

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut
Analüütilise keemia õppetool

Merili Tammiste

Hapete kahefaasilised pK_a väärtused oktanool-vesi süsteemis

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendajad Ivo Leito, Professor
Sigrid Selberg, Teadur

Tartu 2021

INFOLEHT

Hapete kahefaasilised pK_a väärtused oktanool-vesi süsteemis

Süsteeme, mis koosnevad kahest omavahel mittesegunevast tasakaalulisest faasist, nimetatakse kahefaasilisteks süsteemideks. Ainete happelisust sellistes süsteemides väljendab nende kahefaasiline pK_a ehk pK_a^{ow} . Käesolevas bakalaureusetöös leiti 10 erineva NH-happe kahefaasilised pK_a väärtused. Selleks tehti mõõtmised, kasutades UV/Vis-spektrofotomeetriat ja 1H tuumamagnetresonantspektromeetriat. Saadud väärtuseid võrreldi ka vees ja atsetonitriilis leitud ühefaasiliste pK_a väärtustega.

Märksõnad: pK_a , pK_a^{ow} , NH-happed, UV/Vis, 1H TMR

CERCS: P400

Biphasic pK_a values of acids in octanol-water system

Systems consisting of two immiscible phases at equilibrium with each other are called biphasic systems. A compound's acidity in such systems is expressed by biphasic pK_a or pK_a^{ow} . In this thesis, biphasic pK_a values of 10 different NH acids were found. The measurements were done, using UV/Vis-spectrophotometry and 1H NMR spectrometry. The obtained results were compared with pK_a values measured in water and acetonitrile.

Keywords: pK_a , pK_a^{ow} , NH acids, UV/Vis, 1H NMR

CERCS: P400

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	5
1. Sissejuhatus	6
2. Kirjanduse ülevaade	8
2.1. pK_a väärtused hapete tugevuse kirjeldamisel	8
2.2. Hapete kahefaasilised pK_a väärtused.....	9
2.3. UV/Vis-spektrofotomeetria	11
2.4. Tuumamagnetresonantsspektromeetria (TMR spektromeetria)	13
3. Eksperimentaalne osa	15
3.1. Kasutatud kemikaalid ja lahuste valmistamine	15
3.1.1. Mõõdetud ained	15
3.1.2. Muud kasutatud kemikaalid	16
3.1.3. Lahuste valmistamine.....	16
3.1.4. Kahefaasiliste süsteemide valmistamine	17
3.2. Aparatuur ja spektrite registreerimine.....	18
3.2.1. Lahuste valmistamisel kasutatav aparatuur	18
3.2.2. UV/Vis-spektromeeter	19
3.2.3. TMR spektromeeter.....	20
3.3. Arvutusmeetodid	21
3.3.1. Kahefaasilise pK_a arvutamine	21
3.3.2. Koondtulemuse arvutamine.....	22
3.3.3. Kogutud standardhälbe arvutamine.....	24
4. Tulemused ja arutelu	25
4.1. Tulemuste ülevaade.....	25
4.2. Tulemuste usaldusväarsus	25
4.3. Happe molekuli struktuuri mõju pK_a^{ow} väärtusele	26
4.4. pK_a^{ow} väärtuste võrdlus ühefaasiliste pK_a väärtustega	27

5.	Kokkuvõte	29
6.	Summary	30
	Tänuavaldused.....	31
	Kasutatud kirjandus.....	32

Kasutatud lühendid

a	aktiivsus
α	dissotsiatsiooniate
Boc	<i>t</i> -BuOCO- (struktuur on toodud Joonisel 2)
δ	keemiline nihe
DMF	dimetüülformamiid
DMSO	dimetüülsulfoksiid
K_a	dissotsiatsioonikonstant
MeCN	atsetonitriil
pH	$-\log a(\text{H}^+)$, negatiivne kümnendlogaritm vesinikioonide aktiivsusest
pK_a	$-\log K_a$, negatiivne kümnendlogaritm dissotsiatsioonikonstandist
pK_a^{ow}	kahefaasiline pK_a
TMR	tuumamagnetresonants
Tos	4-CH ₃ -C ₆ H ₄ -SO ₂ - (struktuur on toodud Joonisel 2)
UV	ultraviolettkiirgus
Vis	nähtav valgus

1. Sissejuhatus

Kahefaasilised süsteemid koosnevad kahest teineteisega tasakaalus olevast mittesegunevast faasist. Enamiku rakenduste puhul on nendeks faasideks orgaaniline lahusti ja vesi. Käesoleva bakalaureusetöö raames on orgaaniliseks lahustiks 1-oktanol (edaspidi on kasutusel nimetus oktanol). Lipofiilsete hapete ja aluste reaktsioonid kahefaasilistes keskkondades esinevad paljudes valdkondades faasiülekandekatalüüsist¹ rakumembraanides toimuvate bioprotsessideni.² Lipofiilsete hapete ja aluste struktuurid sisaldavad enamasti ulatuslikke süsivesinikfragmente (alküülühmad, aromaatsed tuumad ja muud), mistõttu nad lahustuvad vees halvasti ja orgaanilistes lahustites hästi. Kahefaasilistes süsteemides paiknevad vesinikioonid põhiliselt veefaasis ning lipofiilsed happed ja nende anioonid põhiliselt orgaanilises faasis. Seetõttu ei saa sellistes süsteemides hapete ja aluste käitumist ühefaasilise pK_a väärtusega adekvaatselt kirjeldada.

Kahefaasilistes süsteemides toimuvate hapete ja aluste reaktsioonide kirjeldamise olulisust ja ideed on kirjeldatud juba 2012. aastal,³ aga eksperimentaalne meetod selle realiseerimiseks – kahefaasilise pK_a väärtuse määramiseks – on uudne ja avaldatud alles hiljuti.⁴ Teadaolevalt on Tartu Ülikooli analüütilise keemia õppetooli hapete-aluste töögrupp praegu maailmas ainus grupp, kus selliseid mõõtmisi tehakse. Siiani on sel teemal avaldatud vaid kaks kahefaasilise pK_a määramist kajastavat publikatsiooni,^{4,5} mis mõlemad käsitlevad lipofiilseid aluseid. Seni ei ole avaldatud ühtegi publikatsiooni hapete kahefaasiliste pK_a väärtuste kohta.

Käesolev töö on osa suuremast projektist, mille raames määratakse kahefaasilisi pK_a väärtuseid mitmesugustele hapetele. Saadud tulemuste põhjal on ettevalmistamisel artikli käsikiri, kus avaldatakse ka käesoleva töö raames saadud tulemused. Käesolev töö keskendub lipofiilsete NH-hapete kahefaasiliste pK_a väärtuste määramisele.

Käesolevas töös kasutatakse kahefaasiliste pK_a väärtuste määramiseks UV/Vis-spektrofotomeetria (UV/Vis-spektrofotomeetria on antud töö kontekstis sama mis UV/Vis-spektromeetria) ja tuumamagnetresonantspektromeetria (TMR spektromeetria) meetodeid.

Bakalaureusetöö eesmärk on selgitada välja, kuidas käituvad hapetena lipofiilsed NH-happed kahefaasilises oktanolis ja veest koosnevas süsteemis. Selleks leitakse nendele ainetele kahefaasilised pK_a väärtused ning võrreldakse saadud tulemusi vees ja atsetonitriilis määratud ühefaasiliste pK_a väärtustega. Kahefaasilist pK_a määramise meetodit on varasemalt rakendatud

protoneeritud aluste (katioonsete hapete) jaoks, kuid neutraalsete hapete jaoks veel mitte. Hüpotees on, et samasugune mõõtemetod sobib ka hapete kahefaasiliste pK_a väärtuste mõõtmiseks.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. pK_a väärtused hapete tugevuse kirjeldamisel

Ühe levinuima ja tänapäeval domineeriva hapete-aluste teooria – Brønsted-Lowry teooria – järgi on happed vesinikiooni (H^+) doonorid ja alused vesinikiooni aktseptorid. Happe (HA) ja aluse (B) vahelises reaktsioonis saab pärast H^+ loovutamist happest selle konjugeeritud alus (A^-) ja pärast H^+ liitmist alusest selle konjugeeritud hape (BH^+):^{6,7}



Happe HA dissotsieerumist lahuses (võrrand 2) kirjeldab dissotsiatsioonikonstant K_a , mille võrrandis 3 tähistab a vastavate osakeste aktiivsusi ja nurksulud vastavate osakeste tasakaalulisi kontsentratsioone.^{6,8} Lahusti (S) aktiivsus loetakse traditsiooniliselt võrdseks ühega.⁶



$$K_a(HA) = \frac{a(SH^+) \cdot a(A^-)}{a(HA)} \approx \frac{[SH^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \quad (3)$$

Tavaliselt esitatakse happe dissotsiatsioonikonstant K_a selle negatiivse kümnendlogaritmi pK_a kujul (võrrand 4). pK_a väärtust kasutatakse happe tugevuse väljendamiseks: madalamale pK_a väärtusele vastab tugevam hape.^{6,7,9}

$$pK_a(HA) = -\log K_a(HA) = -\log \frac{a(H^+) \cdot a(A^-)}{a(HA)} = pH - \log \frac{a(A^-)}{a(HA)} \quad (4)$$

Puhverlahuse pH väärtus muutub mõõduka hulga happe või aluse lisamisel vähesel määral. Happe (või selle aniooni sisaldava soola lahustamisel puhverdatud lahuses määravad HA ja A^- tasakaaluliste kontsentratsioonide suhte puhverlahuse pH ja happe pK_a .⁶

$$\log \frac{[A^-]}{[HA]} \approx \log \frac{a(A^-)}{a(HA)} = pH - pK_a(HA) \quad (5)$$

Kuigi vesi on kõige levinumalt kasutatav lahusti, leidub suur hulk aineid, mis vesikeskkonnas ei lahustu. Lisaks kulgevad mittevahelühendites paljud protsessid, mida pK_a väärtused mõjutavad, mistõttu ei ole kohane selliste protsesside kirjeldamiseks pK_a väärtuseid vesilahustes määrata.

Sellest tulenevalt on määratud pK_a väärtuseid mittevsesilahustes, kusjuures on selgunud, et ainete pK_a väärtused mittevsesilahustes erinevad tugevalt nende pK_a väärtustest vesilahustes.¹⁰ Lahustite erinevate omaduste tõttu saadakse nendes erinevad pK_a väärtused. Nendeks omadusteks on eeskätt dielektriline läbitavus, happelisus, aluselisisus ja autoprotolüüsikonstant ning võime solvateerida ioone.^{8,10,11} Lahusti dielektriline läbitavus määrab, kas lahusti soodustab vabade ionide tekkimist või esinevad ionid eeskätt ionpaaridena.⁸ Lahusti happelisus määrab, millises ulatuses saavad tugevad alused seal deprotoneeritud vormis esineda ja aluselisisus näitab, millises ulatuses saavad tugevad alused dissotsieerimata vormis esineda. Lahusti autoprotolüüsikonstant määrab, kui laia pK_a väärtuste vahemikku saab antud lahustis määrata.¹⁰ Lahustid, mida on pK_a väärtuste mõõtmiseks enim kasutatud, on dimetüülsulfoksiid (DMSO)¹², atsetonitriil (MeCN)¹³ ja dimetüülformamiid (DMF).¹⁴ Ka käesolevas töös võrreldakse saadud pK_a^{ow} väärtuseid atsetonitriilis mõõdetud pK_a väärtustega.

