3.1 Úvod

Veľký význam nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) v chémii spočíva v tom, že poskytuje informácie o tienení jadier elektrónmi. Jadrá v rôznych elektrónových prostrediach sú rôzne tienené, a teda majú rôzne chemické posuny. Vďaka tomuto je NMR silným nástrojom pre skúmanie elektrónovej štruktúry molekúl. Empirické pravidlá, ktoré dávajú do vzťahu chemické posuny s konštantami substituentov σ , elektrónovou hustotou, elektronegativitami a rôznymi ďalšími empirickými parametrami, sa ukázali ako mimoriadne významné nielen pre riešenie štruktúr organických zlúčenín, ale aj pre základné štúdie distribúcie elektrónov v molekulách.

Toto praktické cvičenie je zamerané na štúdium elektrónových efektov substituentov na chemické posuny. Cieľom je poskytnúť návod ako pomocou NMR chemických posunov určiť jemné detaily týkajúce sa distribúcie a polarizácie elektrónov v molekulách.[15]

3.1.1 Tienenie jadier

Pod pojmom tienenie jadier rozumieme vplyv okolitej elektrónovej hustoty na NMR aktívne jadro. Vzťah medzi efektívnym magnetickým poľom B_{eff} , ktoré vplýva na jadro (určuje jeho chemický posun), a vonkajším magnetickým poľom B_0 je popísaný rovnicou:

$$B_{\text{eff}} = (1 - \sigma)B_0$$

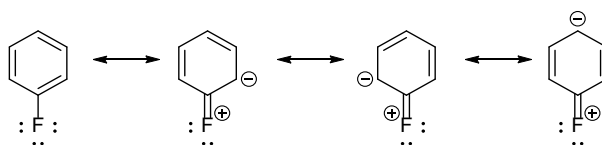
kde σ je tieniaca konštanta.

Tienenie jadier je dôsledkom cirkulácie elektrónov v molekulách, ktorá spôsobuje vznik elektrických prúdov a následne sekundárnych lokálnych magnetických polí, ktoré zosilňujú alebo zoslabujú vonkajšie magnetické pole ovplyvňujúce jadrá molekuly.[15]

3.1.2 Spôsoby prenosu efektu substituentov

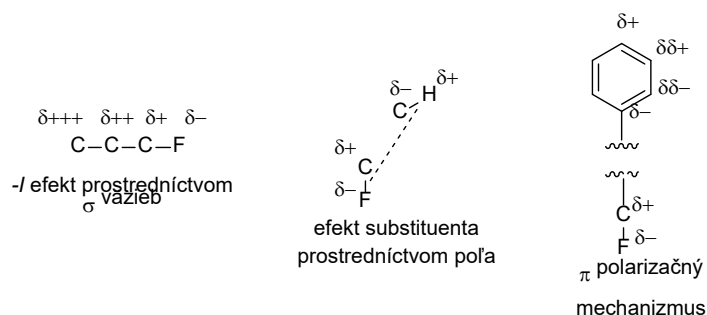
Pri štúdiu prenosu efektu substituentov je potrebné myslieť na to, že chemické posuny sú mimoriadne citlivé na elektrónové efekty substituentov a často odrážajú príspevky z viacerých konkurenčných mechanizmov prenosu elektrónov.

Efekty substituentov sa delia na polárne a rezonančné. Rezonančné efekty súvisia so schopnosťou substituenta delokalizovať alebo prenášať náboj, zatiaľ čo polárne efekty súvisia so schopnosť substituenta polarizovať elektrónovú hustotu pozorovaného miesta (t.j. polárne efekty nezahŕňajú formálny prenos náboja medzi substituentom a pozorovaným miestom). Rezonančné efekty sú prezentované pomocou rezonančných štruktúr zobrazených na Obrázku 11. Atóm fluóru je π -elektróndonorom a zvyšuje elektrónovú hustotu v polohách orto a para na aromatickom kruhu, čím dochádza k posunu rezonančných čiar týchto uhlíkov k vyššiemu poľu, tzn. k nižším hodnotám ppm.[15]



Obrázok 11. Rezonančné štruktúry fluórbenzénu.

Na rozdiel od rezonančných efektov, polárne efekty substituentov môžu byť prenášané jedným alebo viacerými mechanizmami. Obrázok 12 zobrazuje tri typy polárnych efektov substituenta fluóru.[15]



Obrázok 12. Polárne efekty substituenta fluóru.

Fluór má $-I$ efekt a spôsobuje zníženie elektrónovej hustoty na susedných atómoch uhlíka. Je významný len na miestach veľmi blízko substituenta. Ak chceme pozorovať efekt substituenta na atómoch vzdialených od substituenta, potom indukčný efekt nezohráva žiadnu úlohu.

Ďalším efektom je efekt poľa vyplývajúci z elektrického dipólu substituenta. Tento má dlhší dosah. Pôsobí cez priestor a ovplyvňuje elektrónovú hustotu jadier polarizáciou elektrónovej hustoty pozdĺž väzieb.

Posledným je π polarizačný mechanizmus, kedy dochádza k pôsobeniu cez priestor na nenasýtený π systém. V našom prípade elektrónakceptorový atóm fluóru polarizuje π elektrónový oblak benzénového jadra.[15]

3.1.3 Korelačná analýza

Pri korelačnej analýze je cieľom použiť vzťahy medzi chemickými posunmi a Hammettovými konštantami σ (predstavujú sumu indukčného a rezonančného efektu substituenta), Taftovými konštantami σ_I a σ_R a Swainovými a Luptonovými konštantami F a R substituentov na získanie jedného alebo viacerých koeficientov prenosu ρ , ktoré sa používajú na kvantifikáciu spôsobov, akými sú prenášané efekty substituentov.

Vplyv substituentov na chemické posuny je zvyčajne analyzovaný využitím dvoch prístupov: (a) využitie jedného substitučného parametra σ (single substituent parameter SSP) alebo (b) dvoch substitučných parametrov σ_I a σ_R alebo F a R (dual substituent parameter DSP), ktoré sú charakterizované nasledujúcimi rovnicami:[16]

1. jednoparametrová Hammettova metóda SSP:

$$SCS = \rho\sigma + h$$

2. dvojparametrová metóda DSP:

$$SCS = \rho_I\sigma_I + \rho_R\sigma_R + h$$

$$SCS = \rho_FF + \rho_RR + h$$

Premenná SCS predstavuje zmenu chemického posunu daného jadra, ρ je konštanta, ktorá odráža citlivosť NMR chemických posunov jadier voči vplyvu substituenta (voči indukčnému efektu, efektu poľa alebo rezonančnému efektu substituenta), σ_I , σ_R , F a R sú substitučné konštanty odrážajúce ich elektrónové vlastnosti a h je priesečník.[16]

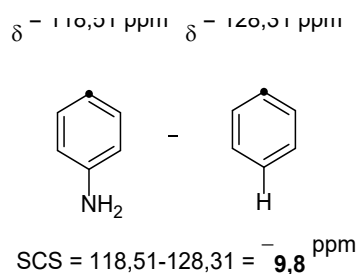
Rovnica metódy SSP obsahuje konštantu σ , ktorá vyjadruje miešanie polárnych a π delokalizačných efektov. Analýza pomocou DSP je zvyčajne významnejšia, pretože chemické posuny sú korelované s lineárnou kombináciou indukčného efektu σ_I , efektu poľa F a ďalších efektov (σ_R , σ_R^0 , σ_R^+ , σ_R^- , R).[15]

Aby sa dosiahlo významné oddelenie polárnych a rezonančných efektov, je potrebné získať experimentálne údaje pre širokú škálu substituentov alebo aspoň pre tzv. základnú sériu.

Základná séria by mala obsahovať dvoch silných donorov (NMe_2 , NH_2 alebo OMe); dva halogény (nie Cl a Br spolu); Me a H ; jeden elektrónakceptor (NO_2 , CF_3 alebo CN); a jeden karbonylový akceptor (COMe alebo COOR).

3.1.4 Konvencie a definície

Chemické posuny jadier sa vyjadrujú pomocou konvencie znamienok, kde kladné hodnoty znamenajú odtienenie, pričom rezonančná čiara sa posúva k nižšiemu magnetickému poľu (vyšším chemickým posunom v ppm). V tomto prípade však budeme uvažovať chemické posuny substituentov (SCS), nie absolútne chemické posuny. SCS je definovaný ako zmena chemického posunu (v ppm) pozorovanej rezonancie, ku ktorej dochádza nahradením atómu vodíka substituentom. Napríklad, SCS pre uhlík v polohe para pre substituent NH_2 na benzéne je $-9,8$ ppm (Obrázok 13).



Obrázok 13. Príklad výpočtu chemického posunu substituentov (SCS).

Elektrónové hustoty sa zvyknú taktiež vyjadrovať z hľadiska efektu substituentov. Hodnoty Δq_π , Δq_σ , Δq_t sa používajú na vyjadrenie zmien indukovaných substituentom v π , σ a celkovej ($= \pi + \sigma$) hustote elektrónov. Keďže tieto zmeny sú zvyčajne malé, číselné hodnoty sú často násobené faktorom 10^3 alebo 10^4 . Kladné hodnoty Δq označujú substituentom indukované navýšenie elektrónovej hustoty.

3.2 Úlohy

1. Syntéza substituovaných chalkónov

- Uskutočnite syntézu substituovaných chalkónov podľa Schémy 1 (zlúčeniny **3a–g**).

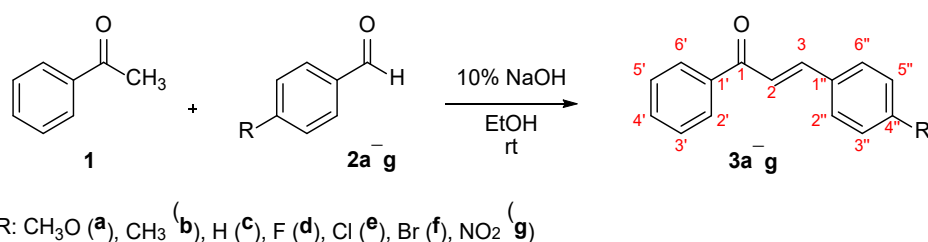


Schéma 2. Syntéza substituovaných chalkónov 3a–g.

2. Štúdium vplyvu substituentov na ¹³C NMR chemické posuny

- Analyzujte vplyv rôznych substituentov R na ¹³C NMR chemické posuny vybraných uhlíkov v derivátoch 3a–g.

3.3 Materiál a metódy

Chemikálie				
Názov	Molekulová hmotnosť	Čistota	Množstvo	Bezpečnostné upozornenia
4-metoxybenzaldehyd	136,15 g.mol ⁻¹	98 %	114,47 mg	Reprodukčná toxicita, (kat. 2), H361fd
4-metylbenzaldehyd	120,15 g.mol ⁻¹	97 %	102,06 mg	Akútna toxicita, (Kategória 4), H302 Dráždivosť kože, (Kategória 2), H315 Podráždenie očí, (kat. 2), H319
benzaldehyd	106,12 g.mol ⁻¹	99 %	88,33 mg	Akútna toxicita, (kat. 4), H302, H332 Dráždivosť kože, (kat. 2), H315 Podráždenie očí, (kat. 2), H319 Reprodukčná toxicita, (kat. 1B), H360D Toxicita pre špecifický cieľový orgán - jednorazová expozícia, (kat. 3), Dýchací systém, H335
4-fluórbenzaldehyd	124,11 g.mol ⁻¹	98 %	104,35 mg	Horľavé kvapaliny, (kat. 3), H226 Akútna toxicita, (kat. 4), H302 Podráždenie očí, (kat. 2), H319
4-chlórbenzaldehyd	140,57 g.mol ⁻¹	97 %	119,40 mg	Akútna toxicita, (kat. 4), H302 Dráždivosť kože, (kat. 2), H315 Podráždenie očí, (kat. 2), H319 Senzibilizácia kože, (kat. 1), H317
4-brómbenzaldehyd	185,02 g.mol ⁻¹	99 %	153,99 mg	Akútna toxicita, (kat. 4), H302 Dráždivosť kože, (kat. 2), H315 Podráždenie očí, (kat. 2), H319 Senzibilizácia kože, (kat. 1), H317 Toxicita pre špecifický cieľový orgán - jednorazová expozícia, (kat. 3), Dýchací systém, H335
4-nitrobenzaldehyd	151,12 g.mol ⁻¹	98 %	127,06 mg	Podráždenie očí, (kat. 2), H319 Senzibilizácia kože, (kat. 1), H317
acetofenón	120,15 g.mol ⁻¹	99 %	700,00 mg	Akútna toxicita, (kat. 4), H302 Podráždenie očí, (kat. 2), H319
etanol, p.a.			14 ml	Horľavé kvapaliny, (kat. 2), H225 Podráždenie očí, (kat. 2), H319
hydroxid sodný (NaOH)	40,0 g.mol ⁻¹	p.a.	466,2 mg	Žieravosť kože, (subkat. 1A), H314 Vážne poškodenie očí, (kat. 1), H318
destilovaná voda			4,2 ml	-

Laboratórne pomôcky		
Názov	Počet (ks)	Kapacita/rozsah
navážovačky	9	-
kadička	1	10 ml
sklenené pipety	5	2,0 ml
automatická pipeta	1	100 μ l
Pasteurove pipety	2	-
guľaté banky	7	25 ml
filtračný papier	7	$\varnothing$ 90 mm
Eppendorfove mikroskúmavky	7	2,0 ml
NMR kyvety Wilmad	7	$\varnothing$ 5 mm, pre 600 MHz NMR spektrometer

	^1H NMR	^{13}C NMR	COSY	HSQC	HMBC
teplota	25 °C				
rozpúšťadlo	CDCl_3				
spektrálna šírka [ppm]	-1 až +14	-10 až +240	1024, 1024	1024, 1024	1024, 1024
akvizitný čas [s]	5,0	1,0	0,15	0,15	0,15
relaxačná doba [s]	5,0	3,0	1,0	1,0	1,0
počet skenov	16	1 000	4	4	4

3.4 Experimentálna časť

3.4.1 Syntéza chalkónov

K etanolovému roztoku (2 ml) acetofenónu (100 mg, 97,1 μ l, 0,824 mmol) pridáme 10 % vodný roztok hydroxidu sodného (0,67 ml) a následne ekvimolárne množstvo príslušného benzaldehydu (Tabuľka 5). Reakčnú zmes miešame 15–60 min, pričom priebeh reakcie sledujeme pomocou TLC ($n\text{Hex}/\text{A}$, 2:1). Vznik produktu sa prejaví zmenou sfarbenia reakčnej zmesi a vznikom zrazeniny.

V prípade, že zrazenina nevznikne, vložíme reakčnú zmes do ľadového kúpeľa, prípadne priamo do reakčnej zmesi pridáme ľadovú vodu (2 ml). Vzniknutú zrazeninu odfiltrujeme, premyjeme malým množstvom vody a vysušíme. Produkt kryštalizujeme z malého množstva horúceho etanolu.

Tabuľka 5. Navážky reaktantov pre syntézu substituovaných chalkónov **3a–g**.

		M_w [g.mol ⁻¹]	m [mg]	n [mmol]	ρ [g.cm ⁻³]	V [ml]
a	acetofenón (99%)	120,15	100,0	0,824	1,03	0,0971
	4-metoxybenzaldehyd (98%)	136,15	114,47	0,824	1,12	0,1023
	etanol	-	-	-	-	2,0
	NaOH (10% vodný roztok)	40,0	66,6	-	-	0,6
b	acetofenón (99%)	120,15	100,0	0,824	1,03	0,0971
	4-metylbenzaldehyd (97%)	120,15	102,06	0,824	1,02	0,1002
	etanol	-	-	-	-	2,0
	NaOH (10% vodný roztok)	40,0	66,6	-	-	0,6
c	acetofenón (99%)	120,15	100,0	0,824	1,03	0,0971
	benzaldehyd (99%)	106,12	88,33	0,824	1,05	0,0841
	etanol	-	-	-	-	2,0
	NaOH (10% vodný roztok)	40,0	66,6	-	-	0,6
d	acetofenón (99%)	120,15	100,0	0,824	1,03	0,0971
	4-fluórbenzaldehyd (98%)	124,11	104,35	0,824	1,157	0,0902
	etanol	-	-	-	-	2,0
	NaOH (10% vodný roztok)	40,0	66,6	-	-	0,6
e	acetofenón (99%)	120,15	100,0	0,824	1,03	0,0971
	4-chlórbenzaldehyd (97%)	140,57	119,40	0,824	-	-
	etanol	-	-	-	-	2,0
	NaOH (10% vodný roztok)	40,0	66,6	-	-	0,6
f	acetofenón (99%)	120,15	100,0	0,824	1,03	0,0971
	4-brómbenzaldehyd (99%)	185,02	153,99	0,824	-	-
	etanol	-	-	-	-	2,0
	NaOH (10% vodný roztok)	40,0	66,6	-	-	0,6
g	acetofenón (99%)	120,15	100,0	0,824	1,03	0,0971
	4-nitrobenzaldehyd (98%)	151,12	127,06	0,824	-	-
	etanol	-	-	-	-	2,0
	NaOH (10% vodný roztok)	40,0	66,6	-	-	0,6

3.5 Výsledky a diskusia

3.5.1 Spracovanie NMR spektier v programe MestreNova

NMR spektrá série chalkónov (Schéma 2) spracujeme v programe MestreNova. 1D aj 2D spektrá referencujeme na signál referenčného činidla TMS ($\delta_H = 0,0$ ppm). Chemické posuny uhlíkov C-1 (C=O), C-2 a C-3 zapíšeme do tabuľky v programe Excel.

3.5.2 Štúdium vplyvu substituentov na ¹³C NMR chemické posuny

Postup analýzy demonštrujeme iba na chemickom posune atómu uhlíka C=O. Analýzu ostatných chemických posunov uskutočnia študenti samostatne. V programe Excel vytvoríme

tabuľku, ktorá bude obsahovať chemické posuny príslušných atómov uhlíka odčítané z ^{13}C NMR spektier, a konštanty substituentov σ , σ_R^+ , σ_R^- , R^+ , R^- , F a R z publikácie [17].

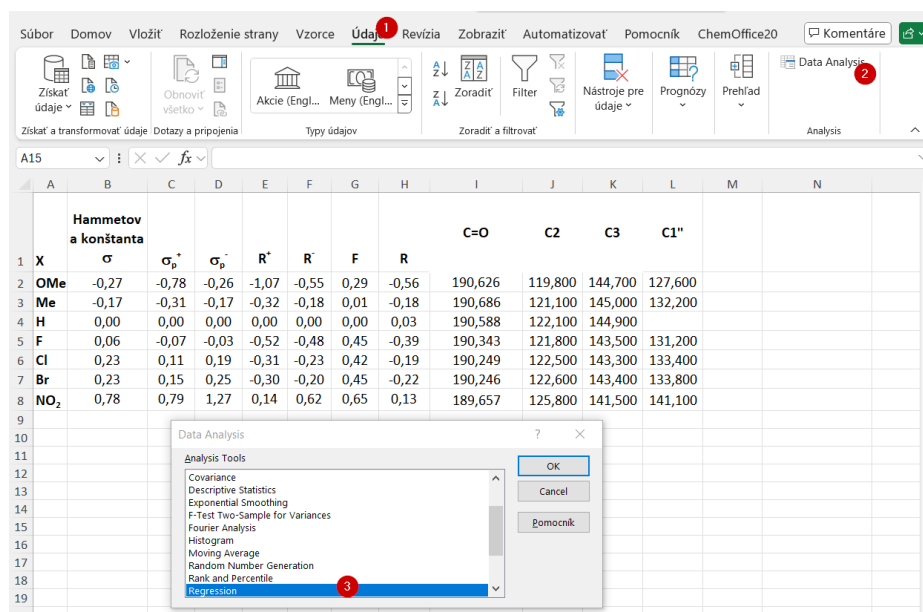
Tabuľka 6. Vybrané ^{13}C chemické posuny [δ , ppm] chalkónov **3a–g** spolu s elektrónovými konštantami substituentov σ , σ_R^+ , σ_R^- , R^+ , R^- , F a R .

chalkón		σ	σ_R^+	σ_R^-	R^+	R^-	F	R	$\delta_{\text{C=O}}$	δ_{C_2}	δ_{C_3}
3a	CH₃O	-0,27	-0,78	-0,26	-1,07	-0,55	0,29	-0,56	190,626	119,800	144,700
3b	CH₃	-0,17	-0,31	-0,17	-0,32	-0,18	0,01	-0,18	190,686	121,100	145,000
3c	H	0	0	0	0,00	0,00	0,03	0	190,588	122,100	144,900
3d	F	0,06	-0,07	-0,03	-0,52	-0,48	0,45	-0,39	190,343	121,800	143,500
3e	Cl	0,23	0,11	0,19	-0,31	-0,23	0,42	-0,19	190,249	122,500	143,300
3f	Br	0,23	0,15	0,25	-0,30	-0,20	0,45	-0,22	190,246	122,600	143,400
3g	NO₂	0,78	0,79	1,27	0,14	0,62	0,65	0,13	189,657	125,800	141,500

Chemické posuny karbonylových uhlíkov C=O (Tabuľka 6) sa menia v závislosti od substituentov na fenylovom jadre. Rozdiel chemických posunov je 1,029 ppm (189,657–190,686 ppm). Elektrónakceptorové substituenty zvyšujú elektrónovú hustotu na karbonylovom uhlíku (posun k nižším hodnotám δ), zatiaľ čo elektróndonorové substituenty znižujú elektrónovú hustotu na tomto atóme (posun k vyšším hodnotám δ). Tento fakt vyvracia všeobecne platné tvrdenie, že elektrónakceptorové substituenty znižujú elektrónovú hustotu a elektróndonorové substituenty zvyšujú elektrónovú hustotu na uhlíkoch. Toto pozorovanie sa pokúsime vysvetliť pomocou korelačnej analýzy využitím SSP ako aj DSP metódy.

NMR chemické posuny v závislosti od substitučných efektov budeme analyzovať podľa nasledujúceho postupu:

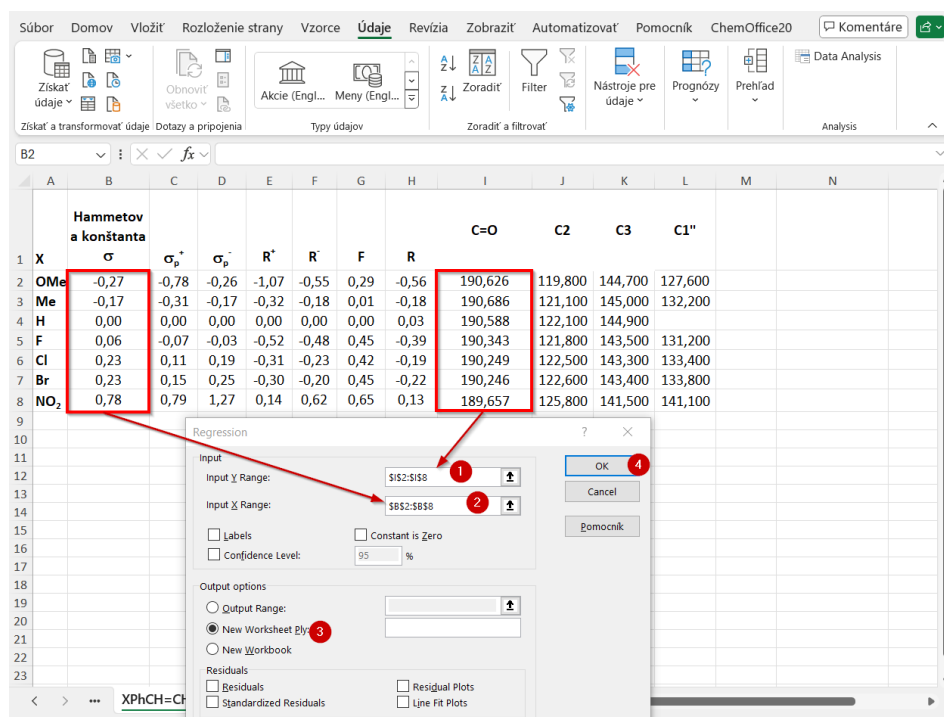
1. Na záložke *Údaje* (1) vyberieme položku *Analýza dat/Data Analysis* (2) a v dialógovom okne *Data Analysis* položku *Regresia* (3, Obrázok 14).



Obrázok 14. Výber metódy pre analýzu údajov.

2. V dialógovom okne *Regresia* nastavíme:

- Vstupná oblasť Y*: vyberieme rozsah buniek pre premennú „chemický posun SCS“ (Obrázok 15).
- Vstupná oblasť X*: vyberieme rozsah buniek pre elektrónovú konštantu substituenta σ , σ_R^+ , σ_R^- , R^+ , R^- , F a R alebo viacero premenných F a R (Obrázok 15).
- V časti *Output options* je potrebné zaškrtnúť možnosť *Výstup na nový hárok/New Worksheet Ply* (Obrázok 15).
- Klikneme na tlačidlo OK, pričom prebehne regresná analýza.



Obrázok 15. Výber údajov pre vstupnú oblasť Y, X.

3. Regresné tabuľky sa zobrazia na novom hárku. V týchto tabuľkách sa nachádzajú všetky potrebné hodnoty pre vytvorenie korelačných rovníc.

Hodnoty, ktoré sú dôležité pre SSP a DSP analýzu ¹³C NMR chemických posunov (ppm) sú vyznačené v Tabuľke P1–P7 farebne. Z takto získaných hodnôt zostavíme dve nové tabuľky (Tabuľka 7, Tabuľka 8).

Cieľom tejto úlohy je preskúmať, ako elektrónové vlastnosti substituentov ovplyvňujú chemický posun karbonylového uhlíka C=O v štruktúre chalkónov **3a–g** pomocou regresnej analýzy. Pre tento účel použijeme substitučné konštanty σ , σ_R^+ , σ_R^- , R^+ , R^- , F a R ako nezávislé premenné a ¹³C NMR chemický posun ako závislú premennú.

Substitučná konštant σ vyjadruje celkový elektrónový efekt substituenta (indukčný a rezonančný), konštanty σ_R^+ , σ_R^- , R^+ , R^- vyjadrujú elektrónové rezonančné efekty substituenta za podmienok, keď substituent stabilizuje kladný (σ_R^+ , R^+) alebo záporný (σ_R^- , R^-) náboj. Konštant F vyjadruje čisto indukčný efekt/efekt poľa substituenta a konštant R

vyjadruje čisto rezonančný efekt substituenta. Všetky popísané konštanty poskytujú štatistický základ pre odhad vplyvu substituentov na ^{13}C NMR chemický posun karbonylového uhlíka $\text{C}=\text{O}$.

