Multi-Wavelength Kinetics용 Agilent Cary 8454 UV-Vis 다이오드 어레이의 장점

응용 자료

특수 화학

저자

Dr. Ursula Tems

Agilent Technologies
Mulgrave, Australia

서론

pNPA(p-nitrophenyl acetate) 가수분해 반응은 반응 기질 감소 또는 반응 생성물질 증가의 모니터링을 통해 분광 광도로 팔로우될 수 있습니다. 농도의 변화 속도를 모니터링하면 반응 속도를 확정할 수 있습니다.

Agilent Cary 8454 UV-Visible 다이오드 어레이 분광 광도계는 0.1초만에 전체 스펙트럼을 측정할 수 있습니다. 필요 시 시간에 따른 흡광도 변화를 저장된 스펙트럼 데이터에서 언제든지 추출 가능합니다. 전체 파장 범위의 모든 데이터는 동일한 시험 과정에서 동시에 얻기 때문에, 여러 파장 조건에서 결과를 정확하게 해석할 수 있으며 반응 메커니즘에 대한 의미 있는 통찰을 제공할 수 있습니다.

기존 스캐닝 분광 광도계는 매우 편리하고(또는 매우 빠른 반응의 경우 필수적으로) 단일 파장 또는 일부 파장 선택 시 반응 kinetics를 팔로우합니다. 반응이 진행되는 동안, pNPA 가수분해는 270nm에서의 pNPA 소모 또는 405nm에서의 p-nitrophenol 생성에 나타날 수 있습니다. 그러나 전체 스펙트럼 범위를 모니터링하지 않으면, 보다 정확한 데이터 분석을 수행하는 데 필요한 중요한 데이터를 생략할 수 있습니다.

빠르고 정확한 측정 이외에, 정확한 온도 제어는 훌륭한 kinetic에 대해 지극히 중요합니다. 연구되고 있는 반응에 따라, 단지 1°C의 변화도 관찰된 반응 속도에서 상당한 변화를 일으킬 수 있습니다. Agilent Cary 8454에는 정확한 온도 제어를 제공하고 시료를 가열 및 냉각시킬 수 있으며 온도 프로브를 이용하여 시료의 온도를 측정할 수 있는 Peltier 온도 제어 액세서리 (부품 번호 89090A)가 있습니다.

실험

pNPA는 다음과 같은 등식에 따라 알칼리 용액에서 가수분해하여 p-nitrophenol로 됩니다.

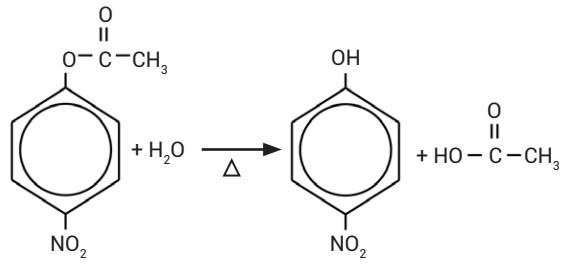

그림 1. pNPA 가수분해 반응

원칙적으로 이것은 2차 반응이지만, 물이 과도한 상태일 경우 유사 1차 kinetics로 나타날 수 있습니다. 반응 속도는 pH 및 온도에 민감합니다. 실험을 수행하기 위해 큐벳에 2.9mL의 0.1 M 인산염 완충액 (pH 8.5)을 추가하고, 온도 조절식 셀 홀더에 넣어 평형이 되도록 하였습니다. 비활성 유리로 코팅된 작은 외부 온도 센서 옵션은 시료의 정확한 온도 확정에 사용되었습니다.

Peltier 온도 컨트롤러는 시료를 포함한 셀 주위의 알루미늄 블록의 온도를 제어합니다. 셀은 온도 차이를 최소화하기 위해 알루미늄 블록에 물리적으로 최대한 밀접하게 접촉합니다. 사전에 설정된 온도와 실제 시료 온도 사이에 매우 작은 차이만 존재하며, 이는 큐벳에 증류수 3mL를 추가하고 외부 센서를 사용해 여러 온도에서의 차이를 분석하는 것을 통해 결정되었습니다(그림 2). 그리고 모니터링된 온도는 외부 온도 센서를 통한 실제 시료의 온도였으며, 이는 최고의 정확성을 확보하였습니다.