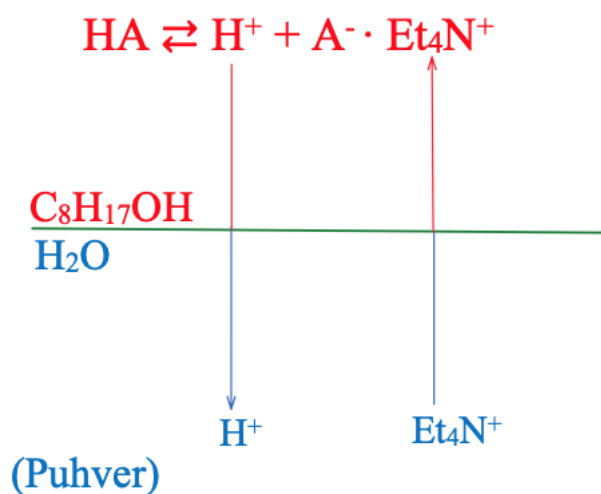
2.2. Hapete kahefaasilised pK_a väärtused

Kahefaasilistes süsteemides on veega mitte segunev orgaaniline faas tasakaalus veefaasiga. Sellistes süsteemides toimuvaid lipofiilsete hapete ja aluste reaktsioone rakendatakse mitmetes valdkondades: faasiülekandekatalüüs,¹ sensormembraanid^{15,16} ja rakumembraanides toimuvad bioprotsessid.²

Kahefaasilistes süsteemides paiknevad lipofiilne hape ja selle anioon eelistatult veega mittesegunevas orgaanilises faasis, mistõttu ei sobi aine happelisuse kirjeldamiseks veefaasis mõõdetud pK_a väärtused. Samas erineb kahefaasilise süsteemi orgaanilises faasis esineva lipofiilse aine happelisus ka ühefaasilises orgaanilises süsteemis esineva aine omast.^{4,9} Lipofiilse happe dissotsiatsioonivõrrand kahefaasilise süsteemi puhul vastab olukorrale, kus nii hape HA kui ka selle anioon A^- on peamiselt orgaanilises faasis. Kuna vesinikioonid asuvad põhiliselt orgaanilise faasiga tasakaalus olevas veefaasis, mõõdetakse pH väärtus kui vesinikioonide aktiivsuse näitaja veefaasis. Kahefaasilise pK_a väärtuse põhimõte on sarnane vesilahuse pK_a väärtusega, kuid selle definitsioonis võetakse arvesse eri faasides leiduvaid ioone.⁴ Nii teooria väljatöötamisel⁴ kui ka selle bakalaureusetöö raames tehtud mõõtmistel on orgaaniliseks faasiks 1-oktanol (edaspidi on kasutusel nimetus oktanol).

Kuna käesolevas töös arvutatakse pK_a^{ow} väärtused lahuste kontsentratsioonide põhjal, on oluline, et ioontugevus oleks süsteemis ligikaudu konstantne. Sel juhul võib lugeda selle ioontugevuse standardolekuks ja on põhjendatud kontsentratsioonide kasutamine aktiivsuste

hinnangutena.¹⁷ Konstantse ioontugevuse saavutamiseks on vaja veefaasi lisada soola, milleks on selles töös Et_4NCl (tetraetüülammooniumkloriid). Happe deprotoneerumisel oktanooli faasis ja vesinikiooni üleminekul veefaasi siirdub Et_4N^+ (tetraetüülammooniumioon) oktanoolifaasi ning tekib ionpaar $\text{A}^-\text{Et}_4\text{N}^+$ (Joonis 1). Kuna ionpaari tekkega takistatakse A^- liikumist veefaasi, on tähtis, et vastaskatsoon oleks lipofiilne. Lisaks on oluline, et soola anioon jääks maksimaalselt veefaasi.⁴ Kloriidioon sobib vastasaniooniks, sest see on piisavalt hüdrofiilne, tänu millele see ei jaotu märgataval määral ionpaarina orgaanilisse faasi.¹⁸ Lisaks on selle konjugeeritud hape HCl piisavalt tugev, et vältida selle jaotumist neutraalina orgaanilisse faasi, mistõttu tekiks veel üks jaotustasakaal, mis raskendaks mõõtmisi. Sellise ionide ümberjaotumisega tagab süsteem faaside elektroneutraalsuse. Vastasiooni Et_4N^+ omadused ja aktiivsus on $\text{p}K_a^{\text{ow}}$ juures tähtis iseloomustav faktor. Tasakaaluvõrrandi (võrrand 7) põhjal saab järeldada, et mida kõrgem on vastasiooni hüdrofoobsus ja aktiivsus, seda rohkem on oktanooli faasis soodustatud ionpaari teke ja HA dissotsiatsioon. Seetõttu on tähtis, et kõik mõõtmised oleks läbi viidud sama soolaga ning et soola kontsentratsioon oleks kõikidel mõõtmistel konstantne. Vastasel juhul poleks võimalik $\text{p}K_a^{\text{ow}}$ väärtuseid omavahel võrrelda.⁴

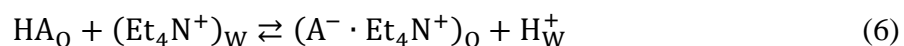


Joonis 1. Ioonide jaotumine kahefaasilises süsteemis.

2018. aastal avaldatud artiklis 4 on kirjeldatud lipofiilsete aluste käitumist kahefaasilises süsteemis. Kuna käesolev töö keskendub lipofiilsetele hapetele, on definitsioonivõrrandid ümber kohandatud kirjeldamiseks hapete käitumist. Lahustunud vesinikioonid paiknevad peamiselt veefaasis ning seetõttu kaasneb happe deprotoneerumise ja protoneerumisega vesinikioonide transport läbi faaside piirpinna (Joonis 1). Kuigi protonvahetus võib toimuda nii veefaasis kui ka veega küllastunud oktanoolikihis, pole protoneerumise ega

deprotoneerumise mehhanism kahefaasilise pK_a seisukohast oluline: tasakaalukonstant kirjeldab tasakaaluolekut hoolimata sellest, kuidas see saavutatakse. Eeldatakse, et veest palju madalama polaarsusega keskkonnas esinevad A^- ioonid peamiselt ioonpaaridena ($A^- \cdot Et_4N^+$) ja vähesel määral ka vabade ioonidena. Järgnevad võrrandid on koostatud eeldusel, et $a(A^- \cdot Et_4N^+)$ võtab arvesse ka vabu ioone.⁴

Summaarselt kirjeldab püstituvat tasakaalu võrrand 6, kus alaindeksid „O“ ja „W“ tähistavad vastavalt orgaanilist faasi ja veefaasi.⁴



Võrrandile vastav tasakaalukonstant K_a^{ow} väljendub reaktsioonis osalevate osakeste aktiivsuste kaudu. Kui konstantsena hoida nii vastasiooni Et_4N^+ aktiivsus vees kui ka veefaasi ioontugevus ja arvestada seda standardolekuna, saab tasakaalukonstandi võrrandi kirjutada järgnevalt:

$$K_a^{ow} = \frac{a(A^- \cdot Et_4N^+)_O \cdot a(H^+)_W}{a(HA)_O} \quad (7)$$

Tasakaalukonstandist saab avaldada pK_a^{ow} :

$$pK_a^{ow} = -\log K_a^{ow} \quad (8)$$

2.3. UV/Vis-spektrofotomeetria

UV/Vis-spektrofotomeetria (UV/Vis-spektrofotomeetria on antud töö kontekstis sama mis UV/Vis-spektromeetria) on analüüsimeetod, mis on laialdaselt kasutusel paljude keemiliste ühendite kvantitatiivseks analüüsiks ultraviolettkiirguse ja nähtava valguse selektiivse neeldumise põhjal lahustes.^{6,19} Keemilise ühendi uurimiseks UV/Vis-spektrofotomeetria abil peab ühend neelama kiirgust lainepikkuste vahemikus 160–780 nm. Praktikas lainepikkusi alla 185 nm enamasti ei kasutata, kuna madalamatel lainepikkustel neelavad kiirgust enamik lahustitest ja õhuhapnik. UV/Vis-spektrofotomeetria põhineb Beer'i seadusel (võrrand 9), mis seob neelduvuse A analüüdi molaarse neelduvusteguri ϵ , optilise teepikkuse b ja analüüdi kontsentratsiooniga c .¹⁹ Seega sõltub molekuli omadustest ja kontsentratsioonist see, millisel lainepikkusel ja kui intensiivselt aine kiirgust neelab.⁶

$$A = \epsilon bc \quad (9)$$

Kõik orgaanilised ühendid neelavad UV-kiirgust tänu valentselektronidele, mida saab ergastada. UV/Vis-spektrofotomeetriat kasutada nii orgaaniliste kui ka paljude anorgaaniliste ühendite uurimiseks.¹⁹ See meetod on hea tundlikkusega, tänu millele saab uurida madalate kontsentratsioonidega lahuseid (tüüpilised kontsentratsioonid on $n \cdot 10^{-5}$ kuni $n \cdot 10^{-6}$ M, vahel ka lausa $n \cdot 10^{-7}$ M).^{19,20} UV/Vis-spektrometriaga on võimalik määrata lahustes ainete tasakaalulisi kontsentratsioone ja seeläbi vahetult jälgida toimuvaid protsesse.²¹ Tänu sellele leiab UV/Vis-spektrofotomeetria ulatuslikku kasutust erinevate tasakaalu- ja kiiruskonstantide, sealhulgas ka pK_a väärtuste määramisel (võrrand 10, kus A_{exp} on mõõdetud neelduvus, A_{A^-} happeaniooni neelduvus ja A_{HA} happe neelduvus).²²⁻²⁴ Kui uuritav süsteem allub Beer'i seadusele (võrrand 9) ning happe ja tema aniooni spektrid erinevad, on võimalik selle meetodi abil läbi viia spektrofotomeetrist tiitrimist.¹⁹ Spektrofotomeetrist tiitrimise tagajärjel saadakse tiitrimiskõver (Joonis 6), mille käänupunktis asub pK_a väärtus.²² Deprotoneerumisega kaasnevad happes ulatuslikud elektronkatte muudatused, mis omakorda toovad kaasa neeldumisspektri muutumise. Erineva pH väärtuse juures on erinev ka happe ja selle aniooni tasakaaluliste kontsentratsioonide suhe lahuses, mistõttu muutub neeldumise intensiivsus. Et spektri muutus deprotoneerumisel oleks piisavalt suur, peab uuritaval molekulil olema ionisatsioonitsentri lähedal kromofoorne rühm, mis tagab aine erinevatele dissotsiatsiooniastmetele vastavate neeldumisspektrite muutuse.^{22,25,26} Kromofoorne rühm sisaldab valentselektrone, mille ergastusenergia on madal. Käesoleva bakalaureusetöö kontekstis kvalifitseerub kromofoorse rühmana igasugune rühm, mis tingib piisava neeldumise ultraviolet- või nähtava kiirguse alas. Peamiseks kromofoorseks rühmas antud töös on aromaadne tuum.^{19,20}

$$pK_a = \text{pH} - \log\left[\frac{(A_{\text{exp}} - A_{HA})}{(A_{A^-} - A_{\text{exp}})}\right] \quad (10)$$

UV/Vis-spektrofotomeetria on selles töös üks kahest pK_a^{ow} määramiseks kasutatud meetodist. Seda kasutati ainete uurimiseks, mille UV/Vis-spektrid muutuvad märgatavalt aine protoneerumisel/deprotoneerumisel. Meetod võimaldab töötada väikeste ainekogustega ning aparatuuri kasutamine on lihtne. Samas peab uuritava aine analüütiline kontsentratsioon oktanolifaasis olema mõõtmiste jooksul konstantne. Seetõttu ei ole UV/Vis-spektrometria

sobiv meetod selliste ainete puhul, mis võivad mõõtmiste käigus jaotuda märgataval määral veefaasi.