3.5.2.1 *Hodnotenie kvality regresných modelov*

Pri analýze výsledkov regresie sa zameriame na nasledujúce ukazovatele:

1. *Štatistická významnosť modelu (F-štatistika, significance F (p-hodnota)):*

- ak je p-hodnota (significance F) $< 0,05$, model je štatisticky významný, čo znamená, že elektrónové vlastnosti substituentov majú významný vplyv na ^{13}C NMR chemický posun karbonylového uhlíka $\text{C}=\text{O}$
- vyššia hodnota F-štatistiky indikuje lepšiu kvalitu modelu

2. *R^2 a $\bar{R}^2$*

- R^2 : ukazuje, aký podiel variability ^{13}C NMR chemického posunu uhlíka $\text{C}=\text{O}$ je vysvetlený modelom
 - vysoká hodnota (napr. $R^2 > 0,8$) svedčí o dobrej predikčnej schopnosti
 - naopak, nízka hodnota, naznačuje, že substitučné konštanty nepredpovedajú spoľahlivo chemický posun
- $\bar{R}^2$: presnejší ukazovateľ pri viacerých premenných, pretože penalizuje zbytočné premenné. Ak sa výrazne líši od R^2 , niektoré premenné môžu byť nevýznamné.

3. *Význam jednotlivých premenných*

- **koeficienty:**
 - koeficienty určujú smer a veľkosť vplyvu substituentov
 - napríklad negatívny koeficient σ_R^+ naznačuje, že so zvyšujúcim sa rezonančným stabilizačným efektom substituenta by mal klesať chemický posun
- **p-hodnota pre koeficient:** ak je $p < 0,05$, daná premenná má štatisticky významný vplyv na chemický posun.

3.5.2.2 SSP analýza

Po analýze korelačných koeficientov R a R^2 ($R < 0,8$) môžeme vylúčiť modely, kde sme korelovali ^{13}C NMR chemické posuny uhlíka C=O skupiny s elektrónovými konštantami substituentov σ_{P}^+ , R^+ , R^- , F a R (Tabuľka 7).

Ostali nám dva modely s hodnotami $R > 0,8$, kde sme korelovali ^{13}C NMR chemické posuny uhlíka C=O skupiny s elektrónovými parametrami σ a σ_{R}^- . Pre tieto dva modely je parameter F vysoký, čo naznačuje, že zvolené modely sú vhodné na interpretáciu závislosti ^{13}C NMR chemického posunu uhlíka C=O od elektrónových efektov substituentov. Navyše, p-hodnota je v oboch prípadoch $< 0,05$ a preto môžeme tieto dva modely považovať za štatisticky významné, čo znamená, že elektrónové vlastnosti substituentov charakterizované konštantami σ a σ_{R}^- majú významný vplyv na ^{13}C NMR chemické posuny karbonylového uhlíka C=O.

Zmenou substituenta dochádza k zmene ^{13}C NMR chemického posunu karbonylového uhlíka C=O (Tabuľka 6). Elektróndonorové substituenty spôsobujú posun k vyšším hodnotám ppm a elektrónakceptórové substituenty zasa posun k nižším hodnotám ppm. Tento fakt je v súlade s výsledkami analýzy, ktorá poukazuje na to, že ^{13}C NMR chemické posuny uhlíka C=O sú ovplyvnené reverzným substitučným efektom ($\rho < 0$).

Tabuľka 7. Výsledky SSP analýzy ^{13}C NMR chemických posunov (ppm) uhlíka C=O pre chalkóny **3a–g**.

		R	R^2	f-štatistika	p-hodnota	ρ	h	n
C=O	σ	0,977	0,953	103,031	0,000159	-0,999±0,098	190,465±0,034	7
	σ_{R}^+	0,885	0,783	18,090	0,0081	-0,654±0,154	190,332±0,068	7
	σ_{R}^-	0,960	0,921	58,224	0,000615	-0,658±0,086	190,460±0,044	7
	R^+	0,547	0,300	2,142	0,203	-0,495±0,338	190,174±0,168	7
	R^-	0,738	0,544	5,965	0,0585	-0,674±0,276	190,244±0,107	7
	F	0,861	0,742	14,384	0,0127	-1,255±0,331	190,749±0,130	7
	R	0,533	0,284	1,987	0,218	-0,804±0,570	190,184±0,167	7

3.5.2.3 DSP analýza

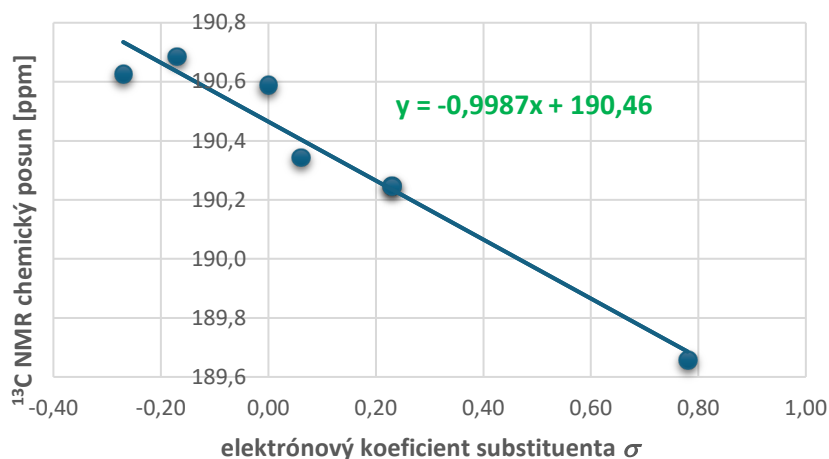
Najlepšie výsledky boli dosiahnuté použitím DSP analýzy, kde bol analyzovaný vplyv efektu poľa F substituentov ako aj rezonančný efekt R na zmenu ^{13}C NMR chemického posunu uhlíka C=O. Táto analýza poskytla vysoké hodnoty korelačných koeficientov R a R^2 ($R < 0,8$) a hodnotu F-test parametra, pričom p-hodnota bola 0,000073. Korelačné koeficienty ρ_{F} a ρ_{R} sú záporné. To znamená, že elektróndonorové substituenty spôsobujú pokles elektrónovej

hustoty na uhlíku C=O chalkónov **3a–g** a teda zvýšenie chemického posunu a elektrónakceptórové substituenty spôsobujú nárast elektrónovej hustoty na uhlíku C=O a teda pokles chemického posunu. Opäť sa potvrdil reverzný substitučný efekt. Absolútna hodnota koeficienta ρ_F je vyššia, z čoho je možné usúdiť, že efekt poľa/indukčný efekt má väčší vplyv na ^{13}C NMR chemický posun uhlíka C=O ako rezonančný efekt.

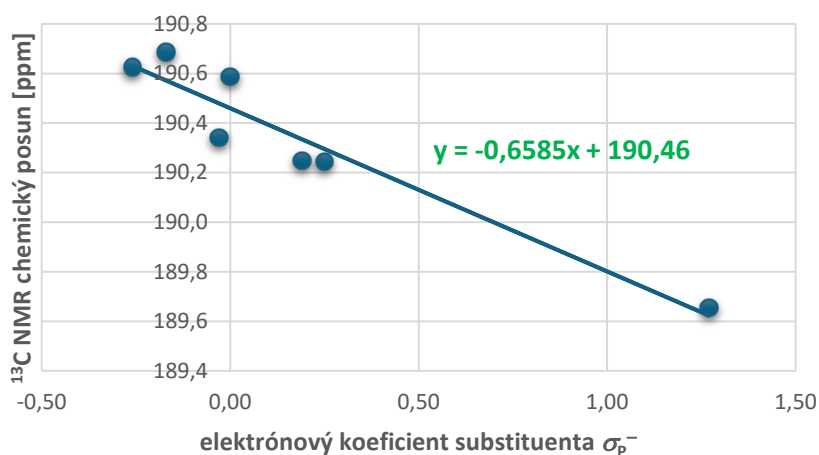
Tabuľka 8. Výsledky DSP analýzy ^{13}C NMR chemických posunov (ppm) uhlíka C=O pre chalkóny **3a–g**.

		R	R^2	f-štatistika	p-hodnota	ρ_F	ρ_R	h	n
C=O	F,R	0,996	0,991	232,563	0,000073	-1,226±0,067	-0,754±0,070	190,591±0,030	7

Znamienko korelačného koeficienta ρ pre SSP analýzu určuje aj sklon trendovej spojnice grafu závislosti ^{13}C NMR chemického posunu daného uhlíka od elektrónovej konštanty substituentov. Klesajúca trendová spojnica poukazuje na negatívnu hodnotu korelačného koeficientu ρ (Graf 2, Graf 3) a stúpajúca trendová spojnica poukazuje na kladnú hodnotu korelačného koeficientu ρ . Tieto fakty sú v súlade s výsledkami regresnej analýzy opísanej vyššie.



Graf 2. Závislosť ^{13}C NMR chemického posunu uhlíka C=O od elektrónovej konštanty substituenta σ .



Graf 3. Závislosť ^{13}C NMR chemického posunu uhlíka C=O od elektrónovej konštanty substituenta σ_{p^-} .

Metóda SSP poskytla veľmi dobrú koreláciu ($r = 0,9766$) medzi ^{13}C NMR chemickým posunom uhlíka C=O a substitučnou konštantou σ (Tabuľka 7), pričom DSP analýza dosiahla ešte presnejší model s $R^2 = 0,9953$. Výsledky jednoznačne poukazujú na to, že indukčný efekt substituentov má dominantný vplyv na chemický posun uhlíka C=O v chalkónoch, v porovnaní s efektom rezonančným.

Reverzný substitučný efekt možno vysvetliť mechanizmom π -polarizácie. Substituent s negatívnym indukčným efektom polarizuje väzbu C–X, čím vzniká dipól, ktorý cez priestor ovplyvňuje π -elektróny väzby C=O. Tento jav mení elektrónovú hustotu na karbonylovom uhlíku, čo sa prejavuje na chemickom posune.

3.6 Záver

Cieľom tohto cvičenia je poskytnúť študentom praktické skúsenosti s použitím regresnej analýzy na analýzu vplyvu elektrónových vlastností substituentov na ^{13}C NMR chemický posun uhlíkov chalkónov. Tento prístup im umožní lepšie pochopiť vzťahy medzi indukčnými a rezonančnými efektami substituentov a ich prejavom v experimentálnych výsledkoch organickej chémie.

Študenti by sa mali naučiť správne interpretovať štatistické ukazovatele, ako je F-test, p-hodnota, korelačný koeficient R a R^2 . Osvoja si ako tieto faktory ovplyvňujú dôveryhodnosť a platnosť vybraného modelu v regresnej analýze, čo je nevyhnutné pri vyhodnocovaní kvantitatívnych vzťahov v chemických systémoch.

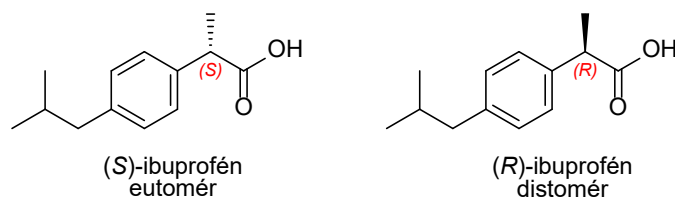
V rámci cvičenia budú študenti schopní identifikovať signifikantné vplyvy substituentov na chemické posuny a správne ich interpretovať v kontexte elektrónových efektov. To je kľúčové pre racionálny návrh a optimalizáciu molekúl so želanými fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Navyše, toto praktické cvičenie poskytne študentom hlbšie pochopenie vplyvu substituentov na molekulárnu štruktúru a reaktivitu ako aj na NMR chemické posuny. Študenti by si mali osvojiť analytické zručnosti potrebné na prácu s experimentálnymi dátami a schopnosť využívať regresné modely na vyhodnocovanie a interpretáciu chemických reakcií a vlastností. Toto cvičenie poskytuje cenný základ pre ďalšie štúdium v oblasti kvantitatívnej analýzy a interpretácie chemických údajov, čo bude študentom nápomocné aj v ich ďalších výskumných alebo profesionálnych aktivitách.

4 STANOVENIE ENANTIOMÉRNEHO NADBYTKU

4.1 Úvod

Chirálné molekuly sú široko zastúpené v biologických systémoch, napríklad v proteínoch, sacharidoch, hormónoch a DNA. Približne 16 % liečiv je chirálnych,[18] pričom chiralita významne ovplyvňuje ich biologické interakcie, bezpečnosť a účinnosť. Jeden z enantiomérov, ktorý je hlavnou alebo jedinou aktívnou formou, sa nazýva eutomér, zatiaľ čo druhý, nežiadúci enantiomér, sa označuje ako distomér.[19]

Ibuprofén (Obrázok 16), bežne predávaný ako racemát, je nesteroidné protizápalové liečivo (NSAID) so stereocentrom. (*S*)-enantiomér je eutomér, ktorý zodpovedá za analgetický a protizápalový účinok inhibíciou enzýmu COX-2. Zaujímavé je, že *in vivo* sa približne 60 % (*R*)-enantioméru premieňa pôsobením enzýmu CYP450 na (*S*)-eutomér, pričom spätná premena je zanedbateľná. (*R*)-enantiomér preto slúži ako proliečivo (*S*)-enantioméru.[19]



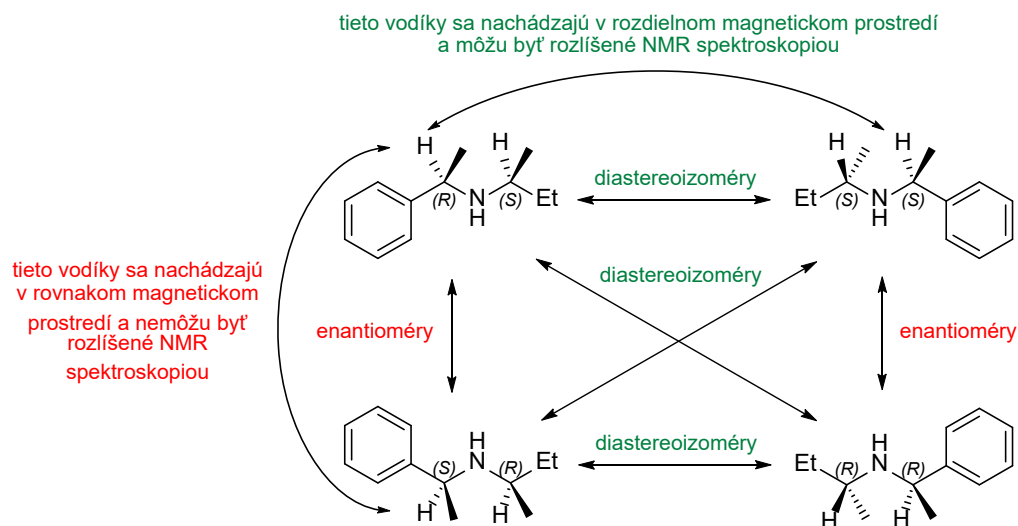
Obrázok 16. Štruktúra (*S*)- a (*R*)-ibuprofénu.

4.1.1 Metódy stanovenia enantiomérneho nadbytku

Enantiomérny nadbytok (% ee) sa v minulosti určoval meraním optickej otáčavosti roztoku zlúčeniny, pričom na tento účel bolo potrebné poznať špecifickú otáčavosť čistého enantioméru ako referenčnú hodnotu. Táto metóda však bola neskôr nahradená vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) s chirálnou stacionárnou fázou, pri ktorej enantioméry vykazujú rozdielne retenčné časy. Hoci je HPLC presná metóda, analýza môže trvať až 60 minút, čo viedlo k vývoju rýchlejších analytických metód.

Jednou z takýchto metód je technika využívajúca ^1H NMR spektroskopiu, ktorá umožňuje získať údaje za menej ako 5 minút. V achirálnom prostredí majú enantioméry identické NMR spektrá, a preto nie je možné ich relatívne zastúpenie určiť priamo pomocou NMR spektroskopie. Na ich rozlíšenie sa používa enantiomérne čisté chirálne činidlo, ktoré s enantiomérmi vytvára neekvivalentné diastereoizomérne komplexy. Diastereoizoméry sa na rozdiel od enantiomérov líšia fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami, čo spôsobuje, že ich

vodíky sa nachádzajú v odlišných magnetických prostrediach a poskytujú rozdielne ^1H NMR spektrá (Obrázok 17). Týmto spôsobom možno pomocou NMR spektroskopie stanoviť relatívne pomery enantiomérov v zmesi.[20]

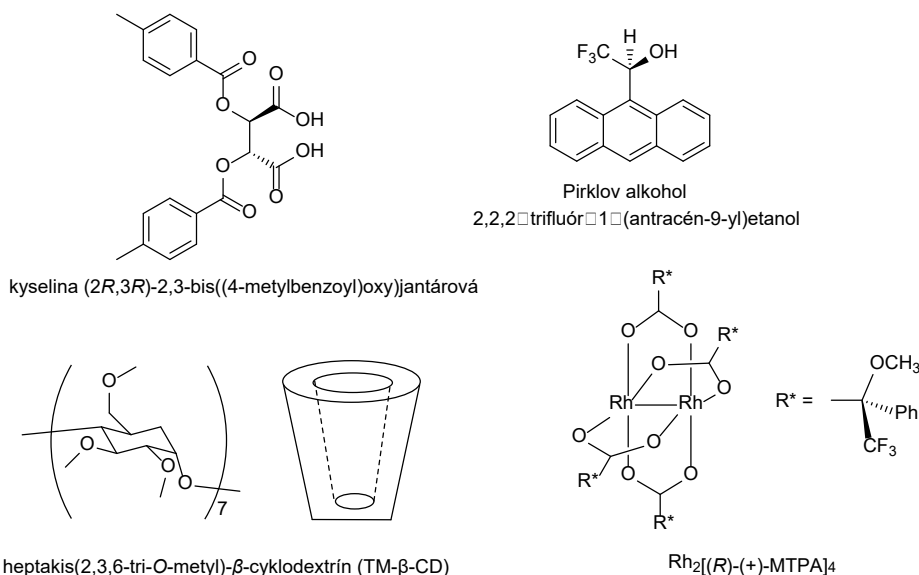


Obrázok 17. Vzťah medzi enantiomérmi a diastereoizomérmi.

Na stanovenie pomeru enantiomérov pomocou NMR spektroskopie sa využívajú metódy, v ktorých enantiomérne čistá molekula vystupuje ako chirálne derivatizačné činidlo (CDA), chirálne solvatačné činidlo (CSA) alebo lantanoidové posunové činidlo (CLSR).[21] CDA vytvára kovalentnú väzbu s reaktívnou funkčnou skupinou analytu. Na trhu je dostupné množstvo takýchto činidiel na analýzu karboxylových kyselín, alkoholov a amínov, pričom existujú stratégie na derivatizáciu ďalších funkčných skupín.

CSA interagujú s analytom prostredníctvom nekovalentných väzieb, ako sú dipól-dipólové interakcie, iónové párovanie a π - π interakcie. Významnú úlohu pri týchto interakciách zohrávajú stericke efekty a výber rozpúšťadla. CSA rozpustné v organických rozpúšťadlách bývajú často účinnejšie v nepolárnych rozpúšťadlách, v ktorých dochádza k interakcii medzi analytom a CSA. Naopak, v polárnych rozpúšťadlách dochádza k solvatacii analytu rozpúšťadlom a výsledkom je nízka enantiodiferenciácia.[21] Vo vode rozpustné CSA, často tvorené organickými makrocyclickými zlúčeninami, ako sú cyklodextríny, sa ukázali ako účinné pri NMR analýze enantiomérov vo vodnom prostredí. Vo vode rozpustné analyty obsahujúce hydrofóbne časti, ako sú napríklad aromatické kruhy, môžu vytvárať inklúzne komplexy s CSA tak, že sa hydrofóbna časť analytu vkladá do hydrofóbnej dutiny cyklodextrínu. Tento spôsob

interakcie podporuje selektívne rozlíšenie enantiomérov, čo umožňuje ich analýzu pomocou NMR spektroskopie.[22] Obrázok 18 znázorňuje vybrané príklady najčastejšie používaných CSA.



Obrázok 18. Štruktúry niektorých zlúčenín používaných ako chirálne solvatačné činidlá (CSA).

Na transformáciu enantiomérov na diastereoizomérny pár pomocou CDA existuje viacero overených prístupov. Medzi najčastejšie využívané patrí kovalentná derivatizácia pomocou chloridu Mosherovej kyseliny (MTPA-Cl, Schéma 3), ktorá sa uplatňuje pri alkoholoch [23] a amínoch. Ďalším prístupom je tvorba iónových párov (napr. amónnych solí) medzi chirálnymi bázami a chirálnymi kyselinami, ako je napríklad kyselina gáforsulfónová za vzniku diastereoizomérnych solí s rozdielnymi NMR signálmi.[24,25]

Alternatívne možno enantioméry rozlíšiť pomocou chirálnych posunových činidiel, ktoré s nimi tvoria nekovalentné komplexy. Príkladom je tris[3-(heptafluórpropylhydroxymetylén)-(+)-gáfor] európium(III), známe pod skratkou $\text{Eu}(\text{hfc})_3$, ktoré spôsobuje rozdielny chemický posun jednotlivých enantiomérov v dôsledku chirálnej diferenciácie s paramagnetickým centrom.[25]

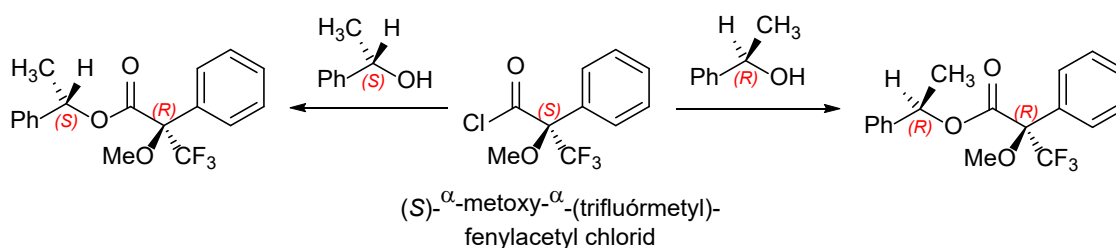


Schéma 3. Derivatizácia chirálneho sekundárneho alkoholu enantiomérmne čistým chloridom Mosherovej kyseliny za vzniku diastereoizomérov.

Enantiomérny nadbytok (% ee, z angl. enantiomeric excess) vyjadruje, o koľko viac je jedného enantioméru v zmesi oproti druhému. Enantiomérny nadbytok je definovaný ako:

$$\% ee(R) = \frac{n_R - n_S}{n_R + n_S} \cdot 100 \%$$

Kde n_R je látkové množstvo (*R*)-enantioméru a n_S je látkové množstvo (*S*)-enantioméru.

Enantiomérny nadbytok (% ee) nadobúda hodnoty od 0 % pre racemickú zmes (50 % každého enantioméru) až po 100 % pre enantiomérmne čistú vzorku (obsahujúcu výhradne jeden enantiómér).

Ak vzorka obsahuje napríklad 80 % majoritného (*R*)-enantioméru a 20 % minoritného (*S*)-enantioméru, enantiomérny nadbytok (*R*)-enantioméru môžeme vyjadriť matematicky nasledovne:

$$\% ee (R)\text{-enantioméru} = \% (R)\text{-enantioméru} - \% (S)\text{-enantioméru} = 80 \% - 20 \% = 60 \%$$

tzn., že (*R*)-enantioméru je v zmesi o 60 % viac ako (*S*)-enantioméru.

Podobný vzťah platí aj pre hodnotu normalizovaných integrálov signálov vodíka (*R*)-enantioméru (I_R) a (*S*)-enantioméru (I_S):[26]

$$\% ee(R) = \frac{I_R - I_S}{I_R + I_S} \cdot 100 \%$$

Rozdiel chemických posunov dvoch enantiomérov sa označuje symbolom $\Delta\delta$. Počiatočný chemický posun analytu je δ . Pridaním CSA dôjde k narušeniu chemického okolia vodíka a teda k zmene chemického posunu. Rozdiel medzi pôvodným a novým chemickým posunom je potom $\Delta\delta$. Ak táto rezonančná línia vykazuje anizotropiu a každý enantiómér poskytne samostatný signál, rozdiel medzi týmito dvoma chemickými posunmi je $\Delta\Delta\delta$.

Hodnota $\Delta\Delta\delta$ však nezaručuje úplnú diferenciáciu rezonančných línii, pretože mnohé z nich majú charakter multipletu, čo často vedie k ich prekryvu.[25]

Ukázalo sa, že enantiorezolučný kvocient E je lepším ukazovateľ toho, ako dobre sa dajú enantioméry v NMR rozlíšiť, než sledovanie rozdielu ich chemických posunov $\Delta\Delta\delta$: [25]

$$E = \frac{|\Delta\Delta\delta|}{3W}$$

Kde W je šírka rezonancie v jednej desatine jej výšky.

Hodnota E je spoľahlivejším ukazovateľom ako $\Delta\Delta\delta$, pokiaľ ide o to, či sú dva multiplety úplne oddelené alebo sa v NMR spektre stále prekrývajú. Platí:

- $E = 0$ žiadna enantiodiferenciácia
- $0 < E < 1$ čiastočná enantiodiferenciácia
- $E \cong 1$ stredná enantiodiferenciácia
- $E \gg 1$ vysoká enantiodiferenciácia

4.1.2 Stanovenie enantiomérmeho nadbytku pomocou Bull-Jamesovej sústavy

Stanovenie enantiomérmeho nadbytku sekundárneho amínu možno uskutočniť pomocou chirálneho derivatizačného činidla na báze kyseliny 2-formylfenylborónovej (FPBA) a (*R*)-(+)-1,1'-bi(2-naftolu) [(*R*)-BINOL]. Tieto zlúčeniny tvoria chirálny boronátový ester, ktorý následne reaguje s chirálnym amínom, ako je α -metylbenzylamín (MBA), za vzniku dvojice diastereoizomérnych imínov (Schéma 4).

