

PRÁCTICA III.5

MEDIDA DEL pK_a DE VARIOS FENOLES Y SU APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ELECTRÓNICOS

MEASUREMENT OF THE pK_a OF PHENOLS AND ITS APPLICATION TO THE DETERMINATION OF QSAR-RELATED ELECTRONIC PARAMETERS

Pilar López-Alvarado, J. Carlos Menéndez, M^a Teresa Ramos

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad

Complutense, 28040 Madrid, Spain

josecm@farm.ucm.es

1.- Introducción

La constante de disociación ácida, que describe la ionización de compuestos en disolución acuosa, es una propiedad física fundamental de los fármacos. Es frecuente encontrar diferencias en la solubilidad y por tanto en la absorción, biorreactividad y toxicidad, cuando se comparan las propiedades de las especies neutras e ionizadas. En la bibliografía no siempre se encuentran valores de pK_a determinados experimentalmente, por lo que es necesario calcularlos. Uno de los principales parámetros relacionados con el carácter donador o aceptor electrónico de un sustituyente presente en la molécula de un fármaco es el parámetro σ de Hammett, que se define a partir de los valores de pK_a , del ácido benzoico y sus derivados, como se verá más adelante. Aunque este parámetro se introdujo en un contexto fisicoquímico, es muy importante también en el ámbito de la Química Farmacéutica, ya que uno de los objetivos del diseño de fármacos es la búsqueda de relaciones cuantitativas entre la estructura química y la actividad biológica (QSAR). Este objetivo requiere disponer de parámetros (descriptores) que permitan expresar de forma cuantitativa las variaciones de ciertas propiedades fisicoquímicas al modificar la estructura.

Hammett propuso que cada grupo funcional unido a la molécula del ácido benzoico produce un efecto predecible sobre su acidez. Para cuantificarlo, definió para cada sustituyente y cada posición una constante de sustituyente σ_x , de la siguiente forma:

$$\sigma_x = \log \frac{K_x}{K_H} = \log K_x - \log K_H \quad [1]$$

donde K_H es la constante de ionización del ácido benzoico en agua a 25 °C y K_x es la constante de ionización del ácido benzoico sustituido, en las mismas condiciones. Los valores positivos de σ_x corresponden a sustituyentes atradores de electrones, que aumentan la acidez del ácido benzoico, mientras que valores negativos de σ_x indican sustituyentes que se comportan como donadores electrónicos hacia el anillo aromático.

Puede aplicarse la ecuación de Hammett a sistemas diferentes de los ácidos benzoicos, siempre que el sustituyente X esté situado en un anillo aromático. La ecuación de Hammett generalizada es:

$$\rho\sigma_x = \log \frac{K_x}{K_H} = \log K_x - \log K_H \quad [2]$$

donde ρ es la pendiente de la recta que se obtiene al representar los valores de pK_a de una familia de compuestos ácidos (por ejemplo, fenoles, ácidos fenoxiacéticos, etc.) frente a los de un grupo de derivados del ácido benzoico que lleven los mismos sustituyentes. En definitiva, la ecuación de Hammett generalizada (ecuación 2) permite utilizar los efectos electrónicos de los sustituyentes de los ácidos benzoicos como modelo para el cálculo de los efectos de dichos sustituyentes unidos a otras estructuras aromáticas ácidas. También es posible emplear ecuaciones similares para estudiar el efecto de los sustituyentes en otras reacciones diferentes del equilibrio ácido-base.

Para los compuestos en los que se forma una carga negativa en una posición bencílica, como es el caso de la ionización de fenoles a sus iones fenóxido, el efecto de resonancia de los sustituyentes aceptores de electrones en posición *para* se ve notablemente aumentado. Esto hace que sea necesario definir una nueva constante llamada σ^- .

En esta práctica se pretende conseguir tres objetivos:

- a) Determinar el pK_a empleando un método espectrofotométrico.
- b) Verificar que existe una relación lineal entre el pK_a y σ (ecuación de Hammett) y aplicar esta relación al cálculo de ρ correspondiente a la ionización de los fenoles, así

como la predicción del pK_a de fenoles no ensayados experimentalmente (y quizá incluso desconocidos con anterioridad).

- c) Emplear los valores de pK_a obtenidos experimentalmente para calcular valores σ^- .

2.- Procedimiento experimental para la determinación de valores de pK_a

MATERIAL DE LABORATORIO.

Matraces aforados

1 x 1L

1 x 250 mL por cada fenol

3 x 100 mL por cada fenol

Matraz Erlenmeyer (2L)

Probeta (100 mL)

Pipetas y pera de goma

Pipeta aforada de 20 mL

Espátula

Varilla de vidrio

Cubetas de cuarzo para UV-visible

Electrodo de vidrio

REACTIVOS

Bórax (tetraborato sódico decahidratado)

Solución 2M de ácido clorhídrico

Solución 2M de hidróxido sódico

Varios fenoles, cuyo pK_a está comprendido entre 8 y 10:

- Fenol
- 3-Nitrofenol
- 3-Clorofenol
- 3-Cresol
- 4-Cresol
- 4-Metoxifenol
- 4-Hidroxiacetofenona
- 4-Acetilaminofenol (paracetamol)

APARATOS.

Espectrofotómetro de UV-visible.

pH-metro.

PROCEDIMIENTO

2.1- Preparación de la disolución tampón

Se pesa tetraborato sódico decahidratado (9.535 g), se enrasa hasta 1 L con agua destilada y se agita vigorosamente para disolverlo. En el matraz erlenmeyer de 2 L, se mezcla esta disolución con 92 mL de una disolución 0,1 M de HCl, que previamente se ha pasado por el matraz de 1 L para disolver los últimos residuos de bórax. Una vez preparada la disolución tampón, se mide su pH en el pH-metro y se anota el valor obtenido, que será necesario para los cálculos posteriores. Este valor deberá ser próximo a 9.

2.2- Preparación de las disoluciones madre de fenoles

Utilizar un matraz aforado de 250 mL, empleando las cantidades que se indican en la tabla 1 y la disolución tampón obtenida en el apartado 2.1. Puesto que los fenoles seleccionados tienen valores de pK_a comprendidos entre 8 y 10, este pH garantiza que estén presentes tanto la forma neutra como la forma ácida del fenol. La concentración de estas disoluciones es alrededor de 10^{-4} M, pero no es necesario que sea conocida, como se justificará posteriormente.

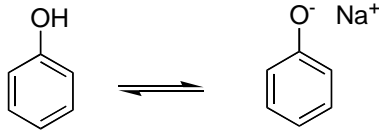
Las cantidades indicadas en la tabla 1 están calculadas para que la absorbancia en el ultravioleta de la disolución obtenida sea aproximadamente $A = 1$ y suponen un compromiso entre la precisión en la pesada y el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer. Debe comprobarse que la absorbancia de la disolución a la longitud de onda indicada para cada fenol, que en general corresponde a su máximo de absorción en el tampón de pH 9, está comprendida entre 0,8 y 1,2. En caso contrario, diluir con más tampón o añadir más fenol, según convenga.