2.4. Tuumamagnetresonantsspektromeetria (TMR spektromeetria)

Tuumamagnetresonantsspektromeetria on analüüsimeetod, mille abil saab uurida molekulide struktuuri ja molekulides toimuvaid protsesse, näiteks ionisatsioon ja ionisatsioonitsentrid.^{22,27} TMR spektromeetria põhineb asjaolul, et aatomituumade spinnidel on magnetväljas erinevatel orientatsioonidel erinev energia. Energianivoode erinevus sõltub magnetvälja tugevusest, tuumast ning tuuma keemilisest ümbrusest (elektronitihedusest tuuma ümber). Tänu sellele saabki TMR spektromeetria ülal nimetatud eesmärkidel kasutada.²⁸ Meetodiks vajalik ülitugev magnetväli tekitatakse ülijuhtmagneti abil. Spinnide erinevate orientatsioonide energiatega erinevus on ka ülitugevas magnetväljas väike ning vastab raadiosagedusliku kiirguse kvantide energiale.⁶

Praktikas kasutatakse nn Fourier' teisendusega TMR spektromeetreid,^{19,29} milles kiiritatakse aatomituumasid lühikeste tugevate raadiosageduslike impulssidega, mis katavad oodatava sagedusvahemiku. Kiiritamise vahelisel ajal tuumad relakseeruvad, kiirates omakorda raadiosagedusliku kiirgust. Seda kiirgust registreerides saadakse keeruline aeglahutusega signaal, milles on summeerunud kõikidele energianivoode vahedele vastavad sagedused. Signaal-müra suhte parandamiseks summeeritakse mitu aeglahutusega signaali, mis muudetakse seejärel Fourier' teisenduse abil sageduslahutusega signaaliks – TMR spektriiks. Tagamaks erineva väljatugevusega TMR spektromeetritel saadud spektrite võrreldavus, kasutatakse TMR spektrite esitamisel reeglina sageduse asemel sageduse suhtelist nihet – nn keemilist nihet δ – mõne referentstuumade (¹H TMR korral tetrametüülsilaani vesinikuaatomi tuumad, ¹³C TMR korral tetrametüülsilaani süsinikuaatomi tuumad) sagedusest, väljendatuna miljondikes osades (ppm).¹⁹

TMR spektromeetria abil on võimalik leida protsesse kirjeldavaid konstante, tänu millele saab seda kasutada pK_a väärtuste määramiseks.^{28,30} Käesolevas töös on kasutusel ¹H TMR, kus mõõdetakse happe ja selle aniooni vesinikutuumade keemilist nihet. Kahefaasilist pK_a -d on määratud ka ¹³C TMR abil, kus mõõdetakse süsinikutuumade keemilist nihet.^{19,22} Keemilise nihke põhjuseks on väikesed erinevused lokaalse magnetvälja tugevuses, mis tekivad tuumade ümber liikuvatest elektronidest.^{6,19} Mida kõrgem on elektronitihedus tuuma ümber, seda tugevamini on tuum väliselt rakendatava välja täie mõju eest varjestatud. Seega on tuuma

varjestatus otseselt seotud seda ümbritseva elektrontihedusega. Mida elektronegatiivsemad on tuuma ümbruses asuvad rühmad, seda vähem on tuum varjestatud ja seda kõrgem on keemilise nihke väärtus.¹⁹ Kuna happe ja aniooni tasakaal sõltub pH-st, kaasneb pH väärtuse muutusega ka keemilise nihke muutus.²² Ka TMR puhul saab pK_a väärtuse avaldada analoogselt võrrandile 10, asendades neelduvuse A keemilise nihkega δ :

$$pK_a = \text{pH} - \log\left[\frac{\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{HA}}}{\delta_{\text{A}^-} - \delta_{\text{exp}}}\right] \quad (11)$$

Graafiliselt on pK_a väärtus leitav UV/Vis-meetodile analoogse tiitrimiskõvera abil (Joonis 6), mille telgedel on pH ja keemiline nihe. Sellise tiitrimiskõvera käänupunktile vastav pH ongi pK_a väärtus.²²

Erinevalt UV/Vis-spektromeetriast ei pea uuritav aine TMR spektromeetria korral sisaldama kromofoorseid rühmi, kuna mõõtmise jaoks pole oluline aine kiirguse neelamise võime. Kuna saadav keemilise nihke väärtus ei sõltu aine kontsentratsioonist, pole oluline aine konstantne kontsentratsioon uuritavas lahuses. Tänu sellele on tuumamagnetresonantsiga võimalik mõõta madalama lipofiilsusega aineid, mis võivad osaliselt veefaasi jaotuda. Need aspektid muudavad ainete valiku võrreldes UV/Vis-spektromeetriaga palju laiemaks, tänu millele TMR käesolevas töös kasutusele võetigi. Samas on TMR UV/Vis-spektromeetriaga võrreldes vähem tundlik, mistõttu peavad mõõdetavad lahused olema kõrgema kontsentratsiooniga, mis omakorda toob kaasa suurema ainekulu. Lisaks võib TMR spektris mõõdetava aine signaal kattuda oktanooli signaalidega, mis raskendab täpse keemilise nihke väärtuse lugemist.

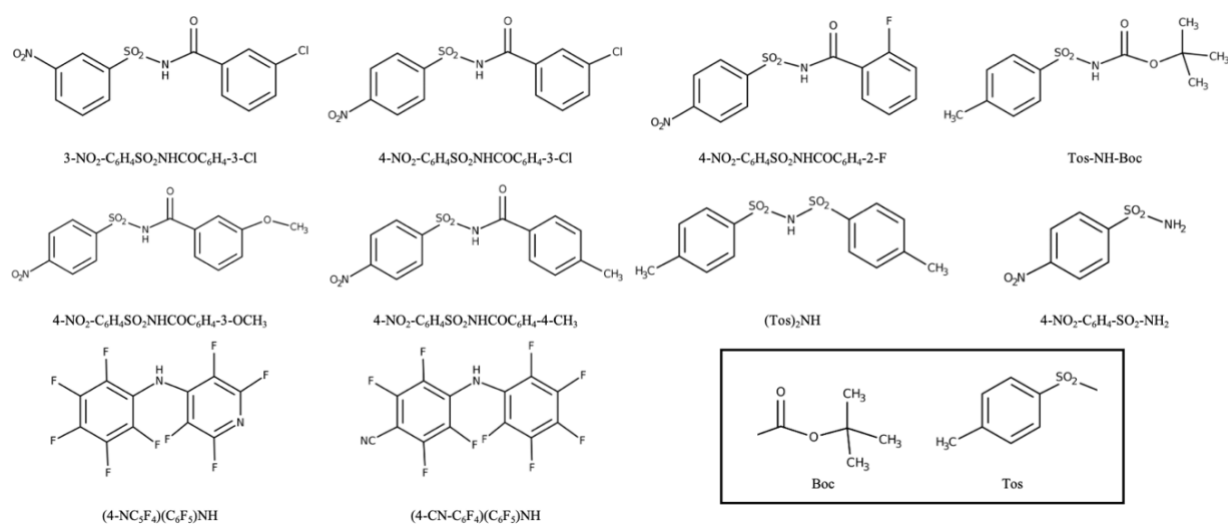
3. Eksperimentaalne osa

3.1. Kasutatud kemikaalid ja lahuste valmistamine

3.1.1. Mõõdetud ained

Mõõtmiseks valiti NH-happed, mis oleksid piisavalt kõrge lipofiilsusega ja mille eeldatavad pK_a^{ow} väärtused jääksid mõõdetavasse vahemikku. Lisaks peeti silmas seda, et esindatud oleksid erinevad aineklassid ning et vähemalt mõnest aineklassist oleks mitu esindajat. Uuriti järgnevaid aineklasse: segaimiidid (Tabelis 1 ained 1–5 ja 9), imiidid (aine 8), amiidid (aine 10), ja diarüülamiinid (ained 6–7). Mõõdetud aineteks on järgnevad NH-happed: 3-kloro-N-[(3-nitrofenüül)sulfonüül]bensamiid, 3-kloro-N-[(4-nitrofenüül)sulfonüül]bensamiid,¹³ 2-fluoro-N-[(4-nitrofenüül)sulfonüül]bensamiid, 3-metoksü-N-[(4-nitrofenüül)sulfonüül]bensamiid, 4-metüül-N-[(4-nitrofenüül)sulfonüül]bensamiid,¹³ 2,3,5,6-tetrafluoro-4-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenüül)amino]bensoonitriil, 2,3,5,6-tetrafluoro-N-(2,3,4,5,6-pentafluorofenüül)-4-püridiinamiin, 4-metüül-N-[(4-metüülfenüül)sulfonüül]benseensulfoonamiid,³¹ N-(tert-butoksükarbonüül)-p-tolueensulfoonamiid,³² 4-nitrobenseensulfoonamiid.³¹

Töös uuritud segaimiidid 1–5 on sünteesitud Sigrid Selbergi poolt vastavalt artiklis 13 olevale sünteesieeskirjale. Ülejäänud ained on samad, mida on kasutatud eespool viidatud artiklites. Joonisel 2 on toodud ainete struktuurid ja valemid.



Joonis 2. Mõõdetud ainete struktuurid ja valemid.

3.1.2. Muud kasutatud kemikaalid

Teadaoleva pH väärtusega veefaasi valmistamiseks kasutati erinevates vahekordades kolme lahust: 0,01 M HEPES + 0,1 M Et₄NCl; 0,1 M HCl + 0,1 M Et₄NCl ja 0,1 M Et₄NOH. Lahuste valmistamisel kasutati järgmiseid aineid: HEPES (Sigma ≥99.5%); Et₄NCl (Sigma ≥98% (titration)); HCl (Honeywell Fluka ≥37%) ja 20% Et₄NOH vesilahus (Acros Organics). Lahused valmistati MilliQ veega. Kahe esimese lahuse valmistamisel kaaluti ained ning viidi analüütilise ülekandmise teel mõõtkolbi, kolmanda lahuse valmistamisel pipeteeriti vajalik kogus 20% Et₄NOH lahust otse mõõtkolbi. Lipofiilne Et₄N⁺ stabiliseerib ioonpaardumise kaudu uuritava happe aniooni oktanoolis. Et stabiliseeriv mõju oleks kõikides lahustes sama, on oluline kontsentratsioonide samasus. Kuna Et₄N⁺ kontsentratsioon on kõigis kolmes lahuses sama, on kontsentratsioonide samasus tagatud ka lahuste kokkusegamisel.

3.1.3. Lahuste valmistamine

Nii mõõdetavate ainete lahuste kui ka puhverlahuste kontsentratsioonid määrati gravimeetriselt, kasutades 0,00001 g eraldusvõimega kaalu Sartorius CPA225D-0CE.

Mõõdetavate ainete lahuste valmistamiseks kasutati Sigma-Aldrich ReagentPlus® 99% oktanooli. Lahuste puhul on kõikjal kasutusel masside järgi arvutatud kontsentratsioonid, et arvesse võtta oktanooli pipeteerimisel tekkinud ebatäpsuseid. Uuritav aine viidi spaatliga otse 16 ml või 40 ml klaasviaali ja kaaluti. Oktanooli lisati viaali 1–10 ml automaatpipetiga ning seejärel kaaluti ka lisatud oktanooli hulk. Kui uuritav aine oktanoolis piisavalt kiiresti ei lahustunud, kasutati lahuse valmistamisel ultrahelivanni Grant XUBA1.

UV/Vis-spektromeetria puhul mõõdeti lahuseid kontsentratsioonidega suurusjärgus $1-6 \cdot 10^{-5}$ M. Sellise kontsentratsiooniga lahuse saamiseks lahjendati eelnevalt valmistatud kõrgema kontsentratsiooniga emalahust. Lahjenduse tegemiseks pipeteeriti 40 ml klaasviaali sobiv kogus emalahust ja oktanooli. Nii pipeteeritud emalahuse kui ka oktanooli täpsed lisatud kogused leiti kaalumise teel. Tuumamagnetresonantspektromeetria korral on sobivad kontsentratsioonid kõrgemad (suurusjärgus 1–10 mM), mistõttu nende puhul polnud lahjendamine vajalik. Seejärel pipeteeriti 2 ml valmistatud lahust üheksasse kuni neljateistkümmesse 4 ml klaasviaali.