V aprotických rozpúšťadlách je výsledný komplex stabilizovaný koordináciou voľného elektrónového páru dusíka do prázdneho *p*-orbitálu bóru. Tento prístup, známy ako Bullova–Jamesova sústava (Bull–James assembly), predstavuje trojzložkovú chirálnu derivatizáciu a umožňuje stanovenie enantiomérmeho nadbytku nielen chirálnych amínov, ale aj aminoesterov, diolov, aminoalkoholov, diamínov, hydroxykyselín, dikarboxylových kyselín či hydroxylamínov. Výhodou tejto metódy je jej jednoduchosť, nízke náklady a krátky čas analýzy.

Vzhľadom na to, že počas derivatizácie nedochádza ku kinetickej rezolúcii, je pozorovaný diastereoizomérny nadbytok výsledných iminoboronátových esterov priamym ukazovateľom enantiomérmeho nadbytku východiskového chirálneho analytu.[27]

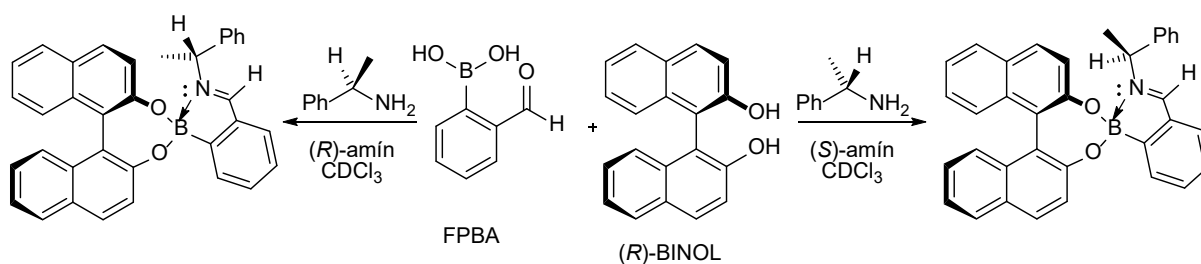
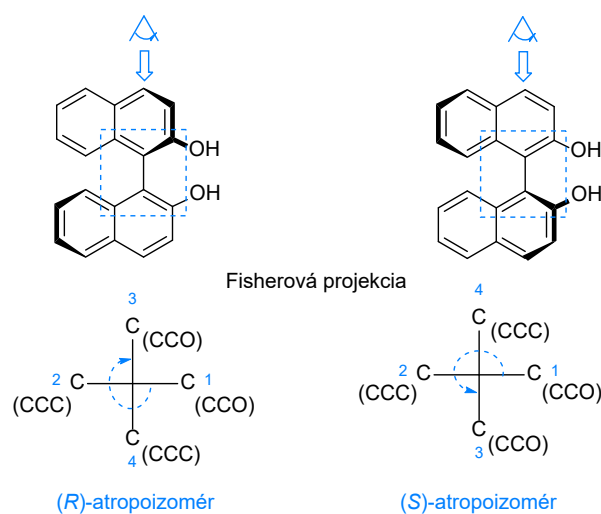


Schéma 4. Tvorba diastereoizomérnych iminoboronátových esterov na stanovenie enantiomérmeho nadbytku chirálneho amínu.

(R)-BINOL neobsahuje chirálny tetraédrický atóm uhlíka, vykazuje však axiálnu chiralitu, ktorá vzniká v dôsledku obmedzenej rotácie okolo jednoduché väzby medzi dvoma naftylovými jednotkami. Táto rotácia je stericky blokovaná, čím vznikajú stabilné atropoizoméry. Konfigurácia týchto izomérov sa označuje deskriptormi (*R*) alebo (*S*) na základe pravidiel Cahn–Ingold–Prelog (CIP) aplikovaných na chirálnu os (Obrázok 19):[28]

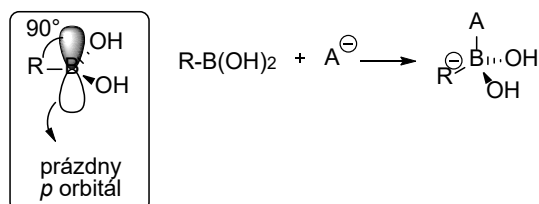
1. Molekulu pozorujeme z jednej strany pozdĺž chirálnej osi, ktorá spája dve aromatické jednotky (tzv. axiálna chiralita).
2. Fischerovu projekciu vytvoríme tak, že dve skupiny bližšie k pozorovateľovi umiestnime na horizontálnu os.
3. Pomocou pravidiel Cahn–Ingold–Prelog (CIP) určíme, ktorá z týchto dvoch skupín má najvyššiu prioritu a označíme číslom 1, druhú označíme číslom 2.
4. Skupinu s vyššou prioritou na zvislej osi označíme číslom 3.
5. Určíme *R/S* konfiguráciu:
 - i. Priorita substituentov korešpondujúca so smerom hodinových ručičiek zodpovedá konfigurácii (*R*).
 - ii. Priorita substituentov korešpondujúca s protismerom hodinových ručičiek zodpovedá konfigurácii (*S*).



Obrázok 19. Stanovenie chiralít a priradenie R/S deskriptorov atropoizomérnych biarylov.

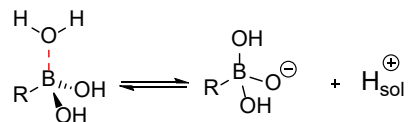
Tento chirálny diol a 2-FPBA vytvárajú stabilný cyklický boronátový ester (Schéma 4).

Borónové kyseliny sú stredne kyslé a reagujú s bázami za vzniku tetraédrických aduktov, pretože centrálny atóm bóru je sp^2 hybridizovaný a elektróndeficitný, má voľný p -orbitál kolmý na rovinu molekuly, vďaka čomu sú borónové kyseliny dobrými Lewisovými kyselinami (Obrázok 20).[29]



Obrázok 20. Štruktúra a reaktivita borónových kyselín ako Lewisových kyselín.

Borónové kyseliny sa koordinujú s vodou. Následnou reakciou vzniká solvatovaný protón a boronátový anión (Obrázok 21).[29]



Obrázok 21. Reakcia medzi vodou a borónovou kyselinou.

Kľúčovým krokom pri stanovení ee v tomto experimente je kondenzácia *o*-formylovej skupiny 2-FPBA s chirálnymi primárnymi amínmi za vzniku diastereoizomérov imínu (Schéma 4).

4.2 Úlohy

- Vytvorenie kalibračnej krivky enantiomérmeho nadbytku chirálnych amínov.**
 - Zostrojte kalibračnú krivku pre (*R*)- α -metylbenzylamín.
- Stanovenie enantiomérmeho nadbytku vzoriek chirálnych primárnych amínov s neznámym ee.**
 - Pomocou zostrojenej kalibračnej krivky stanovte enantiomérmeho nadbytok vzoriek chirálnych amínov.

4.3 Materiál a metódy

Chemikálie				
Názov	Molekulová hmotnosť	Čistota	Množstvo	Bezpečnostné upozornenia
(<i>R</i>)-(+)-1,1'-bi(2-naftol)	286,32 g.mol ⁻¹	99 %	0,07230 g	Dráždivosť kože (kat. 2), H315 Podráždenie očí (kat. 2), H319
kyselina 2-formylfenylborónová	149,94 g.mol ⁻¹	≥95,0 %	0,03946 g	Dráždivosť kože (kat. 2), H315 Podráždenie očí (kat. 2), H319 Toxicita pre špecifický cieľový orgán - jednorazová expozícia (kat. 3), H335
(<i>R</i>)- α -metylbenzylamín	121,18 g.mol ⁻¹	≥99,0 % ee: 96 % (GLC)	33,8 μ l	Akútna toxicita (kat. 4), H302 Akútna toxicita (kat. 4), H312 Žieravosť kože (subkat. 1B), H314 Vážne poškodenie očí (kat. 1), H318
(<i>S</i>)- α -metylbenzylamín	121,18 g.mol ⁻¹	≥98 % ee: 98 % (GLC)	33,6 μ l	Akútna toxicita (kat. 4), H302 Akútna toxicita (kat. 3), H311 Žieravosť kože (subkat. 1B), H314
molekulové sitá 4Å	-	-	-	-
chloroform-d ₁	-	99,8 atom % D	-	Akútna toxicita, (kat. 4), H302 Akútna toxicita, (kat. 3), H331 Dráždivosť kože, (kat. 2), H315 Podráždenie očí, (kat. 2), H319 Karcinogenita, (kat. 2), H351 Reprodukčná toxicita, (kat. 2), H361d Toxicita pre špecifický cieľový orgán - jednorazová expozícia, (kat. 3), H336 Toxicita pre špecifický cieľový orgán - opakovaná expozícia, (kat. 1), H372

Laboratórne pomôcky		
Názov	Počet (ks)	Kapacita/rozsah
sklenená vialka	1	10 ml
automatická pipeta	2	20–200 μ l, 100–1000 μ l
odmerné banky	3	5 ml
NMR kyvety Wilmad	7	Ø 5 mm, pre 600 MHz NMR spektrometer

	Kvantitatívne NMR spektrá
	¹ H NMR
teplota	25 °C
rozpúšťadlo	CDCl ₃
spektrálna šírka [ppm]	–2 až +14
akvizíčný čas [s]	6,0
relaxačná doba [s]	10,0
počet skenov	64

4.4 Experimentálna časť

4.4.1 Príprava zásobných roztokov.

1. Príprava roztoku kyseliny 2-FPBA (50 mmol.dm⁻³) a (*R*)-BINOLu (50 mmol.dm⁻³) v CDCl₃.

V 10 ml kadičke rozpustíme 2-FPBA (39,46 mg) a (*R*)-BINOL (72,30 mg) v CDCl₃ (4 ml). V prípade potreby roztok jemne zahrejeme (napr. pomocou ultrazvukového kúpeľa pri 30 °C počas niekoľkých minút), aby sme zabezpečili úplné rozpustenie látok. Roztok kvantitatívne preniesieme do 5 ml odmernej banky a doplníme CDCl₃ po značku. Následne pridáme aktivované molekulové sitá¹ MS 4Å v takom množstve, aby pokryli dno odmernej banky. Banku uzavrieme a roztok necháme sušiť 10 minút za občasného premiešania.

2. Príprava roztokov enantiomérov (*R*)-MBA (50 mmol.dm⁻³) a (*S*)-MBA (50 mmol.dm⁻³) pre vytvorenie kalibračnej krivky

Do prvej 5 ml odmernej banky napipetujeme enantiomér (*R*)-MBA (33,8 µl) a do druhej enantiomér (*S*)-MBA (33,6 µl) a výsledný objem doplníme CDCl₃ po rysku. Následne pridáme aktivované molekulové sitá¹ MS 4Å v takom množstve, aby pokryli dno odmernej banky. Banku uzavrieme a roztok necháme sušiť 10 minút za občasného premiešania.

4.4.2 Stanovenie enantiomérneho nadbytku chirálnych primárnych amínov pomocou kalibračnej krivky

Pripravíme 7 vzoriek s presnou hodnotou *ee* pre zostrojenie kalibračnej krivky a to tak, že najprv do NMR kyvety napipetujeme (*R*)-MBA a (*S*)-MBA (Tabuľka 9; kapitola 4.4.1; bod 2).²

¹ Aktivované molekulové sitá: sušené 3 h pri 250 °C v muflovej peci za atmosférického tlaku.

² Na zostrojenie kalibračnej krivky postačí 5 bodov.

Následne do kyviek pridáme 0,3 ml chloroformového zásobného roztoku obsahujúceho 2-FPBA a (*R*)-BINOL (kapitola 4.4.1; bod 1). Zásobný chloroformový roztok 2-FPBA a (*R*)-BINOL (0,3 ml) pridáme aj ku vzorke s neznámou hodnotou ee.

Tabuľka 9. Vzorky α -metylbenzylamínu so známym ee pre zostrojenie kalibračnej krivky.

vzorka	ee [%]	(<i>R</i>)-MBA [μ l]	(<i>S</i>)-MBA [μ l]
1	75	263	37
2	50	225	75
3	25	188	112
4	0	150	150
5	-25	112	188
6	-50	75	225
7	-75	37	263
X	?		

4.5 Výsledky a diskusia

4.5.1 Spracovanie NMR spektier v programe MestreNova

NMR spektrá východiskových látok, vzoriek 1–7 a neznámej vzorky spracujeme v programe MestreNova. Spektrá referencujeme voči signálu referenčného činidla TMS (δ_{H} = 0,0 ppm).

4.5.1.1 Referenčné spektrá východiskových látok

Východiskovým krokom pred analýzou derivatizovaných vzoriek bolo nameranie ^1H NMR spektier východiskových zlúčenín v CDCl_3 . Charakteristické signály identifikované v týchto spektrách slúžia ako referenčné chemické posuny v ďalšej analýze:

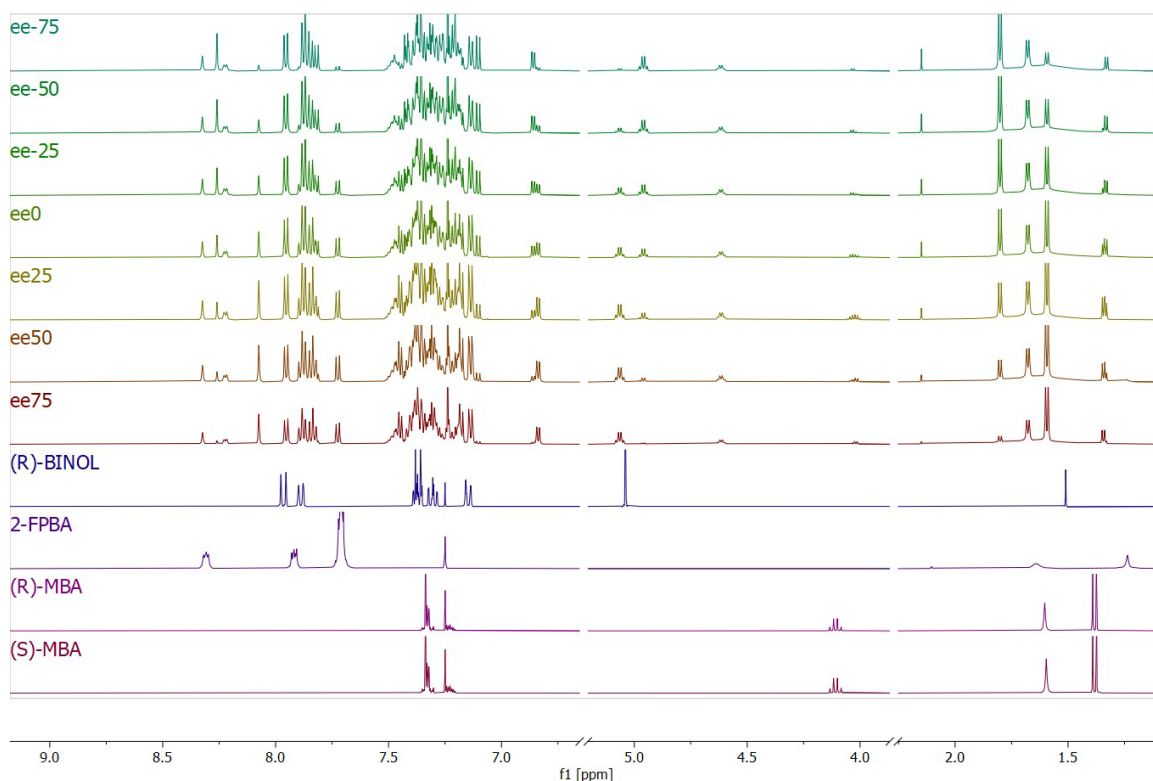
- (*R*)-BINOL: singlet hydroxylových vodíkov s chemickým posunom 5,05 ppm
- 2-FPBA: singlet aldehydového vodíka s chemickým posunom 9,93 ppm
- (*R*)-MBA: kvartet benzylového vodíka s chemickým posunom 4,12 ppm

4.5.1.2 Spektrá derivatizovaných vzoriek

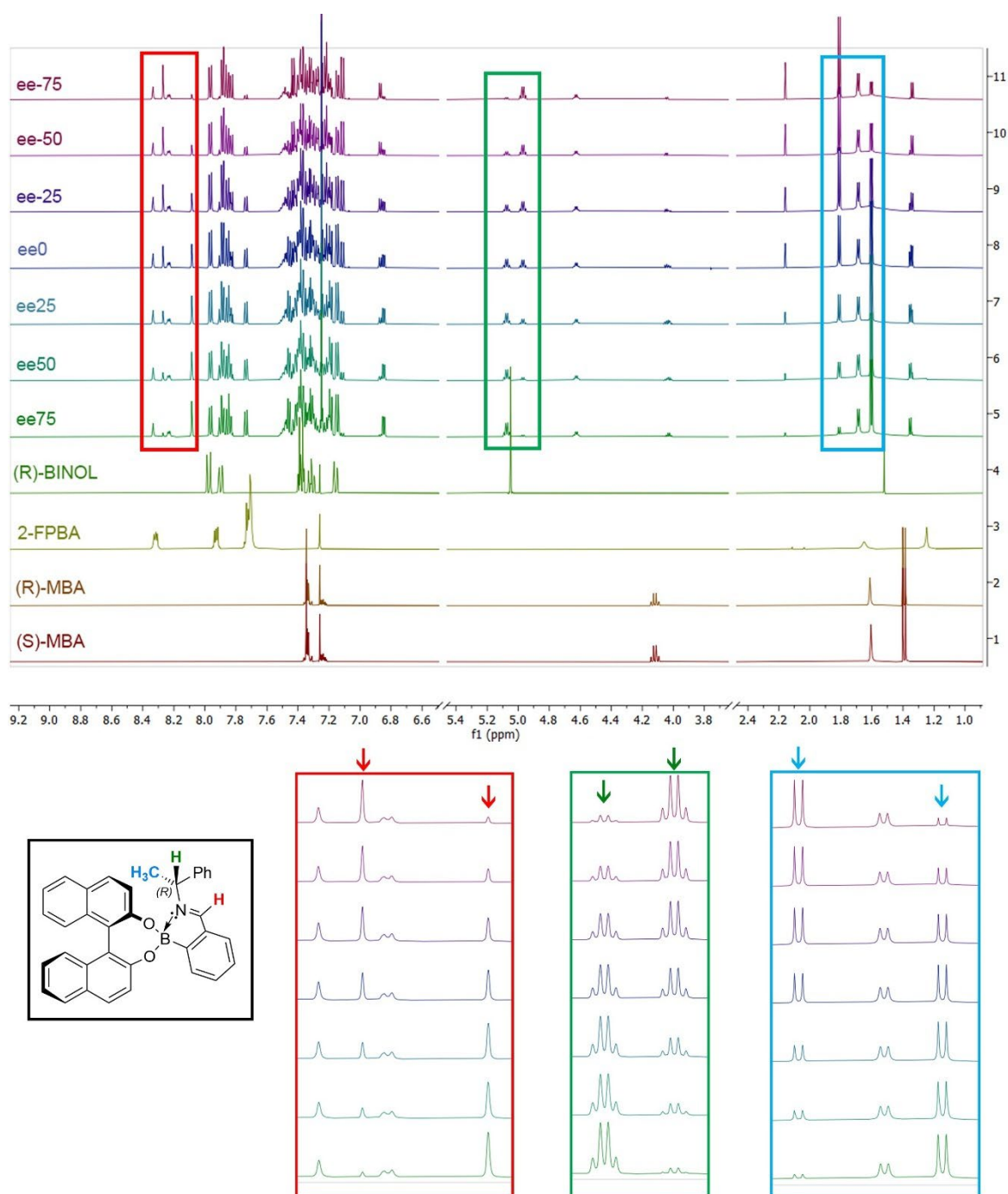
Reakciou primárnych amínov so zmesou obsahujúcou 2-FPBA a (*R*)-BINOL vznikajú diastereoizoméry, ktorých niektoré vodíky vykazujú rozdielne ^1H NMR chemické posuny. V analyzovaných spektrách derivatizovaných vzoriek boli identifikované nasledovné signály:

- **imínový (aldimínový) vodík:**
 - (*S*)-diastereoizomér: singlet, $\delta = 8,28$ ppm (Obrázok 22, Obrázok 23)
 - (*R*)-diastereoizomér: singlet, $\delta = 8,10$ ppm (Obrázok 22, Obrázok 23)
- **benzylový vodík:**
 - (*S*)-diastereoizomér: kvartet, $\delta = 4,98$ ppm (Obrázok 22, Obrázok 23)
 - (*R*)-diastereoizomér: kvartet, $\delta = 5,09$ ppm (Obrázok 22, Obrázok 23)
- **metylový vodík:**
 - (*S*)-diastereoizomér: dublet, $\delta = 1,82$ ppm (Obrázok 22, Obrázok 23)
 - (*R*)-diastereoizomér: dublet, $\delta = 1,61$ ppm (Obrázok 22, Obrázok 23)

Tieto signály sú dostatočne rozlíšené, čo umožňuje ich použitie na kvantitatívnu analýzu a stanovenie enantiomérmeho nadbytku.



Obrázok 22. Porovnanie ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) spektier (*R*)-BINOL-u, 2-FPBA, (*R*)-MBA, (*S*)-MBA a kalibračných vzoriek.



Obrázok 23. Porovnanie ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) spektier kalibračných vzoriek. Farebne sú rozlíšené signály patriace aldimínovému, benzylovému vodíku a metylovým vodíkom.

4.5.2 Kvantitatívna analýza a stanovenie enantiomérmeho nadbytku

Enantiomérmne zloženie derivatizovaných vzoriek bolo vyhodnotené na základe integrácie vybraných signálov v ^1H NMR spektre. Vzhľadom na dobré rozlíšenie signálov imínových vodíkov ($\delta = 8,10$ a $8,28$ ppm) boli tieto signály zvolené ako hlavné analytické parametre na výpočet enantiomérmeho nadbytku ee (Obrázok 23).

Na zabezpečenie porovnateľnosti integrálov medzi jednotlivými spektrami bol ako referenčný signál použitý signál patriaci vodíkom H-4 a H-4' (*R*)-BINOL-u s chemickým posunom 7,97 ppm, ktorého koncentrácia je vo všetkých vzorkách rovnaká. Tomuto signálu bola priradená normalizovaná integrálna hodnota 200 (čo zodpovedá dvom vodíkom, t. j. 100 na 1 vodík). Hodnoty normalizovaných integrálov boli následne spracované v tabuľke programu Excel.

V nasledujúcom texte sa zameriame na vytvorenie kalibračnej krivky a stanovenie enantiomérmeho nadbytku *ee* neznámej vzorky iba na základe integrálnych hodnôt signálov imínových vodíkov.

4.5.2.1 Výpočet enantiomérmeho nadbytku (*ee*)

Experimentálna hodnota *ee* pre každú vzorku bola vypočítaná podľa vzorca (Tabuľka 10):

$$\%ee = \left(\frac{I_R - I_S}{I_R + I_S} \right) \cdot 100 \%$$

kde I_R je integrálna hodnota signálu (*R*)-diastereoizoméru a I_S je integrálna hodnota signálu (*S*)-diastereoizoméru.

Tabuľka 10. Výpočet enantiomérmeho nadbytku *ee* (*R*)-diastereoizoméru na základe integrálnych hodnôt signálov imínových vodíkov ($\delta = 8,10$ a $8,28$ ppm).

teoretický <i>ee</i> (<i>R</i>)-diastereoizoméru [%]	I_S (8,28 ppm)	I_R (8,10 ppm)	$I_R - I_S$	$I_R + I_S$	experimentálny <i>ee</i> (<i>R</i>)-diastereoizoméru [%]
75	14,18	141,23	127,05	155,41	81,75
50	33,74	113,89	80,15	147,63	54,29
25	45,78	104,36	58,58	150,14	39,02
0	64,47	78,63	14,16	143,1	9,90
-25	77,03	59,16	-17,87	136,19	-13,12
-50	92,81	40,22	-52,59	133,03	-39,53
-75	107,34	19,76	-87,58	127,1	-68,91

Na základe údajov (Tabuľka 10) bola zostrojená kalibračná krivka závislosti teoretického enantiomérmeho nadbytku *ee* (os *y*) od experimentálne vypočítaného *ee* (os *x*; Graf 4).

Získaná rovnica regresnej priamky umožňuje späť určiť teoretický *ee* na základe nameraných údajov:

$$y = 1,0078x - 9,1278$$

4.5.2.2 Stanovenie enantiomérmeho nadbytku neznámej vzorky

Pre neznámu vzorku boli z ^1H NMR spektier získané normalizované integrálne hodnoty signálov imínových vodíkov: $I_R = 106,19$ a $I_S = 43,61$. Tieto hodnoty boli použité na stanovenie experimentálneho ee (*R*)-diastereoizoméru:

$$\% ee(R) = \left(\frac{106,19 - 43,61}{106,19 + 43,61} \right) \cdot 100 \% = 41,78 \%$$

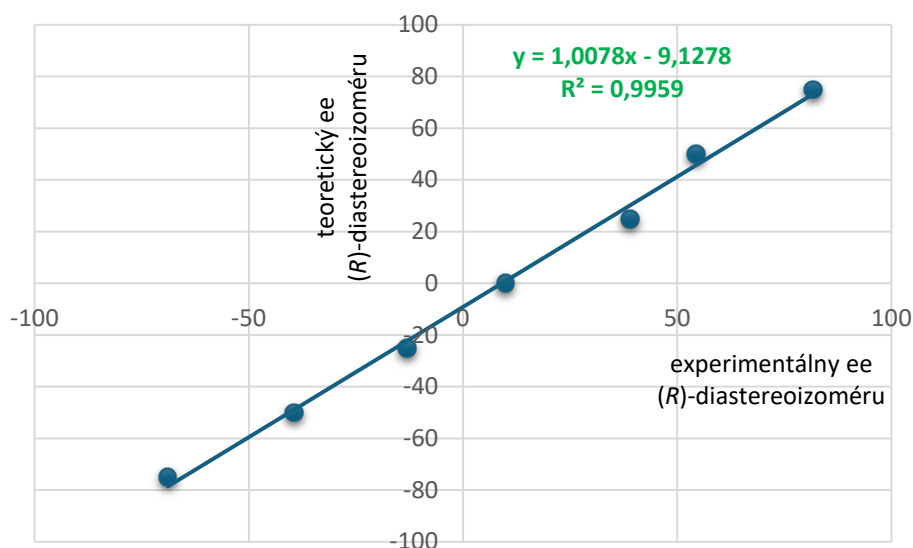
Takto získanú hodnotu ee (*R*)-diastereoizoméru dosadíme do regresnej rovnice:

$$y = 1,0078x - 9,1278$$

$$y = 1,0078 \cdot 41,78 - 9,1278$$

$$y = 32,98 \%$$

Zistená hodnota (32,98 %) enantiomérmeho nadbytku veľmi dobre korešponduje s očakávanou hodnotou 33,3 %, ktorá zodpovedá zloženiu vzorky pripravenej zmiešaním 200 μl (*R*)-MBA a 100 μl (*S*)-MBA.



