

Eine schnelle Methode zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf chemische Reaktionen

Reduzieren Sie den Zeitaufwand für Experimente,
indem Sie kinetische Experimente bei vier
Temperaturen gleichzeitig durchführen



Autoren

Kevin Grant und Matt Quinn

Agilent Technologies,
Australien

Einführung

Viele Applikationen in den Biowissenschaften und der Chemie erfordern ein genaues Verständnis der Geschwindigkeit von Reaktionsprozessen. Variablen wie Temperatur, pH-Wert, Druck und das Vorhandensein zusätzlicher chemischer Komponenten und Makromoleküle können erhebliche Auswirkungen auf die Reaktionsgeschwindigkeiten haben. Daher ist es für eine große Bandbreite an Applikationen, wie die Charakterisierung von Enzymen, chemische Synthesen und Lebensmittelherstellung sowie in Branchen, die von der optimalen Produktlagerung und den Stabilitätsbedingungen abhängig sind, wichtig, die Einflüsse solcher Parameter zu verstehen. UV-Vis-Spektralphotometer werden routinemäßig zur Charakterisierung und Quantifizierung von Reaktionskinetiken eingesetzt, da sie kontinuierlich über die Änderung der Extinktion Konzentrationsänderungen im Verlauf der Zeit messen.

Die Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Temperaturen auf Reaktionsgeschwindigkeiten ist zeitaufwändig, da Experimente bei verschiedenen Temperaturen wiederholt werden müssen. Sie erfordert zudem spezielle Ausrüstung, die im Probenraum des Spektralphotometers installiert werden muss. Eine solche Ausrüstung verwendet häufig zirkulierendes Wasser, um die Proben zu temperieren. Dies führt zur Gefahr von Flutungen, zu Lärm und zusätzlichem Wartungsaufwand im Labor.

Neueste Entwicklungen spektrophotometrischer Geräte mit Temperatursteuerung bieten eine erhebliche Zeitsparnis und eine höhere Präzision der Temperatursteuerung. Das Agilent Cary 3500 Multizonen-UV-Vis-Spektralphotometer ermöglicht die Messung von Proben in einem Experiment bei vier verschiedenen Temperaturen. Das Cary 3500 kann in die Küvetten integrierte Temperatursonden verwenden, um die Temperatur der Lösungen während des Experiments genau zu steuern, oder es kann mit der Blocktemperatur betrieben werden, was sich äußerst gut für Experimente bei konstanten Temperaturen eignet. Die Multizellen-Halterung ist in das Gerät eingebaut und verwendet wasserfreie, luftgekühlte Peltier-Elemente zur Steuerung der Probentemperaturen zwischen 0 und 110 °C.

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Zeitsparentials bei der Durchführung kinetischer Messungen bei vier verschiedenen Temperaturen in einem Experiment. Zu diesem Zweck wurde die Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat (pNPA) verwendet. Es handelt sich dabei um eine bekannte Reaktion und die Reaktionsgeschwindigkeit hängt von der Temperatur ab.

Experimentelles

In alkalischer Lösung hydrolysiert p-Nitrophenylacetat (pNPA) leicht zu p-Nitrophenol (PNP). pNPA besitzt ein Extinktionsmaximum bei 270 nm und PNP, je nach Temperatur, ein Extinktionsmaximum zwischen 405 und 410 nm. Im Verlauf der Zeit wurden UV-Spektren (Wellenlängenscans) aufgenommen, um sowohl die Abnahme an pNPA als auch die Zunahme von PNP im Verlauf der Reaktion zu beobachten. Das Experiment wurde bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt und die Reaktionsgeschwindigkeit bei 80 °C wurde ermittelt.

Proben

Es wurde eine 0,0001 M Lösung von p-NPA in Methanol hergestellt. Außerdem wurde eine Phosphatpufferlösung (PBS) aus 100 mM NaCl, 0,1 nM EDTA und 10 mM Natriumphosphat hergestellt und auf pH 7,0 eingestellt.

Die unverdünnte PBS wurde verwendet, um eine Basislinie aufzunehmen. Sie wurde außerdem während jeder Messung als Referenz verwendet. Für dieses Experiment wurden Standard-Quarzküvetten (3,5 ml) mit einer optischen Schichtdicke von 10 mm und Magnetrührer vom Sterntyp bei 500 U/min verwendet.