3.1.4. Kahefaasiliste süsteemide valmistamine

Veefaasi valmistamiseks valati esmalt keeduklaasi puhversüsteemi (0,01 M HEPES + 0,1 M Et₄NCl) lahus, sinna sisse pandi pH-elektrood ning hakati vastavalt soovitatavatele pH väärtustele lisama kas aluselist (0,1 M Et₄NOH) või happelist (0,1 M HCl + 0,1 M Et₄NCl) titranti. Kui soovitud pH oli saavutatud, pipeteeriti 2 ml vesilahust viaalis olevale oktanoolilahusele. Segu loksutati intensiivselt 1–2 minuti jooksul ning seejärel lasti kihtidel eralduda.

Erinevate pH väärtustega lahustes on hapetel erinevad dissotsiatsiooniastmed (võrrand 12), mis omakorda toovad kaasa erinevused neelduvuse ja keemilise nihke väärtustes. Mõõtmiste käigus saadud neelduvuse või keemilise nihke väärtused moodustavad tiitrimiskõvera (Joonis 6) kahe platooga, mis vastavad pK_a^{ow} väärtusest tunduvalt kõrgematele ($\alpha \approx 1$) või madalamatele ($\alpha \approx 0$) pH väärtustele. Lisaks platoode neelduvuse või keemilise nihke väärtustele on vaja registreerida vähemalt üks väärtus, mis jääb pK_a^{ow} väärtusest vähem kui 2 ühiku kaugusele, kuna just seal toimub suurem muutus dissotsiatsiooniastmes. Mida enam väärtuseid pK_a^{ow} väärtuse ümbruses registreerida saab, seda usaldusväärsem on tulemus. Seega lähtuti veefaasi valmistamisel pH väärtuste valikul sellest, et esindatud oleks võimalikult erinevad dissotsiatsiooniastmed.

TMR spektromeetria abil uuritavate lahuste kõrge kontsentratsiooni tõttu esinesid veefaasis muutused pH väärtustes, millest tulenevalt hakati alates 2020. aasta augustist mõõtma veefaasi pH-d ka pärast oktanoolikihi eraldamist. UV/Vis-spektromeetria mõõtmiste puhul oli pH muutus pärast oktanoolikihi eraldamist üldiselt vähene ja tingis pK_a^{ow} väärtustes muutusi, mis enamasti jäid vahemikku alla 0,1 pK_a ühiku. Vaid ühel korral oli pK_a^{ow} väärtuste muutus 0,13 pK_a ühikut. Siiski olid muutused väiksemad tulemuste mõõtemääramatusest (vt alajaotus 4.2.), mistõttu sai korrektseks lugeda ka varasemalt läbi viidud UV/Vis mõõtmiste tulemused, kus veekihi ekstraktsioonijärgset pH-d ei mõõdetud. TMR mõõtmiste puhul oli aga pK_a^{ow} väärtuste muutus märgatavam: enamasti jäid muutused alla 0,6 pK_a ühiku, kuid mõnel juhul oli pK_a^{ow} väärtuste muutus lausa 2,6 ühikut. Seetõttu on TMR mõõtmiste puhul arvatud pK_a^{ow} väärtused ainult ekstraktsioonijärgsete pH väärtuste põhjal.

TMR spektromeetria abil uuritavate hüdrofiilsemate ainete lahuste korral esines olukordi, kus kõrgema pH väärtusega lahuste puhul vastas uuritava aine keemiline nihe ekslikult madalamale pH-le omasele väärtusele. Selle põhjuseks on arvatavasti asjaolu, et oktanoolikihis olevates

veetilkades on mõõdetav aine tugevamalt ioniseerunud, kuna ainete pK_a väärtus vesikeskkonnas on tavaliselt madalam pK_a^{ow} väärtusest. Tsentrifugeerimine tagas vee ja oktanooli kihtide parema eraldatuse ning tänu sellele võeti see alates 2021. aasta jaanuarist kasutusele. Tsentrifugeerimine oli eriti vajalik madalama lipofiilsusega ühendite puhul, mille anioon läheb ulatuslikult veefaasi. Kõrge lipofiilsusega ainete puhul tsentrifugeerimine erilist efekti ei omanud. UV/Vis-spektromeetria abil tehtud mõõtmiste korral tsentrifugeerimisel pK_a^{ow} väärtusele mõju ei olnud, küll aga vähendas see emulsiooni mõõdetavas oktanoolikihis, mis omakorda parandas spektrite kvaliteeti.

Kõikidele ainetele, mida mõõdeti suures osas enne tsentrifugeerimise ja ekstraktsioonijärgse pH mõõtmise kasutusele võtmist, on tehtud vähemalt üks kontrollmõõtmine, kus süsteemi tsentrifugeeriti ja mõõdeti veefaasi ekstraktsioonijärgne pH. Saadud pK_a^{ow} väärtuste erinevus oli alati alla 0,5 pK_a ühiku.

3.2. Aparatuur ja spektrite registreerimine

Kahefaasiliste pK_a väärtuste mõõtmine põhineb erinevate pH väärtustega lahustes toimuva happe dissotsiatsiooni ulatusel ehk dissotsiatsiooniastmel (võrrand 12). pK_a^{ow} määramiseks registreeriti spektrid lahustest, kus uuritavate ühendite neutraalse ja deprotoneeritud vormi tasakaalu kirjeldab võrrand 13. Spektrid registreeriti ka lahustest, kus uuritav aine oli peaaegu täielikult dissotsieerunud ($\alpha \approx 1$) või vähesel määral dissotsieerunud ($\alpha \approx 0$). Seda polnud aga võimalik teha juhtudel, kui aine pK_a^{ow} väärtus oli väga kõrge (ained 6, 7 ja 10) või väga madal (aine 8). Nagu on selgitatud alajaotuses 3.3.1, ei ole see kasutatud eksperimendimetoodika korral probleemiks.

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]} \quad (12)$$

$$A = \alpha \cdot A(A^-) + (1 - \alpha) \cdot A(HA) \quad (13)$$

3.2.1. Lahuste valmistamisel kasutatav aparatuur

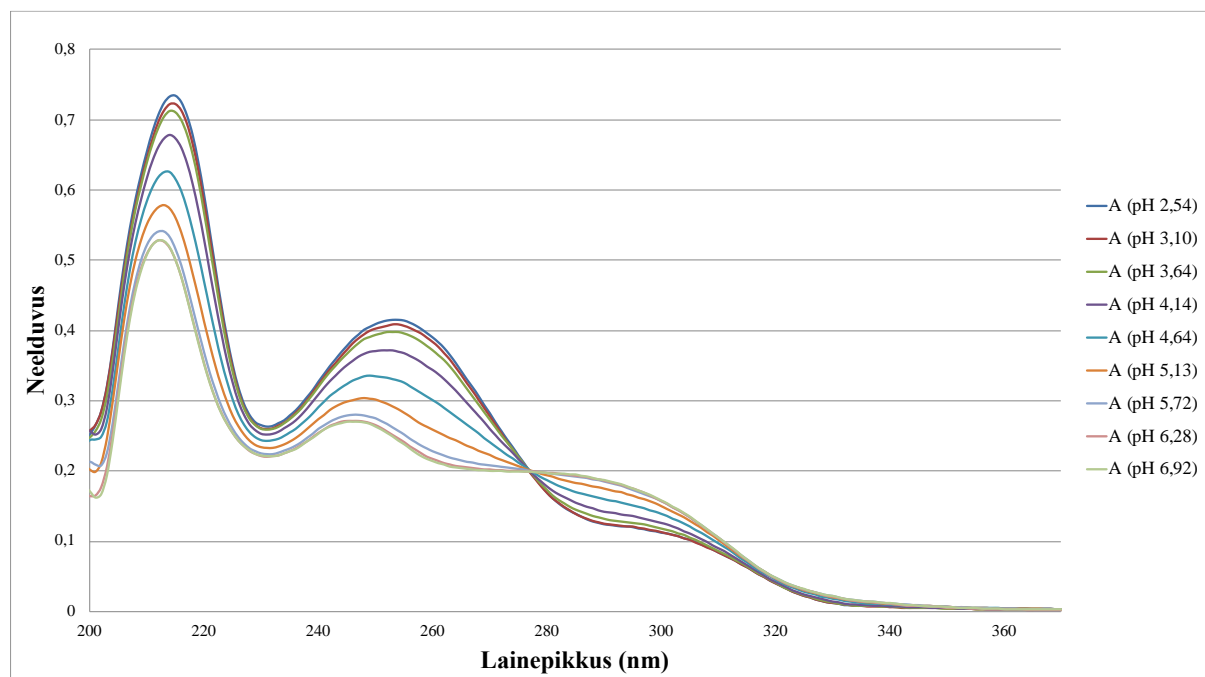
Enne igat mõõtmist kalibreeriti pH-meeter Metrohm 744, kasutades Hydrioni puhverlahuseid pH väärtustega 7,00 ja 4,00. Mõõtmiste perioodi jooksul olid kasutusel Mettler Toledo InLab Micro pH elektrodid. Kalibreerimise kontrolliks kasutati puhverlahust pH väärtusega 10,00.

Kontroll-lahuse mõõtmisel saadud väärtused olid alati vahemikus 9,93–10,04 ja enamikul juhtudel vahemikus 9,98–10,02.

3.2.2. UV/Vis-spektromeeter

Mõõtmisel kasutati UV/Vis-spektromeetrit Thermo Spectronic Evolution 300. Mõõtmise juhtimiseks oli arvutis tarkvara Visionpro. Mõõtmised viidi läbi lainepikkuste vahemikus 190–600 nm, kasutades seadistust Intelliscan, mis mõõtis tihedamalt piirkondades, kus neelduvus oli intensiivsem. Samuti lasti tarkvaral Visionpro mõõtes tulemusi signaal-müra suhte parandamiseks keskmisel tasemel siluda. Mõõtmiseks pipeteeriti ligikaudu 2 ml uuritava aine oktanoolilahust UV/Vis kvartsküveti optilise kihi paksusega 10 mm. Võrdluslahuseks oli sama oktanool, mida kasutati lahuste valmistamisel.