Graf 4. Kalibračná krivka pre aldimínový vodík, grafická závislosť teoretického enantiomérmeho nadbytku ee od experimentálneho enantiomérmeho nadbytku ee (*R*)-diastereoizoméru.

4.6 Záver

Toto praktické cvičenie umožní študentom prehliť si poznatky z oblasti NMR spektroskopie a chiralítou prostredníctvom derivatizačnej metódy umožňujúcej stanovenie enantiomérmeho nadbytku. Študenti si osvoja princíp tvorby diastereoizomérov a pochopia, ako jemné rozdiely v chemickom prostredí ovplyvňujú ^1H NMR chemické posuny vodíkov.

Na základe analýzy referenčných zlúčenín a derivatizovaných vzoriek sa naučia:

- identifikovať špecifické signály charakteristické pre jednotlivé diastereoizoméry,
- vykonávať kvantitatívnu integráciu signálov v spektre,
- normalizovať integrálne hodnoty vzhľadom na referenčný signál,
- zostrojiť kalibračnú krivku a aplikovať ju pri stanovení enantiomérmeho nadbytku neznámej vzorky.

Praktickým prínosom je osvojenie si analytického prístupu, ktorý kombinuje experimentálne merania s matematickým spracovaním údajov (výpočty, grafická interpretácia, regresná analýza). Študenti tak nadobudnú schopnosti dôležité pre modernú stereoselektívnu syntézu, vývoj chirálnych analytických metód a interpretáciu údajov z NMR spektroskopie – zručnosti, ktoré sú nevyhnutné v chemickom výskume, vývoji liečiv a kvalitnej laboratórnej praxi.

5 VPLYV SUBSTITUENTOV, TEPLoty A ROZPÚŠŤADLA NA KETO-ENOL ROVNOVÁHU 1,3-DIKARBONYLOVÝCH ZLÚČENÍN

5.1 Úvod

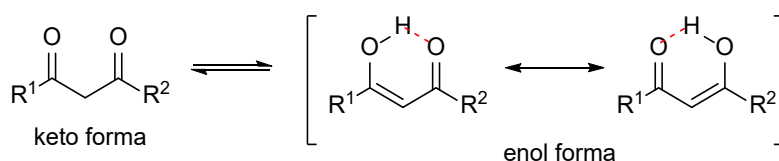
Keto-enol tautoméria je jedným z najdôležitejších rovnovážnych procesov v organickej chémii, ktorý popisuje migráciu vodíka medzi konštitučnými izomérmi a zohráva významnú úlohu v reaktivite a stabilite organických zlúčenín. Ide o špecifický typ chemickej rovnováhy, pri ktorej sa zlúčenina môže nachádzať v dvoch formách, keto forme (obsahujúcej karbonylovú skupinu, $>C=O$) a enol forme (obsahujúcej hydroxylovú skupinu viazanú na uhlík dvojitej väzby, $-C=C-OH$). Tento proces sa nazýva tautomerizácia a uskutočňuje sa presunom vodíka a zmenou polohy dvojitej väzby.

Táto rovnováha je významná najmä v prípade 1,3-dikarbonylových zlúčenín, ktoré majú dve karbonylové skupiny v polohe 1 a 3. 1,3-Dikarbonylové zlúčeniny vykazujú zvýšenú tendenciu k tvorbe enolovej formy v porovnaní s jednoduchými ketónmi, a to vďaka:

- intramolekulovej vodíkovej väzbe (Obrázok 24), ak molekula umožňuje cyklické usporiadanie
- intermolekulovej vodíkovej väzbe (Obrázok 25), najmä pri vyšších koncentráciách v roztoku
- konjugácii enolovej formy, ktorá vedie k energeticky výhodnejšej delokalizácii elektrónov [30]

5.1.1 Keto a enol forma v NMR spektrách

Enol forma má dve konformácie, ktoré sú stabilizované vodíkovou väzbou (Obrázok 24 a Obrázok 25). Ak sú skupiny R^1 a R^2 rovnaké (napr. 2,4-pentándión a dibenzoylmetán) a rýchlosť premeny medzi dvoma konformáciami je vyššia ako NMR časová škála, v NMR spektrách pozorujeme iba jednu sadu signálov patriacich spriemerovanej štruktúre týchto dvoch konformérov (Obrázok 24).[31]

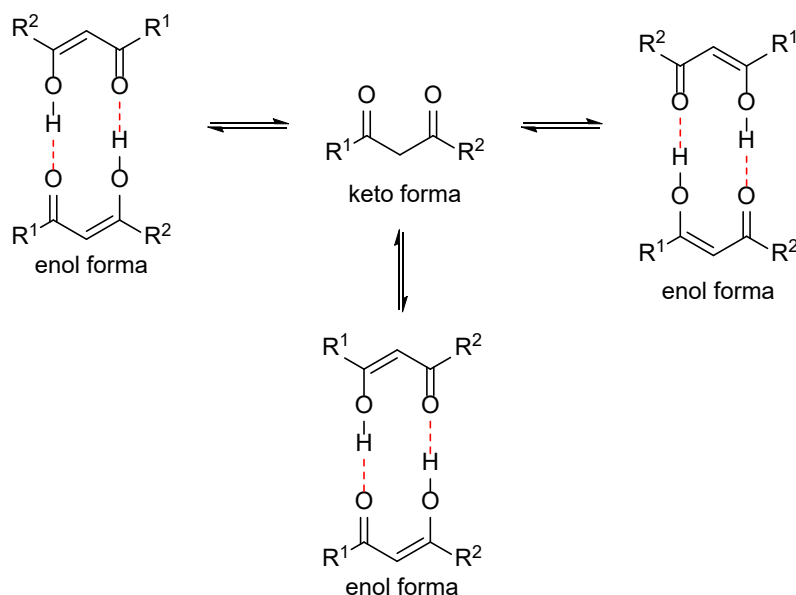


Obrázok 24. Keto-enol tautoméria 1,3-dikarbonylových zlúčenín a vznik intramolekulových vodíkových väzieb.

Rovnovážnu konštantu tautomerizácie K_T vypočítame z integrálnych hodnôt signálov patriacich CH_2 skupine keto formy a CH skupine enol formy (pomer vodíkov týchto dvoch foriem je 2:1):

$$K_T = \frac{[\text{enol}]}{[\text{keto}]} = \frac{I_{\text{CH}}}{\frac{I_{\text{CH}_2}}{2}}$$

Pri vyšších koncentráciách 1,3-dikarbonylových zlúčenín v roztoku môže dôjsť k tvorbe intermolekulových vodíkových väzieb medzi enolovými formami rôznych molekúl (Obrázok 25). Tieto efekty sú výraznejšie v nepolárnych rozpúšťadlách (napr. CDCl_3) a pri zvýšených koncentráciách zlúčeniny.



Obrázok 25. Keto-enol tautóméria 1,3-dikarbonylových zlúčenín a vznik intermolekulových vodíkových väzieb.

5.1.2 Polarita keto a enol formy

Keto tautomér je polárnejší ako enol tautomér, pretože má vyšší dipólový moment μ . Táto vyššia polarita súvisí so štruktúrou keto formy, ktorá obsahuje dve karbonylové skupiny ($\text{C}=\text{O}$). Náboje na karbonylovej skupine sú značne separované. Keďže kyslík je elektronegatívnejším atómom ako uhlík vzniká značný väzbový dipólový moment μ . V porovnaní s enol formou, kde je OH skupina naviazaná na uhlík C_{sp^2} , dochádza k menšej separácii náboja a teda vzniku menšieho väzbového dipólového momentu μ . Výsledkom je

potom vyššia polarita keto formy v porovnaní s enol formou a vyšší podiel keto formy v polárnych rozpúšťadlách.[32]

5.1.3 Faktory ovplyvňujúce keto-enol rovnováhu

1. *Charakter substituentov* [30]

- elektróndonorové skupiny (napr. $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{NH}_2$) zvyšujú stabilitu enolovej formy, pretože dochádza ku konjugácii medzi voľným elektrónovým párom heteroatómu elektróndonorovej skupiny s π -elektrónmi
- elektrónakceptorové skupiny (napr. $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$) stabilizujú keto formu, a destabilizujú enol formu znížením elektrónovej hustoty

2. *Teplota*

- pri vyšších teplotách dochádza k zvýšeniu rýchlosti tautomerizácie, pričom v závislosti od konkrétnej zlúčeniny môže byť preferovaná jedna z foriem
- enolová forma býva často stabilizovaná intramolekulovými vodíkovými väzbami pri nižších teplotách, zatiaľ čo keto forma môže byť dominantná pri vyšších teplotách, najmä ak v rovnováhe dochádza aj ku interakcii s rozpúšťadlom

3. *Rozpúšťadlo*

- vplyv polaritý rozpúšťadiel na podiel keto a enol formy popísal Kurt Meyer a následne mnoho ďalších vedcov [33,34]
- polarita rozpúšťadiel priamo súvisí s ich permitivitou ϵ^3 , ktorá určuje ako veľmi daná látka oslabuje elektrické pole [33]
- polárne molekuly solvujú náboje a tým spôsobujú oslabenie elektrického poľa [33]
- v polárnych protických rozpúšťadlách (napr. voda alebo alkoholy) dominuje keto forma stabilizovaná vznikom vodíkových väzieb s rozpúšťadlom
- v polárnych aprotických (napr. DMSO) dominuje keto forma stabilizovaná vznikom dipól-dipólových interakcií s rozpúšťadlom

³ Permitivita ϵ je fyzikálna vlastnosť materiálu, ktorá opisuje jeho schopnosť oslabiť elektrické pole tienením nábojov. Jednotkou je farad na meter (F/m). Relatívna permitivita (ϵ_r) je pomer absolútnej permitivity ϵ daného materiálu k permitivite vákua ϵ_0 ($\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12}$ F/m). Nazýva sa tiež dielektrická konštanta a vyjadruje, koľkokrát sa elektrické pole zníži v danom prostredí v porovnaní s vákuom. Je to bezrozmerná veličina.

- v nepolárnych rozpúšťadlách (napr. benzén alebo chloroform) dominuje enol forma stabilizovaná vodíkovou väzbou

4. *pH prostredia*

- v kyslom prostredí dochádza k protonácii karbonylovej skupiny, čím sa uľahčuje tvorba enolovej formy
- v zásaditom prostredí je preferovaná deprotonácia α -vodíka, čo vedie k tvorbe enolátu

5. *Vodíkové väzby a intramolekulové interakcie*

- enol forma je stabilizovaná intramolekulovými vodíkovými väzbami, čo posúva rovnováhu v jej prospech

6. *Konjugácia a delokalizácia elektrónov*

- ak je enol forma zapojená do konjugácie s π -elektrónmi, je energeticky výhodnejšia ako keto forma

7. *Sterické faktory*

- prítomnosť objemných substituentov v blízkosti karbonylovej skupiny môže ovplyvniť stabilitu keto alebo enol formy

8. *Prítomnosť kovových iónov alebo komplexných činidiel*

- niektoré kovové ióny môžu preferenčne stabilizovať jednu z tautomérnych foriem tvorbou komplexov

5.1.4 Stanovenie štandardnej Gibbsovej energie

Na kvantitatívne vyjadrenie polohy tautomérskej rovnováhy sa používa rovnovážna konštanta K_T , ktorú možno priamo určiť z ^1H NMR spektier.

Z integrálnych hodnôt signálov zodpovedajúcich metylénovej skupine $-\text{CH}_2-$ keto formy a metínovej skupine $-\text{CH}=\text{}$ enol formy je možné vypočítať štandardnú Gibbsovu energiu ΔG° tautomerizácie:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_T = -RT \ln \frac{[\text{enol}]}{[\text{keto}]} = -RT \ln \frac{I_{\text{CH}}}{\frac{I_{\text{CH}_2}}{2}}$$

Kde R je molárna plynová konštanta ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) a T termodynamická teplota (v K), I_{CH} je integrálna hodnota signálu $-\text{CH}=\text{}$ skupiny enolovej formy a I_{CH_2} je integrálna hodnota

signálu $-\text{CH}_2-$ skupiny keto formy. Faktor 2 v menovateli zohľadňuje, že signál CH_2 skupiny keto formy reprezentuje dva ekvivalentné vodíky, zatiaľ čo CH skupina v enol forme len jeden. Stanovenie ΔG° umožňuje určiť, ktorá forma v rovnováhe prevláda. Ak $\Delta G^\circ < 0$, rovnováha je posunutá v prospech enolovej formy. Ak $\Delta G^\circ > 0$, prevláda keto forma. Čím je vyššia absolútna hodnota ΔG° , tým výraznejšie je posunutie rovnováhy.

5.1.5 Štúdium závislosti tautomérskej rovnovážnej konštanty K_T od teploty, stanovenie zmeny entalpie ΔH° a zmeny entropie ΔS°

Teplotná závislosť chemických rovnováh je kľúčovým aspektom termodynamiky. V prípade tautomerizácie, kde dochádza k výmene medzi dvoma tautomérmi (v našom prípade keto a enol formou), je dôležité študovať, ako sa rovnovážna konštanta K_T mení s teplotou. Tieto informácie nám poskytujú údaje o energetických zmenách spojených s prechodom medzi formami, konkrétne o zmene entalpie ΔH° a entropie ΔS° .

Pre pochopenie tejto závislosti sa často využíva van't Hoffova rovnica, ktorá popisuje teplotnú závislosť rovnovážnej konštanty:

$$\ln K_T = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

kde K_T je rovnovážna konštanta tautomerizácie, ΔH° je zmena štandardnej entalpie reakcie ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$), ΔS° je zmena štandardnej entropie reakcie ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), R je plynová konštanta ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T je termodynamická teplota (v K).

Z tejto rovnice vyplýva, že ak poznáme hodnoty rovnovážnej tautomérskej konštanty K_T pri rôznych teplotách, môžeme pomocou regresie vypočítať ΔH° a ΔS° : [35]

- $\Delta H^\circ > 0$ reakcia je endotermická, rovnováha sa posúva smerom ku enol forme pri zvyšujúcej sa teplote
- $\Delta H^\circ < 0$ reakcia je exotermická, preferovaná je keto forma
- $\Delta S^\circ > 0$ nárast neusporiadanosti (napr. zanikla vodíková väzba)
- $\Delta S^\circ < 0$ zníženie entropie systému, často kvôli stabilizácii keto formy

5.1.6 Stanovenie permitivity (dielektrickej konštanty) zmesi rozpúšťadiel a solvatačnej Gibbsovej energie $\Delta\Delta G^\circ$

Ako už bolo spomenuté vyššie, keto tautomér je polárnejší ako enol tautomér. V polárnejších rozpúšťadlách bude teda rovnováha posunutá smerom ku keto forme. Tento efekt možno pozorovať aj v zmesiach rozpúšťadiel. Na jeho kvantitatívne štúdium sa využíva Onsager-Kirkwoodova teória [32,33], ktorá umožňuje vyhodnotiť vplyv polaritu rozpúšťadla na stabilitu a rozdelenie tautomérov v roztoku.

Pre výpočet Gibbsovej energie je potrebné poznať permitivitu (dielektrickú konštantu) použitej zmesi. Amirjahed a Blake [36] odvodili vzťah pre výpočet efektívnej permitivity ε_r (dielektrickej konštanty) dvojzložkovej zmesi:[33,36]

$$\varepsilon_r = \frac{aX_1 + bX_2}{cX_1 + dX_2}$$

kde index 1 predstavuje menej polárne rozpúšťadlo a index 2 polárnejšie rozpúšťadlo, X_1 a X_2 je mólový podiel rozpúšťadiel. Koeficienty a , b , c , d vypočítame pomocou nasledujúcich vzťahov:[33]

$$a = V_1 \left(\frac{3\varepsilon_1}{\varepsilon_1 + 2} \right)$$

$$b = V_2 \left(\frac{3\varepsilon_2}{\varepsilon_2 + 2} \right)$$

$$c = V_1 \left(\frac{3}{\varepsilon_1 + 2} \right)$$

$$d = V_2 \left(\frac{3}{\varepsilon_2 + 2} \right)$$

kde V_1 a V_2 sú molárne objemy rozpúšťadiel a ε_1 a ε_2 sú dielektrické konštanty jednotlivých rozpúšťadiel.

Tento model nezohľadňuje polaritu rozpustenej látky, preto je potrebné, aby jej koncentrácia bola oveľa nižšia ako koncentrácia rozpúšťadiel.[33]

Onsager-Kirkwoodova teória popisuje interakciu medzi rozpúšťadlom a rozpustenou látkou na základe dipólových momentov μ a permitivity prostredia ε . Dôležitou súčasťou je tzv. Onsager-Kirkwoodov faktor $f(\varepsilon)$:

$$f(\varepsilon) = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1}$$

Tento faktor popisuje polarizovateľnosť prostredia (zmesi rozpúšťadiel) a jeho vplyv na stabilitu molekúl s rôznym dipólovým momentom μ . [32,33]

Teória predpovedá, že posun rovnováhy smerom ku keto alebo enol forme je ovplyvnený dielektrickou konštantou rozpúšťadla ε a dipólovým momentom μ reaktantov a produktov. Na základe tejto teórie je možné vysvetliť ako polárne rozpúšťadlá ovplyvňujú pozíciu rovnováhy a stabilitu polárnych rozpustených látok:

$$\Delta\Delta G^\circ \propto \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1}\right)(\mu_e^2 - \mu_k^2)$$

kde ε je dielektrická konštanta zmesi rozpúšťadiel a μ_e^2 a μ_k^2 sú dipólové momenty enol a keto formy. [32]

Mills a kol. rozšírili Onsager-Kirkwoodovu teóriu o korekčný faktor, ktorý zohľadňuje efekt vodíkových väzieb prostredníctvom faktora k_{HB} . Tento faktor je vyjadrený v závislosti od Kamletových a Taftových parametrov, akceptora β a donora α , a umožňuje odvodiť vzťah pre rozdiel solvatačných Gibbsových energií $\Delta\Delta G^\circ$ tautomérov rôznych zlúčenín. [37,38] V nasledujúcom vzťahu, člen k_s predstavuje rozdiel druhých mocnín dipólových momentov keto a enol formy ($\mu_e^2 - \mu_k^2$):

$$\Delta\Delta G^\circ = k_s \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1}\right) + k_{HB}$$

Z uvedenej rovnice je zrejmé, že medzi polaritou rozpúšťadla (vyjadrenou pomocou Onsager-Kirkwoodovho faktora) a rozdielnou Gibbsovou energiou tautomérov existuje lineárna závislosť. Tento model preto výborne vysvetľuje ako rozpúšťadlo ovplyvňuje stabilitu tautomérov, prečo je v polárnych rozpúšťadlách preferovaná keto forma a ako možno kvantifikovať tieto efekty na základe experimentálnych údajov.

5.2 Úlohy

1. Priradenie chemických posunov vodíkom a atómom uhlíka vybraných 1,3-dikarbonylových zlúčenín pomocou NMR spektroskopie.

2. Stanovenie rovnovážnych konštánt K_T a výpočet štandardných Gibbsových energií ΔG° tautomerizácie 2,4-pentándiónu, benzoylacetónu a dibenzoylmetánu v deuterovaných rozpúšťadlách C_6D_6 , $CDCl_3$, acetón- d_6 a DMSO- d_6 s rôznou polaritou.
3. Štúdium teplotnej závislosti rovnovážnej konštanty K_T tautomerizácie 2,4-pentándiónu, benzoylacetónu a dibenzoylmetánu a stanovenie zmeny entalpie ΔH° a zmeny entropie ΔS° tohto procesu pomocou van't Hoffovej analýzy.
4. Stanovenie rovnovážnych konštánt K_T a výpočet solvatačných Gibbsových energií $\Delta \Delta G^\circ$ tautomerizácie 2,4-pentándiónu v zmesiach deuterovaných rozpúšťadiel $CDCl_3$ a DMSO- d_6 s kontinuálne sa meniacim molárnym pomerom a vypočítanou permitivitou ϵ .

5.3 Materiál a metódy

Chemikálie				
Názov	Molekulová hmotnosť	Čistota	Množstvo	Bezpečnostné upozornenia
2,4-pentándión	100,12 g.mol ⁻¹	≥99 %	36,08 mg	Horľavá kvapalina, (kat. 3), H226 Akútna toxicita, (kat. 4), H302 Akútna toxicita, (kat. 3), H331
benzoylacetón	162,19 g.mol ⁻¹	99 %	15,57 mg	Podľa smernice (ES) č. 1272/2008 nie je nebezpečnou látkou ani zmesou.
dibenzoylmetán	224,25 g.mol ⁻¹	98 %	21,53 mg	Podľa smernice (ES) č. 1272/2008 nie je nebezpečnou látkou ani zmesou.
dimetylsulfoxid- d_6	84,17 g.mol ⁻¹	stupeň deuterácie min. 99,8 %		Podľa smernice (ES) č. 1272/2008 nie je nebezpečnou látkou ani zmesou.
chloroform- d_1	120,38 g.mol ⁻¹	stupeň deuterácie min. 99,95 %		Akútna toxicita, (kat. 4), H302 Akútna toxicita, (kat. 3), H331 Dráždivosť kože, (kat. 2), H315 Podráždenie očí, (kat. 2), H319 Karcinogenita, (kat. 2), H351 Reprodukčná toxicita, (kat. 2), H361d Toxicita pre špecifický cieľový orgán - jednorazová expozícia, (kat. 3), H336 Toxicita pre špecifický cieľový orgán - opakovaná expozícia, (kat. 1), H372
benzén- d_6	84,15 g.mol ⁻¹	stupeň deuterácie min. 99,95 %	1,8 ml	Horľavé kvapaliny, (kat. 2), H225 Dráždivosť kože, (kat. 2), H319 Podráždenie očí, (kat. 2), H319 Mutagenita zárodočných buniek, (kat. 1B), H340 Karcinogenita, (kat. 1A), H350 Toxicita pre špecifický cieľový orgán - opakovaná expozícia, (kat. 1), H372 Aspiračná nebezpečnosť, (kat. 1), H304
acetón- d_6	64,12 g.mol ⁻¹	stupeň deuterácie min. 99,9 %	1,8 ml	Horľavé kvapaliny, (kat. 2), H225 Podráždenie očí, (kat. 2), H319 Toxicita pre špecifický cieľový orgán - jednorazová expozícia, (kat. 3), H336

Laboratórne pomôcky		
Názov	Počet (ks)	Kapacita/rozsah
sklenené pipety	5	1,0 ml
automatické pipety	3	1–10 μ l, 1–1000 μ l
NMR kyvety Wilmad	7	$\varnothing$ 5 mm, pre 600 MHz NMR spektrometer

	NMR spektrá	
	^1H NMR	^{13}C NMR
teplota	25 °C	
rozpúšťadlo	podľa úlohy	
spektrálna šírka [ppm]	–1 až +18	–10 až +240
akvizičný čas [s]	5,0	1,0
relaxačná doba [s]	5,0	3,0
počet skenov	32	1 000

5.4 Experimentálna časť

5.4.1 Príprava vzoriek na analýzu pre úlohu 1–3

Z každej 1,3-dikarbonylovej zlúčeniny pripravíme do NMR kyviat 4 vzorky s koncentráciou 0,04 M v štyroch deuterovaných rozpúšťadlách, pričom objem pripravených roztokov bude 0,6 ml. Nameriame 1D a 2D NMR spektrá, ktoré budú použité pre presné stanovenie chemických posunov keto a enol foriem (úloha 1) a tiež kvantitatívne ^1H NMR spektrum pre stanovenie rovnovážnych konštánt K_T tautomerizácie (úloha 2). Vzorky všetkých štyroch 1,3-dikarbonylových zlúčenín v CDCl_3 použijeme pre stanovenie teplotnej závislosti rovnovážnej konštanty K_T (úloha 3), pričom po každej zmene teploty počkáme 15 minút, aby došlo k ustáleniu rovnováhy a až potom nameriame kvantitatívne ^1H NMR spektrum.

5.4.2 Príprava vzoriek na analýzu pre úlohu 4

Pripravíme sériu zmesí deuterovaných rozpúšťadiel $\text{DMSO-d}_6/\text{CDCl}_3$ s mólovými pomermi 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10, pričom celkový objem každej zmesi bude 0,6 ml. Do každej zmesi pridáme 2,4-pentándión tak, aby výsledná koncentrácia látky vo vzorke bola 0,04 M. Vzorky dôkladne premiešame a použijeme na meranie kvantitatívnych ^1H NMR spektier.

5.5 Výsledky a diskusia

5.5.1 Priradenie chemických posunov vodíkom a atómom uhlíka vybraných 1,3-dikarbonylových zlúčenín pomocou NMR spektroskopie

Na základe ^1H a ^{13}C NMR spektier (600 MHz a 151 MHz) boli priradené signály vodíkom a uhlíkom 2,4-pentándiónu, benzoylacétónu a dibenzoylmetánu v deuterovaných rozpúšťadlách rôznej polarizácie (Tabuľka 11). U každej zo študovaných zlúčenín boli v ^1H NMR spektrách pozorované keto aj enol formy, avšak v rôznych pomeroch, preto sú v Tabuľke 11 pre niektoré rozpúšťadlá uvedené iba ^1H NMR chemické posuny. Keto a enol formy sa líšili typickými signálmi patriacimi metylénovej skupine CH_2 keto formy (nižší chemický posun) a metínovej skupine CH enol formy (vyšší chemický posun). Hodnoty ich chemických posunov sa menili v závislosti od substitúcie (aryl vs. alkyl) a polarizácie prostredia.

Tabuľka 11. ^1H (600 MHz) a ^{13}C NMR (151 MHz) chemické posuny (δ , ppm) keto a enol foriem 2,4-pentándiónu, benzoylacetónu a dibenzoylmetánu v deuterovaných rozpúšťadlách.