Geräte und Methode

Für alle Messungen wurde ein Cary 3500 Multizonen-UV-Vis-Spektralphotometer verwendet (Abbildung 1). Die Methodenparameter sind in Tabelle 1 aufgeführt.



Abbildung 1: Der Probenraum des Cary 3500 Multizonen-UV-Vis-Spektralphotometers verfügt über eine integrierte Multizellen-Halterung. Jedes Paar aus Probe und Referenz kann bei verschiedenen Temperaturen gehalten werden.

Tabelle 1: Geräteparameter.

Parameter	Einstellung
Wellenlängenbereich (nm)	220 – 520 nm (Scan)
Scanrate (nm/min)	1200
Spektrale Bandbreite (nm)	5
Signalmittelungszeit (s)	0,1
Datenintervall (nm)	2
Rührgeschwindigkeit (U/min)	500
Anzahl der Temperaturzonen	4
Temperaturen (°C)	20, 40, 60, 80
Temperatursteuerung	Block

Jede Probenküvette wurde mit 2980 µl Phosphatpufferlösung gefüllt und in die Multizellen-Halterung gestellt (Abbildung 1). Nach einer Wartezeit von 10 Minuten, um das System auf die Äquilibrierungstemperatur zu bringen, wurden 20 µl der methanolischen p-NPA-Lösung hinzugefügt.

Danach wurde 30 Minuten lang alle 30 Sekunden die Extinktion im Wellenlängenbereich von 220 bis 520 nm gemessen. Diese Messungen wurden für alle Temperatursätze gleichzeitig durchgeführt. Die in die Cary UV Workstation integrierten Funktionen zur kinetischen Analyse wurden verwendet, um eine kinetische Kurve zu erzeugen und die Reaktionsgeschwindigkeit zu ermitteln.

Ergebnisse

Bei der Hydrolyse von pNPA wird die Acetatgruppe unter basischen Bedingungen abgespalten. Werden die Bedingungen so gewählt, dass Wasser im Überschuss vorhanden ist, kann eine Reaktion pseudo-erster Ordnung angenommen werden. Da der pH-Wert des PBS-Puffers auf 7 eingestellt war, kann eine langsamere Reaktion erwartet werden, und ein Verhalten zweiter Ordnung dominiert.

Einfluss der Temperatur

Die UV-Spektren der pNPA-Hydrolyse bei vier verschiedenen Temperaturen sind in Abbildung 2 gezeigt. Es gibt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Temperatur der Probe und der als Zunahme von PNP gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 2). Bei 80 °C sind die isosbestischen Punkte deutlich zu erkennen, was auf eine direkte Umwandlung von pNPA in PNP hinweist. Die kinetischen Daten der UV-Spektren für das Experiment bei 80 °C wurden verwendet, um für den PNP-Peak bei 408 nm die Extinktion gegen die Zeit aufzutragen (Abbildung 3). Die Berechnung der Geschwindigkeit einer Reaktion zweiter Ordnung (integriert in die Cary UV Workstation-Software) wurde dann zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung (k) für die Reaktion mit $k = 883,194$ ($1/\text{[min}\cdot\text{mol]}$) verwendet.

UV-Spektren

Werden im Verlauf der Zeit UV-Spektren aufgenommen, kann die Abnahme von pNPA und die Zunahme von PNP beobachtet werden (Abbildung 2). Der gesamte Wellenlängenbereich liefert zusätzliche Informationen, die der Anwender nicht erhält, wenn nur bei einer Wellenlänge gemessen wird. Beispielsweise das mögliche Vorhandensein von Reaktionszwischenstufen sowie kleine Veränderungen der Probe und die Lage isosbestischer Punkte, wie in Abbildung 2 gezeigt.