Tabla 1. Cantidades recomendadas de cada fenol para la preparación de las disoluciones madre y valores correspondientes de λ_{\max}

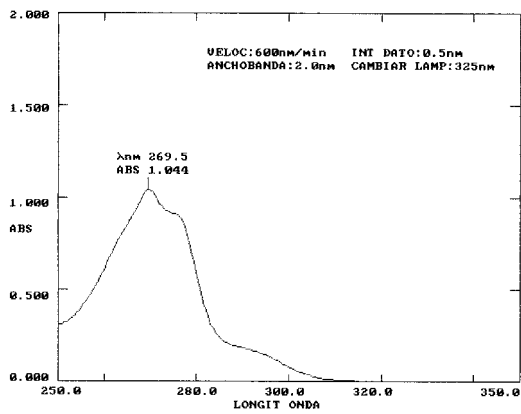
Compuesto	Pesada	λ_{\max}
Fenol	16 \pm 2 mg	269,5 nm
3-Nitrofenol	7 \pm 2 mg	252,0 nm
3-Clorofenol	20 \pm 2 mg	282,0 nm
3-Cresol	16 \pm 2 mg	271,0 nm
4-Cresol	20 \pm 2 mg	277,0 nm
4-Metoxifenol	13 \pm 2 mg	288,0 nm
4-Hidroxiacetofenona	2 \pm 1 mg	325,0 nm
4-(Acetilamino)fenol	7 \pm 2 mg	245,5 nm

2.3.- Obtención de espectros UV

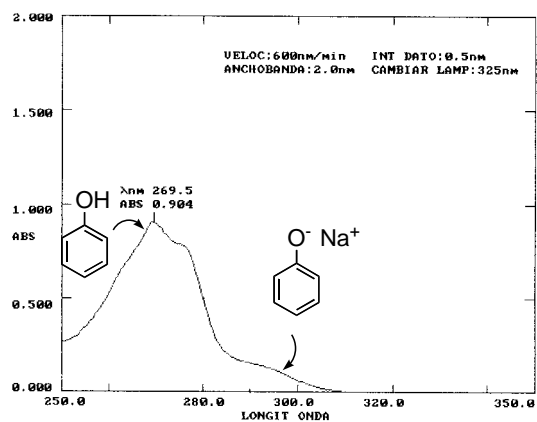
Para cada fenol, se preparan disoluciones diluidas a tres valores diferentes de pH, como sigue. En tres matraces aforados de 100 mL, se añaden, respectivamente, 20 mL de HCl 2 M, disolución tampón y NaOH 2 M y se completa el volumen de cada matraz con la disolución del fenol, agitándose a continuación. Las tres disoluciones contendrán exactamente la misma concentración del fenol, aunque variará la proporción de las formas no disociada y disociada, según su pH. Se registra el espectro UV de las tres disoluciones en el intervalo 230-350 nm. Como guía, se reproducen algunos ejemplos representativos en las figuras 1-3.



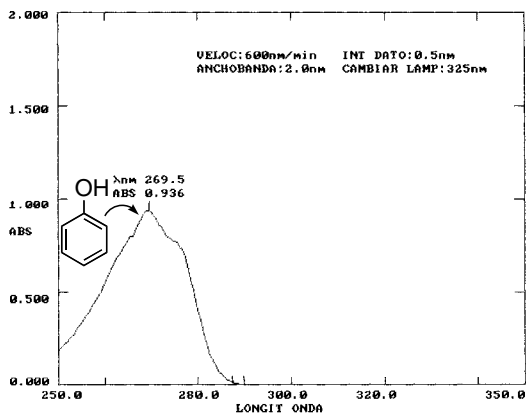
Disolución madre en tampón de pH 9



Disolución madre diluida con tampón



Disolución madre diluida con HCl 2M



Disolución madre diluida con NaOH 2M

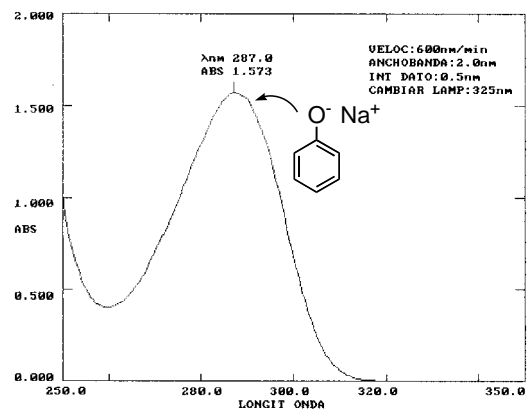
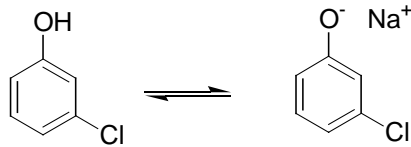
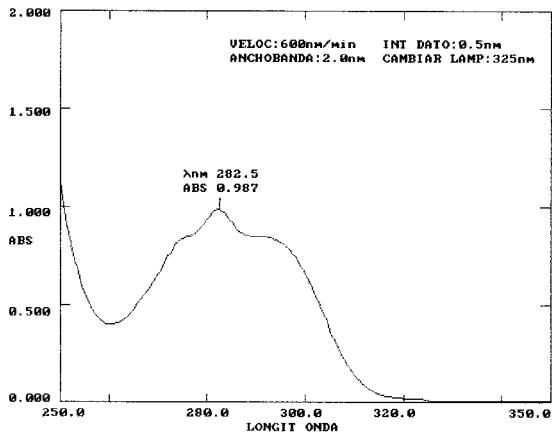


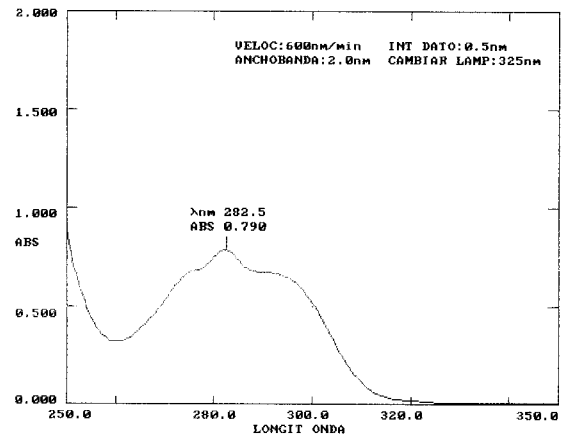
Figura 1. Espectros de absorción UV del fenol a diferentes valores de pH