CDCl ₃		DMSO-d ₆	
Keto forma	Enol forma	Keto forma	Enol forma
Acetón-d ₆		Benzén-d ₆	
Keto forma	Enol forma	Keto forma	Enol forma

5.5.2 Stanovenie rovnovážnych konštánt K_T a výpočet štandardných Gibbsových energií ΔG° tautomerizácie 2,4-pentándiónu, benzoylacetónu a dibenzoylmetánu v deuterovaných rozpúšťadlách C₆D₆, CDCl₃, acetón-d₆ a DMSO-d₆ s rôznou polaritou

Na základe analýzy integrálnych hodnôt signálov prislúchajúcich CH₂ skupine (keto forma) a CH skupine (enol forma) v ^1H NMR spektrách bola pre každú zlúčeninu v štyroch deuterovaných rozpúšťadlách (C₆D₆, CDCl₃, acetón-d₆ a DMSO-d₆) vypočítaná rovnovážna konštanta tautomerizácie K_T a následne aj štandardná Gibbsova energia reakcie ΔG° . Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcich tabuľkách (Tabuľky 12–14), kde sú uvedené aj príslušné hodnoty permitivity ϵ rozpúšťadiel[39] a ich dipólové momenty μ .

Tabuľka 12. Rovnovážne konštanty tautomerizácie K_T a štandardné Gibbsove energie ΔG° pre 2,4-pentándión (0,04 M) vo vybraných deuterovaných rozpúšťadlách pri teplote 25 °C.

Rozpúšťadlo	Permitivita ϵ [39]	Dipólový moment μ [D]	I_{CH2}	I_{CH}	K_T	ΔG° [J.mol ⁻¹]
C ₆ D ₆	2,3	0	21,94/2	100,0	18,23	-7196,4
CDCl ₃	4,8	1,11	33,20/2	100,0	12,05	-6169,6
Acetón-d ₆	20,7	3,11	39,66/2	100,0	10,09	-5728,9
DMSO-d ₆	46,7	3,9	150,88/2	100,0	2,65	-2416,8

Tabuľka 13. Rovnovážne konštanty tautomerizácie K_T a štandardné Gibbsove energie ΔG° pre benzoylacetón (0,04 M) vo vybraných deuterovaných rozpúšťadlách pri teplote 25 °C.

Rozpúšťadlo	Permitivita ϵ [39]	Dipólový moment μ [D]	I_{CH2}	I_{CH}	K_T	ΔG° [J.mol ⁻¹]
C ₆ D ₆	2,3	0	2,34/2	100,0	170,94	-12 744,4
CDCl ₃	4,8	1,11	15,78/2	100,0	25,35	-8013,3
Acetón-d ₆	20,7	3,11	11,71/2	100,0	34,16	-8752,8
DMSO-d ₆	46,7	3,9	52,75/2	100,0	7,58	-5021,8

Tabuľka 14. Rovnovážne konštanty tautomerizácie K_T a štandardné Gibbsove energie ΔG° pre dibenzoylmetán (0,04 M) vo vybraných deuterovaných rozpúšťadlách pri teplote 25 °C.

Rozpúšťadlo	Permitivita ϵ [39]	Dipólový moment μ [D]	I_{CH2}	I_{CH}	K_T	ΔG° [J.mol ⁻¹]
C ₆ D ₆	2,3	0	2,37/2	100,0	168,78	-12 712,8
CDCl ₃	4,8	1,11	2,34/2	100,0	170,94	-12 744,4
Acetón-d ₆	20,7	3,11	3,73/2	100,0	107,24	-11 588,6
DMSO-d ₆	46,7	3,9	15,67/2	100,0	25,53	-8030,7

Z údajov v tabuľkách vyplýva, že pre všetky tri skúmané zlúčeniny platí, že rovnovážna konštanta K_T klesá so zvyšujúcou sa permitivitou ϵ rozpúšťadla, t. j. rovnováha sa posúva smerom ku keto forme v polárnejších rozpúšťadlách. Tomu zodpovedá aj zvýšenie hodnoty ΔG° (menej záporná hodnota) v polárnejších rozpúšťadlách, čo indikuje menšiu termodynamickú výhodnosť enol formy. V nepolárnom prostredí (C₆D₆ a CDCl₃) prevažuje enolová forma, najmä pri benzoylacetóne a dibenzoylmetáne, zatiaľ čo v DMSO-d₆ je rovnováha výrazne posunutá ku keto forme.

Z výsledkov vyplýva, že tautomerizačná rovnováha je výrazne ovplyvnená polaritou prostredia, čo je v súlade s teóriou solvatácie. Hodnoty Gibbsovej energie ΔG° sú vyššie (menej záporné), teda rovnováha je posunutá na stranu keto formy a enol forma je menej výhodnou pri

prechode k polárnejším rozpúšťadlám. Táto závislosť reflektuje skutočnosť, že keto forma má vyšší dipólový moment μ , a preto je v polárnych rozpúšťadlách energeticky stabilnejšia.

5.5.3 Štúdium teplotnej závislosti rovnovážnej konštanty K_T tautomerizácie 2,4-pentándiónu, benzoylacetónu a dibenzoylmetánu a stanovenie zmeny entalpie ΔH° a zmeny entropie ΔS° tohto procesu pomocou van't Hoffovej analýzy

Na objasnenie vplyvu teploty na polohy tautomerizačnej rovnováhy boli pre zlúčeniny 2,4-pentándión, benzoylacetón a dibenzoylmetán namerané ^1H NMR spektrá v CDCl_3 pri piatich rôznych teplotách (25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C a 45 °C). Z pomeru integrálnych intenzít signálov prislúchajúcich enolovej (CH) a keto (CH_2) forme bola vypočítaná rovnovážna konštanta K_T pre každú teplotu.

Pre každú zlúčeninu bol zostrojený van't Hoffov graf, kde na os y bola vynesená hodnota $\ln K_T$ a na os x prevrátená hodnota termodynamickej teploty $1/T$. Vyjadrením lineárnej regresie v tvare:

$$\ln K_T = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

bolo možné získať hodnoty zmeny entalpie ΔH° a zmeny entropie ΔS° pomocou vzťahov:

$$\Delta H^\circ = -R \cdot \text{smernica}$$

$$\Delta S^\circ = R \cdot y_{\text{priesečník}}$$

Vzhľadom na relatívne úzky teplotný rozsah (25–45 °C) predpokladáme, že zmena entalpie ΔH° a zmena entropie ΔS° sú teplotne nezávislé. Preto sa hodnoty týchto termodynamických parametrov určujú lineárnou regresiou zo závislosti $\ln K_T$ od $1/T$, pričom pre každý skúmaný systém získavame jednu hodnotu ΔH° a ΔS° platnú v danom teplotnom intervale.

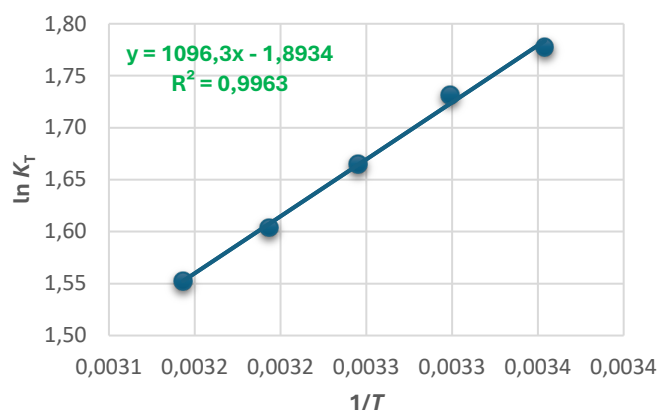
1. 2,4-Pentándión

Rovnovážna konštanta K_T so zvyšujúcou sa teplotou klesá (Tabuľka 15), čo naznačuje, že enolová forma je stabilnejšia pri nižších teplotách. Van't Hoffovou analýzou sme získali hodnotu zmeny entalpie $\Delta H^\circ = -9114,6 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ a hodnotu zmeny entropie $\Delta S^\circ = -15,7 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ (Tabuľka 15, Graf 5).

Negatívna hodnota entalpie poukazuje na to, že tautomerizácia na enolovú formu je exotermická, zatiaľ čo záporná hodnota zmeny entropie indikuje zníženie neusporiadanosti systému. Zníženie neusporiadanosti systému je pravdepodobne zapríčinené vznikom intramolekulových vodíkových väzieb enol formy.

Tabuľka 15. Teplotná závislosť rovnovážnej konštanty K_T tautomerizácie 2,4-pentándiónu (0,04 M) v $CDCl_3$.

Teplota (°C)	Teplota (K)	I_{CH}	I_{CH2}	K_T	$1/T$	$\ln K_T$	R (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔH° (J.mol ⁻¹)	ΔS° (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
25	298,15	100	16,91	5,9154	0,0034	1,7776	8,314	-9114,6382	-15,7417
30	303,15	100	17,70	5,6497	0,0033	1,7316			
35	308,15	100	18,92	5,2854	0,0032	1,6650			
40	313,15	100	20,11	4,9727	0,0032	1,6040			
45	318,15	100	21,18	4,7226	0,0031	1,5523			



Graf 5. Van't Hoffov graf pre 2,4-pentándión v $CDCl_3$.

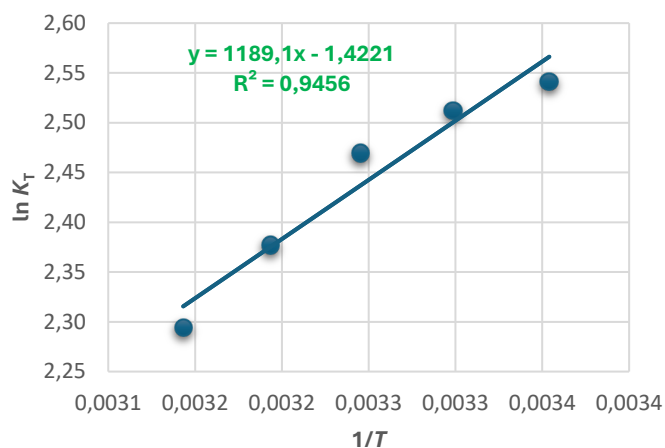
2. Benzoylacetón

Aj pri benzoylacetóne je zrejma klesajúca tendencia rovnovážnej tautomerizačnej konštanty K_T so zvyšujúcou sa teplotou (Tabuľka 16). Z hodnoty zmeny entalpie ($\Delta H^\circ = -9886,2 \text{ J.mol}^{-1}$) je zrejme, že aj tento proces je exotermický a so zvyšujúcou sa teplotou sa rovnováha posúva na stranu keto formy. Na druhej strane je však proces, rovnako ako v prvom prípade, entropicky nevýhodný⁴ ($\Delta S^\circ = -11,8 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) (Tabuľka 16, Graf 6).

⁴ Klesajúca zmena entropie ΔS° prispieva k zvýšeniu zmeny Gibbsovej energie ΔG° ($\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$).

Tabuľka 16. Teplotná závislosť rovnovážnej konštanty K_T tautomerizácie benzoylacetónu (0,04 M) v $CDCl_3$.

Teplota (°C)	Teplota (K)	I_{CH}	I_{CH2}	K_T	$1/T$	$\ln K_T$	R (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔH° (J.mol ⁻¹)	ΔS° (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
25	298,15	100	7,8750	12,6984	0,0034	2,5415	8.314	-9886,1774	-11,8233
30	303,15	100	8,1100	12,3305	0,0033	2,5121			
35	308,15	100	8,4650	11,8133	0,0032	2,4692			
40	313,15	100	9,2800	10,7759	0,0032	2,3773			
45	318,15	100	10,0850	9,9157	0,0031	2,2941			

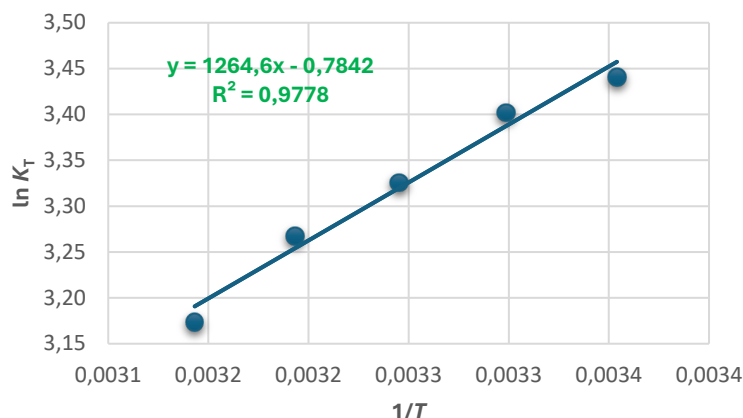
**Graf 6.** Van't Hoffov graf pre benzoylacetón v $CDCl_3$.

3. Dibenzoylmetán

Pre dibenzoylmetán je pokles K_T s teplotou ešte výraznejší (Tabuľka 17). Vyššia absolútna hodnota zmeny entalpie ($\Delta H^\circ = -10\,513,9 \text{ J.mol}^{-1}$) oproti 2,4-pentándiónu ($\Delta H^\circ = -9114,6 \text{ J.mol}^{-1}$) ako aj benzoylacetónu ($\Delta H^\circ = -9886,2 \text{ J.mol}^{-1}$) naznačujú vyššiu energetickú výhodnosť enol formy, čo súvisí s delokalizáciou π -elektrónov a stabilizáciou konjugovaného systému. Aj v tomto prípade je proces spojený so znížením entropie systému ($\Delta S^\circ = -6,5 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) v dôsledku tvorby intramolekulových vodíkových väzieb stabilizujúcich enol formu.

Tabuľka 17. Teplotná závislosť rovnovážnej konštanty K_T tautomerizácie dibenzoylmetánu (0,04 M) v $CDCl_3$.

Teplota (°C)	Teplota (K)	I_{CH}	I_{CH2}	K_T	$1/T$	$\ln K_T$	R (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔH° (J.mol ⁻¹)	ΔS° (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
25	298,15	100	3,2050	31,2012	0,0034	3,4405	8,314	-10513,8844	-6,5198
30	303,15	100	3,3300	30,0300	0,0033	3,4022			
35	308,15	100	3,5950	27,8164	0,0032	3,3256			
40	313,15	100	3,8100	26,2467	0,0032	3,2675			
45	318,15	100	4,1850	23,8949	0,0031	3,1737			



Graf 7. Van't Hoffov graf pre dibenzoylmetán v CDCl_3 .

Porovnanie zmien entalpie ΔH° tautomerizácie študovaných 1,3-diketónov

Zmena entalpie ΔH° tautomerizácie odzrkadľuje energetickú výhodnosť prechodu z keto na enolovú formy. Vo všetkých prípadoch boli pozorované záporné hodnoty ΔH° , čo znamená, že enolová forma je energeticky výhodnejšia než keto forma.

Najnižšia záporná hodnota zmeny entalpie bola vypočítaná pre dibenzoylmetán ($\Delta H^\circ = -10514 \text{ J.mol}^{-1}$), teda jeho enolová forma je najviac stabilizovaná z hľadiska entalpie. Naopak najvyššia záporná hodnota a najnižšia absolútna hodnota zmeny entalpie ($\Delta H^\circ = -9115 \text{ J.mol}^{-1}$) bola pre 2,4-pentándión, čo znamená, že tvorba enol formy je v tomto prípade najmenej exotermická.

Tento fakt možno vysvetliť na základe stabilizačných efektov enol foriem:

- pri arylsubstituovaných 1,3-diketónoch (benzoylacetón a dibenzoylmetán) môže byť enolová forma stabilizovaná rezonanciou, kedy sú π -elektróny karbonylovej skupiny a fenylového jadra delokalizované – tento efekt sa najvýraznejšie prejavuje u dibenzoylmetánu s dvoma fenylovými jadrami
- vo všetkých troch prípadoch dochádza ku vzniku intramolekulej vodíkovej väzby u enol formy, čo je energeticky výhodný proces a prispieva k negatívnej hodnote ΔH°

Pri porovnaní hodnôt zmien entropie pre študované 1,3-dikarbonylové zlúčeniny bol najmenší pokles zmeny entropie ΔS° pozorovaný pre dibenzoylmetán ($\Delta S^\circ = -6,5 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), zatiaľ čo benzoylacetón ($\Delta S^\circ = -11,8 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) a 2,4-pentándión ($\Delta S^\circ = -15,7 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) vykazujú výraznejší pokles. Tento výsledok možno vysvetliť molekulovou flexibilitou a štruktúrou oboch tautomérov.

Dibenzoylmetán obsahuje dve objemné fenylové skupiny, ktoré majú v keto forme stabilné planárne usporiadanie vďaka rozsiahlej π -konjugácii medzi aromatickými kruhmi a karbonylovými skupinami. Táto konjugácia vedie k výraznému zníženiu rotačných a vibračných stupňov voľnosti, čím sa znižuje aj entropia keto formy. Pri prechode na enolovú formu dochádza k väčšej stabilizácii tvorbou intramolekulovej vodíkovej väzby a planárnej štruktúry s delokalizáciou π -elektrónov naprieč celou molekulou. Tento prechod znamená ďalšie zníženie neusporiadanosti systému v porovnaní s keto formou, takže rozdiel entropie medzi už pomerne rigidnou keto formou a enol formou nie je taký výrazný ako v prípade benzoylacetónu a 2,4-pentándiónu.

Výsledná zmena entropie ΔS° teda odzrkadľuje relatívny rozdiel neusporiadanosti medzi enol a keto formou. V prípade dibenzoylmetánu, kde už samotná keto forma je rigidná, je tento rozdiel nižší ako pri flexibilnejšej molekule 2,4-pentándiónu.

5.5.4 Stanovenie rovnovážnych konštánt K_T a výpočet solvatačných Gibbsových energií ΔG° tautomerizácie 2,4-pentándiónu v zmesiach deuterovaných rozpúšťadiel CDCl_3 a DMSO-d_6 s kontinuálne sa meniacim molárnym pomerom a vypočítanou permitivitou ϵ

Pre štúdium vplyvu zloženia zmesi rozpúšťadiel na rovnováhu tautomerizácie 2,4-pentándiónu sme použili deuterované rozpúšťadlá CDCl_3 a DMSO-d_6 s postupne sa meniacim molárnym pomerom týchto dvoch komponentov, a súčasne zmenou polaroty prostredia vyjadrenú pomocou dielektrickej konštanty ϵ , resp. Onsager-Kirkwoodovho faktora $(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1)$.

Výpočet objemov jednotlivých rozpúšťadiel vo vzorkách

Molárny pomer rozpúšťadiel je definovaný ako pomer molárnych zlomkov X jednotlivých rozpúšťadiel vo vzorke:

$$\frac{n_{\text{CDCl}_3}}{n_{\text{DMSO-d}_6}} = \frac{X_{\text{CDCl}_3}}{X_{\text{DMSO-d}_6}}$$

pričom platí:

$$X_{\text{CDCl}_3} + X_{\text{DMSO-d}_6} = 1$$

$$V_{\text{DMSO-d}_6} + V_{\text{CDCl}_3} = 0,6 \text{ ml}$$

Pomocou hustôt ρ a molárnych hmotností M_r rozpúšťadiel sme vyjadrili vzťah medzi objemami a molárnymi zlomkami:

$$\frac{X_{\text{CDCl}_3}}{X_{\text{DMSO-d}_6}} = \frac{\frac{\rho_{\text{CDCl}_3} \cdot V_{\text{CDCl}_3}}{M_{\text{CDCl}_3}}}{\frac{\rho_{\text{DMSO-d}_6} \cdot V_{\text{DMSO-d}_6}}{M_{\text{DMSO-d}_6}}}$$

A následne vzťah pre výpočet objemu CDCl_3 :

$$V_{\text{CDCl}_3} = \frac{0,6 \cdot X_{\text{CDCl}_3} \cdot M_{\text{CDCl}_3} \cdot \rho_{\text{DMSO-d}_6}}{X_{\text{DMSO-d}_6} \cdot M_{\text{DMSO-d}_6} \cdot \rho_{\text{CDCl}_3} + X_{\text{CDCl}_3} \cdot M_{\text{CDCl}_3} \cdot \rho_{\text{DMSO-d}_6}}$$

Objem DMSO-d_6 potom vypočítame:

$$V_{\text{DMSO-d}_6} = 0,6 - V_{\text{CDCl}_3}$$

Výpočty objemov uskutočníme v programe Excel.

Výpočet relatívnej permitivity (dielektrickej konštanty) zmesi

Relatívnu permitivitu ε_r zmesi sme určili pomocou empirického vzťahu:[33]

$$\varepsilon = \frac{aX_{\text{CDCl}_3} + bX_{\text{DMSO-d}_6}}{cX_{\text{CDCl}_3} + dX_{\text{DMSO-d}_6}}$$

Koeficienty a , b , c , d vypočítame pomocou nasledujúcich vzťahov:[33]

$$a = V_{\text{m,CDCl}_3} \left(\frac{3\varepsilon_{\text{CDCl}_3}}{\varepsilon_{\text{CDCl}_3} + 2} \right)$$

$$b = V_{\text{m,DMSO-d}_6} \left(\frac{3\varepsilon_{\text{DMSO-d}_6}}{\varepsilon_{\text{DMSO-d}_6} + 2} \right)$$

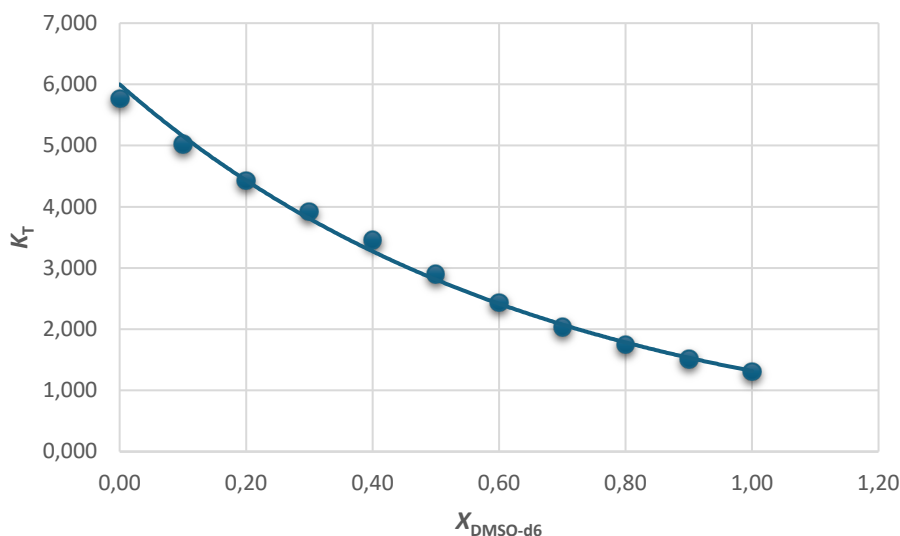
$$c = V_{\text{m,CDCl}_3} \left(\frac{3}{\varepsilon_{\text{CDCl}_3} + 2} \right)$$

$$d = V_{\text{m,DMSO-d}_6} \left(\frac{3}{\varepsilon_{\text{DMSO-d}_6} + 2} \right)$$

Kde $V_{\text{m,CDCl}_3}$ a $V_{\text{m,DMSO-d}_6}$ sú molárne objemy použitých rozpúšťadiel ($V_{\text{m}} = \frac{M_r}{\rho}$) a $\varepsilon_{\text{CDCl}_3}$ a $\varepsilon_{\text{DMSO-d}_6}$ sú relatívne permitivity nedeuterovaných rozpúšťadiel.

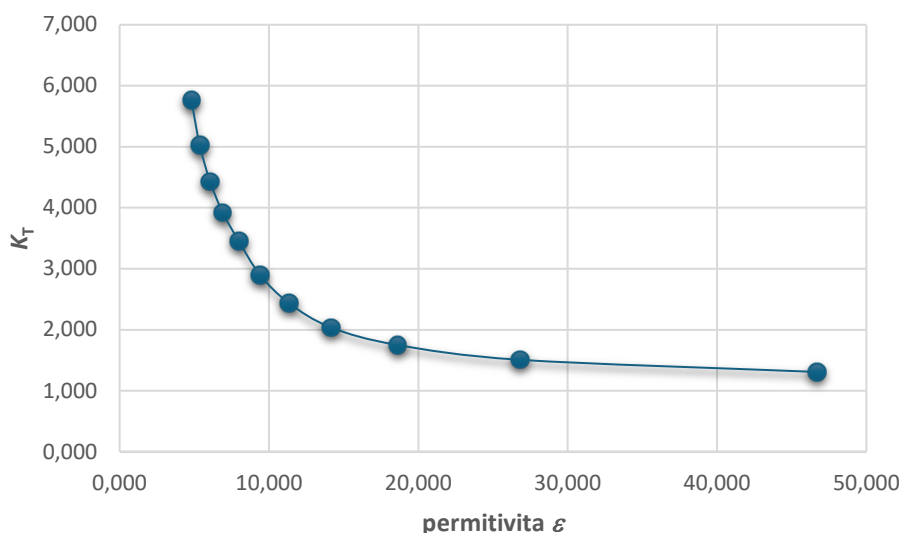
Vplyv polarity študovaných molekúl na celkovú permitivitu zmesi nebudeme brať do úvahy a preto musíme počas daného experimentu zachovať konštantnú koncentráciu študovaných molekúl.

Na objasnenie vplyvu zloženia zmesi rozpúšťadiel na polohu tautomerizačnej rovnováhy boli pre 2,4-pentándión vypočítané rovnovážne tautomerizačné konštanty K_T z pomeru integrálnych intenzít signálov prislúchajúcich enolovej (CH) a keto (CH_2) forme (Tabuľka 18). Analýza ukázala, že zmena pomeru CDCl_3 a DMSO-d_6 v zmesi ovplyvňuje rovnovážnu konštantu tautomerizácie K_T , čo je dôsledkom zmeny polaroty prostredia a interakcií molekúl 2,4-pentándiónu s rozpúšťadlom. Hodnota rovnovážnej konštanty K_T sa znižuje so zvyšujúcim sa podielom polárnejšieho rozpúšťadla DMSO-d_6 , teda rovnováha sa posúva na stranu keto formy (Graf 8). Toto zistenie je v súlade s očakávaním, že polárne rozpúšťadlá stabilizujú keto formu viac ako enolovú formu.



Graf 8. Keto-enol rovnováha ako funkcia zvyšujúceho sa podielu polárnejšieho DMSO-d_6 v zmesi.