반응 온도가 평형화되었을 때, 건조 acetonitrile 원액에 p-nitrophenyl 50µL을 추가함으로써 반응을 시작시키며, 그리고 교반기로 700rpm에서 반응을 혼합하였습니다. 온도 및 반응 속도에 따라 조정된 특정 간격을 근거하여 자동으로 스펙트럼을 획득하였습니다. 그림 3에 125초 간격으로 측정된 55°C에서의 반응 스펙트럼을 나타납니다.

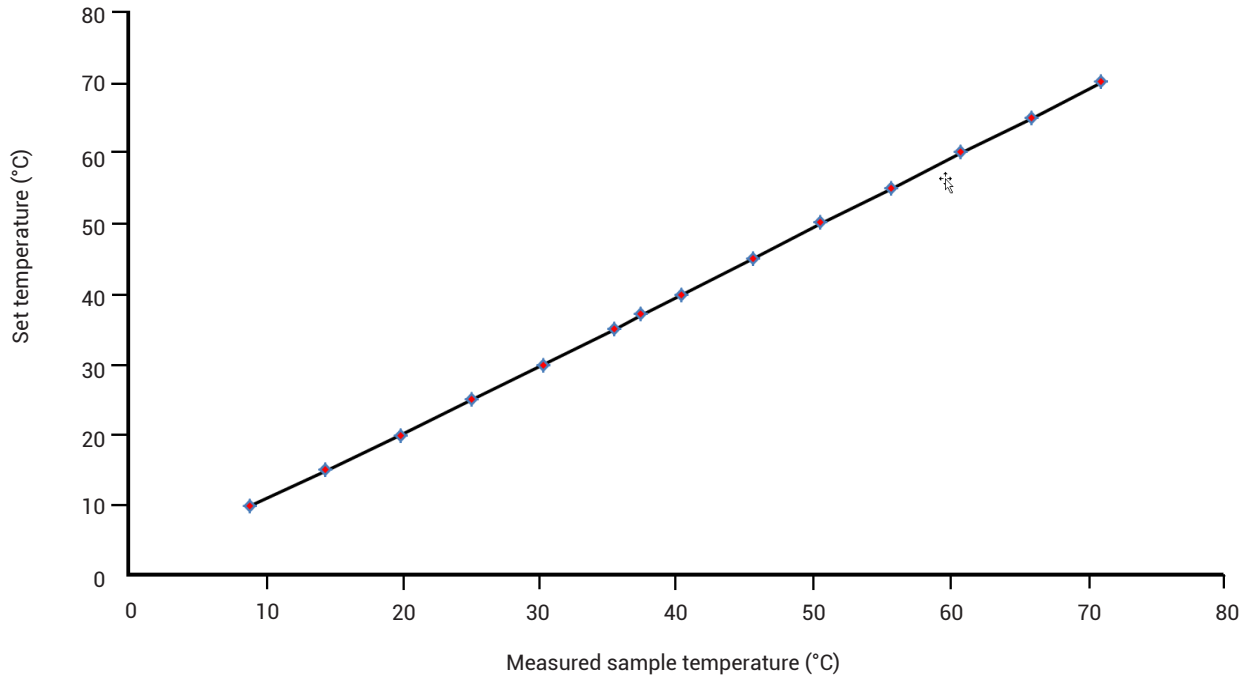

그림 2. 세트(셀 홀더) 온도 및 측정된 시료 온도 간의 상관관계

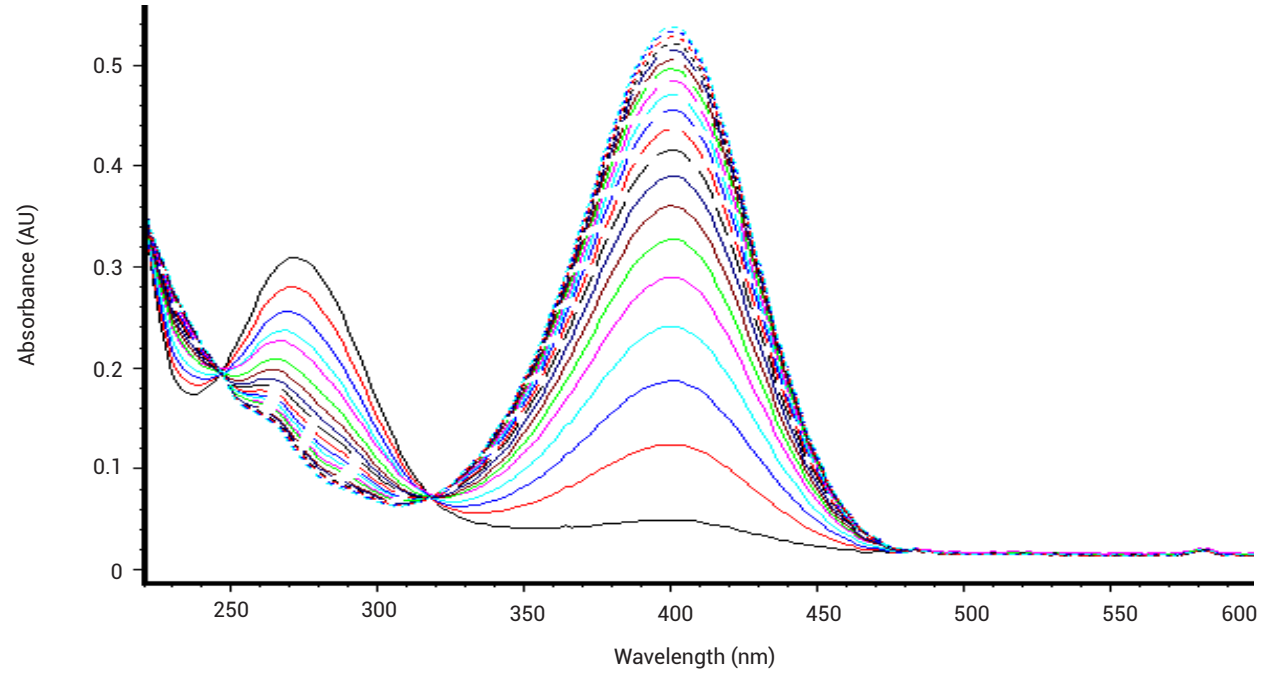

그림 3. 55°C에서의 p-nitrophenyl acetate 가수분해 반응 스펙트럼

파장 범위에 걸쳐 반복적으로 변화되는 흡수 스펙트럼을 기록하면, 스펙트럼은 하나 또는 그 이상의 파장에서 교차될 수 있습니다(그림 3). 이러한 교차점은 등흡광점이라고 불으며, 반응물질 및 생성물질 간에 균일한 반응(즉 부반응 또는 연속 반응이 없음)을 이뤄지고 있음을 나타냅니다. 그림 3의 정확한 등흡광점은 반응 시간 전체에 걸친 Agilent Cary 8454 UV-Visible 분광 광도계의 광학 및 온도 안정성을 보여줍니다.

UV-Visible ChemStation을 사용하면 기존에 수집된 데이터을 손쉽게 열 수 있고 모든 파장을 재분석 가능합니다. 이러한 경우에, 데이터 수집 이후 기타 성분이 흡수되지 않는 단일 파장(405nm)에서의 p-nitrophenol 형성에 대한 데이터 추출을 통해 반응 kinetics를 분석할 수 있습니다(그림 4).

BioChemical Analysis 애드온(G1117AA)의 일부로 이용할 수 있는 UV-Visible ChemStation 소프트웨어의 Kinetics 모드를 사용하여 55 C에서 $1.24 \times 10^{-3} s^{-1}$로 유사 1차 속도 상수를 계산하였습니다.