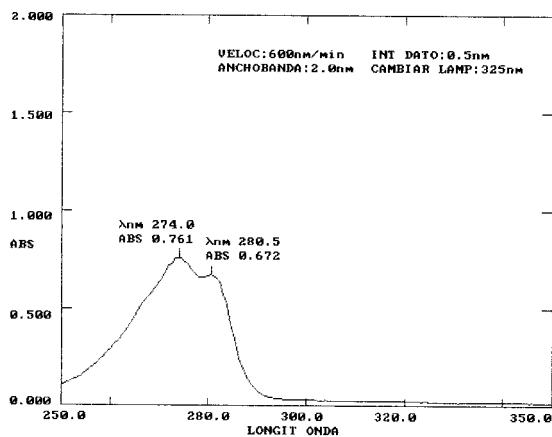
Disolución madre en tampón de pH 9



Disolución madre diluida con tampón



Disolución madre diluida con HCl 2M



Disolución madre diluida con NaOH 2M

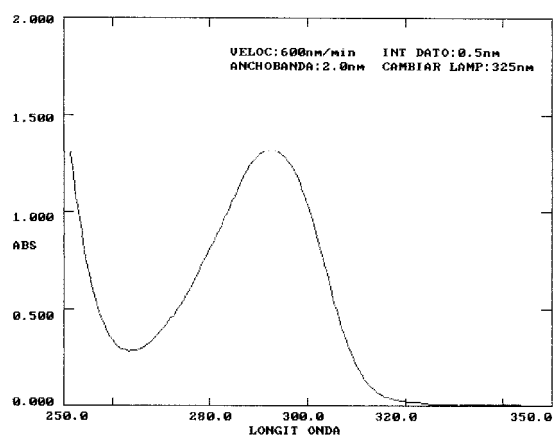


Figura 2. Espectros de absorción UV del 3-clorofenol a diferentes valores de pH

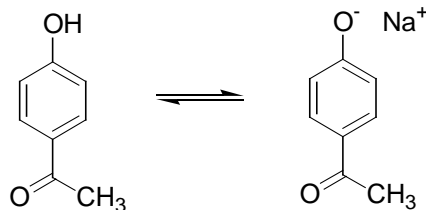
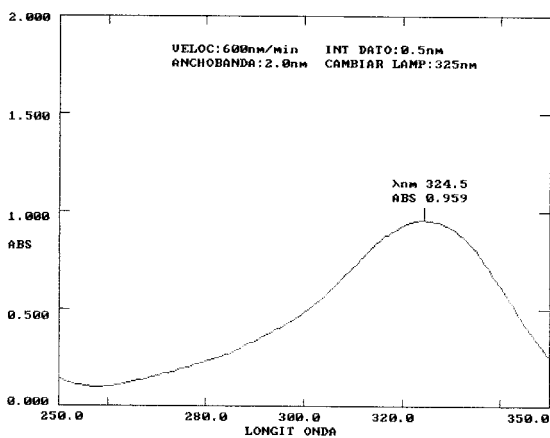
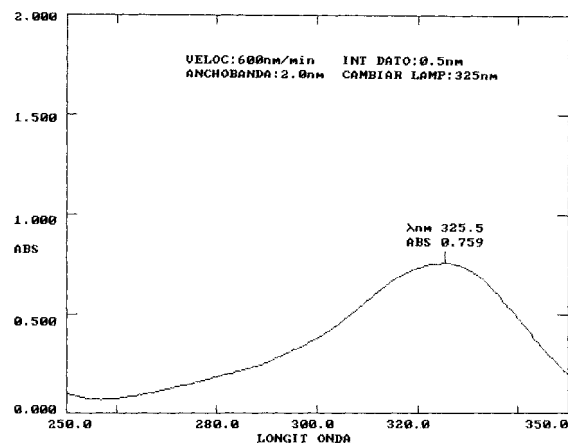
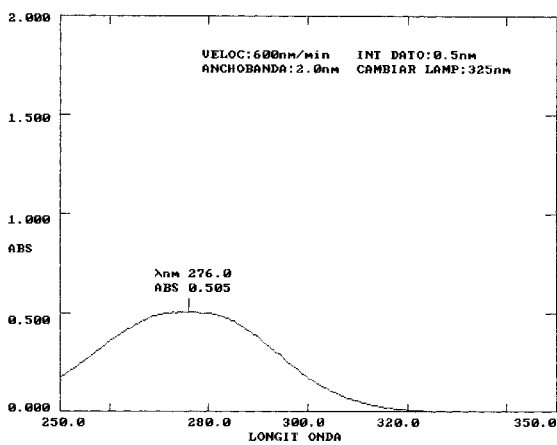
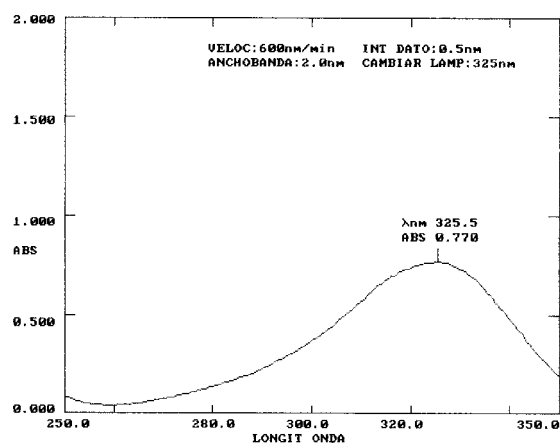
**Disolución madre en tampón de pH 9****Disolución madre diluida con tampón****Disolución madre diluida con HCl 2M****Disolución madre diluida con NaOH 2M**

Figura 3. Espectros de absorción UV de la 4-hidroxiacetofenona a diferentes valores de pH

Las medidas de pK_a se llevan a cabo a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de la forma *ionizada*. La razón es que la diferencia de absorción entre las especies ionizadas y neutras es máxima en estas condiciones (figura 4).

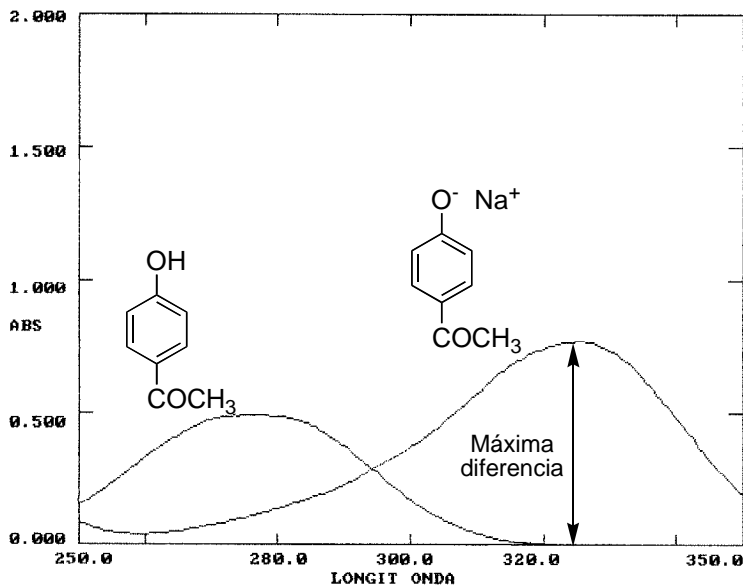


Figure 4. Superposición de los espectros de absorción UV de las formas ionizada y neutra de la 4-hidroxiacetofenona

Las longitudes de onda de los máximos de absorción de las especies ionizadas se recogen en la tabla 2:

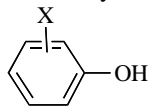
Table 2.- Longitudes de onda de los máximos de absorción de las especies ionizadas

Compuesto	λ_{\max}
Fenol	287,5 nm
3-Nitrofenol	292,5 nm
3-Clorofenol	292,5 nm
3-Cresol	289,5 nm
4-Cresol	296,0 nm
4-Metoxifenol	306,0 nm
4-Hidroxiacetofenona	325,5 nm
4-Acetilaminofenol	256,0 nm

A continuación, se determinan las absorbancias de las tres disoluciones a las longitudes de onda indicadas en la tabla 2. Utilizaremos las abreviaturas: *A* para la absorbancia de la

disolución tamponada, A_a para la absorbancia de la disolución ácida y A_b para la absorbancia de la disolución básica. Se recomienda resumir los resultados como se indica en la tabla 3:

Tabla 3. Absorbancias experimentales y valores calculados de pK_a



X	A	A_a	A_b	pK_a
H				
3-NO ₂				
3-Cl				
3-CH ₃				
4-CH ₃				
4-OCH ₃				
4-COCH ₃				
4-NHCOCH ₃				

3.- Cálculos

Los fenoles son lo bastante ácidos para disociarse en disolución acuosa:



En medio alcalino ($\text{pH} > 12$), la especie predominante es la ionizada (ión fenóxido, ArO^-), mientras que en medio ácido ($\text{pH} < 1$) se encuentran como fenoles no disociados (Ar-OH). A valores intermedios de pH existirá una mezcla de ambas especies, de acuerdo con la ecuación:

$$K_a = \frac{[\text{ArO}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{ArOH}]} \quad [3]$$

Por tanto,

$$\log \frac{1}{K_a} = pK_a = pH + \log \frac{[\text{ArOH}]}{[\text{ArO}^-]} = pH + \log \frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{ArO}^-}} \quad [4]$$

Es decir, el cálculo del pK_a requiere conocer el valor del cociente $c_{\text{ArOH}}/c_{\text{ArO}^-}$ a un valor determinado de pH, siendo c la concentración molar. Puesto que las estructuras electrónicas de un fenol y de su anión son diferentes, cabe esperar que presenten espectros UV-visible con valores de λ_{max} también diferentes y, por tanto, una disolución de un fenol puede tratarse como la disolución de una mezcla de dos especies. En este tipo de mezclas, y suponiendo que los solutos no interaccionan entre sí, se cumple la ley de Lambert-Beer para cada uno de ellos, por lo que la absorbancia de la disolución a una λ determinada es la suma de las absorbancias debidas a cada uno de los componentes:

$$A_\lambda = \sum_i A_i \quad [5]$$

Por tanto, la absorbancia total (A) medida a $\text{pH} = 9$ se puede expresar como sigue, teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer:

$$A = A_{\text{ArOH}} + A_{\text{ArO}^-} \quad [6]$$

$$A = \varepsilon_{\text{ArOH}} bc_{\text{ArOH}} + \varepsilon_{\text{ArO}^-} bc_{\text{ArO}^-} \quad [7]$$

A todos los valores de pH, la concentración analítica es la suma de las concentraciones de las formas neutra e ionizada ($c = c_{\text{ArOH}} + c_{\text{ArO}^-}$). Sin embargo, cuando $\text{pH} < 1$, se cumple que $c_{\text{ArOH}} \gg c_{\text{ArO}^-}$ y puede asumirse que ArOH es la única especie presente en estas condiciones. Por tanto, la medida realizada a pH ácido permite conocer el valor de $\varepsilon_{\text{ArOH}}$ a la longitud de onda de trabajo:

$$A_a = \varepsilon_{\text{ArOH}} bc_{\text{sol.ácida}} \Rightarrow \varepsilon_{\text{ArOH}} = \frac{A_a}{bc_{\text{sol.ácida}}} \quad [8]$$

Análogamente, debido a que a $\text{pH} > 12$ se cumple que $c_{\text{ArO}^-} \gg c_{\text{ArOH}}$, la absorbancia medida a pH básico (A_b) permite conocer el valor de $\varepsilon_{\text{ArO}^-}$:

$$A_b = \varepsilon_{\text{ArO}^-} b c_{\text{sol. básica}} \Rightarrow \varepsilon_{\text{ArO}^-} = \frac{A_b}{b c_{\text{sol. básica}}} \quad [9]$$

Sustituyendo estos valores en la expresión de la absorbancia total a pH 9, resulta:

$$A_T = \frac{A_a}{b c_{\text{sol. ácida}}} b c_{\text{ArOH}} + \frac{A_b}{b c_{\text{sol. básica}}} b c_{\text{ArO}^-} \quad [10]$$

$$A_T = A_a \frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{sol. ácida}}} + A_b \frac{c_{\text{ArO}^-}}{c_{\text{sol. básica}}} \quad [11]$$

Debido al procedimiento experimental seguido, las concentraciones $c_{\text{sol. ácida}}$ y $c_{\text{sol. básica}}$ son iguales entre sí, y corresponden, en la disolución de pH 9, a la suma de las concentraciones de las dos especies presentes:

$$c_{\text{sol. ácida}} = c_{\text{sol. básica}} = c_{\text{ArOH}} + c_{\text{ArO}^-} \quad [12]$$

Por tanto, los cocientes de concentraciones de la ecuación [11] equivalen a fracciones molares, ya que:

$$\frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{sol. ácida}}} = \frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{ArOH}} + c_{\text{ArO}^-}} = \frac{\frac{n_{\text{ArOH}}}{V}}{\frac{n_{\text{ArOH}}}{V} + \frac{n_{\text{ArO}^-}}{V}} = x_{\text{ArOH}} \quad [13]$$

$$\frac{c_{\text{ArO}^-}}{c_{\text{sol. básica}}} = \frac{c_{\text{ArO}^-}}{c_{\text{ArOH}} + c_{\text{ArO}^-}} = \frac{\frac{n_{\text{ArO}^-}}{V}}{\frac{n_{\text{ArOH}}}{V} + \frac{n_{\text{ArO}^-}}{V}} = x_{\text{ArO}^-} \quad [14]$$

Con esta modificación, la ecuación [11] queda de la siguiente forma:

$$A_T = A_a \cdot x_{\text{ArOH}} + A_b \cdot x_{\text{ArO}^-} \quad [15]$$

Y, puesto que las dos fracciones molares suman 1,

$$A_T = A_a \cdot (1 - x_{\text{ArO}^-}) + A_b \cdot x_{\text{ArO}^-} \quad [16]$$

Esta expresión permite calcular la fracción molar de la especie ArO^- , y también la de ArOH restando dicho valor de 1. A partir de estos valores se puede determinar el pK_a deseado, ya que:

$$pK_a = pH + \log \frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{ArO}^-}} \quad [17]$$

Finalmente, puesto que la concentración molar es proporcional a la fracción molar,

$$pK_a = pH + \log \frac{x_{\text{ArOH}}}{x_{\text{ArO}^-}} \quad [18]$$

A partir de [16] y [18], se deduce (ver la cuestión nº 4.1):

$$pK_a = pH + \log \frac{A_b - A}{A - A_a} \quad [19]$$

4. Cuestiones

- 4.1.- Complete la deducción de la ecuación [19].
- 4.2.- Calcule las fracciones molares de las dos especies presentes en las disoluciones en medio tamponado de cada fenol.
- 4.3.- Calcule el pK_a de todos los fenoles.
- 4.4.- Utilizando sus valores de pK_a y algunos valores adicionales que se dan en la tabla 4, haga una representación de Hammett (pK_a , frente a σ). ¿Cuál es la ecuación de la recta obtenida por el método de mínimos cuadrados? Relaciónela con la ecuación de

Hammett [2]. ¿Qué relación tiene la pendiente de la recta con ρ ? ¿Cuál es el significado de ρ y la ordenada en el origen de la recta?

Table 4. Algunos valores bibliográficos de σ y pK_a

Sustituyente	σ	pK_a
H	0,00	
3-Me	-0,06	
4-Me	-0,17	
3-F	0,34	---
3-Br	0,39	---
3-Cl	0,37	
4-F	0,06	9,91
3-OMe	0,11	9,65
4-OMe	-0,28	
4-Ac	0,48	
3-NO ₂	0,71	

- 4.5. A partir de los valores de pK_a obtenidos, y utilizando la ecuación [2], calcule las constantes de sustituyente para los grupos 3-nitro- y 4-acetilo. Compare estos valores con los valores de σ bibliográficos de la tabla 4, y dé una explicación de las discrepancias que puedan existir.
- 4.6.- El valor de pK_a del compuesto sustituido en 4 con un grupo acetilo se desvía de la línea recta anterior. ¿Por qué?
- 4.7.- Con los datos de que dispone, prediga los valores de pK_a del 3-fluorofenol y el 3-bromofenol.
- 4.8.- A partir del valor de pK_a obtenido para el paracetamol, calcule el grado de ionización de este fármaco en el estómago y el intestino, suponiendo que el pH de ambos es 1 y 6, respectivamente.