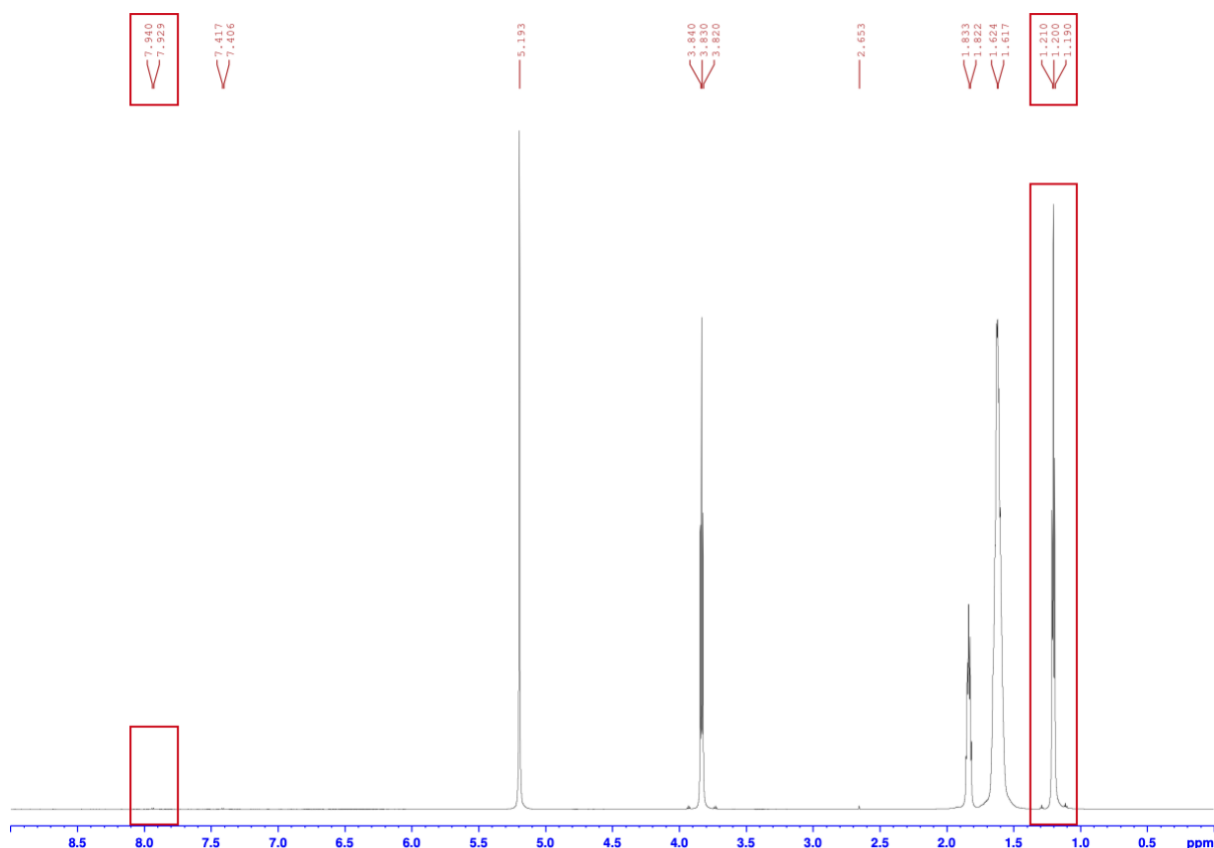
Igast erineva pH väärtusega lahusest registreeriti neelduvusspekter, mis seejärel viidi üle mõõtmise protokollis, kus graafikute ühtlustamiseks teostati ühe-punkti baasijoone korrigeerimine. Mõõtmise lõpuks koostati graafik, kus on näha kõigi eri pH väärtustega lahuste spektrid (Joonis 3).



Joonis 3. Näide aine $4\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NHCOC}_6\text{H}_4\text{-3-OCH}_3$ kontsentratsiooniga $2,27 \cdot 10^{-5}$ M lahuste neeldumisspektritest erinevate vesinikioonide aktiivsuste puhul.

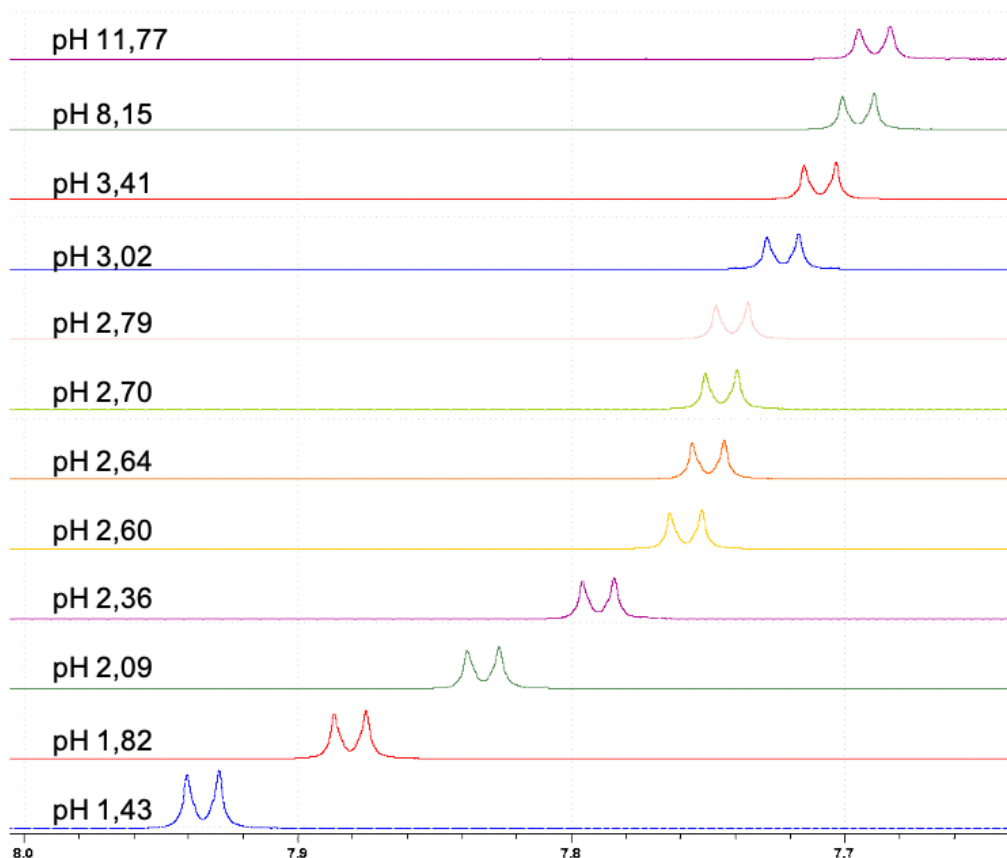
3.2.3. TMR spektromeeter

Mõõtmiste läbiviimiseks kasutati Bruker AVANCE-III 700 MHz TMR spektromeetrit ja TopSpin 3.2 tarkvara. Kõikide ainete puhul registreeriti ^1H spektreid. Kuna mõõtmisteks ei kasutatud deutereeritud solvente, viidi enne iga lahuse mõõtmist läbi magnetvälja ühtlustamiseks *shimming* protsess, milleks kasutati spektri kõige intensiivsemat ja laiemat piiki (Joonisel 4 väärtusega 1,617–1,624 ppm), mis vastab oktanooli $-\text{CH}_2-$ rühmade (3.–7. süsiniku) vesinikutuumadele. Mõõdetavat oktanoolikihti pipeteeriti TMR-tuubi 800 μl . Iga lahuse jaoks koguti 32–1000 spektrit, mida töödeldi TopSpin 3.2 programmis, kus neile tehti Fourier' teisendus. Keemiliste nihete skaala pandi paika oktanooli $-\text{CH}_3$ rühma vesinike piigi järgi (Joonisel 4 väärtusega 1,200 ppm), et ühe mõõtmise raames oleks skaala fikseeritud ja keemiliste nihete muutused usaldusväärsed. Iga aine jaoks valiti välja ja monitoriti 1–2 piiki, mis vastasid deprotoneerumistsentri lähedal asetsevatele vesinikele, et keemilise nihke muutus oleks suurim.



Joonis 4. Näide aine $(\text{Tos})_2\text{NH}$ lahuse kontsentratsiooniga $9,92 \cdot 10^{-3}$ M TMR spektrist.

Punaste kastidega on märgitud Joonisel 5 näha olevate analüüsiks kasutatud piikide piirkond ($\sim 7,9$ ppm) ja oktanooli $-\text{CH}_3$ piik (1,200 ppm), mille järgi pandi paika keemiliste nihete skaala.



Joonis 5. Näide aine $(\text{Tos})_2\text{NH}$ lahuste kontsentratsiooniga $9,92 \cdot 10^{-3}$ M keemilise nihke muutusest erinevate pH väärtuste puhul.

3.3. Arvutusmeetodid

3.3.1. Kahefaasilise pK_a arvutamine

Kahefaasilise pK_a arvutamiseks valitakse esmalt aine neeldumismaksimumi lainepikkus või TMR spektri piik. Sellel lainepikkusel registreeritakse protoneeritud/deprotoneeritud vormide eksperimentaalsed neelduvuse või keemilise nihke väärtused. Seejärel arvutatakse dissotsiatsiooniaste α (võrrand 14) kindlal pH väärtusel ja teoreetiline neelduvuse või keemilise nihke väärtus A_{calc} (võrrand 15).

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a^{\text{ow}})}} \quad (14)$$

$$A_{\text{calc}} = \alpha \cdot A(A^-)_{\text{calc}} + (1 - \alpha) \cdot A(\text{HA})_{\text{calc}} \quad (15)$$

Edasi leitakse happe deprotoneeritud ja protoneeritud piirvormide teoreetilised neelduvuse või keemilise nihke väärtused ($A(A^-)_{\text{calc}}$ ja $A(\text{AH})_{\text{calc}}$) ning pK_a^{ow} väärtus vähimruutude meetodil

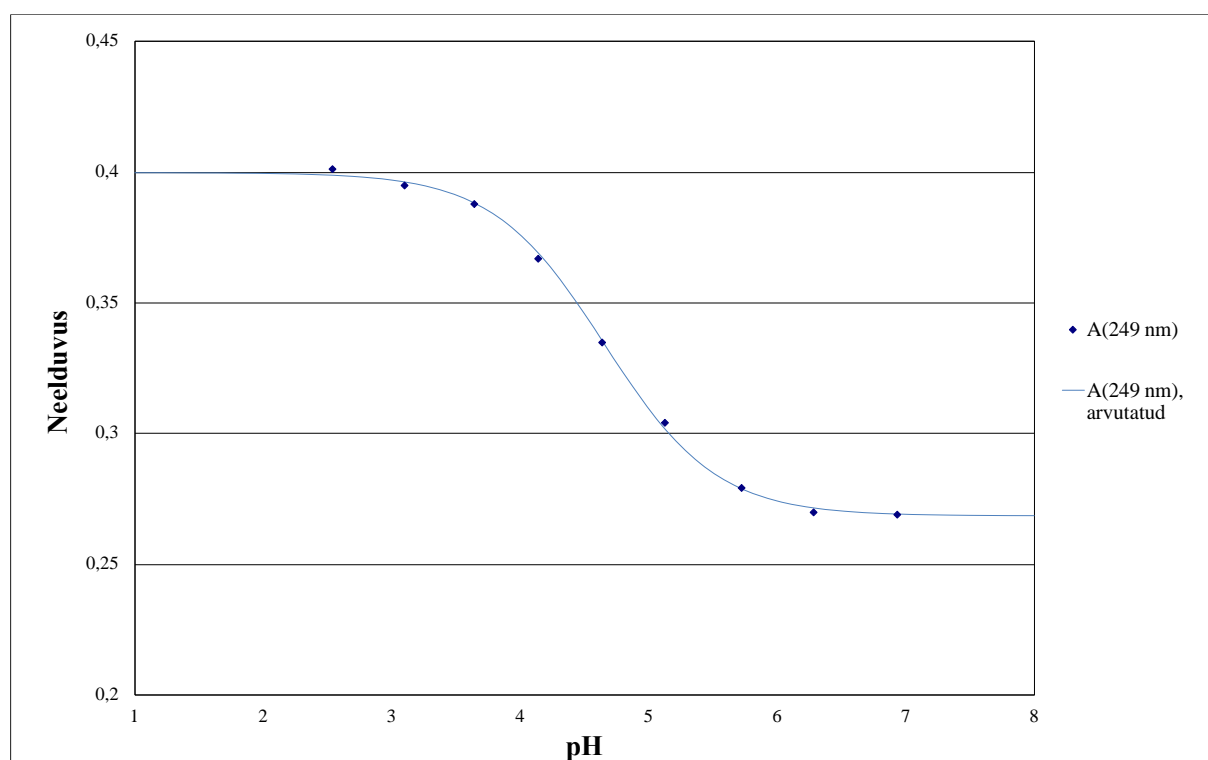
nõnda, et teoreetiliste ja eksperimentaalsete neelduvuste vahede (võrrand 16) ruutude summa oleks minimaalne (võrrand 17).

$$\Delta = A_{\text{calc}} - A \quad (16)$$

$$\sum \Delta^2 \rightarrow \min \quad (17)$$

Minimiseerimiseks kasutatakse MS Exceli lisandmoodulit Solver. Igal iteratsioonil leitakse uued A_{calc} väärtused, vastavalt sellele, kuidas Solver ülalmainitud väärtuseid muudab.