Rovnako platí, že so zvyšujúcou sa permitivitou zmesi sa zvyšuje podiel keto formy, čo je opäť v súlade s Meyerovým pravidlom (Graf 9), ktoré môže byť aplikované aj na binárne systémy. Z oboch grafov je zjavné, že s malým nárastom podielu polárnejšieho rozpúšťadla DMSO-d_6 a zároveň aj permittivity ϵ zmesi, výrazne rastie hodnota rovnovážnej konštanty K_T .



Graf 9. Keto-enol rovnováha ako funkcia zvyšujúcej sa permittivity ϵ zmesi.

Podľa teórie Onsagera–Kirkwooda, ktorá opisuje vplyv polarizability prostredia na polarizovateľnosť molekúl, možno vzťah medzi polaritou a solvatačnou Gibbsovou energiou $\Delta\Delta G^\circ$ vyjadriť ako lineárnu závislosť medzi $\Delta\Delta G^\circ$ a faktorom $(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1)$. Táto závislosť bola v rámci experimentu potvrdená lineárnou regresiou získanou z experimentálnych dát. Pre výpočet $\Delta\Delta G^\circ$ bola použitá rovnica (Tabuľka 18):

$$\Delta\Delta G^\circ = -R T \ln K_T$$

Tabuľka 18. Stanovenie rovnovážnych konštánt K_T a výpočet solvatačných Gibbsových energií $\Delta\Delta G^\circ$ tautomerizácie 2,4-pentándiónu v zmesiach deuterovaných rozpúšťadiel CDCl_3 a $\text{DMSO}-d_6$ s kontinuálne sa meniacim molárnym pomerom a vypočítanou permitivitou ϵ .

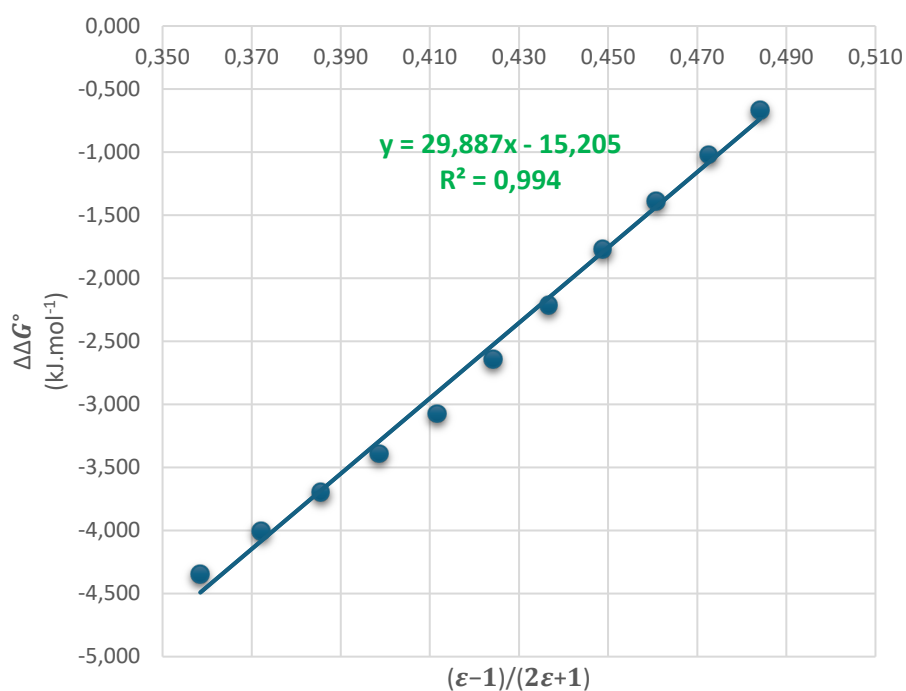
	$X_{\text{DMSO}-d_6}$	X_{CDCl_3}	$V_{\text{DMSO}-d_6}$	V_{CDCl_3}	a	ϵ	I_{CH}	I_{CH_2}	K_T	$\frac{(\epsilon - 1)}{(2\epsilon + 1)}$	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ.mol ⁻¹)
1	1,00	0,00	0,600	0,000	169,948	46,700	1	1,529	1,308	0,484	-0,666
2	0,90	0,10	0,533	0,067		26,819	1	1,327	1,507	0,473	-1,017
3	0,80	0,20	0,467	0,133	b	18,622	1	1,143	1,750	0,461	-1,387
4	0,70	0,30	0,404	0,196	203,479	14,147	1	0,981	2,039	0,449	-1,766
5	0,60	0,40	0,342	0,258		11,329	1	0,82	2,439	0,437	-2,210
6	0,50	0,50	0,281	0,319	c	9,391	1	0,689	2,903	0,424	-2,642
7	0,40	0,60	0,222	0,378	35,406	7,977	1	0,579	3,454	0,412	-3,073
8	0,30	0,70	0,164	0,436		6,899	1	0,51	3,922	0,399	-3,387
9	0,20	0,80	0,108	0,492	d	6,051	1	0,451	4,435	0,386	-3,692
10	0,10	0,90	0,054	0,546	4,357	5,365	1	0,398	5,025	0,372	-4,002
11	0,00	1,00	0,000	0,600		4,800	1	0,347	5,764	0,358	-4,342

Následná lineárna regresia solvatačnej Gibbsovej energie $\Delta\Delta G^\circ$ ako funkcie Onsager-Kirkwoodovho faktora $(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1)$ ukázala veľmi dobrú koreláciu (Graf 10), čo naznačuje, že zmeny v polarite rozpúšťadla významne ovplyvňujú rovnováhu keto-enolovej tautomerizácie.

Zo závislosti vyplýva, že so zvyšujúcou sa permitivitou zmesi (t. j. so zvyšujúcim sa podielom polárneho DMSO- d_6), rastie hodnota Onsager-Kirkwoodovho faktora $(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1)$, a súčasne sa znižuje rovnovážna konštanta K_T . Tento trend odráža preferenciu keto formy v polárnejšom prostredí, pričom $\Delta\Delta G^\circ$ sa stáva negatívnejším, čo znamená, že keto forma je čoraz energeticky výhodnejšia oproti enolovej forme.

Z lineárneho priebehu je zrejmé, že $\Delta\Delta G^\circ$ závisí predovšetkým od polarity prostredia a potvrdzuje použiteľnosť Onsager-Kirkwoodovho modelu pre vysvetlenie solvatačných efektov v systémoch s rovnováhou medzi tautomérmi.

Táto lineárna korelácia zároveň podporuje hypotézu, že rozdiely v dipólových momentoch μ medzi keto a enol formou (tzv. parameter k_s) zohrávajú kľúčovú úlohu pri rozpúšťaní jednotlivých foriem v médiách s rôznou permitivitou. V nepolárnom prostredí (vyšší podiel $CDCl_3$) je stabilizovaná enolová forma, ktorá je menej polárna, zatiaľ čo v DMSO- d_6 sa stabilizuje polárnejšia keto forma.



Graf 10. Závislosť solvatačnej Gibbsovej energie $\Delta\Delta G^\circ$ od Onsager-Kirkwoodovho koeficienta $(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1)$.

Nelineárna regresia experimentálnych údajov pomocou rovnice:

$$\Delta\Delta G^\circ = k_s \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} \right) + k_{\text{HB}}$$

poskytla hodnotu smernice $k_s = 29,89 \text{ kJ.mol}^{-1}$ a priesečník $k_{\text{HB}} = -15,21 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

Smernica k_s vyjadruje vplyv rozdielu druhých mocnín dipólových momentov keto a enol formy na ich stabilitu. Vyššia hodnota k_s naznačuje výrazný rozdiel v polarite medzi tautomérmí, pričom enolová forma je stabilizovaná v prostredí s nižšou permitivitou, zatiaľ čo keto forma v polárnejšom prostredí. Hodnota k_{HB} zohľadňuje špecifické interakcie ako vodíkové väzby a poukazuje na to, že v silne polárnych rozpúšťadlách ako DMSO dochádza k oslabeniu stabilizačných interakcií (intramolekulová vodíková väzba), ktoré zvýhodňujú enol formu. V prostredí s vyšším podielom DMSO intramolekulová vodíková väzba zaniká. Výsledkom je zvýšená stabilita keto formy oproti enol forme. Negatívna hodnota k_{HB} neznamená priamu stabilizáciu keto formy pomocou vodíkových väzieb, ale skôr relatívnu destabilizáciu enol formy v dôsledku zániku intramolekulovej vodíkovej väzby v polárnom prostredí.

5.6 Záver

Toto experimentálne cvičenie umožňuje študentom pochopiť vplyv polarity rozpúšťadiel na rovnováhu keto-enol tautómie prostredníctvom priameho merania rovnovážnych konštánt K_T pomocou NMR spektroskopie. Postupnou zmenou zloženia zmesi dvoch deuterovaných rozpúšťadiel (CDCl_3 a DMSO-d_6) a výpočtom dielektrickej konštanty zmesi si študenti osvoja princíp modulácie chemickej rovnováhy pomocou fyzikálnych vlastností prostredia.

Cvičenie integruje teoretické poznatky z fyzikálnej chémie (rovnováhy, Gibbsova energia, Onsager-Kirkwoodov model) s praktickým zvládnutím analytickej techniky (^1H NMR).

Cvičenie tak poskytuje komplexný pohľad na prepojenie medzi štruktúrou, rozpúšťadlom a termodynamikou chemických rovnováh a rozvíja analytické, technické aj interpretačné schopnosti študentov.

6 LITERATÚRA

- [1] C. Barthel, G. Massiot, C. Lavaud, An easy-to-use and general nuclear magnetic resonance method for the determination of partition coefficients of drugs and natural products, *Magn. Reson. Chem.* 59 (2021) 835–843. <https://doi.org/10.1002/mrc.5159>.
- [2] H. Cumming, C. Rücker, Octanol-Water Partition Coefficient Measurement by a Simple ^1H NMR Method, *ACS Omega* 2 (2017) 6244–6249. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01102>.
- [3] S.K. Bharti, R. Roy, Quantitative ^1H NMR spectroscopy, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 35 (2012) 5–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>.
- [4] J. Dai, L. Jin, S. Yao, L. Wang, Prediction of partition coefficient and toxicity for benzaldehyde compounds by their capacity factors and various molecular descriptors, *Chemosphere* 42 (2001) 899–907. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00181-8).
- [5] A. Siddiqa, A. Tajammal, A. Irfan, M. Azam, M.A. Munawar, R.S. Hardy, M.A.R. Basra, Synthesis, molecular docking, bio-evaluation and quantitative structure activity relationship of new chalcone derivatives as antioxidants, *J. Mol. Struct.* 1277 (2023) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134814>.
- [6] T. Kinoshita, C. Tsunoda, S. Goto, K. Hasegawa, H. Chatani, M. Fujita, H. Kataoka, Y. Katahara, Y. Shimada, Y. Otsuka, K. Komatsu, H. Terada, Enthalpy-Entropy Compensation in the Structure-Dependent Effect of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on the Aqueous Solubility of Diltiazem, *Chem. Pharm. Bull.* 70 (2022) 120–129. <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00834>.
- [7] M. Alimuddin, D. Grant, D. Bulloch, N. Lee, M. Peacock, R. Dahl, Determination of log D via automated microfluidic liquid-liquid extraction, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 5140–5142. <https://doi.org/10.1021/jm8005228>.
- [8] E. V. Anslyn, D.A. Dougherty, *Modern physical organic chemistry*, 2011. <https://doi.org/10.1002/poc.1909>.
- [9] L. Grycová, R. Dommissé, L. Pieters, R. Marek, NMR determination of pK_a values of indoloquinoline alkaloids, *Magn. Reson. Chem.* 47 (2009) 977–981. <https://doi.org/10.1002/mrc.2494>.
- [10] A.D. Gift, S.M. Stewart, P. Kwete Bokashanga, Experimental determination of pK_a

- values by use of NMR chemical shifts, revisited, *J. Chem. Educ.* 89 (2012) 1458–1460. <https://doi.org/10.1021/ed200433z>.
- [11] A. Zivkovic, J.J. Bandolik, A.J. Skerhut, C. Coesfeld, M. Raos, N. Zivkovic, V. Nikolic, H. Stark, Low field nmr determination of pka values for hydrophilic drugs for students in medicinal chemistry, *Magnetochemistry* 3 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry3030029>.
- [12] J.J.H. Ackerman, G.E. Soto, W.M. Spees, Z. Zhu, J.L. Evelhoch, The NMR chemical shift pH measurement revisited: Analysis of error and modeling of a pH dependent reference, *Magn. Reson. Med.* 36 (1996) 674–683. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910360505>.
- [13] B. Šarac, S. Hadži, Analysis of Protonation Equilibria of Amino Acids in Aqueous Solutions Using Microsoft Excel, *J. Chem. Educ.* 98 (2021) 1001–1007. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01144>.
- [14] J. Bezençon, M.B. Wittwer, B. Cutting, M. Smieško, B. Wagner, M. Kansy, B. Ernst, PKa determination by ^1H NMR spectroscopy - An old methodology revisited, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 93 (2014) 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.12.014>.
- [15] D.J. Craik, Substituent Effects on Nuclear Shielding, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(08\)60207-0](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(08)60207-0).
- [16] Y.S. Kara, S. Yalduz, Substituent effect study on the experimental ^{13}C NMR chemical shifts of 3-(substituted phenyl)-3a,4,8,8a-tetrahydro-1,3-dioxepino[5,6-d] [1,2] isoxazoles, *J. Mol. Struct.* 1193 (2019) 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.121>.
- [17] C. Hansch, A. Leo, R.W. Taft, A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters, *Chem. Rev.* 91 (1991) 165–195. <https://doi.org/10.1021/cr00002a004>.
- [18] S. Peng, Y. Zhu, C. Luo, P. Zhang, F. Wang, R. Li, G. Lin, J. Zhang, Chiral drugs: Sources, absolute configuration identification, pharmacological applications, and future research trends, *LabMed Discov.* 1 (2024) 100008. <https://doi.org/10.1016/j.lmd.2024.100008>.
- [19] R.U. McVicker, N.M. O’Boyle, Chirality of New Drug Approvals (2013-2022): Trends and Perspectives, *J. Med. Chem.* 67 (2024) 2305–2320.

- <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c02239>.
- [20] J.S. Fossey, E. V. Anslyn, W.D.G. Brittain, S.D. Bull, B.M. Chapin, C.S. Le Duff, T.D. James, G. Lees, S. Lim, J.A.C. Lloyd, C. V. Manville, D.T. Payne, K.A. Roper, Rapid determination of enantiomeric excess via NMR spectroscopy: A research-informed experiment, *J. Chem. Educ.* 94 (2017) 79–84. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00355>.
- [21] P. Chaudhary, G.D. Yadav, S. Singh, A simple protocol for determination of enantiopurity of amines using BINOL derivatives as chiral solvating agents via ^1H - and ^{19}F -NMR spectroscopic analysis, *RSC Adv.* 12 (2022) 25457–25464. <https://doi.org/10.1039/d2ra05291a>.
- [22] C.M. Puentes, T.J. Wenzel, Phosphated cyclodextrins as water-soluble chiral NMR solvating agents for cationic compounds, *Beilstein J. Org. Chem.* 13 (2017) 43–53. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.6>.
- [23] T.R. Hoye, C.S. Jeffrey, F. Shao, Mosher ester analysis for the determination of absolute configuration of stereogenic (Chiral) carbinol carbons, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 2451–2458. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.354>.
- [24] N.M. Maier, J.A. Zoltewicz, Dynamic equilibration of diastereomeric salts of atropisomers. Proton NMR spectra of 1,8-di(3'-pyridyl)naphthalene in the presence of R-camphorsulfonic acid, *Tetrahedron* 53 (1997) 465–468. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(96\)01058-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(96)01058-7).
- [25] T.J. Wenzel, *Differentiation of Chiral Compounds Using NMR Spectroscopy*, 2018. <https://doi.org/10.1002/9781119324782>.
- [26] B. Plainchont, D. Pitoux, M. Cyrille, N. Giraud, Highly Accurate Quantitative Analysis of Enantiomeric Mixtures from Spatially Frequency Encoded ^1H NMR Spectra, *Anal. Chem.* 90 (2018) 1595–1600. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02411>.
- [27] R.R. Groleau, T.D. James, S.D. Bull, The Bull-James assembly: Efficient iminoboronate complex formation for chiral derivatization and supramolecular assembly, *Coord. Chem. Rev.* 428 (2021) 213599. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213599>.
- [28] Y. Bin Wang, S.H. Xiang, B. Tan, Introduction and Characteristics, *Axially Chiral Compd. Asymmetric Synth. Appl.* (2021) 3–12. <https://doi.org/10.1002/9783527825172.ch1>.
- [29] N. de J. Hiller, N.A. do Amaral e Silva, T.A. Tavares, R.X. Faria, M.N. Eberlin, D. de Luna Martins, Arylboronic Acids and their Myriad of Applications Beyond Organic Synthesis,

- European J. Org. Chem. 2020 (2020) 4841–4877.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.202000396>.
- [30] M. Vakili, V. Darugar, F.S. Kamounah, P. Erik Hansen, M. Hermann, M. Pittelkow, Tautomerism in pyridinyl methyl β -diketones in the liquid and the solid state; a combined computational and experimental study, J. Mol. Liq. 383 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122074>.
- [31] A. Grushow, T.J. Zielinski, Hydrogen bonding using NMR: A new look at the 2,4-pentanedione keto-enol tautomer experiment, J. Chem. Educ. 79 (2002) 707–714.
<https://doi.org/10.1021/ed079p707>.
- [32] P.O. Sandusky, Expansion of the classic acetylacetone physical chemistry laboratory NMR experiment: Correlation of the enol-keto equilibrium position with the solvent dipole moment, J. Chem. Educ. 91 (2014) 739–742.
<https://doi.org/10.1021/ed400583q>.
- [33] C.H. Courtney, V. V. Krishnan, Keto-Enol Tautomerization of Acetylacetone in Mixed Solvents by NMR Spectroscopy. A Physical Chemistry Experiment on the Application of the Onsager-Kirkwood Model for Solvation Thermodynamics, J. Chem. Educ. 97 (2020) 825–830. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00737>.
- [34] T. Tsukahara, K. Nagaoka, K. Morikawa, K. Mawatari, T. Kitamori, Keto-Enol Tautomeric Equilibrium of Acetylacetone Solution Confined in Extended Nanospaces, J. Phys. Chem. B 119 (2015) 14750–14755. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b08020>.
- [35] A.B. Koudriavtsev, W. Linert, Keto-enol equilibrium from NMR data: A closer look at the laboratory experiment, J. Chem. Educ. 86 (2009) 1234–1237.
<https://doi.org/10.1021/ed086p1234>.
- [36] A.K. Amirjahed, M.I. Blake, Deviation of dielectric constant from ideality for certain binary solvent systems, J. Pharm. Sci. 64 (1975) 1569–1570.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600640936>.
- [37] R.W. Taft, M.J. Kamlet, The Solvatochromic Comparison Method. 2. a-Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities, J. Am. Chem. Soc. 98 (1976) 2887–2894.
<https://doi.org/10.1021/ja00418a009>.
- [38] M.J. Kamlet, R.W. Taft, The Solvatochromic Comparison Method. I. The b-Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities, J. Am. Chem. Soc. 98 (1976) 377–

383. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00418a009>.

[39] https://chem.washington.edu/sites/chem/files/documents/facilities/nmrsolventschart_001.pdf, (n.d.).

7 PRÍLOHY

7.1 Prístroje a softvér

Prístrojové a softvérové vybavenie pre realizáciu NMR experimentov:

Prístroj/softvér	Model/Výrobca	Špecifikácia/Parametre
NMR spektrometer	Varian VNMRS 600/ Palo Alto, Kalifornia, USA	^1H: 599,87 MHz ^{13}C: 150,84 MHz - sonda: 5 mm inverzná s detekciou H-X, so z-gradientovou cievkou - teplota: 298,15 K
Centrifúga	BioSan MSC-6000/ Riga, Litva	- rýchlosť: 1000–6000 ot./min - časovač rotácie: 1 s – 30 min - intenzita vortexovania: jemná, stredná, silná - čas vortexovania: 0–20 - regulácia SMS-cyklu: 1–999 cyklov - zvukový signál časovača: áno
pH meter	HI 2211 pH/ORP Meter/ Hanna Instruments, Thajsko	- rozsah pH: 2,0–16,0 - teplotný rozsah: 20–120 °C - presnosť: $\pm 0,01$ pH - kombinovaná pH elektróda HI1330B pre testovacie skúmavky a vialky
Ultrazvukový kúpeľ	EMMI-08STH, EMAG, Nemecko	- objem: 700 ml - ultrazvuk 120 W - časovač: 1–15 min - ohrev: 20–80 °C
Magnetické miešadlo s ohrevom	AREX-6 VELP Scientifica, Taliansko	- keramikou potiahnutá hliníková platňa - teplotný rozsah: do 370 °C - objem miešanej kvapaliny: do 20 l - rýchlosť miešania: 30–1700 ot./min
Vákuová rotačná odparka		
UV lampa so stojanom	UV 240 Krüss Optronic, Nemecko	prepínanie medzi dvomi vlnovými dĺžkami: 366 nm a 254 nm
Softvér MestreNova	MNova v. 15.0.1/ Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španielsko	

7.2 Kalibrácia pH metra

Elektródu opláchnite destilovanou vodou, jemne osušte vatovým tampónom. Na spustenie kalibračného režimu stlačte tlačidlo CAL.

Do kadičky (10 ml) nalejte tlmivý roztok pH 7.01 a umiestnite do neho elektródu. Čakajte, na displeji sa zobrazí blikajúci symbol CFM. Stlačte tlačidlo CFM, čím akceptujete kalibračný bod. Následne vyberte elektródu z tlmivého roztoku, opláchnite destilovanou vodou a jemne osušte vatovým tampónom.

Do kadičky (10 ml) nalejte tlmivý roztok pH 4,01 a umiestnite do neho elektródu. Čakajte, na displeji sa zobrazí blikajúci symbol CFM. Stlačte tlačidlo CFM, čím akceptujete kalibračný bod. Následne vyberte elektródu z tlmivého roztoku, opláchnite destilovanou vodou a jemne osušte vatovým tampónom.

pH meter je pripravený na meranie pH pripravených roztokov.

7.3 Fosfátový tlmivý pufer

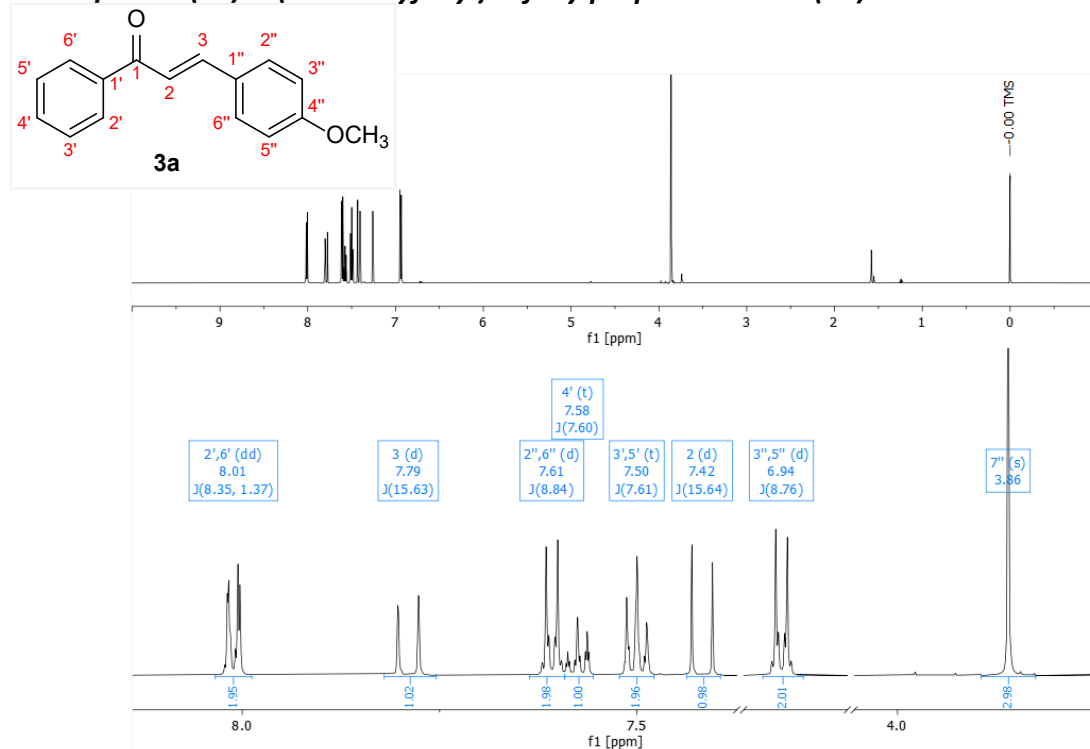
- Príprava 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ roztoku: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,875 g) rozpustíte v destilovanej vode v odmernej banke tak, aby finálny objem roztoku bol 25 ml.
- Príprava 0,2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ roztoku: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,675 g) rozpustíte v destilovanej vode v odmernej banke tak, aby finálny objem roztoku bol 25 ml.
- Príprava 0,1 M fosfátového pufru: Zmiešajte roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ s roztokom $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ podľa tabuľky a doplňte na objem 100 ml.

pH (25 °C)	0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ml)	0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ml)
5,8	0,400	4,600
6,0	0,615	4,385
6,2	0,925	4,075
6,4	1,325	3,675
6,6	1,875	3,125
6,8	2,450	2,550
7,0	3,050	1,950
7,2	3,600	1,400
7,4	4,050	0,950
7,6	4,350	0,650
7,8	4,575	0,425
8,0	4,735	0,265