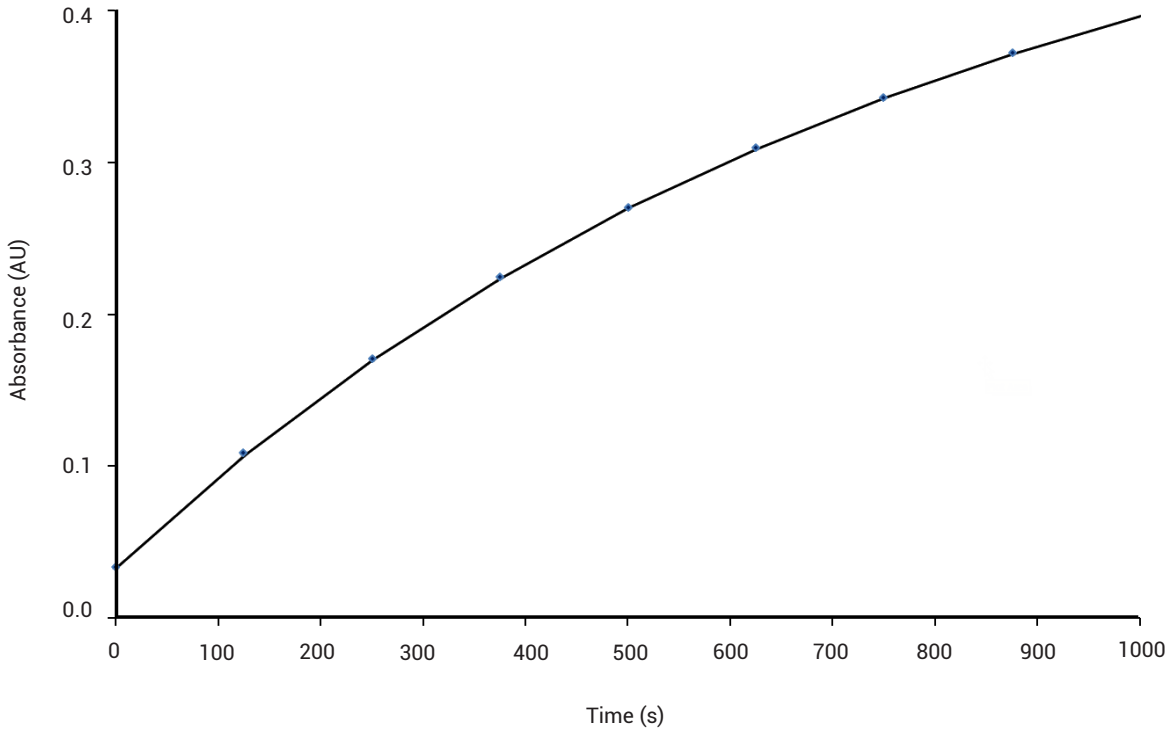

그림 4. 405nm에서의 흡광도 변화에 근거한 반응 비율

결론

Agilent Cary 8454 UV-Visible 분광 광도계는 효소 촉매 및 화학 반응 모두의 kinetics 분석에 이상적입니다. 본 응용자료에서 우리는 반응 온도를 신뢰성 있게 제어할 수 있는 Peltier 온도 액세서리의 효율성을 입증하였고, 동시에 기기가 kinetic 분석에 탁월한 안정성을 나타내는 것을 보여주었습니다.

다이오드 어레이 분광 광도계의 사용 장점에는 스펙트럼당 0.1초 밖에 안 되는 시간에 전체 스펙트럼을 신속하게 수집하는 것을 포함됩니다.

전체 스펙트럼 수집을 통해 사용자는 반응에 사용 가능한 모든 데이터를 얻을 수 있습니다. 또한 데이터 수집 이후 뒤로 이동하여 모든 파장의 반응 속도를 빠르고 손쉽게 검토할 수 있습니다. 한편, 각 측정 시점에서의 기질 및 생성물질의 농도를 확정하기 위해 파장 범위 전체 모니터링하여 스펙트럼의 다성분 분석을 수행 가능합니다.

www.agilent.com

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2014

2014년 3월 13일 발행
발행물 번호: 5991-4283KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

Agilent Technologies