Eksperimentaalselt registreeritud neelduvuste ja Solveri abil leitud suuruste põhjal arvutatud neelduvuste kokkulangevuse näiteks on allolev graafik.



Joonis 6. Aine 4-NO₂-C₆H₄SO₂NHCOC₆H₄-3-OCH₃ kontsentratsiooniga 2,27 · 10⁻⁵ M lahuste neelduvused lainepikkusel 249 nm erinevate pH väärtuste juures (rombid) ning vastav teoreetiline kõver (pidevjoon).

3.3.2. Koondtulemuste arvutamine

Kuna mõõtetulemuste põhjal arvutatakse happe ja vastava aniooni suhe keemilisest nihkest või neelduvuse väärtusest kindlal lainepikkusel, sisaldab saadav pK_a^{ow} väärtus aniooni (ioonpaari)

ja neutraali kontsentratsioonide, mitte aktiivsuste suhet. Kontsentratsiooni ja aktiivsuse vaheliste võimalike erinevuste hindamiseks on kasutusel Debye-Hückeli lihtsustatud teooria (võrrand 18),⁶ mis võimaldab leida ionide aktiivsuskoeffitsiente ja mille rakendamisel pK_a^{ow} arvutusele saadakse võrrand 19.

$$\log f_o = -A_o \sqrt{I_o} \quad (18)$$

$$pK_a^{ow} = pH - \log \frac{[A^- \cdot Et_4N^+]_o \cdot f_o}{[HA]_o} = pH - \log \frac{[A^- \cdot Et_4N^+]_o}{[HA]_o} - \log f_o \quad (19)$$

Neutraalse happe aktiivsuskoeffitsiendi oktanooli faasis võib lugeda võrdseks ühega. Happeaniooni aktiivsuskoeffitsiendiks on f_o . Võrrandis 18 tähistab I_o oktanooli faasi ioontugevust ning A_o on lahustist ja temperatuurist sõltumatu konstant. I_o võrdsustati poole uuritava aine lahuse kontsentratsiooniga oktanooli faasis olenemata sellest, millises ulatuses aine veefaasi võis jaotuda. Võrrandite 18 ja 19 põhjal on ühe mõõtmise tulemuseks saadud pK_a^{ow} väärtuse ja $\sqrt{I_o}$ vahel lineaarne suhe. Debye-Hückeli ioontugevuse reegli kohaselt ei sõltu A_o väärtus ka sellest, millise ioniga tegemist on. Kuna reegli tuletamisel on tehtud tõsiseid lihtsustusi, on selle töö raames eeldatud, et A_o väärtuse sõltumatus kehtib vaid sarnase struktuuriga ionide puhul. Käesolevas töös uuritud NH-happed on kõik piisavalt sarnase struktuuriga, et neid käsitleda ühe grupina.

Erinevatel kontsentratsioonidel tehtud mõõtmiste tulemusena saadud kontsentratsioonipõhiste pK_a^{ow} väärtuste põhjal arvutati igale mõõdetud ainele korrigeeritud pK_a^{ow} väärtused (võrrand 20). Seejärel leiti A_o ning keskmine pK_a^{ow} väärtus $\overline{pK_a^{ow}}$, kasutades taas vähimruutude meetodit, nõnda, et teoreetiliste ja eksperimentaalsete pK_a^{ow} väärtuste vahede ruutude summa oleks minimaalne (võrrandid 16–17).

$$pK_a^{ow}_{calc} = \overline{pK_a^{ow}} + A_o \cdot \sqrt{I_o} \quad (20)$$

Andmeid töödeldi kahel viisil. Esimese variandi puhul eeldati, et sõltuvus ioontugevusest puudub ning seega on kõikide ainete A_o väärtus võrdne nulliga ja f_o väärtus võrdne ühega. Sel viisil leitud lõplikud pK_a^{ow} väärtused on sisuliselt individuaalsete pK_a^{ow} väärtuste keskmised. Teise variandi puhul eeldati, et pK_a^{ow} väärtused sõltuvad ioontugevusest (võrrandi 18 põhjal),

mistõttu on kõikide ainete ülene A_0 väärtus võrdne nullist erineva arvuga. Selle variandi puhul varieeriti lõplike pK_a^{ow} väärtuste saamiseks lisaks ainete pK_a^{ow} väärtustele ka A_0 väärtust.

Kuna esimest varianti kasutades leitud tulemused erinesid teise variandiga leitud tulemustest väga vähesel määral, mis jääb alla tulemuste päevadevahelisele hajuvusele (suurim erinevus esimese ja teise variandiga leitud tulemuste vahel oli 0,08 pK_a ühikut), siis ei saa nende andmete põhjal väita, et kontsentratsioonipõhine pK_a^{ow} sõltub ioontugevusest. Seega on siin töös esitatud pK_a^{ow} väärtused vastavalt ülalkirjeldatud esimesele variandile, st on eeldatud, et A_0 väärtus võrdne nulliga.

3.3.3. Kogutud standardhälbe arvutamine

Kogutud standardhälve (võrrand 21) arvutati selle töö raames ainete erinevatel päevadel ja kontsentratsioonidel leitud pK_a^{ow} väärtustest vastavalt järgnevale võrrandile:

$$S_{kogutud} = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2 + \dots + (n_k-1)s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}} \quad (21)$$

Kogutud standardhälve võtab arvesse kõiki efekte, mis põhjustavad tulemuste juhuslikku muutumist erinevate päevade vahel, näiteks kontsentratsioonidest tulenevad määramatused, spektrite korduvus, juhuslikud hälbed pH mõõtmisel, pH meetri kalibreerimise erinevused erinevatel päevadel jne. Standardhälve ei võta samas arvesse efekte, mis on erinevate päevade lõikes süstemaatilised (vähetõenäoline olukord, et pH-meeter näitab kogu bakalaureusetöö tegemise vältel süstemaatiliselt madalamaid või kõrgemaid väärtuseid). Kuna käesolevas töös ei suudetud identifitseerida olulisi erinevate päevade tulemusi süstemaatiliselt mõjutavaid efekte, on kogutud standardhälve selle töö raames autori hinnangul sobilik hinnang liitstandardmõõtemääramatusele (mõõtemääramatuse terminoloogia on seletatud veebikursuses, mida kajastab töö 33).

4. Tulemused ja arutelu

4.1. Tulemuste ülevaade

Kokku määrati oktanool-vesi süsteemis 10 erineva NH-happe pK_a^{ow} väärtused. Tulemused on esitatud Tabelis 1, kus lisaks kahefaasilistele pK_a väärtustele on välja toodud olemasolevad ühefaasilised pK_a väärtused vees ja atsetonitriilis.

Tabel 1. Eksperimentaalselt määratud keskmised kahefaasilised pK_a väärtused.^a

Aine nr	Aine valem	pK_a (MeCN) ¹³	pK_a (H ₂ O) ^b	Keskmine pK_a^{ow}	Mõõte- seeriade arv ^c
1	3-NO ₂ -C ₆ H ₄ -SO ₂ -NH-CO-C ₆ H ₄ -3-Cl	14,55	1,3	4,3	4 (4)
2	4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -SO ₂ -NH-CO-C ₆ H ₄ -3-Cl	14,43	1,2	4,1	4 (4)
3	4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -SO ₂ -NH-CO-C ₆ H ₄ -2-F	–	–	4,5	4 (5)
4	4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -SO ₂ -NH-CO-C ₆ H ₄ -3-OCH ₃	–	–	4,7	4 (4)
5	4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -SO ₂ -NH-CO-C ₆ H ₄ -4-CH ₃	15,68	2,0	5,0	4 (4)
6	(4-CN-C ₆ F ₄)(C ₆ F ₅)NH	19,88	9,8	11,7	1 (3)
7	(4-NC ₅ F ₄)(C ₆ F ₅)NH	20,39	10,1	11,8	1 (3)
8	(Tos) ₂ NH	11,97	-4,9	2,0	3 (4)
9	Tos-NH-Boc	–	5,05 ³⁴	7,9	3 (4)
10	4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -SO ₂ -NH ₂	24,55	9,04 ³⁵	12,0	3 (3)

^a Kõik pK_a^{ow} väärtused on määratud käesolevas töös. pK_a väärtused MeCN keskkonnas on saadud kirjandusest.

^b Ligikaudsed hinnangud $pK_a(H_2O)$ väärtusele on $pK_a(MeCN)$ olemasolul arvutatud autori poolt, kasutades artiklis 13 esitatud ennustusvõrrandit, kui pole märgitud teisiti.

^c Esitatud on autori poolt tehtud edukate mõõteseriade arv. Sulgudes on kõikide arvestatud mõõteseriade arv.

Iga ainega tehti kokku vähemalt 3 edukat mõõteseriat, mille tulemust sai lõpptulemuse arvutamisel kasutada. Edukateks loeti kõik mõõteseriad, mille korral ei leitud sisulisi probleeme. Puhtalt statistilistel kaalutlustel tulemusi välja ei jätud. Kõik mõõteseriad viidi läbi erinevatel päevadel erinevate kontsentratsioonide juures. Aineid 1–7 mõõdeti UV/Vis-spektrofotomeetriga ja aineid 8–10 TMR spektromeetriga.

4.2. Tulemuste usaldusväärsus

Tulemuste usaldusväärssuse hindamiseks kasutati kogutud standardhälvet. Sõltumata päevast ja lahuste kontsentratsioonidest langesid saadud pK_a^{ow} väärtused aineti üldiselt hästi kokku.

Mõnevõrra halvem on kokkulangevus ainel 10. Kõiki neid tulemusi arvestati kogutud standardhälbe arvutuses. Autori mõõdetud tulemuste kogutud standardhälbe väärtuseks saadi 0,2, vabadusastmete arvuga 21. Seda väärtust võib pidada ka saadud pK_a^{ow} väärtuste keskmiseks liitstandardmääramatuseks, mis on sobiv kõigi ainete jaoks peale 10, mille individuaalne standardhälve (pK_a^{ow} väärtuste standardmääramatuse hinnang) oli 0,4 pK_a ühikut. Tulenevalt kogutud standardhälbe väärtusest on Tabelis 1 esitatud pK_a^{ow} tulemused ühe komakohaga.

Lisaks töö autorile mõõtsid ainet 9 Sigrid Selberg, aineid 3 ja 8 Andre Leesment ning aineid 6 ja 7 Anh Hai Vu. Kaasates ka nende mõõtmiste tulemused kogutud standardhälbe arvutusse saadi kogutud standardhälbe väärtuseks samuti 0,2, vabadusastmete arvuga 28. Kuna see on võrdne ülaltoodud kogutud standardhällbega, saab väita, et kõigi nelja mõõtja tulemused on heas kooskõlas, mis kaudselt kinnitab tulemuste usaldusväärsust. Kõikide mõõtmiste tulemusi arvestades leitud kogutud standardhällbega võrdne või sellest kõrgem individuaalne standardhälve oli ainete 7 ja 10 tulemustel, vastavalt 0,3 ja 0,4 pK_a ühikut.

