

Преимущества спектрофотометра Agilent Cary 8454 UV-Vis с диодно- матричным детектором для кинетических исследований на нескольких длинах волн

Методическая информация

Специализированные реактивы

Автор

Д-р Урсула Темс (Ursula Tems)

Agilent Technologies
Малгрейв, Австралия



Введение

Наблюдение за реакцией гидролиза п-нитрофинилацетата (pNPA) можно проводить спектрофотометрическим методом, отслеживая уменьшение субстратов реакции или увеличение продуктов реакции. Регистрация скорости изменения концентрации позволяет определить скорость реакции.

Спектрофотометр Agilent Cary 8454 UV-Vis с диодно-матричным детектором может измерять полный спектр менее чем за 0,1 секунды. Изменения величины поглощения во времени могут быть получены из сохраненных спектральных данных по мере необходимости. Поскольку сбор данных происходит одновременно по всему диапазону длин волн в ходе одного эксперимента, правильная интерпретация результатов возможна при различных длинах волн, что позволяет в значительной мере понять механизм реакции.



Agilent Technologies

При использовании традиционных спектрофотометров удобно (а в случае очень быстрых реакций — необходимо) наблюдать за кинетикой реакции на одной или нескольких длинах волн. Следить за гидролизом рНРА можно при 270 или 405 нм, взяв за фактор развития реакции расход рНРА или образование п-нитрофенола соответственно. Однако, если не отслеживать весь спектр, можно пропустить важные данные, необходимые для более точного анализа.

В дополнение к скорости и точности для надежности кинетических измерений чрезвычайно важно точно контролировать температуру. В зависимости от изучаемой реакции изменение температуры всего лишь на 1° С может вызвать значительные изменения в наблюдаемой скорости реакции. Для спектрофотометра Agilent Cary 8454 доступна приставка для регулирования температуры на основе эффекта Пельтье (каталожный номер 89090А), которая позволяет точно регулировать температуру и может как охлаждать, так и нагревать образец, а также измерять температуру образцов с помощью температурного зонда.

Экспериментальная часть

Щелочной раствор рНРА подвергают гидролизу до п-нитрофенола по уравнению реакции:

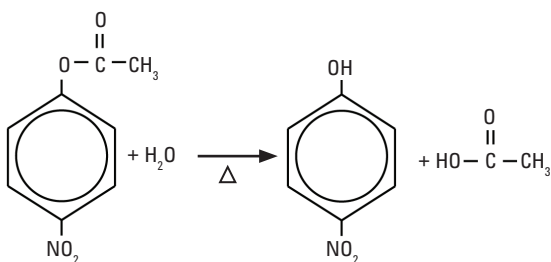


Рисунок 1. Реакция гидролиза рНРА

В принципе, это реакция второго порядка, но если вода находится в избытке, она может продемонстрировать ложную кинетику первого порядка. Скорость реакции зависит от pH и температуры. Эксперименты проводили путем добавления 2,9 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 8,5) в кювету, которую поместили в термостатируемый кюветодержатель и оставили до уравнивания. Точное определение температуры образца проводилось с помощью дополнительного внешнего датчика температуры небольшого размера с инертным стеклянным покрытием.

Регулировка температуры алюминиевого блока, окружающего кювету с образцом, осуществляется с помощью регулятора температуры Пельтье. Кювета практически соприкасается с алюминиевым блоком, чтобы разница температур была минимальной. Разница между заданной температурой и фактической температурой образца очень мала. Это было определено путем добавления в кювету 3 мл дистиллированной воды и измерения разницы при различных заданных температурах с помощью внешнего датчика (рис. 2). Тем не менее для достижения наибольшей точности наблюдали именно фактическую температуру образца, измеренную с помощью внешнего датчика.

После уравнивания температуры реакцию запустили, добавив 50 мкл базового раствора п-нитрофенила в безводном ацетонитриле и перемешивая реакционную смесь в мешалке со скоростью 700 об/мин.

Спектры собирали в автоматическом режиме с заданными интервалами, отрегулированными в соответствии с температурой и скоростью реакции. На рис. 3 показан спектр реакции при 55 °С; измерения спектра проводились с интервалом 125 секунд.