5. Bibliografía

Day, R. A. Jr.; Underwood, A. L. Quantitative analysis, 6th Edition, p. 646. Prentice Hall, 1991.

Hansch, C.; Leo, A. Exploring QSAR. Fundamentals and applications in chemistry and biology. American Chemical Society, 1995.

Hansch, C.; Leo, A. Exploring QSAR. Hydrophobic, electronic and steric constants. American Chemical Society, 1995.

Harwood, L. M.; Moody, C. J. Experimental Organic Chemistry. Principles and practice, 1st Ed., experimento 101. Blackwell Scientific Publications, 1989.

J. Carlos Menéndez

josecm@farm.ucm.es

El trabajo en los laboratorios de Medicinal Chemistry debe mantener altos estándares de precaución y buen uso.

El manejo de instrumental eléctrico, la utilización de calor, el material de cristal y los disolventes no presentan un especial problema, si se siguen las instrucciones del supervisor.

Este documento ha sido supervisado por el Prof. J. Carlos Menéndez (josecm@farm.ucm.es) quien informa que no existen problemas específicos de seguridad en la realización de este ejercicio, incluyendo toxicidad, inflamabilidad y explosión, ni cualquier otro destacable, dentro de lo usual en un laboratorio de Medicinal Chemistry.

Se agradecerá comunicar al Editor cualquier posible incidencia.

EXERCISE III.5

MEASUREMENT OF THE pK_a OF PHENOLS AND ITS APPLICATION TO THE DETERMINATION OF QSAR-RELATED ELECTRONIC PARAMETERS

Pilar López-Alvarado, J. Carlos Menéndez, and M^a Teresa Ramos

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

E-mail: josecm@farm.ucm.es

1. Introduction

The acid dissociation constant, which describes the extent to which a compound dissociates in aqueous solution, is a fundamental physical property of drugs. Differences in solubility and hence in absorption, bioreactivity, and toxicology are common when comparing the properties of the ionized and neutral forms. Experimentally determined values of pK_a are not always available in the literature, and often estimated values need to be employed instead. One of the main parameters related to the electronic character (i.e., electron-releasing or -withdrawing) of a substituent present in a drug molecule is Hammett's σ parameter, which is defined from pK_a values of benzoic acids, as shown below. Although this parameter was introduced in a physical organic chemistry context, it is also very important in medicinal chemistry, since the search for quantitative structure–activity relationships (QSARs), which is one of the aims of drug design, requires the use of parameters that describe quantitatively how structural changes lead to variations in certain physicochemical properties related to activity.

Hammett postulated that each functional group attached to the benzoic acid molecule causes a predictable effect on its acidity. In order to quantify this effect, he defined for each substituent and each position a substituent constant σ_x as shown in equation 1, which is normally known as the Hammett equation:

$$\sigma_x = \log \frac{K_X}{K_H} = \log K_X - \log K_H \quad [1]$$

where K_H is the ionization constant for benzoic acid in water at 25 °C and K_X is the ionization constant for the substituted benzoic acid, under the same conditions. Positive σ_x values

correspond to electron-withdrawing substituents, which increase the acidity of benzoic acids, while negative σ_X values are characteristic of electron-releasing substituents.

The Hammett equation can be extended to systems different to benzoic acids, provided that the X substituent is placed on an aromatic ring. The general Hammett equation can be written as follows:

$$\rho\sigma_x = \log \frac{K_X}{K_H} = \log K_X - \log K_H \quad [2]$$

where ρ is the slope of the straight line that is obtained by plotting the pK_a values for a series of acid compounds belonging to the structural family under consideration (e.g., phenols, phenoxyacetic acids, etc.) against those of the corresponding benzoic acids. Equation 2 also means that it is possible to use the electronic effect of a substituent on benzoic acid to calculate the effect of the same substituent on a different acidic aromatic compound. It should also be possible to employ similar equations to study substituent effects on reactions other than acid–base equilibria.

In the ionization of phenols to phenoxide ions, when a negative charge is generated on a benzylic atom, enhanced resonance effects are encountered for *para* resonance-electron-withdrawing substituents, and new constant values, called σ^- , need to be defined.

The purpose of this experiment is threefold:

- a) To illustrate the determination of pK_a using a spectrophotometric method.
- b) To confirm the existence of a linear relationship between pK_a and σ (Hammett's equation) and to apply this relationship to the calculation of ρ for phenol ionization and the prediction of pK_a values of not experimentally tested (and perhaps even previously unknown) compounds.
- c) To use the experimental pK_a data thus obtained to calculate σ^- values.

2. Experimental procedure for pK_a measurements

GLASSWARE AND EQUIPMENT

Volumetric flasks

1 × 1 L

1 × 250 mL for each phenol

3 × 100 mL for each phenol

Conical flask (2 L)

Measuring cylinder (100 mL)

Pipettes and pipette filler

Volumetric pipette (20 mL)

Spatula

Glass rod

Quartz cells for UV–vis spectrophotometric measurements

Combined glass electrode for pH measurements

CHEMICALS

Borax (sodium tetraborate decahydrate)

2 M HCl solution

2 M NaOH solution

Several phenols with pK_a values between 8 and 10:

- Phenol
- 3-Nitrophenol
- 3-Chlorophenol
- 3-Cresol
- 4-Cresol
- 4-Methoxyphenol
- 4-Hydroxyacetophenone
- 4-(Acetylamino)phenol (paracetamol, acetaminophen)

INSTRUMENTS

UV–vis spectrophotometer

pH-meter

PROCEDURE

2.1 Preparation of the buffer solution

Accurately weigh 9.535 g of sodium tetraborate decahydrate in a volumetric flask, complete to 1 L with distilled water and shake vigorously. Transfer the contents to a 2 L conical flask; rinse carefully the volumetric flask with 92 mL of a 0.1 M solution of HCl, and add it to the

borate suspension, which should complete dissolution. Measure the pH of the solution thus obtained, which should be around 9, and write down the value, which will be necessary at a later stage.

2.2 Preparation of the phenol stock solutions

Use a 250-mL volumetric flask, employing the amounts given in Table 1 and using the pH = 9 buffer as solvent. Since the chosen phenols have pK_a values between 8 and 10, this pH guarantees that both forms of the phenol (ionized and neutral) will be present. These solutions are about 10^{-4} M, but it is not necessary to know their precise concentration because of the way the calculations will be performed.