4.3. Happe molekuli struktuuri mõju pK_a^{ow} väärtusele

Aine happelisust tugevdavad induktsioon- ja resonantsaktseptoorised asendajad,³⁶ mis soodustavad tekkinud anioonis laengu delokaliseerumist. Tänu sellele on happeanioon stabiilsem ning hape dissotsieerub soodsamalt. Happelisusele on suurim mõju happelise NH-rühmaga vahetult seotud rühmadel. Rühmade seas väheneb hapestav mõju järjekorras: $-SO_2-$ > $-CO-$ > aromaadne tuum > H. Selle põhjal joonistuvad happelisuse järgi välja grupid: $(Tos)_2NH$ on kõige happelisem, järgnevad segamiidid (1–5 ja 9), diarüülamiinid (6 ja 7) ning viimasena sulfoonamiid 10. Muude asendajate ja nende asukohtade mõju on aine happelisusele väiksem.

Sarnaste struktuuridega ainetel on üldjuhul sarnased pK_a^{ow} väärtused. Seda illustreerivad nii ained 1–5 kui ka 6 ja 7, mis erinevad struktuuri poolest vähesel määral ning millel on ligilähedased pK_a^{ow} väärtused.

Kõige ilmekamalt joonistub muude asendusrühmade mõju ainete happelisusele välja esimese viie aine seas, mis erinevad üksteisest vaid nitrorühma asukoha ja teiste aromaatses tuumas olevate asendusrühmade poolest. Nendel ainetel on kummalgi pool happelisest NH-rühmast hapestavad rühmad $-CO-$ ja $-SO_2-$, tänu millele on tegemist tugevate hapetega. Tänu väga sarnastele struktuuridele on võimalik jälgida pK_a^{ow} väärtuse sõltuvust aromaatses tuumas

olevatest asendajatest ja nende asukohtadest. Kõige madalama pK_a^{ow} väärtusega on aine, mille asendajateks on nitro- ja klororühmad ning millel on nitrorühm para-asendis. Kõige kõrgema pK_a^{ow} väärtusega on hape, mille on asendajateks nitro- ja metüülrühmad. Seega resonants- ja induktsioonaktseptoorsete omadustega asendajad tugevdavad aine happelisust. Happelisust mõjutab ka asendaja asukoht: vastav 4-nitroühend on vastavast 3-nitroühendist happelisem. Seda põhjustab asjaolu, et para-asendis nitrorühmaga kaasneb resonantsefekt, mis mõjutab aromaatsse tuuma sulforühmaga vahetult seotud süsiniku elektrontihedust.

Ainete 6 ja 7 kõrge pK_a^{ow} väärtus tuleneb sellest, et nad ei sisalda $-SO_2-$ ega $-CO-$ asendusrühmi happelisuse tsentri lähedal, mis on tugevad induktsioon- ja resonantsaktseptorid. 6. ja 7. aine suurimaks struktuuriliseks erinevuseks teistest uuritavatest ainetest on see, et nad on tugevalt fluoreeritud. Fluoroasendaja on väga elektronegatiivne ja tänu sellele käituvad need ained hapetena (asendamata diarüülamiini happelisus on väga madal). Para-asendis tsüanorühm 6. aine puhul ja püridüüllämmastik 7. aine puhul on tugevad induktsioon- ja resonantsaktseptorid ning panustavad happelisusesse täiendavalt.

$(Tos)_2NH$ ja $Tos-NH-Boc$ sisaldavad küll mõlemad Tos -rühma, kuid $Tos-NH-Boc$ pK_a^{ow} väärtus on kõrgem ja seda lausa 6 ühiku võrra. $(Tos)_2NH$ -s on mõlemal pool happelist NH -rühma $-SO_2-$ rühmad, mis tagavad kõrge resonants- ja induktsioonefektid ja teevad $(Tos)_2NH$ -st kõige tugevama happe. $Tos-NH-Boc$ puhul on aga NH -rühma küljes ühe Tos rühma asemel Boc -rühm, mis küll sisaldab resonantsaktseptoorset rühma $-CO-$, kuid selle aktseptoorsete võimed on $-SO_2-$ rühmast oluliselt madalamad.

$4-NO_2-C_6H_4-SO_2-NH_2$ on uuritud ainetest ainuke, mille puhul on happelisuse tsentriks $-NH_2$ rühm. Seetõttu on selle happe anioonis laengu delokalisatsioon võimalik vaid ühte asendajasse ja on seega piiratum kui analoogsetel ainetel 1–5 ja 9. Seetõttu on see ühtlasi uuritud hapetest kõige nõrgem.

4.4. pK_a^{ow} väärtuste võrdlus ühefaasiliste pK_a väärtustega

Seitsmel NH -happel on teada eksperimentaalsed ühefaasilised pK_a väärtused, mis on mõõdetud $MeCN$ keskkonnas ning kahel happel on teada eksperimentaalsed ühefaasilised pK_a väärtused vees. On üks hape (10. aine), millel on olemas eksperimentaalne ühefaasiline pK_a väärtus nii atsetonitriilis kui ka vees. Kuuele ainele arvatati $MeCN$ pK_a põhjal ligikaudne pK_a väärtus vees, kasutades artiklis 13 esitatud võrrandit (võrrand 22), kus nS tähistab väävliaatomite arvu ja nH

vesinikuaatomite arvu. Sulgudes on toodud kordajate standardhälbed. Kontrolliks arvutati pK_a väärtus vees ka ainele 10. Arvutuslikuks tulemuseks saadi 8,9, mis on väga lähedane olemasolevale eksperimentaalsele väärtusele (9,04). Eksperimentaalsete pK_a väärtuste määramist vees takistavad peamiselt kaks asjaolu: hapete liigne tugevus (madal pK_a) ja vähene lahustuvus vees. Kui hape on liialt tugev, jääb selle pK_a väärtus väljapoole vees määratavat pK_a väärtuste vahemikku. Kui hape vastavas keskkonnas piisavalt ei lahustu, ei saa hinnata ka aine sealset dissotsiatsiooni ega tasakaalu.

$$pK_a(\text{H}_2\text{O}) = pK_a(\text{MeCN}) \cdot 0,70(0,02) - nS \cdot 2,9(0,2) - nH \cdot 0,24(0,06) - 3,9(0,4) \quad (22)$$

Võrreldes omavahel ühefaasilisi pK_a väärtuseid, on näha, et atsetonitriilis mõõdetud pK_a väärtused on veest mõõdetutest kõrgemad, kuna MeCN solvateerib nii anioone kui ka vesinikiooni veest nõrgemini, mis kajastub ka nende ülekandevabaenergia väärtustes.³⁷ Samas on neutraalide solvatatsioon madalama energeetilise efektiga ning sellest tulenevalt erinevad ka ülekandevabaenergiad vees ja atsetonitriilis vähem.

Atsetonitriilis mõõdetud pK_a väärtused on ligikaudu 8–12 pK_a ühikut kõrgemad kui mõõdetud pK_a^{ow} väärtused. Ainetel 6–7 on pK_a^{ow} väärtuste erinevuseks atsetonitriilis mõõdetutega 8 pK_a ühikut ja ainel 10 on erinevuseks 12 pK_a ühikut. Ülejäänud ainetel on erinevus atsetonitriilis mõõdetud pK_a väärtuste ja pK_a^{ow} väärtuste vahel ligikaudu 10 pK_a ühikut. Vees mõõdetud pK_a väärtused on ligikaudu 3 pK_a ühikut kõrgemad kui mõõdetud pK_a^{ow} väärtused. Siinkohal erinevad ainete 6–8 ühefaasiliste ja kahefaasiliste pK_a väärtuste erinevused, milleks on 2 pK_a ühikut (ained 6–7) ja 7 pK_a ühikut (aine 8). Seega on võimalik järeldada, et sarnaste struktuuride ja pK_a^{ow} väärtustega ainetel on sarnased erinevused ühefaasiliste ja kahefaasiliste pK_a -de vahel. Ainetel 3 ja 4 ühefaasilised pK_a väärtused puuduvad, kuid põhinedes nende sarnasustele ainetega 1–2 ja 5, võib eeldada, et ka nende ühefaasilised pK_a väärtused on teistega samas suurusjärgus.

5. Kokkuvõte

Töö sissejuhatuses püstitatud hüpotees sai kinnitust – aluste kahefaasiliste pK_a väärtuste määramise meetodika sobis ka hapete kahefaasiliste pK_a väärtuste määramiseks. Töö käigus tehti olemasolevale meetodikale mitmeid uuendusi. Kui mõõtmiste alguses oli UV/Vis-spektrofotomeetria ainus meetod, mida kahefaasiliste pK_a -de määramiseks kasutati, siis töö käigus võeti kasutusele ka TMR spektromeetria, mis sobib ka madalama lipofiilsusega ainete uurimiseks. Lisaks täiendati proovide ettevalmistuse käiku tsentrifuugimise ja faaside eraldamise järgsete pH-väärtuste mõõtmise sissetoomisega.

Bakalaureusetöö käigus määrati 10 erineva NH-happe pK_a^{ow} väärtused vähemalt kolmel erineval kontsentratsioonil. Alates 2019. aasta novembrist viidi läbi üle 50 mõõteseeria, millest edukad olid 39. Ainete kahefaasilised pK_a väärtused langevad omavahel hästi kokku, olenemata mõõtmise ajast, läbiviijast ja mõõdetud lahuse kontsentratsioonist, mis kinnitab tulemuste usaldusväärsust. Saadud tulemused on olnud väärtuslik täiendus pK_a^{ow} väärtuste uurimise valdkonnas.

Tööl on edasiarendusteks perspektiivi mitmes suunas. Analüüsimiseks võib võtta uusi lipofiilseid happeid või analüüsida juba mõõdetud NH-happeid veel enamatel kontsentratsioonidel. Veel võib kasutusse võtta teisi meetodeid, mida pK_a väärtuste määramiseks on kasutatud, näiteks fluoromeetria. Viimaks võib uurida ainete happelisust muudes kahefaasilistes süsteemides, asendades oktanooli mõne muu vees vähesel määral lahustuva orgaanilise lahustiga. Kahefaasilised süsteemid on olemas igas organismis ning selliseid süsteeme rakendatakse mitmes valdkonnas, mistõttu on kahtlemata tegemist olulise teemaga. Mida enam teha mõõtmisi ja leida korrelatsioone kahefaasiliste ja ühefaasiliste pK_a väärtuste vahel, seda lähemale on võimalik jõuda neid ühendava mudelini. Selline mudel kirjeldaks kahefaasiliste süsteemide happelisust ja võimaldaks arvutada pK_a^{ow} väärtuseid ühefaasiliste pK_a väärtuste põhjal. Selline pK_a väärtuste ennustamise võimalus oleks väärtuslik paljudele.

Bakalaureusetöö võib lugeda õnnestunuks, kuna eksperimendimeetodika osutus sobivaks ja leiti usaldusväärsed pK_a^{ow} väärtused kümnele NH-happele. Tulemusi võrreldi olemasolevate ühefaasiliste pK_a väärtustega. Leiti, et enamiku hapete korral on erinevus atsetonitriilis mõõdetud ühefaasilise pK_a väärtuse ja pK_a^{ow} väärtuste vahel ligikaudu 10 pK_a ühikut ning vees mõõdetud ühefaasilise pK_a väärtuse ja pK_a^{ow} väärtuse vahel ligikaudu 3 ühikut.

6. Summary

The hypothesis proposed at the beginning of this thesis was demonstrated to be true: the experimental method previously used to determine biphasic pK_a values of bases was suitable for the determination of biphasic pK_a values for acids. In the process of the work, some improvements were made to the existing method. In the beginning of the measurements made for this work, UV/Vis-spectrophotometry was the only technique used to determine biphasic pK_a values. Later, NMR spectrometry was also taken into use thanks to its suitability for studying less lipophilic compounds. In addition, the workflow of sample preparation was improved by centrifuging the biphasic systems and measuring post-extraction pH values.