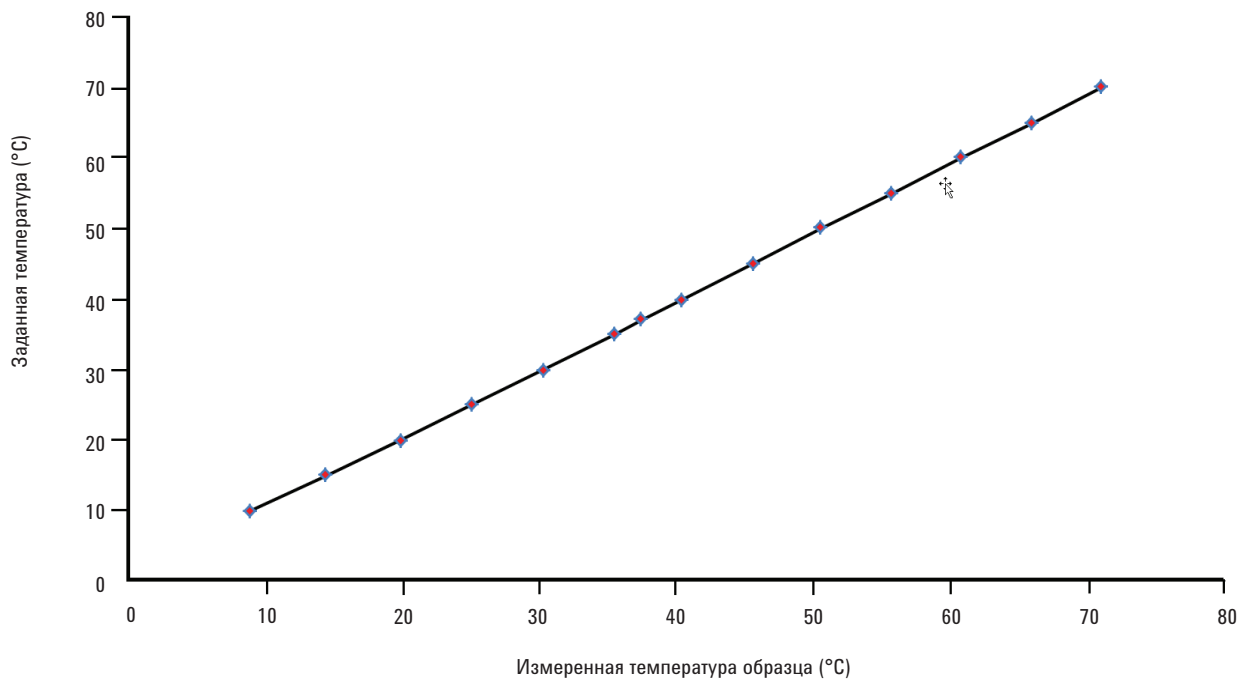


Рисунок 2. Корреляция между заданной (держателем кювет) температурой и измеренной температурой образца.

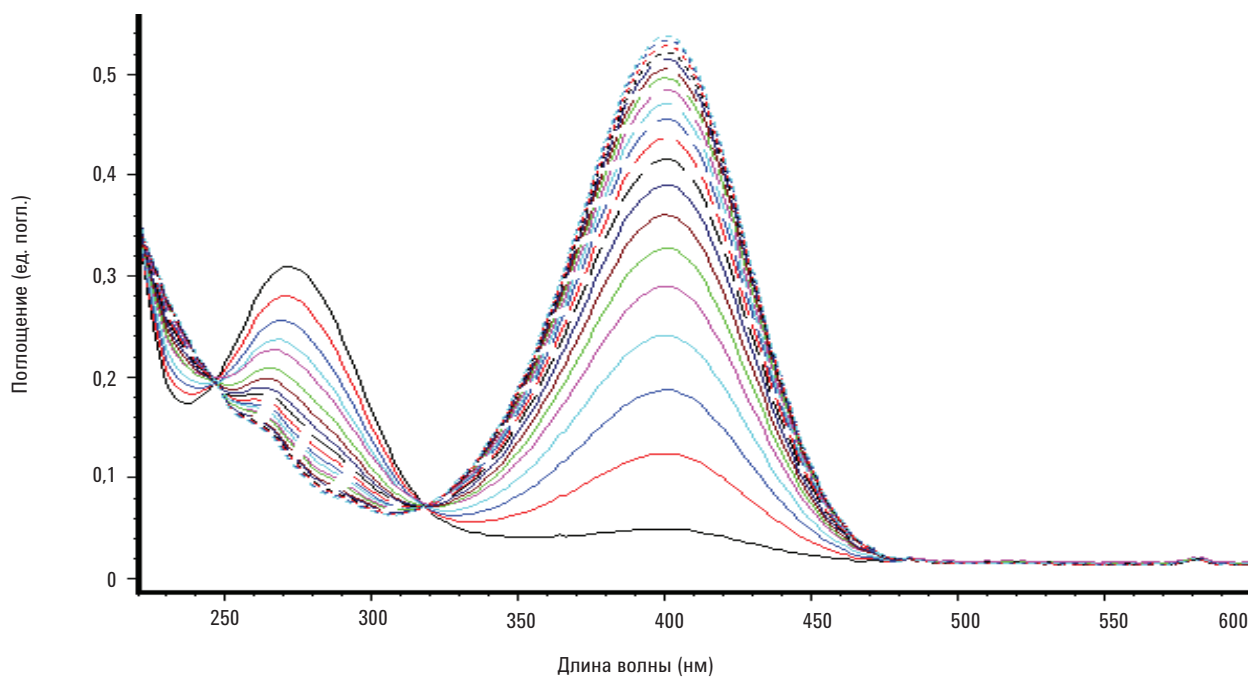


Рисунок 3. Спектр реакции гидролиза п-нитрофенилацетата при 55 °С.