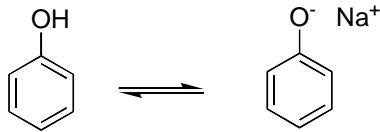
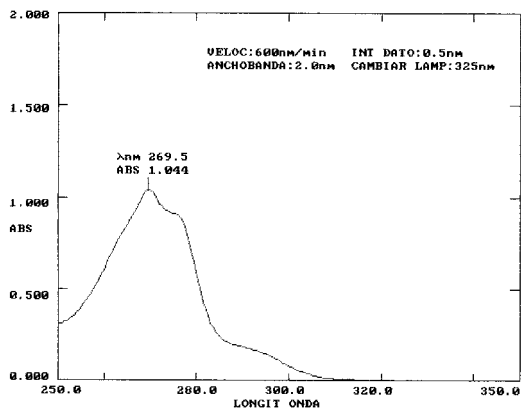
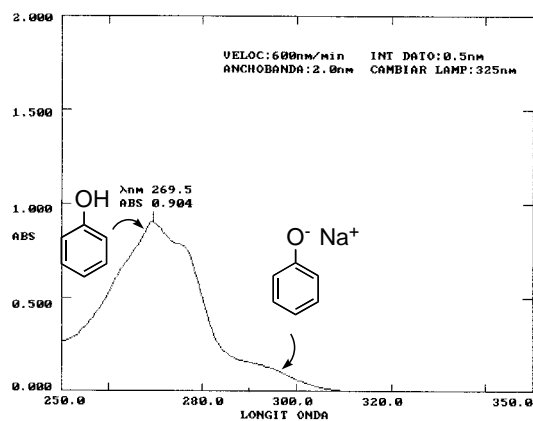
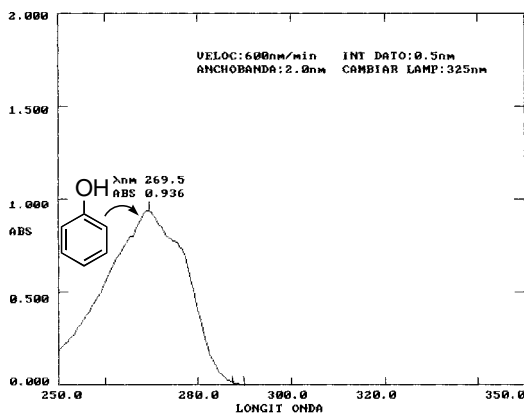
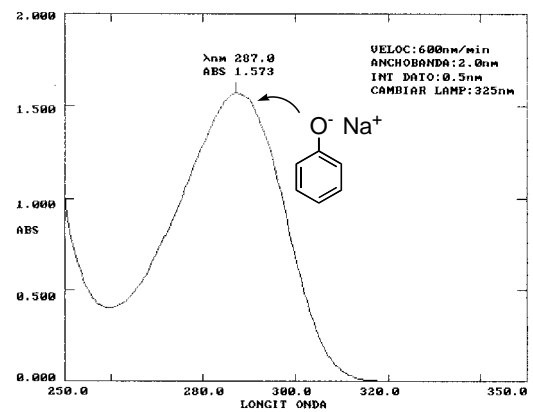
The amounts of phenol derivatives given in Table 1 have been calculated to give absorbances around $A = 1$, and represent a compromise between accuracy in the weight and moderate deviations from the Lambert–Beer law at the wavelength where the measurements are actually made (see Table 2 below). It should be verified that the absorbance values at the wavelengths given in Table 1 (corresponding to the absorption maxima) are comprised between 0.8 and 1.2. Otherwise, dilute with more buffer or concentrate the solution with some more phenol, as necessary.

Table 1 Amounts of each phenol recommended for the preparation of stock solutions and wavelengths of their absorption maxima.

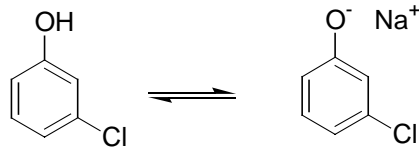
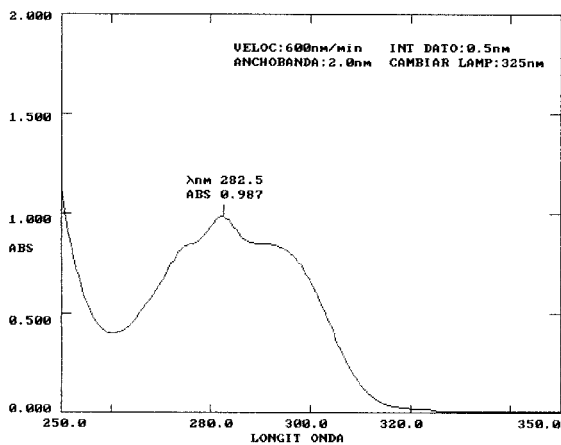
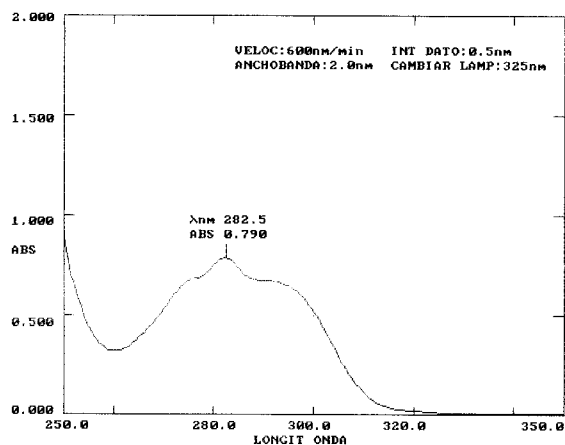
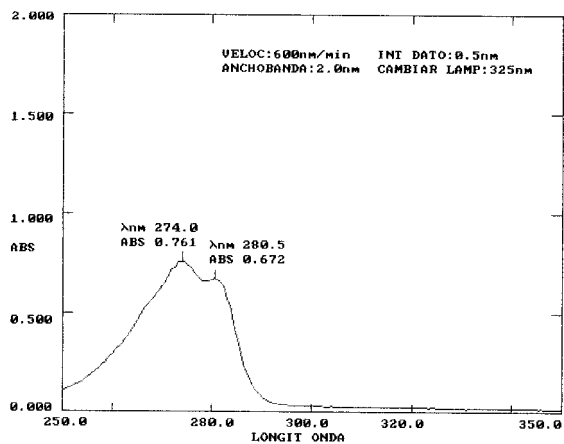
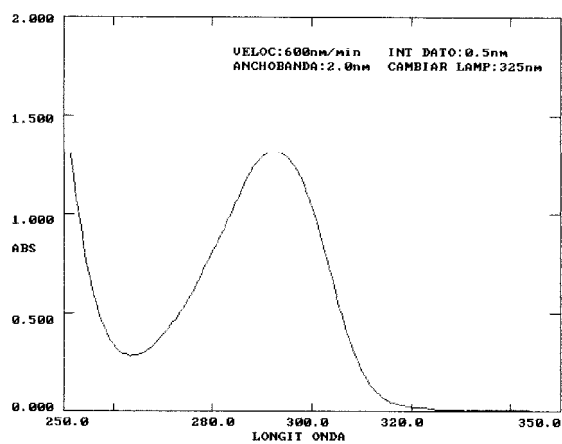
Compound	Weight	λ_{\max}
Phenol	16 ± 2 mg	269.5 nm
3-Nitrophenol	7 ± 2 mg	252.0 nm
3-Chlorophenol	20 ± 2 mg	282.0 nm
3-Cresol	16 ± 2 mg	271.0 nm
4-Cresol	20 ± 2 mg	277.0 nm
4-Methoxyphenol	13 ± 2 mg	288.0 nm
4-Hydroxyacetophenone	2 ± 1 mg	325.0 nm
4-(Acetylamino)phenol	7 ± 2 mg	245.5 nm