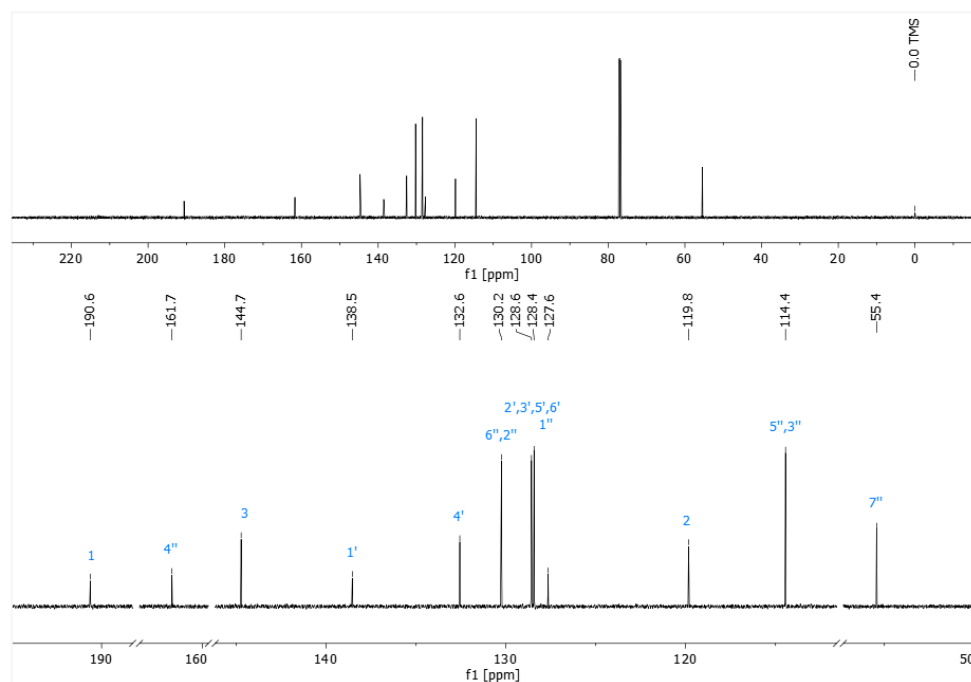
7.4 Vplyv substituentov na ^1H a ^{13}C NMR chemické posuny vybraných atómov chalkónov

7.4.1 NMR spektrá chalkónov 3a–g

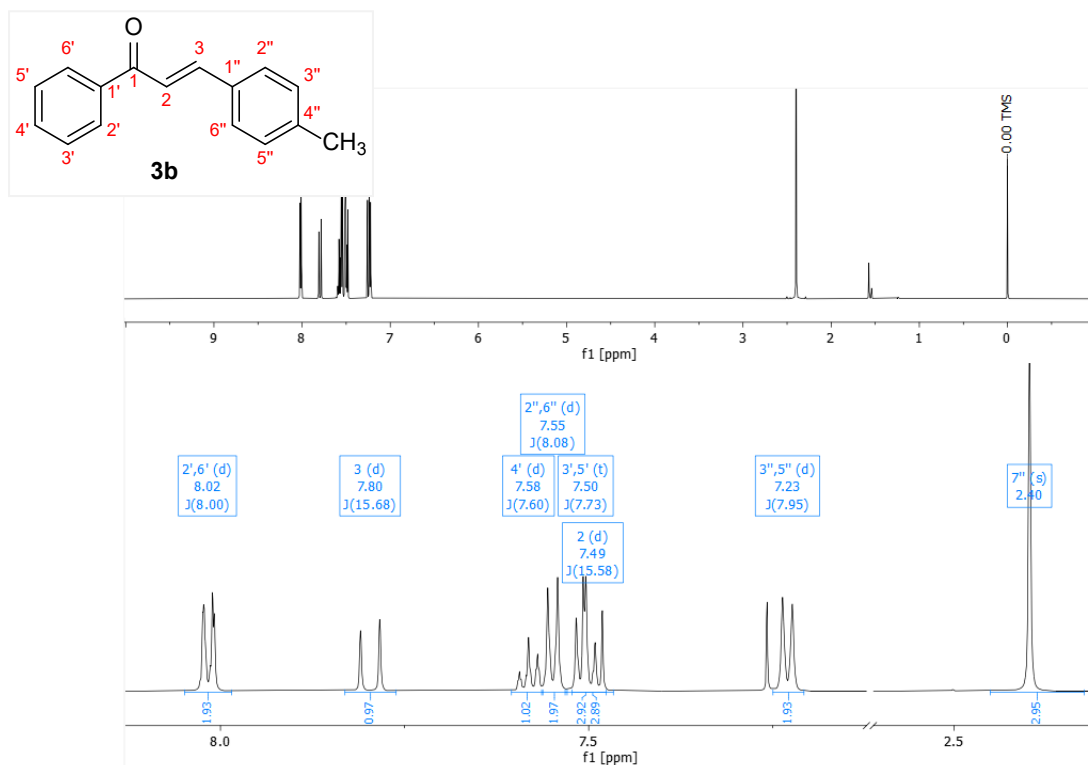
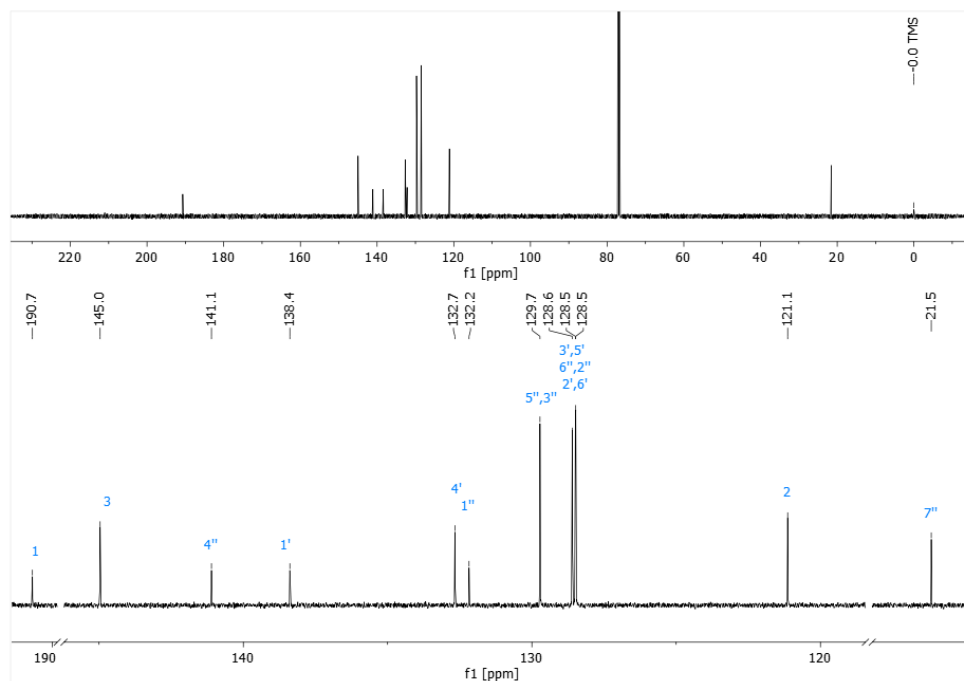
NMR spektrá (2E)-3-(4-metoxyfenyl)-1-fenylprop-2-én-1-ónu (3a)

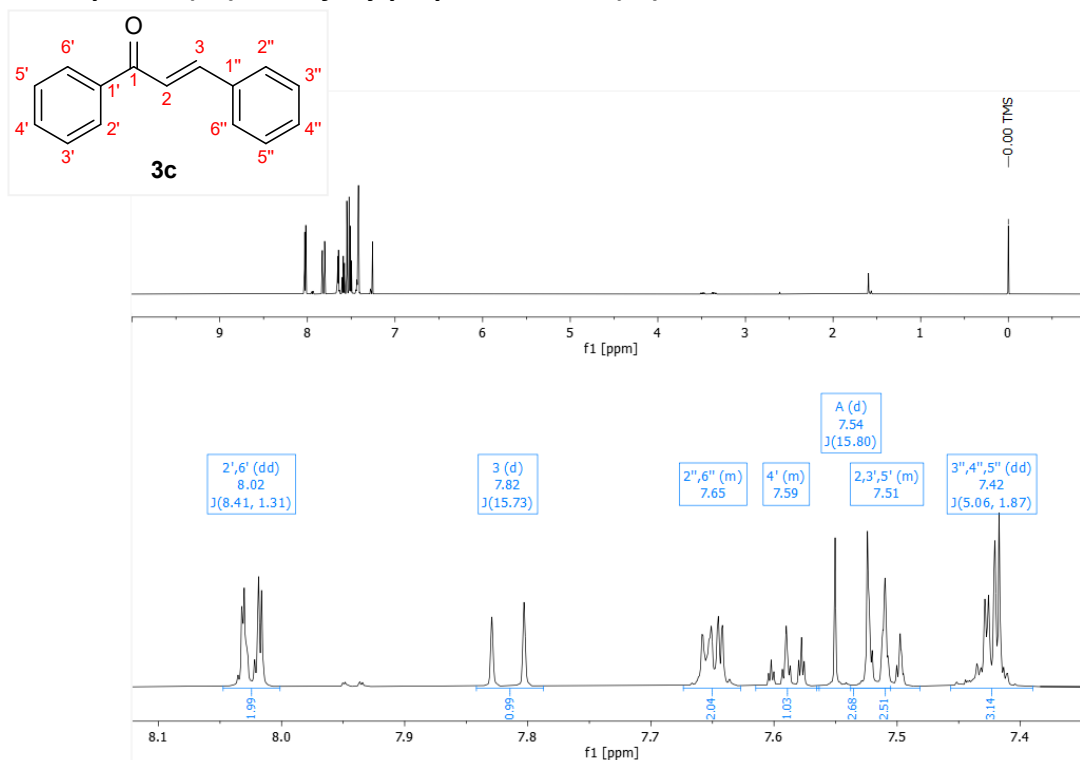
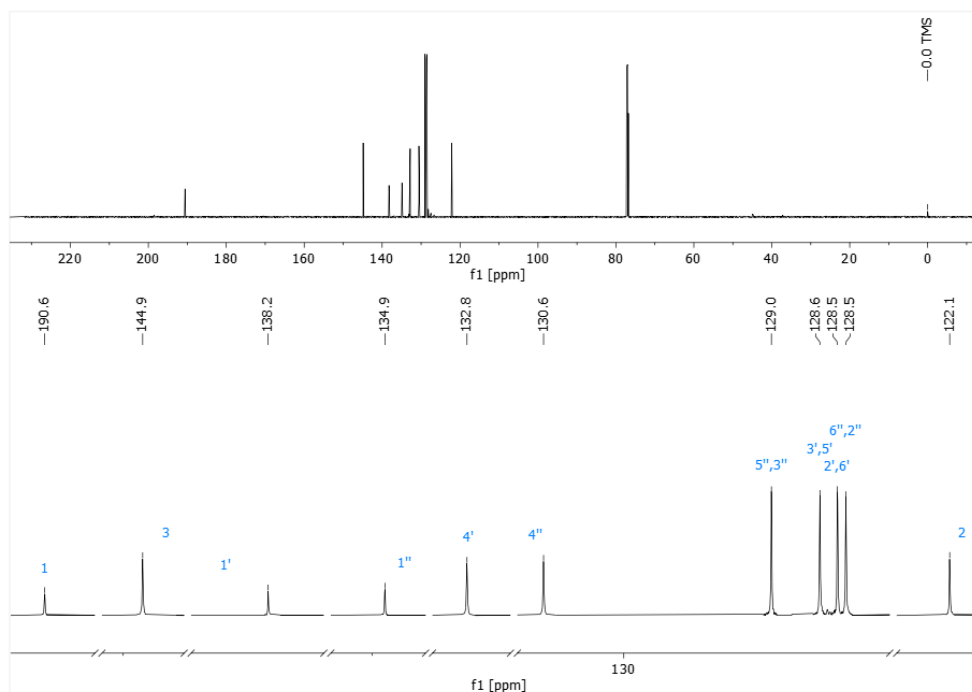


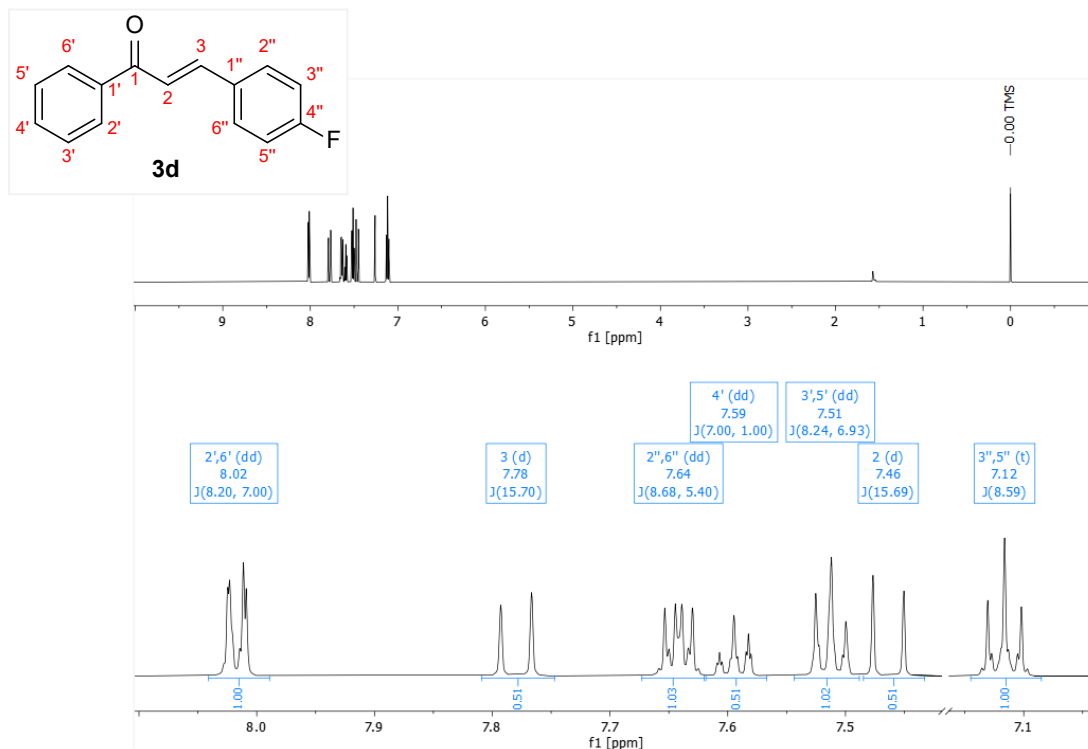
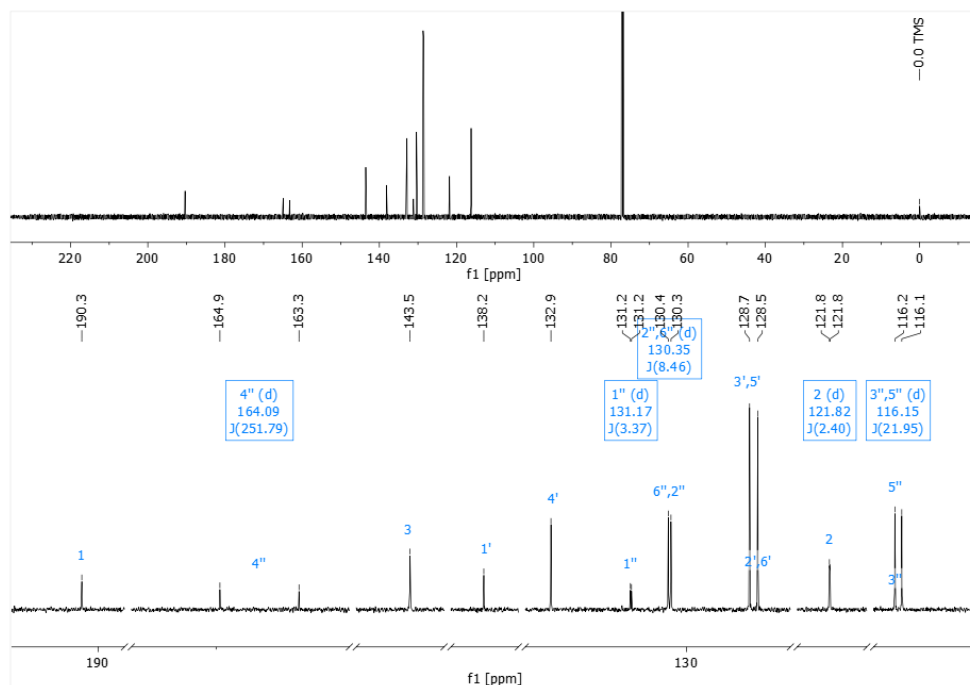
Obrázok P1. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) spektrum chalkónu 3a.

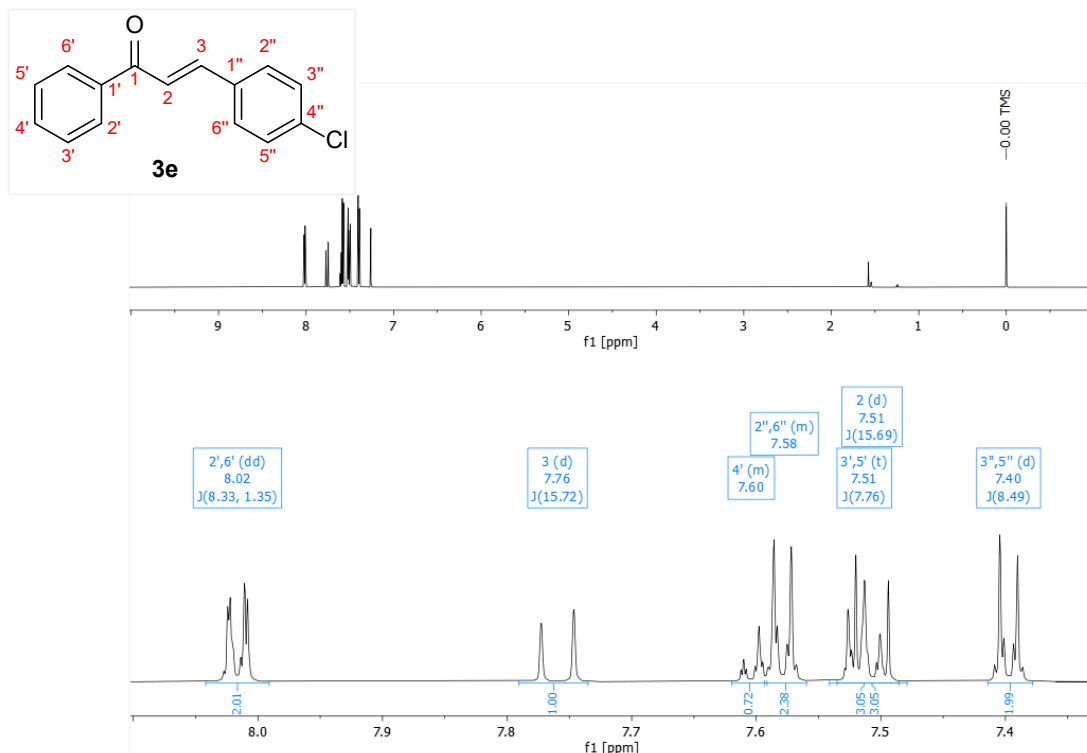
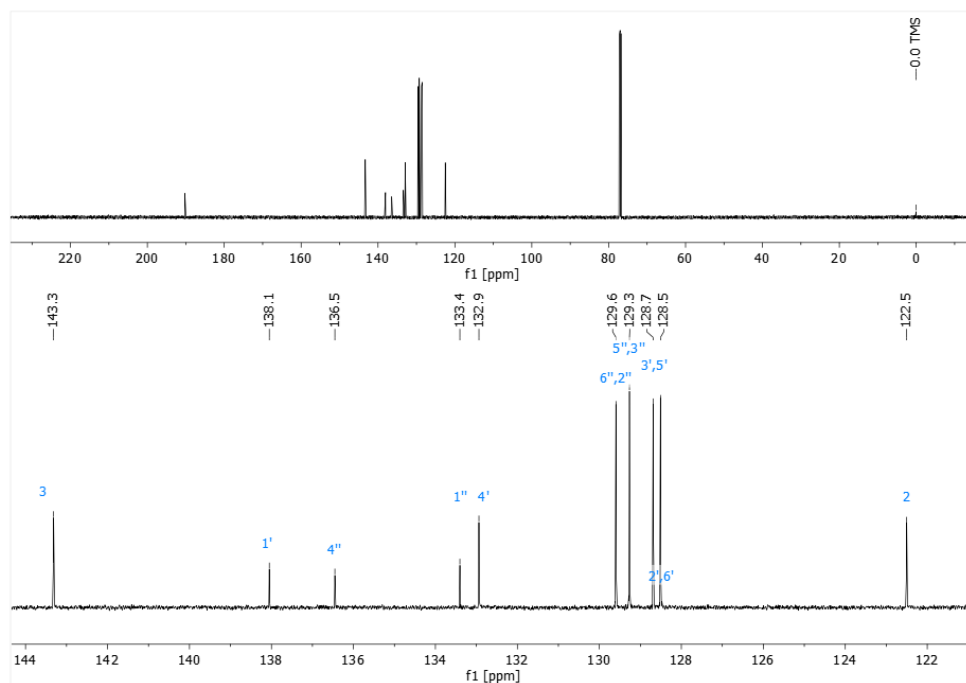


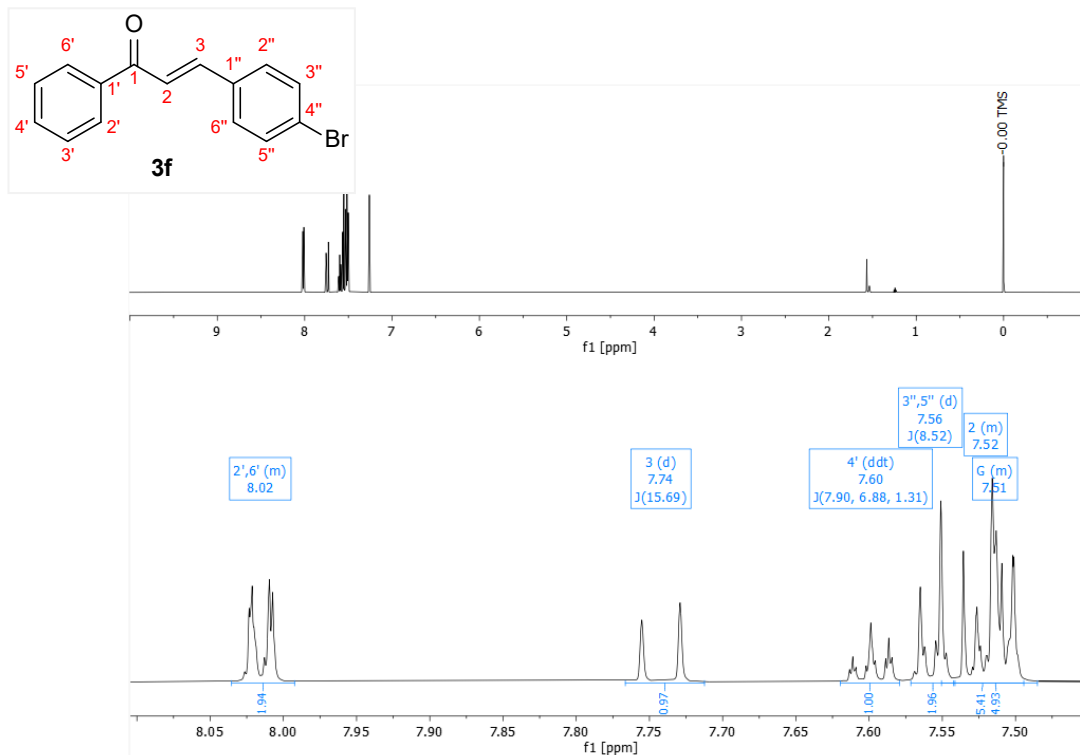
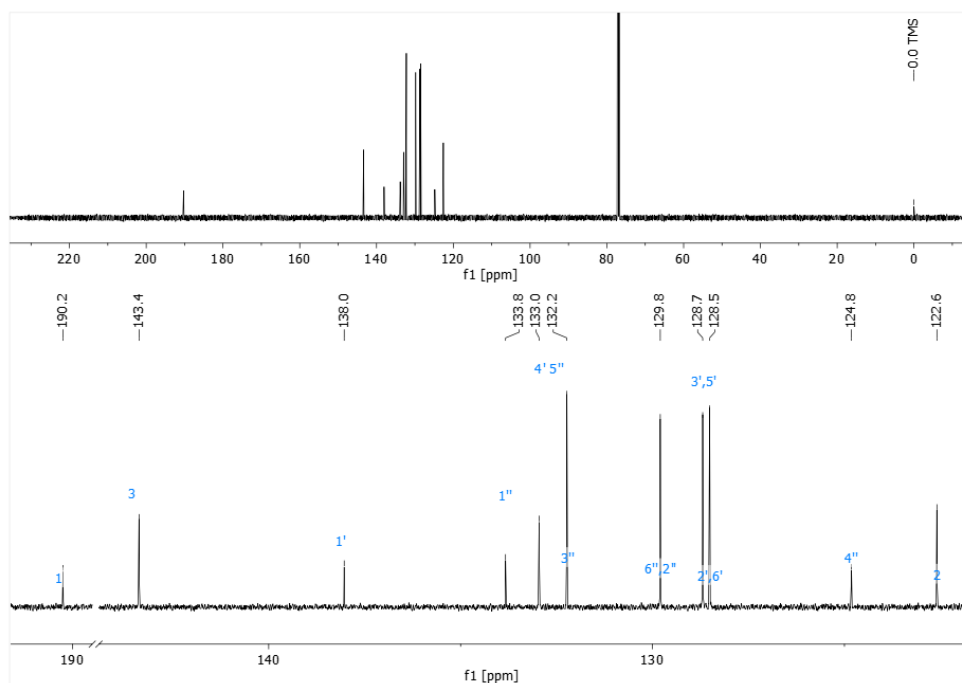
Obrázok P2. ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) spektrum chalkónu 3a.