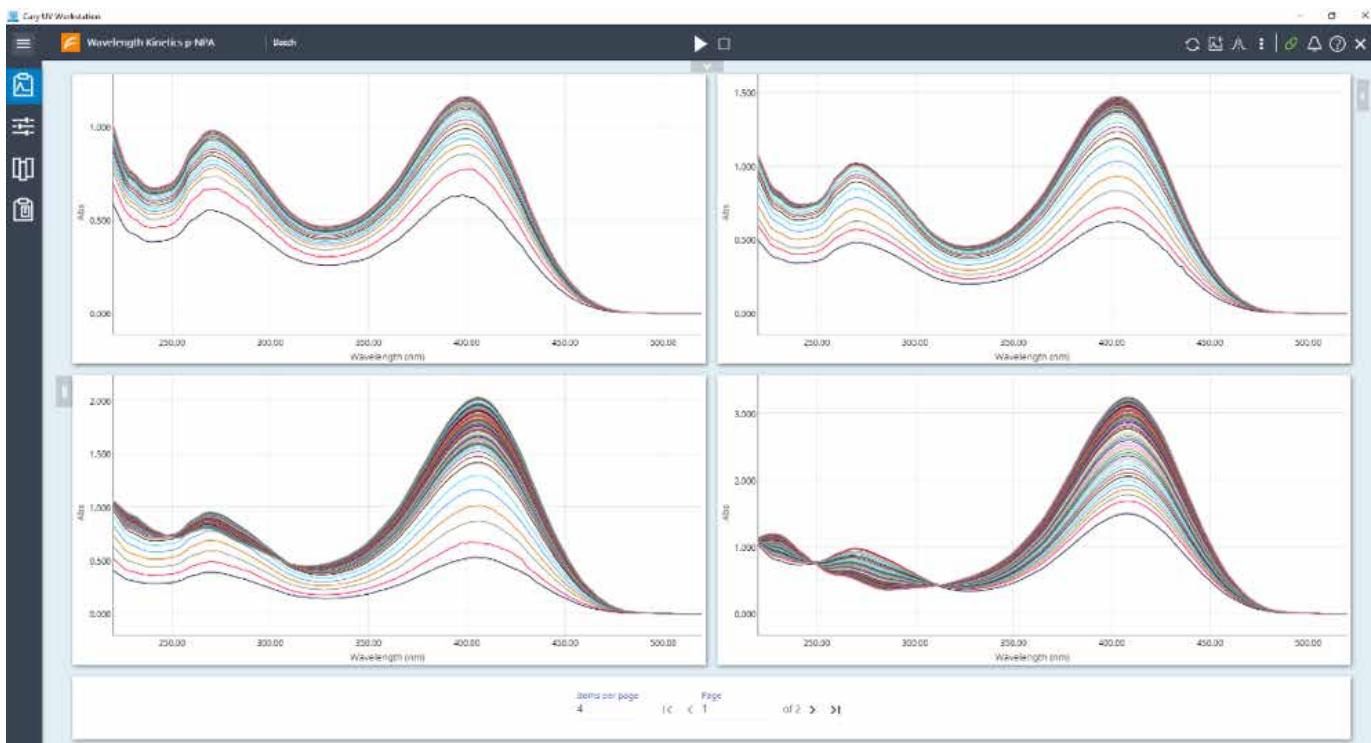


Abbildung 2: UV-Spektren im Verlauf der Zeit im Wellenlängenbereich von 220 bis 520 nm, 30 Minuten lang aufgenommen, nachdem die Reaktion durch das Mischen der beiden Reagenzien gestartet wurde. Oben links bei 20 °C, oben rechts bei 40 °C, unten links bei 60 °C und unten rechts bei 80 °C.