Если изменение спектра поглощения периодически регистрируется во всем диапазоне длин волн, возможно пересечение спектров при одной или нескольких длинах волн (рис. 3). Эти точки пересечения называются изобестическими. Они указывают на то, что продукты образуются из реагентов в ходе единой реакции (т. е. без побочных или многостадийных реакций). Четкие изобестические точки на рис. 3 указывают на оптическую и температурную стабильность спектрофотометра Agilent Cary 8454 UV-Vis в ходе всей реакции.

С помощью ПО ChemStation для УФ- и видимого диапазонов можно легко открыть существующие данные и повторно проанализировать данные, полученные при любой длине волны. В этом случае после сбора данных кинетику реакции можно определить посредством выделения данных об образовании п-нитрофенола при одной длине волны (405 нм), когда другие компоненты не поглощают излучение (рис. 4).

В режиме Kinetics ПО ChemStation для УФ- и видимого диапазонов, который является частью дополнительного модуля BioChemical Analysis (G1117AA), была рассчитана константа скорости ложного первого порядка, равная $1,24 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ при 55° C .

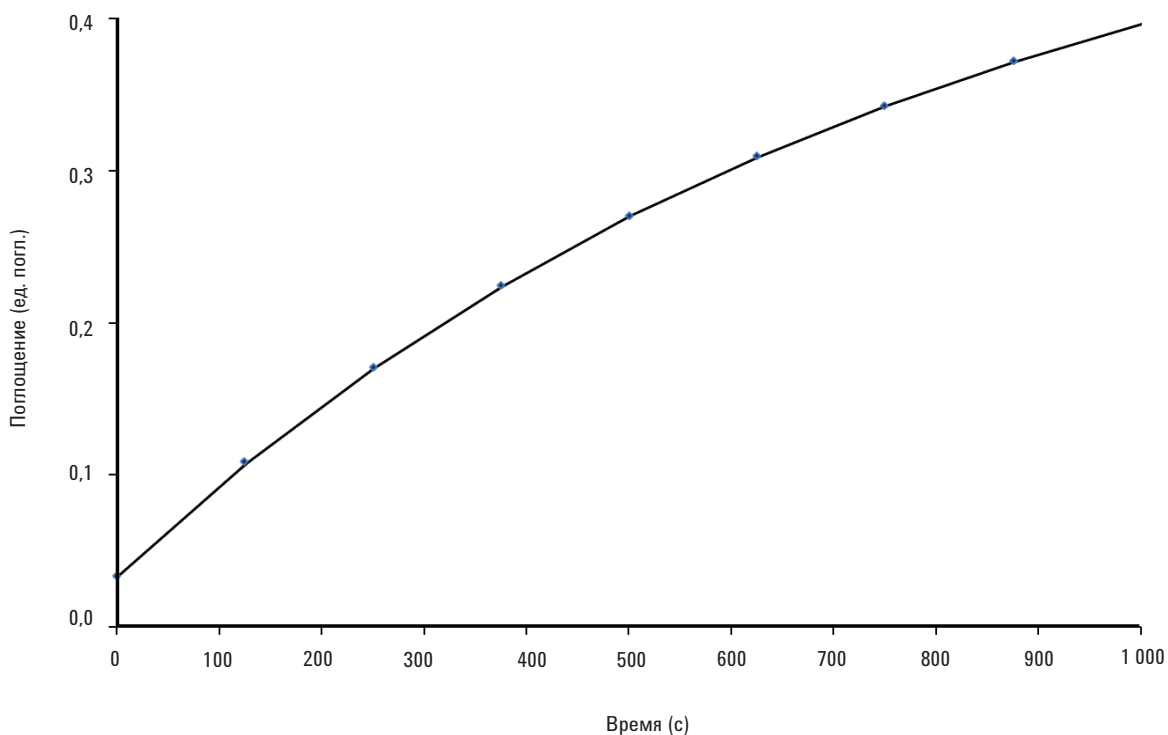


Рисунок 4. Скорость реакции была определена по изменению величины поглощения при 405 нм.

Заключение

Спектрофотометр Agilent Cary 8454 UV-Vis идеально подходит для кинетических исследований, будь то реакция, катализируемая ферментами, или химическая реакция. Была продемонстрирована эффективность приставки для надежной регулировки температуры реакции на основе эффекта Пельтье, при этом прибор демонстрирует исключительную стабильность во времени при проведении кинетического анализа.

К преимуществам использования спектрофотометра с диодно-матричным детектором относится быстрый сбор полного спектра со скоростью всего лишь 0,1 с/спектр.

Сбор полного спектра предоставляет пользователю все доступные данные по реакции. После сбора данных можно легко и быстро вернуться и повторно пересчитать скорость реакции для любой длины волны. С другой стороны, при отслеживании по всему диапазону длин волн спектры поддаются многокомпонентному анализу, что позволяет определить концентрации и субстратов, и продуктов в каждый измеренный момент времени.

www.agilent.com

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2014

Опубликовано 13 марта 2014 г.

Номер публикации: 5991-4283RU



Agilent Technologies