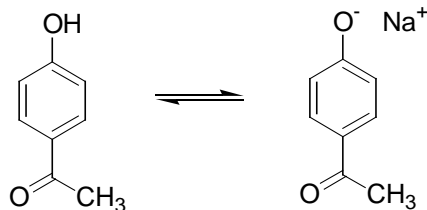
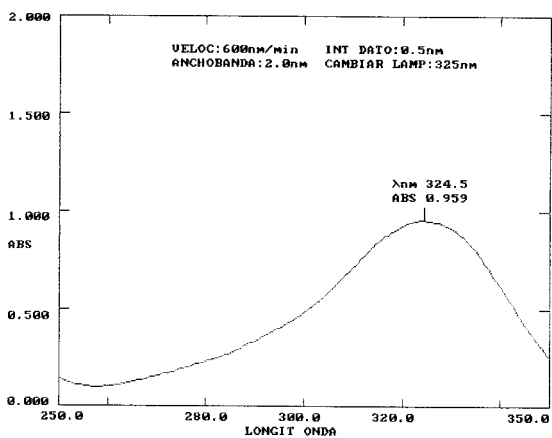
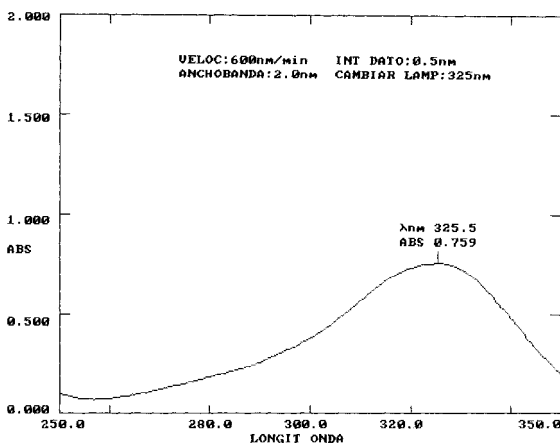
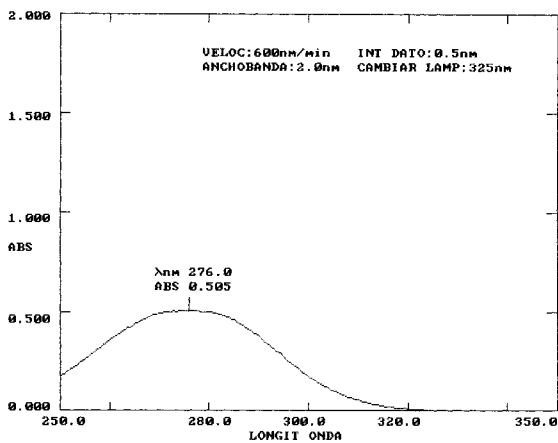
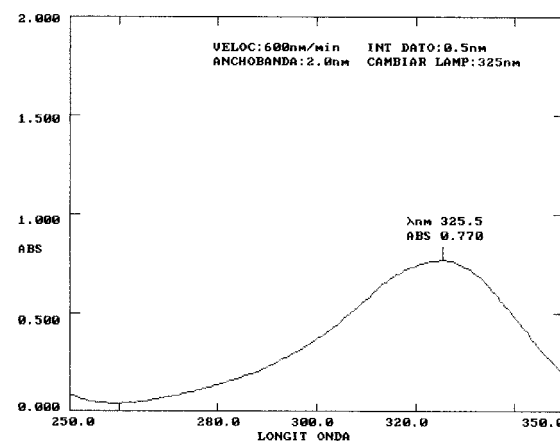
2.3 Determination of UV spectra

For each phenol, prepare diluted solutions at three different pH values as follows. Place 20 mL of 2 M HCl solution, 20 mL of the 2M NaOH solution, and 20 mL of the buffer solution in three different 100 mL volumetric flasks and make up the volume of each flask to 100 mL with the phenol stock solution prepared in 2.2 and shake the flasks. These solutions contain the same phenol concentration, although the amounts of neutral and ionized forms will be different because of the different pH values. Register the UV absorption spectra of the three solutions in the 230–350 nm interval. As a guide, representative examples of these spectra are given in Figs. 1–3.

**Mother solution in pH 9 buffer****Mother solution, after dilution with buffer****Mother solution, after dilution with HCl 2M****Mother solution, after dilution with NaOH 2M****Fig. 1** UV absorption spectra of phenol at several pH values.

N.B. Correct English; Mother solution = Stock solution

**Mother solution in pH 9 buffer****Mother solution, after dilution with buffer****Mother solution, after dilution with HCl 2M****Mother solution, after dilution with NaOH 2M****Fig. 2** UV absorption spectra of 3-chlorophenol at several pH values.

**Mother solution in pH 9 buffer****Mother solution, after dilution with buffer****Mother solution, after dilution with HCl 2M****Mother solution, after dilution with NaOH 2M****Fig. 3** UV absorption spectra of 4-acetylphenol at several pH values.

The actual pK_a measurement is carried out at the wavelength corresponding to the maximum absorption of the *ionized* form. The reason is that the difference of absorption between the ionized and neutral species is maximum under these conditions (Fig. 4).

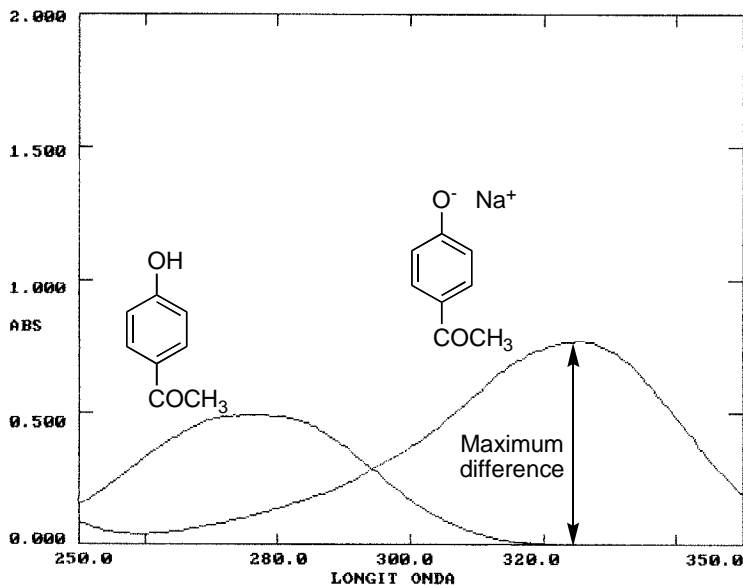


Fig. 4 Superimposition of the UV absorption spectra of the ionized and non-ionized forms of 4-hydroxyacetophenone.

The wavelengths corresponding to absorption maxima of the ionized species are given in Table 2.

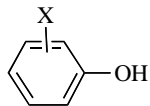
Table 2 Wavelengths of the absorption maxima of the ionized species.

Compound	λ_{\max}
Phenol	287.5 nm
3-Nitrophenol	292.5 nm
3-Chlorophenol	292.5 nm
3-Cresol	289.5 nm
4-Cresol	296.0 nm
4-Methoxyphenol	306.0 nm
4-Hydroxyacetophenone	325.5 nm
4-(Acetylamino)phenol	256.0 nm

Measure the absorbances of the three solutions at the wavelengths given in Table 2 for each phenol. We will use the abbreviations A for the absorbance of the buffered solution, A_a

for the absorbance of the acidic solution and A_b for the absorbance of the basic solution. It is advised that you summarize the results as shown in Table 3:

Table 3 Experimental absorbances and calculated pK_a values.