In this thesis, biphasic pK_a values of 10 different NH acids were determined at no less than three different concentrations. Since November of 2019, over 50 measurement series were conducted, of which 39 were successful. The compounds' pK_a values agree well regardless of the time and person performing the measurement, as well as the concentration of the measured solution, which supports the results' reliability. The obtained results have been a valuable addition in the field of pK_a^{ow} values. There are many ways in which this work could be further developed. A larger variety of lipophilic acids could be studied, or the acids already analysed could be measured at more concentrations. Additionally, other techniques could be included, which have been used to determine pK_a values, such as fluorometry. Finally, the acidity of compounds could be studied in other biphasic systems by replacing octanol with another water-immiscible organic solvent.

Biphasic systems exist in every organism and are applied in many areas, which is why studying acidities in such systems is definitely important. The more measurements are done and the more correlations between pK_a^{ow} and pK_a values are found, the better is the possibility of creating a model connecting the two. Such model would express the acidities in biphasic systems and would make calculating pK_a^{ow} values based on pK_a values possible. This kind of possibility to predict pK_a^{ow} values would be valuable to many.

This work can be considered to be successful, because the experimental method turned out to be suitable and reliable pK_a^{ow} values were found for 10 NH acids. The results were compared with existing pK_a values. It was concluded that in most cases the difference between pK_a^{ow} values and pK_a values in acetonitrile is around 10 pK_a units and the difference between pK_a^{ow} values and pK_a values in water is around 3 pK_a units.

Tänuavaldused

Suurimad tänusõnad selle töö juhendajatele professor Ivo Leitole ja teadur Sigrid Selbergile aja eest, mida nad selle töö valmimisse pühendasid, ning abi ja nõuannete eest, mida nad pakkusid nii mõõtmiste läbiviimisel kui ka töö kirjutamisel.

Veel sooviksin tänada Andre Leesmenti, kes pakkus välja ideid uurimismetoodika edasiarendamiseks ja andis head nõu bakalaureusetöö teksti kohta.

Lisaks ülalnimetatutele soovin tänada ka Anh Hai Vud, kes leidis pK_a^{ow} väärtused kahele siin töös uuritud ainele.

Viimaks sooviksin tänada ka Darja Lavõginat, Jaak Nerutit ja Andra Rummi väärtusliku tagasiside eest õppeainete Loodusteadusliku meetodi seminar ja Lõputöö seminar raames.

Kasutatud kirjandus

- (1) Ooi, T.; Maruoka, K. Recent Advances in Asymmetric Phase-Transfer Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (23), 4222–4266. <https://doi.org/10.1002/anie.200601737>.
- (2) Lane, N.; Martin, W. F. The Origin of Membrane Bioenergetics. *Cell* **2012**, *151* (7), 1406–1416. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.050>.
- (3) Avdeef, A. *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*; John Wiley & Sons, 2012.
- (4) Selberg, S.; Tshepelevitsh, S.; Leito, I. Biphasic pK_a Values. *Croat. Chem. Acta* **2018**, *91* (4), 599–602. <https://doi.org/10.5562/cca3405>.
- (5) Selberg, S.; Pagano, T.; Tshepelevitsh, S.; Haljasorg, T.; Vahur, S.; Luik, J.; Saame, J.; Leito, I. Synthesis and Photophysics of a Series of Lipophilic Phosphazene-based Fluorescent Indicators. *J. Phys. Org. Chem.* **2019**, *32* (7), e3950. <https://doi.org/10.1002/poc.3950>.
- (6) Atkins, P. W.; Jones, L. *Keemia alused: Teekond teadmiste juurde*; Tartu Ülikooli Kirjastus: Tartu, 2012.
- (7) Carey, F. A.; Giuliano, R. M. *Organic Chemistry*, 8th ed.; McGraw-Hill: New York, 2011.
- (8) Reichardt, C.; Welton, T. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 4th, updated and enl. ed ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2011.
- (9) Paenurk, E.; Kaupmees, K.; Himmel, D.; Kütt, A.; Kaljurand, I.; Koppel, I. A.; Krossing, I.; Leito, I. A Unified View to Brønsted Acidity Scales: Do We Need Solvated Protons? *Chemical Science* **2017**, *8* (10), 6964–6973. <https://doi.org/10.1039/C7SC01424D>.
- (10) Kütt, A.; Selberg, S.; Kaljurand, I.; Tshepelevitsh, S.; Heering, A.; Darnell, A.; Kaupmees, K.; Piirsalu, M.; Leito, I. PK_a Values in Organic Chemistry – Making Maximum Use of the Available Data. *Tetrahedron Letters* **2018**, *59* (42), 3738–3748. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.08.054>.
- (11) Cox, B. G. *Acids and Bases: Solvent Effects on Acid-Base Strength*, First edition.; Oxford University Press: Oxford, 2013.
- (12) Bordwell, F. G. Equilibrium Acidities in Dimethyl Sulfoxide Solution. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21* (12), 456–463. <https://doi.org/10.1021/ar00156a004>.
- (13) Kütt, A.; Tshepelevitsh, S.; Saame, J.; Lõkov, M.; Kaljurand, I.; Selberg, S.; Leito, I. Strengths of Acids in Acetonitrile. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, *2021* (9), 1407–1419. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202001649>.

- (14) Kolthoff, I. M.; Chantooni, M. K.; Smagowski, Henryk. Acid-Base Strength in N,N-Dimethylformamide. *Anal. Chem.* **1970**, *42* (13), 1622–1628. <https://doi.org/10.1021/ac60295a013>.
- (15) Martin, K.; Nöges, J.; Haav, K.; Kadam, S. A.; Pung, A.; Leito, I. Exploring Selectivity of 22 Acyclic Urea-, Carbazole- and Indolocarbazole-Based Receptors towards 11 Monocarboxylates. *European Journal of Organic Chemistry* **2017**, *2017* (35), 5231–5237. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700931>.
- (16) Rüütel, A.; Yrjänä, V.; Kadam, S. A.; Saar, I.; Ilisson, M.; Darnell, A.; Haav, K.; Haljasorg, T.; Toom, L.; Bobacka, J.; Leito, I. Design, Synthesis and Application of Carbazole Macrocycles in Anion Sensors. *Beilstein J. Org. Chem.* **2020**, *16*, 1901–1914. <https://doi.org/10.3762/bjoc.16.157>.
- (17) Koort, E.; Gans, P.; Herodes, K.; Pihl, V.; Leito, I. Acidity Constants in Different Media (I=0 and I=0.1 M KCl) from the Uncertainty Perspective. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385* (6), 1124–1139. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0519-x>.
- (18) Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Aqueous Solvation Free Energies of Ions and Ion–Water Clusters Based on an Accurate Value for the Absolute Aqueous Solvation Free Energy of the Proton. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (32), 16066–16081. <https://doi.org/10.1021/jp063552y>.
- (19) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed.; Saunders golden sunburst series; Saunders College Pub.; Harcourt Brace College Publishers: Philadelphia : Orlando, Fla, 1998.
- (20) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Skoog and West's Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th edition, Cengage technology edition.; Cengage Learning: Hampshire, 2014.
- (21) Perkampus, H.-H. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*; Springer laboratory; Springer-Verlag: Berlin; New York, 1992.
- (22) Reijenga, J.; Van Hoof, A.; Van Loon, A.; Teunissen, B. Development of Methods for the Determination of PK_a Values. *Analytical chemistry insights* **2013**, *8*, ACI-S12304. <https://doi.org/10.4137%2FACI.S12304>.
- (23) Kaljurand, I.; Rodima, T.; Leito, I.; Koppel, I. A.; Schwesinger, R. Self-Consistent Spectrophotometric Basicity Scale in Acetonitrile Covering the Range between Pyridine and DBU. *The Journal of organic chemistry* **2000**, *65* (19), 6202–6208. <https://doi.org/10.1021/jo005521j>.

- (24) Musil, K.; Florianova, V.; Bucek, P.; Dohnal, V.; Kuca, K.; Musilek, K. Development and Validation of a FIA/UV–Vis Method for pK_a Determination of Oxime Based Acetylcholinesterase Reactivators. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, *117*, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.09.010>.
- (25) Selberg, S.; Rodima, T.; Lõkov, M.; Tshepelevitsh, S.; Haljasorg, T.; Chhabra, S.; Kadam, S. A.; Toom, L.; Vahur, S.; Leito, I. Synthesis and Properties of Highly Lipophilic Phosphazene Bases. *Tetrahedron Letters* **2017**, *58* (22), 2098–2102. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.039>.
- (26) Kütt, A.; Rodima, T.; Saame, J.; Raamat, E.; Mäemets, V.; Kaljurand, I.; Koppel, I. A.; Garlyauskayte, R. Yu.; Yagupolskii, Y. L.; Yagupolskii, L. M.; Bernhardt, E.; Willner, H.; Leito, I. Equilibrium Acidities of Superacids. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (2), 391–395. <https://doi.org/10.1021/jo101409p>.
- (27) Hore, P. J. *Nuclear Magnetic Resonance*; Oxford chemistry primers; Oxford University Press: Oxford; New York, 1995.
- (28) Popov, K.; Rönkkömäki, H.; Lajunen, L. H. J. Guidelines for NMR Measurements for Determination of High and Low pK_a Values (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2006**, *78* (3), 663–675. <https://doi.org/10.1351/pac200678030663>.
- (29) Mitchell, T. N.; Costisella, B. *NMR--from Spectra to Structures: An Experimental Approach*, 2nd rev. and expanded ed.; Springer: Berlin ; New York, 2007.
- (30) Pastor, A.; Martínez-Viviente, E. NMR Spectroscopy in Coordination Supramolecular Chemistry: A Unique and Powerful Methodology. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, *252* (21–22), 2314–2345. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.025>.
- (31) Leito, I.; Kaljurand, I.; Koppel, I. A.; Yagupolskii, L. M.; Vlasov, V. M. Spectrophotometric Acidity Scale of Strong Neutral Brønsted Acids in Acetonitrile. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (22), 7868–7874. <https://doi.org/10.1021/jo981124l>.
- (32) Koppel, I.; Koppel, J.; Maria, P.-C.; Gal, J.-F.; Notario, R.; Vlasov, V. M.; Taft, R. W. Comparison of Brønsted Acidities of Neutral NH-Acids in Gas Phase, Dimethyl Sulfoxide and Water. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1998**, *175* (1–2), 61–69. [https://doi.org/10.1016/S0168-1176\(98\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1176(98)00113-X).
- (33) Leito, I.; Helm, I.; Jalukse, L. Using MOOCs for Teaching Analytical Chemistry: Experience at University of Tartu. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (5), 1277–1281. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8399-y>.

- (34) Koppel, I.; Koppel, J.; Leito, I.; Pihl, V.; Grehn, L. The Acidity of Some Neutral NH-Acids in Water and Dimethyl Sulfoxide. *Journal of chemical research. Synopses (Print)* **1994**, No. 6, 212–213.
- (35) Kakeya, N.; Aoki, M.; Kamada, A.; Yata, N. Biological Activities of Drugs. VI. Structure-Activity Relationship of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors. (1). *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, *17* (5), 1010–1018. <https://doi.org/10.1248/cpb.17.1010>.
- (36) Hansch, Corwin.; Leo, A.; Taft, R. W. A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters. *Chem. Rev.* **1991**, *91* (2), 165–195. <https://doi.org/10.1021/cr00002a004>.
- (37) Marcus, Y.; Kamlet, M. J.; Taft, R. W. Linear Solvation Energy Relationships: Standard Molar Gibbs Free Energies and Enthalpies of Transfer of Ions from Water into Nonaqueous Solvents. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92* (12), 3613–3622. <https://doi.org/10.1021/j100323a057>.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Merili Tammiste,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Hapete kahefaasilised pK_a väärtused oktaanol-vesi süsteemis“, mille juhendajad on Ivo Leito
ja Sigrid Selberg,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **26.05.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Merili Tammiste

26.05.2021