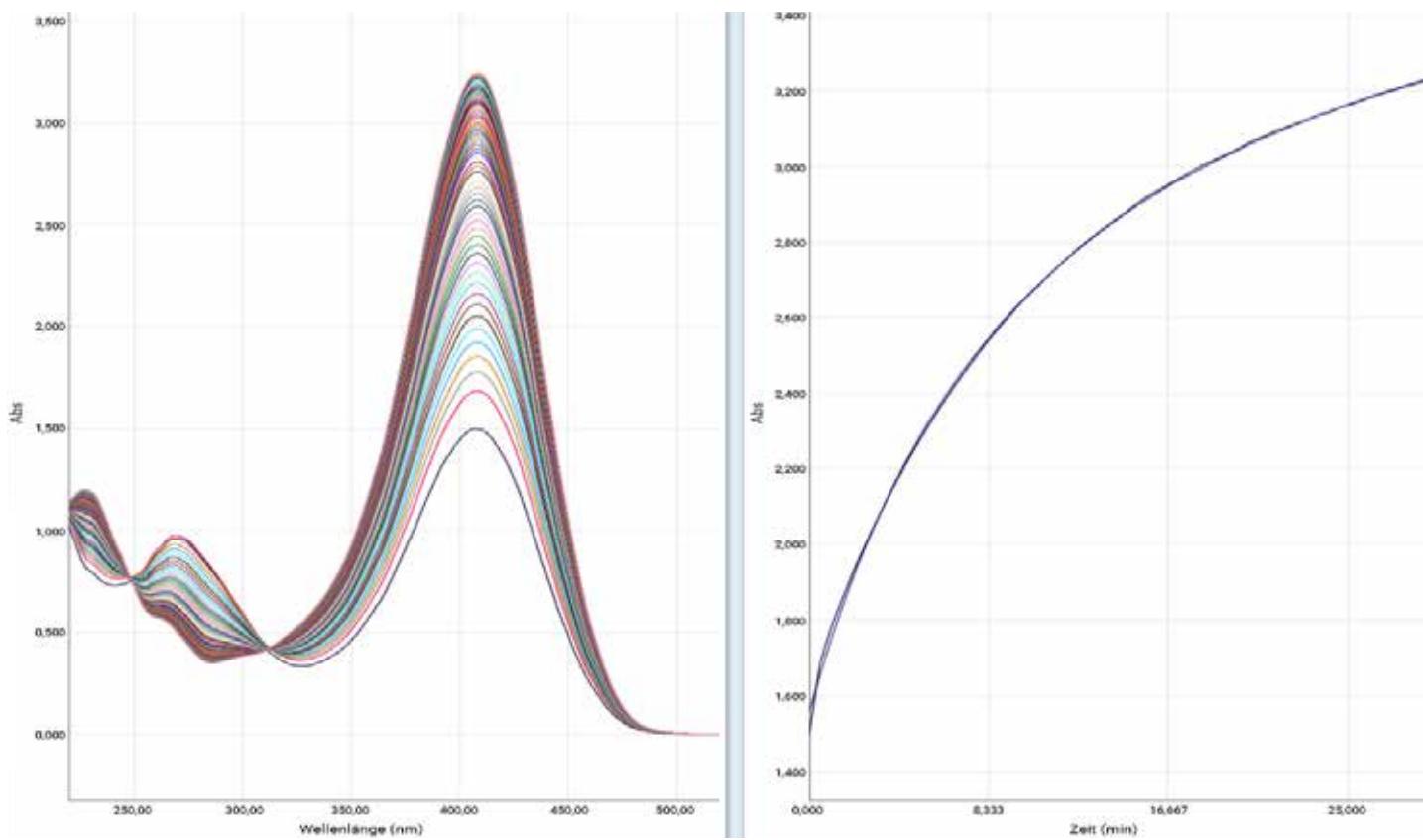


Abbildung 3: UV-Spektren für die bei 80 °C durchgeführte Reaktion mit charakteristischen isosbestischen Punkten (links). Die Änderung der Extinktion im Verlauf der Zeit bei 408 nm (rechts) wurde mit der Cary UV Workstation-Software aufgezeichnet und zur Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit verwendet.

Schlussfolgerungen

Das Cary 3500 Multizonen-UV-Vis-Spektralphotometer ermöglichte es, dass die Hydrolyse von pNPA in einem einzigen Experiment bei vier verschiedenen Temperaturen beobachtet werden konnte. Die Auswirkung der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in einem Experiment von 30 Minuten gleichzeitig bei 20 °C, 40 °C, 60 °C und 80 °C gezeigt.

Durch die schnelle Aufnahme der Spektren während des Experiments konnten die Daten bei verschiedenen Wellenlängen interpretiert werden. Während die Reaktionsgeschwindigkeiten für alle vier Temperaturen ermittelt werden können, kann der Reaktionsmechanismus unter Umständen unterschiedlich ablaufen. Die Beobachtung des gesamten Wellenlängenbereichs für die

Reaktion kann nützliche Erkenntnisse in Bezug auf den Reaktionsmechanismus liefern.

Die Reaktionskinetik besser zu kennen, ist die Grundlage für ein besseres Verständnis von chemischen Wechselwirkungen und Reaktionsprozessen. Obwohl dies viele Informationen liefert, kann die Durchführung eingehender Experimente zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit von Reaktionsprozessen äußerst zeitaufwändig sein. Mit der einzigartigen Funktion des Agilent Cary 3500 Multizonen-UV-Vis-Spektralphotometers zur Messung bei mehreren Temperaturen konnten die kinetischen Daten in 25 % der Zeit, die ein herkömmliches UV-Vis-System benötigt, aufgenommen werden. Dies stellt eine einzigartige Zeitsparnis für das Labor dar.

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Änderungen vorbehalten.