X	A	A_a	A_b	pK_a
H				
3-NO ₂				
3-Cl				
3-CH ₃				
4-CH ₃				
4-OCH ₃				
4-COCH ₃				
4-NHCOCH ₃				

3. Calculations

Phenols are sufficiently acidic to be dissociated in aqueous solution:



In basic media (pH > 12), the predominant species is phenoxide anion (ArO^-), while in acid solution (pH < 1) they are not ionized and the neutral form Ar-OH predominates. At intermediate pH values, an equilibrium exists, according to:

$$K_a = \frac{[\text{ArO}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{ArOH}]} \quad [3]$$

Therefore,

$$\log \frac{1}{K_a} = pK_a = pH + \log \frac{[\text{ArOH}]}{[\text{ArO}^-]} = pH + \log \frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{ArO}^-}} \quad [4]$$

That is to say, pK_a calculation requires one to know the value of the $c_{\text{ArOH}}/c_{\text{ArO}^-}$ ratio at a given pH value, where c is the molar concentration. Because the electronic structures of phenols and their anions are different, their UV absorption maxima should also differ, and therefore the phenol solution can be treated as a mixture of two components. In this type of mixture, and provided that solutes do not interact among themselves, the Lambert–Beer law holds for each of them, and the total absorbance of the solution at a given λ is the sum of individual absorbances:

$$A_\lambda = \sum_i A_i \quad [5]$$

Therefore, the total absorbance (A_T) at pH = 9 can be given as follows, taking into account Lambert–Beer's law:

$$A = A_{\text{ArOH}} + A_{\text{ArO}^-} \quad [6]$$

$$A = \varepsilon_{\text{ArOH}} b c_{\text{ArOH}} + \varepsilon_{\text{ArO}^-} b c_{\text{ArO}^-} \quad [7]$$

At all pH values, the analytical concentration is the sum of the concentrations of the neutral and ionized forms ($c = c_{\text{ArOH}} + c_{\text{ArO}^-}$). However, when pH < 1, $c_{\text{ArOH}} \gg c_{\text{ArO}^-}$ and it can be

assumed that ArOH is the only species present in these conditions. For this reason, the absorbance value measured at acid pH (A_a) allows to know the value of ϵ_{ArOH} at the working wavelength:

$$A_a = \epsilon_{\text{ArOH}} b c_{\text{sol.ácida}} \Rightarrow \epsilon_{\text{ArOH}} = \frac{A_a}{b c_{\text{sol.ácida}}} \quad [8]$$

Similarly, because at pH > 12 $c_{\text{ArO}^-} \gg c_{\text{ArOH}}$, the absorbance at basic pH (A_b) is related to ϵ_{ArO^-}

$$A_b = \epsilon_{\text{ArO}^-} b c_{\text{sol.básica}} \Rightarrow \epsilon_{\text{ArO}^-} = \frac{A_b}{b c_{\text{sol.básica}}} \quad [9]$$

Taking these values to equation 7, the following expressions are obtained for A_T :

$$A_T = \frac{A_a}{b c_{\text{acid solution}}} b c_{\text{ArOH}} + \frac{A_b}{b c_{\text{basic solution}}} b c_{\text{ArO}^-} \quad [10]$$

$$A_T = A_a \frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{sol.ácida}}} + A_b \frac{c_{\text{ArO}^-}}{c_{\text{sol.básica}}} \quad [11]$$

Owing to the experimental procedure employed, the values for $c_{\text{acid solution}}$ and $c_{\text{basic solution}}$ are identical and equal to the sum of the two species present in the pH 9 buffer:

$$c_{\text{sol.ácida}} = c_{\text{sol.básica}} = c_{\text{ArOH}} + c_{\text{ArO}^-} \quad [12]$$

Combination of equations 11 and 12 leads to 13 and 14, where x are mole fractions.

$$\frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{sol.ácida}}} = \frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{ArOH}} + c_{\text{ArO}^-}} = \frac{\frac{n_{\text{ArOH}}}{V}}{\frac{n_{\text{ArOH}}}{V} + \frac{n_{\text{ArO}^-}}{V}} = x_{\text{ArOH}} \quad [13]$$

$$\frac{c_{\text{ArO}^-}}{c_{\text{sol.básica}}} = \frac{c_{\text{ArO}^-}}{c_{\text{ArOH}} + c_{\text{ArO}^-}} = \frac{\frac{n_{\text{ArO}^-}}{V}}{\frac{n_{\text{ArOH}}}{V} + \frac{n_{\text{ArO}^-}}{V}} = x_{\text{ArO}^-} \quad [14]$$

Using equations 13 and 14, equation 11 can now be written as follows:

$$A_T = A_a \cdot x_{\text{ArOH}} + A_b \cdot x_{\text{ArO}^-} \quad [15]$$

And, because the sum of the two mole fractions must be 1,

$$A_T = A_a \cdot (1 - x_{\text{ArO}^-}) + A_b \cdot x_{\text{ArO}^-} \quad [16]$$

Equation 16 gives the mole fraction of the ArO^- species, and that of ArOH can then be easily obtained by subtraction from 1. From these values, the desired pK_a value can be calculated from its definition:

$$pK_a = pH + \log \frac{c_{\text{ArOH}}}{c_{\text{ArO}^-}} \quad [17]$$

Because molarity is proportional to mole fraction,

$$pK_a = pH + \log \frac{x_{\text{ArOH}}}{x_{\text{ArO}^-}} \quad [18]$$

From equations 16 and 18, it can be easily deduced (see question 4.1) that:

$$pK_a = pH + \log \frac{A_b - A}{A - A_a} \quad [19]$$

4. Questions

- 4.1 Complete the deduction of equation 19.
- 4.2 Calculate the mole fractions of the two species present in the buffered solutions of each phenol.
- 4.3 Determine the pK_a value of all phenols.
- 4.4 Using these pK_a values and some others taken from the literature that are given in Table 4 together with the values of the σ parameter, construct a Hammett plot (pK_a against σ). What is the equation of the best (least squares) straight line? Relate this straight line with the Hammett equation (equation 2). How does the slope of the straight line relate to ρ , as defined in equation 2? What are the meanings of ρ and of the y-intercept?

Table 4 Some literature σ and pK_a values.

Substituent	σ	pK_a
H	0.00	
3-Me	-0.06	
4-Me	-0.17	
3-F	0.34	
3-Br	0.39	
3-Cl	0.37	
4-F	0.06	9.91
3-OMe	0.11	9.65
4-OMe	-0.28	
4-Ac	0.48	
3-NO ₂	0.71	

- 4.5 From their measured pK_a values and using equation 2, calculate the substituent constant values for 3-nitro- and 4-acetyl substituents. Compare these values with σ literature data in Table 4, and give an explanation of any discrepancy observed.
- 4.6 The pK_a value of 4-hydroxyacetophenone (4-acetylphenol) lies out of the straight line. Give an explanation.
- 4.7 Using the data obtained in 4.4 (plot or equation), what values of pK_a can be predicted for 3-fluorophenol and 3-bromophenol?

4.8 From the pK_a value obtained for paracetamol, calculate the degree of ionization of this drug in the stomach and intestine, assuming the pH of the contents of the stomach and intestine to be 1 and 6, respectively.

4. References

Day, R. A. Jr.; Underwood, A. L. Quantitative analysis, 6th Edition, p. 646. Prentice Hall, 1991.

Hansch, C.; Leo, A. Exploring QSAR. Fundamentals and applications in chemistry and biology. American Chemical Society, 1995.

Hansch, C.; Leo, A. Exploring QSAR. Hydrophobic, electronic and steric constants. American Chemical Society, 1995.

Harwood, L. M.; Moody, C. J. Experimental Organic Chemistry. Principles and practice, 1st Ed., experiment 101. Blackwell Scientific Publications, 1989.

J. Carlos Menéndez

josecm@farm.ucm.es

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories. The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. J. Carlos Menéndez (josecm@farm.ucm.es) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.