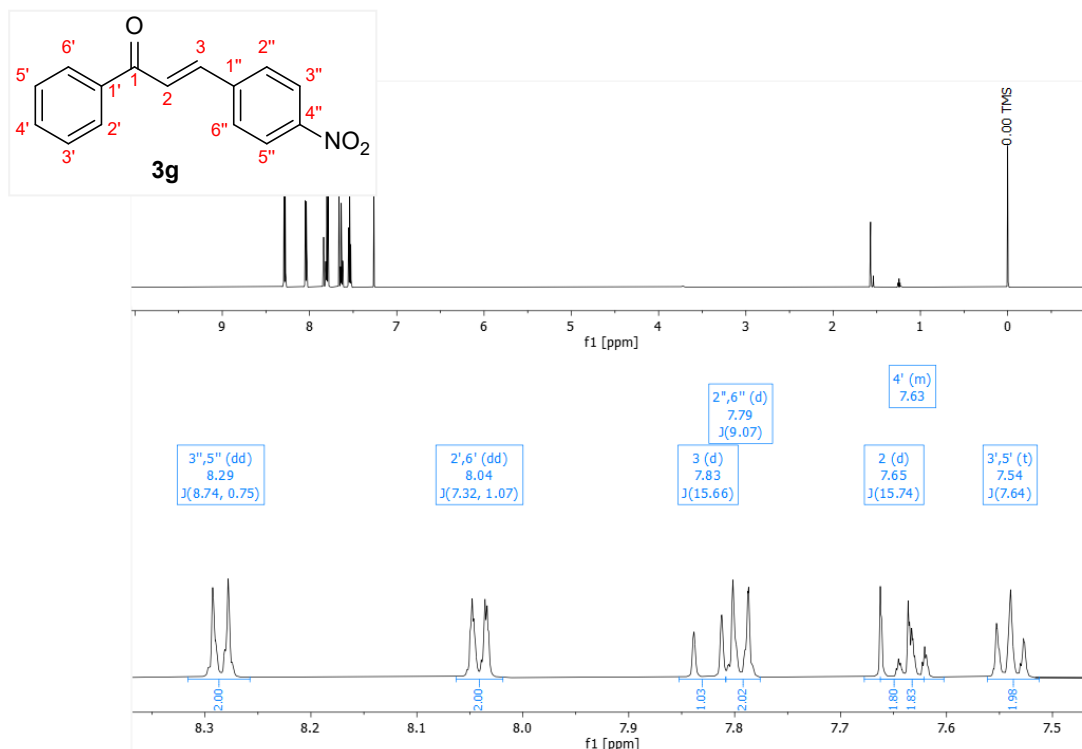
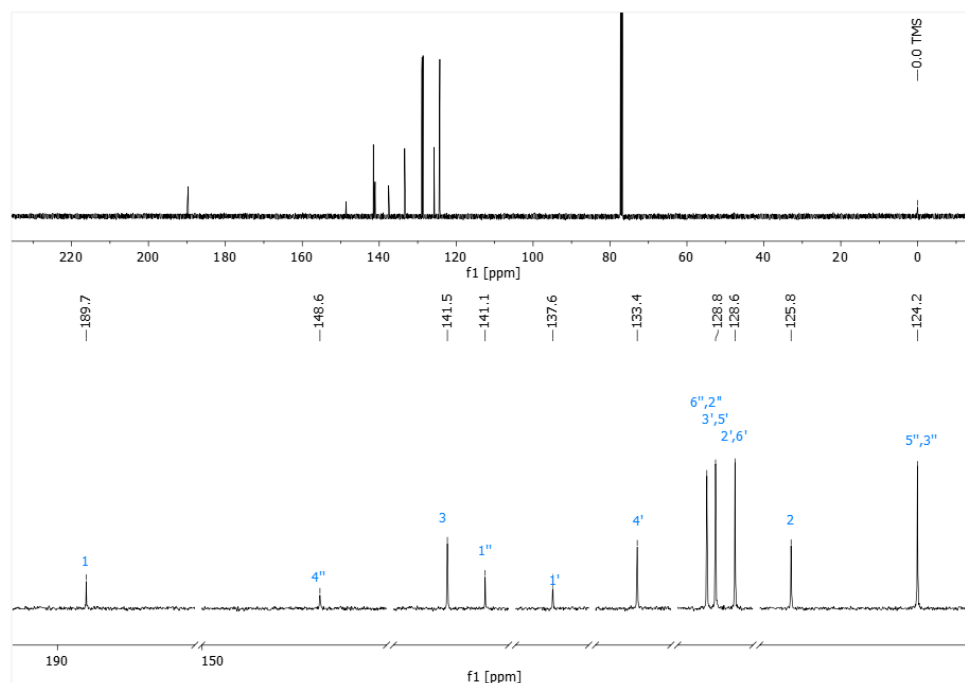
NMR spektrá (2E)-3-(4-metylfenyl)-1-fenylprop-2-én-1-ónu (3b)**Obrázok P3.** ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) spektrum chalkónu **3b**.**Obrázok P4.** ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) spektrum chalkónu **3b**.

NMR spektrá (2E)-1,3-difenyprop-2-én-1-ónu (3c)**Obrázok P5.** ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) spektrum chalkónu **3c**.**Obrázok P6.** ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) spektrum chalkónu **3c**.

NMR spektrá (2E)-3-(4-fluórfenyl)-1-fenylprop-2-én-1-ónu (3d)**Obrázok P7.** ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) spektrum chalkónu **3d**.**Obrázok P8.** ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) spektrum chalkónu **3d**.

NMR spektrá (2E)-3-(4-chlórfenyl)-1-fenylprop-2-én-1-ónu (3e)**Obrázok P9.** ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) spektrum chalkónu **3e**.**Obrázok P10.** ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) spektrum chalkónu **3e**.

NMR spektrá (2E)-3-(4-brómfenyl)-1-fenylprop-2-én-1-ónu (3f)**Obrázok P11.** ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) spektrum chalkónu **3f**.**Obrázok P12.** ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) spektrum chalkónu **3f**.

NMR spektrá (2E)-3-(4-nitrofenyl)-1-fenylprop-2-én-1-ónu (3g)**Obrázok P13.** ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) spektrum chalkónu **3g**.**Obrázok P14.** ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) spektrum chalkónu **3g**.

7.4.2 Výsledky regresnej analýzy

Tabuľka P1. Výsledok korelácie ^{13}C NMR chemických posunov karbonylového uhlíka $\text{C}=\text{O}$ chalkónov **3a–g** s elektrónovými konštantami substituentov σ .

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,976584							
R Square	0,953717							
Adjusted R Square	0,944461							
Standard Error	0,083132							
Observations	7							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	0,712044	0,712044	103,0313361	0,000159128			
Residual	5	0,034555	0,006911					
Total	6	0,746599						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	190,4648	0,033666	5657,516	3,27472E-18	190,3782958	190,5514	190,3783	190,5514
X Variable 1	-0,99867	0,098387	-10,1504	0,000159128	-1,251580813	-0,74576	-1,25158	-0,74576

Tabuľka P2. Výsledok korelácie ^{13}C NMR chemických posunov karbonylového uhlíka $\text{C}=\text{O}$ chalkónov **3a–g** s elektrónovými konštantami substituentov σ_R^+ .

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,885129							
R Square	0,783454							
Adjusted R Square	0,740145							
Standard Error	0,179818							
Observations	7							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	0,584926	0,584926	18,08976	0,008067			
Residual	5	0,161673	0,032335					
Total	6	0,746599						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	190,3319	0,068008	2798,672	1,11E-16	190,157	190,5067	190,157	190,5067
X Variable 1	-0,65428	0,153833	-4,25321	0,008067	-1,04972	-0,25884	-1,04972	-0,25884

Tabuľka P3. Výsledok korelácie ^{13}C NMR chemických posunov karbonylového uhlíka $\text{C}=\text{O}$ chalkónov **3a–g** s elektrónovými konštantami substituentov σ_R^- .

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,959644							
R Square	0,920916							
Adjusted R Square	0,9051							
Standard Error	0,108668							
Observations	7							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	0,687555	0,687555	58,22416	0,000615			
Residual	5	0,059044	0,011809					
Total	6	0,746599						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	190,4597	0,043868	4341,615	1,23E-17	190,347	190,5725	190,347	190,5725
X Variable 1	-0,65848	0,086297	-7,63048	0,000615	-0,88032	-0,43665	-0,88032	-0,43665

Tabuľka P4. Výsledok korelácie ^{13}C NMR chemických posunov karbonylového uhlíka $\text{C}=\text{O}$ chalkónov **3a–g** s elektrónovými konštantami substituentov R^+ .

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,547606							
R Square	0,299872							
Adjusted R Square	0,159846							
Standard Error	0,323331							
Observations	7							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	0,223884	0,223884	2,141551	0,203227			
Residual	5	0,522715	0,104543					
Total	6	0,746599						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	190,1739	0,167792	1133,392	1,01E-14	189,7426	190,6052	189,7426	190,6052
X Variable 1	-0,49487	0,338164	-1,4634	0,203227	-1,36415	0,374407	-1,36415	0,374407

Tabuľka P5. Výsledok korelácie ^{13}C NMR chemických posunov karbonylového uhlíka $\text{C}=\text{O}$ chalkónov **3a–g** s elektrónovými konštantami substituentov R^- .

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,737561							
R Square	0,543996							
Adjusted R Square	0,452795							
Standard Error	0,260941							
Observations	7							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	0,406147	0,406147	5,964819	0,058488			
Residual	5	0,340452	0,06809					
Total	6	0,746599						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	190,2439	0,10651	1786,158	1,04E-15	189,9701	190,5177	189,9701	190,5177
X Variable 1	-0,67403	0,275982	-2,4423	0,058488	-1,38347	0,035404	-1,38347	0,035404

Tabuľka P6. Výsledok korelácie ^{13}C NMR chemických posunov karbonylového uhlíka $\text{C}=\text{O}$ chalkónov **3a–g** s elektrónovými konštantami substituentov F .

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,861423							
R Square	0,742049							
Adjusted R Square	0,690459							
Standard Error	0,196258							
Observations	7							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	0,554013	0,554013	14,38351	0,012725			
Residual	5	0,192586	0,038517					
Total	6	0,746599						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	190,749	0,130424	1462,525	2,84E-15	190,4137	191,0843	190,4137	191,0843
X Variable 1	-1,2546	0,330806	-3,79256	0,012725	-2,10497	-0,40424	-2,10497	-0,40424

Tabuľka P7. Výsledok korelácie ^{13}C NMR chemických posunov karbonylového uhlíka $\text{C}=\text{O}$ chalkónov **3a–g** s elektrónovými konštantami substituentov R .

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,533274
R Square	0,284381
Adjusted R Square	0,141258
Standard Error	0,326888
Observations	7

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	0,212319	0,212319	1,986961	0,217718
Residual	5	0,53428	0,106856		
Total	6	0,746599			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	190,1836	0,167073	1138,324	9,93E-15	189,7541	190,6131	189,7541	190,6131
X Variable 1	-0,80414	0,570474	-1,4096	0,217718	-2,27059	0,662312	-2,27059	0,662312

Tabuľka P8. Výsledok korelácie ^{13}C NMR chemických posunov karbonylového uhlíka C=O chalkónov **3a–g** s elektrónovými konštantami substituentov *F* a *R*.

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,995728
R Square	0,991474
Adjusted R Square	0,98721
Standard Error	0,039893
Observations	7

ANOVA

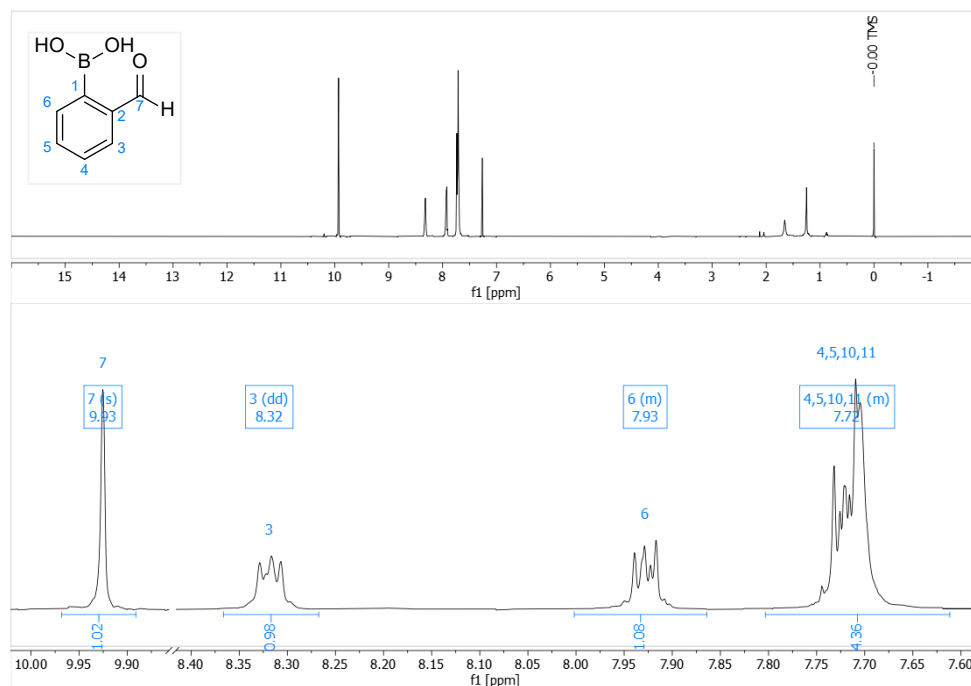
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	2	0,740233	0,370116	232,5634	7,27E-05
Residual	4	0,006366	0,001591		
Total	6	0,746599			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	190,591	0,030267	6296,93	3,82E-15	190,507	190,6751	190,507	190,6751
X Variable 1	-1,22566	0,067296	-18,2131	5,34E-05	-1,41251	-1,03882	-1,41251	-1,03882
X Variable 2	-0,75369	0,069675	-10,8172	0,000414	-0,94714	-0,56024	-0,94714	-0,56024

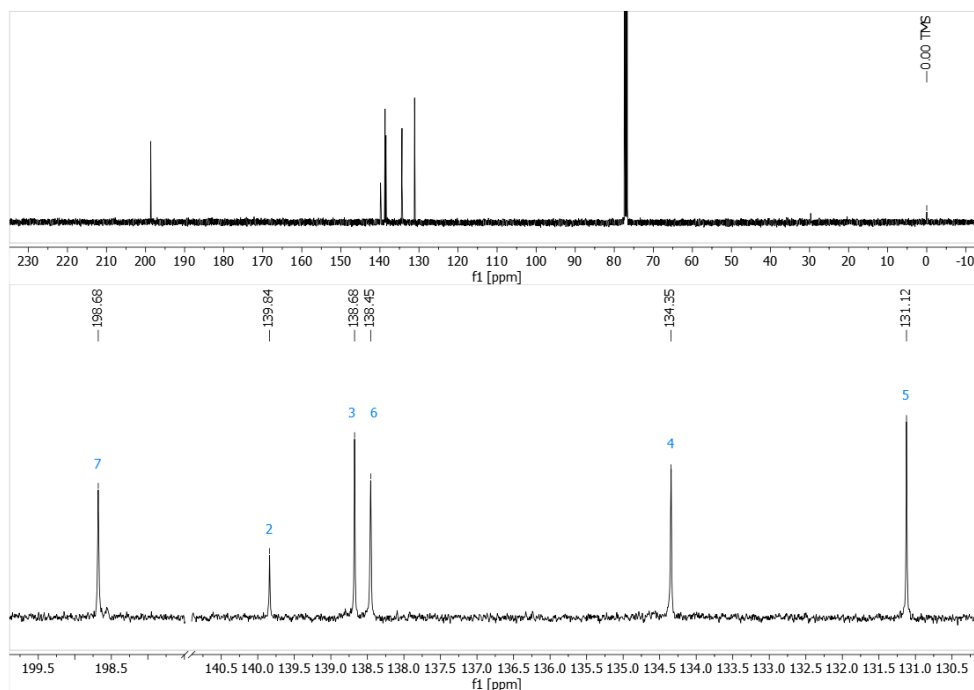
7.5 Stanovenie enantiomérmeho nadbytku

7.5.1 NMR spektrá FPBA, (R)-BINOL-u a (R)- α -metylbenzylamínu

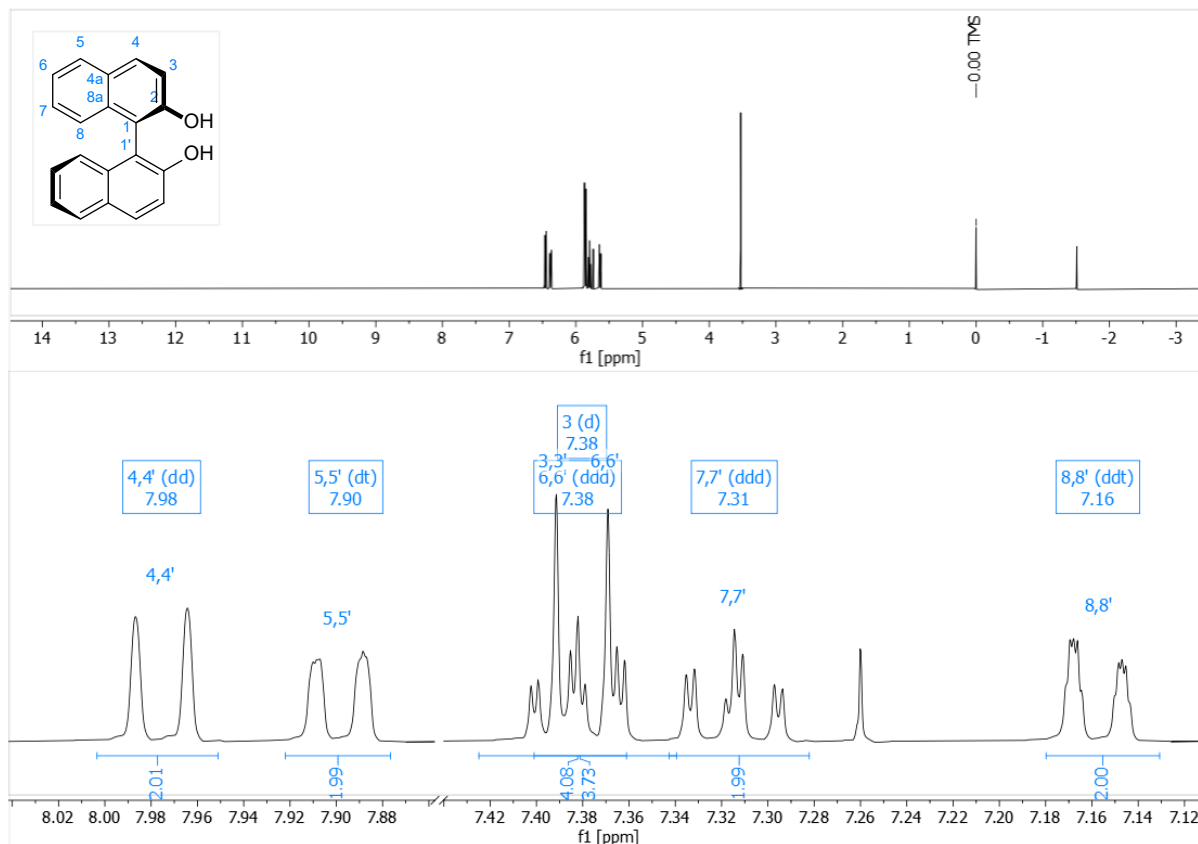
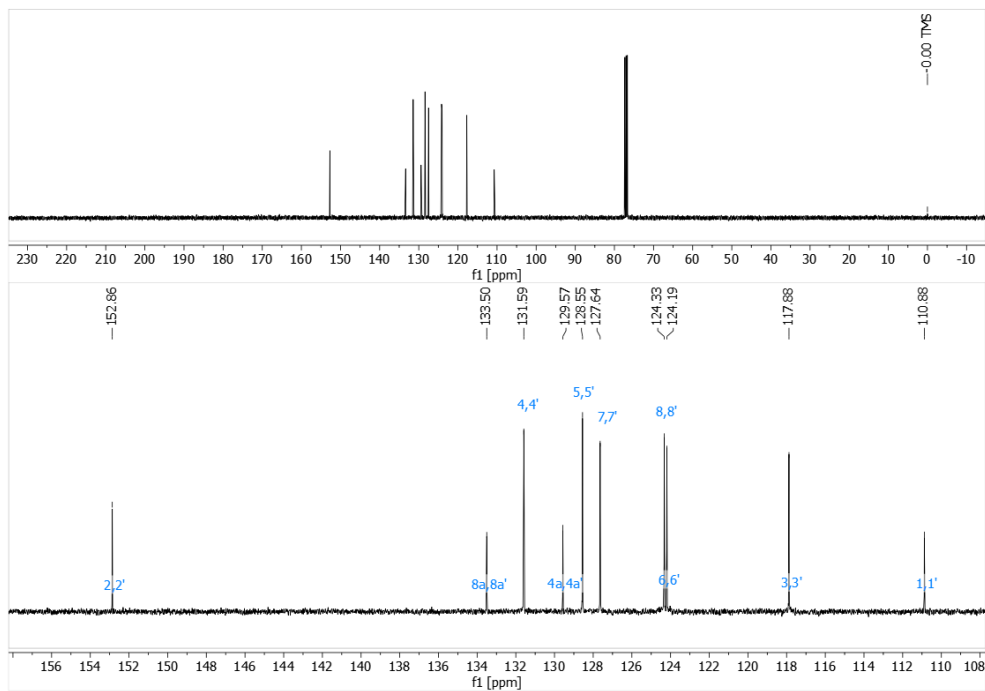
NMR spektrá kyseliny 2-formylfenylborónovej (FPBA)

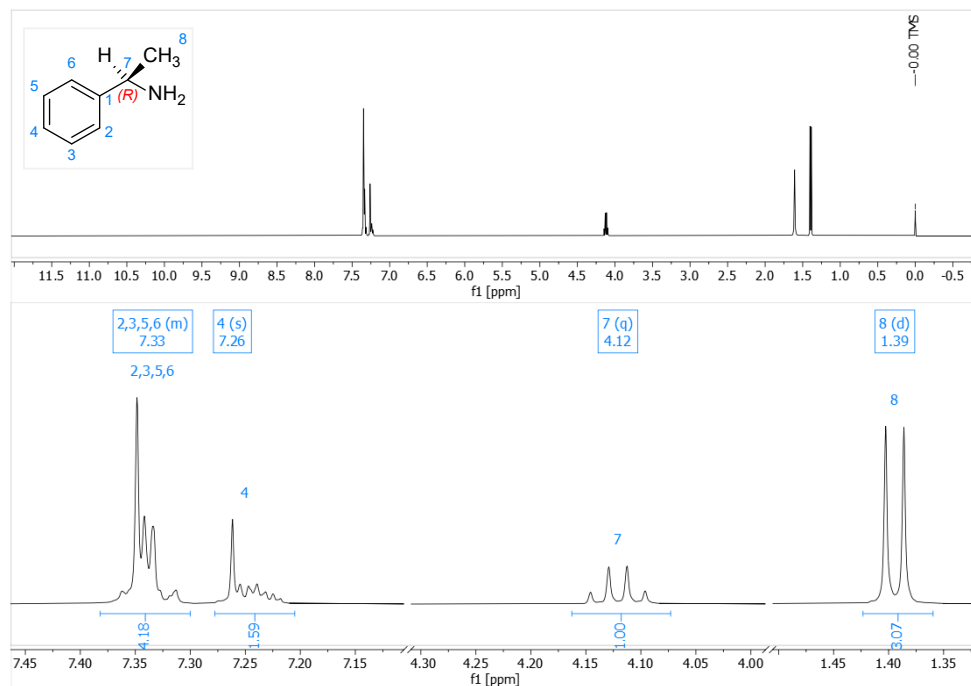
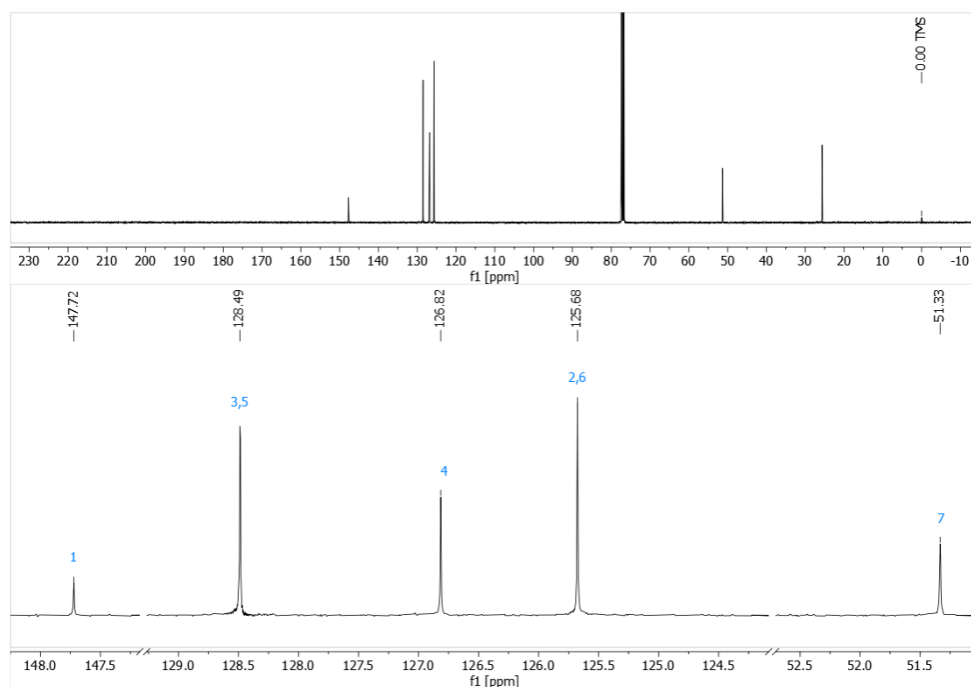


Obrázok P15. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektrum 2-FPBA.



Obrázok P16. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektrum 2-FPBA.

NMR spektrá (*R*)-(+)-1,1'-bi(2-naftolu) ((*R*)-BINOL-u)**Obrázok P17.** ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektrum (*R*)-BINOL-u.**Obrázok P18.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektrum (*R*)-BINOL-u.

NMR spektrá (*R*)- α -metylbenzylamínu**Obrázok P19.** ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektrum (*R*)- α -MBA.**Obrázok P20.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektrum (*R*)- α -MBA.

PRAKTIKUM Z NUKLEÁRNEJ MAGNETICKEJ REZONANCIE

Časť 2: Kvantitatívna analýza a fyzikálno-chemické štúdie s využitím NMR spektroskopie
Skriptum

Autori: doc. RNDr. Mária Vilková, PhD.

RNDr. Zuzana Kudličková, PhD.

RNDr. Ján Elečko, PhD.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Vydavateľstvo ŠafárikPress

Rok vydania: 2025

Počet strán: 107

Rozsah: 6,26 AH

Vydanie: prvé



ISBN 978-80-574-0459-0 (e-publikácia)