

화학 반응에 미치는 온도의 영향을 연구하는 신속한 분석법

4가지 온도에서 동시에 진행되는 동역학 실험을 통해
실험 시간 단축



저자

Kevin Grant, Matt Quinn
Agilent Technologies,
Australia

서론

대부분 생명과학 및 화학 분야에서는 반응 과정을 동적으로 철저히 이해해야 할 필요가 있습니다. 온도, pH, 압력, 추가 화학 성분의 유무, 고분자 등의 변수는 반응 속도에 큰 영향을 미칠 수 있습니다. 효소 특성 규명, 화학적 합성, 식품 제조 및 최적의 제품 보관과 안정성 조건에 의존하는 산업 등을 비롯한 다양한 분야에서는 이러한 파라미터가 미치는 영향을 이해하는 것이 매우 중요합니다. UV-Vis 분광기는 시간에 따른 흡광도 변화량을 통해 시간에 따른 농도 변화를 연속적으로 측정할 수 있어 화학 반응의 동역학적 특성을 규명하고 정량하는 데 보편적으로 사용됩니다.

여러 온도가 반응 속도에 미치는 영향을 분석하는 과정은 오랜 시간이 걸립니다. 서로 다른 온도에서 반복 실험을 해야 하고 분광기의 시료부에 전문 장비를 설치해야 하기 때문입니다. 이러한 장비는 주로 물을 재순환하여 시료 온도를 유지합니다. 이 방식을 사용하면 시료가 넘치거나 노이즈가 발생할 위험이 있고 실험실 유지 관리의 부담을 증가시킵니다.

최근 온도 기반 분광기의 발전으로 인해 분석 시간이 상당히 단축되었고 온도를 보다 정확하게 제어할 수 있게 되었습니다. Agilent Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광기를 사용하면 한 번의 실험으로 4가지 온도에서 시료를 측정할 수 있습니다. Cary 3500은 통합 in-cuvette 온도 프로브를 이용해 실험 중에 용액의 온도를 정확히 제어하거나, 블록 온도를 통해 작동할 수 있어 정온도 실험에 매우 적합합니다. 멀티셀 홀더는 기기에 내장되며, 물이 없는 공랭식 Peltier를 사용하여 시료의 온도를 0~110°C로 제어합니다.

본 연구를 통해 한 번의 실험으로 4가지 온도에서 동역학 속도를 측정할 때 시간을 얼마나 절약할 수 있는지 알아보았습니다. 여기에서는 pNPA(p-nitrophenyl acetate) 가수분해를 사용하였습니다. 이 반응은 잘 알려진 반응으로, 온도의 변화에 따라 반응 속도가 변화합니다.

실험

알칼리성 용액에서 pNPA(p-nitrophenyl acetate)는 PNP(p-nitrophenol)로 쉽게 가수 분해됩니다. pNPA는 270nm에서 최대 흡광도를 가지며 PNP는 405~410nm에서 최대 흡광도를 가집니다(흡광도는 온도에 따라 변화함). 시간에 따른 파장 스캔을 통해 반응이 진행되는 동안 pNPA의 소모량과 PNP의 생성량을 모니터링하였습니다. 이 실험은 pH 7에서 수행하였으며, 80°C에서 시료의 반응 속도를 측정하였습니다.

시료

0.0001M의 p-NPA methanol 용액을 준비하였습니다. NaCl 100mM, EDTA 0.1nM, sodium phosphate 10mM을 포함하는 인산염 완충액(PBS)을 준비하고 pH 7.0으로 조정합니다.

희석하지 않은 PBS로 베이스라인을 정하고 각 측정 시에는 참조 용액으로 활용하였습니다. 본 실험에서는 표준 석영 큐벳(부피 3.5mL, 광학 경로 길이 10mm)을 사용하였으며 별 모양 자력 교반기로 500rpm에서 교반하였습니다.

기기 및 분석법

모든 측정에는 Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광 광도계를 사용하였습니다(그림 1). 분석법 파라미터는 표 1과 같습니다.



그림 1. Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광기의 시료부에는 멀티셀 홀더가 내장되어 있습니다. 각 시료/참조 용액 쌍은 서로 다른 온도에 보관할 수 있습니다.

표 1. 기기 파라미터

파라미터	설정
파장 범위(nm)	220~520nm(스캔)
스캔 속도(nm/분)	1200
스펙트럼 대역폭(nm)	5
신호 평균 시간(s)	0.1
데이터 간격(nm)	2
교반 속도(rpm)	500
온도 구간 수	4
온도(°C)	20, 40, 60, 80
온도 제어	블록

각 시료 큐벳을 인산염 완충액 2980μL로 채우고 멀티셀 홀더에 올려 놓았습니다(그림 1). 온도가 안정화될 때까지 10분간 기다렸다가 p-NPA methanol 용액 20μL를 추가하였습니다.

220~520nm 파장 범위에서 30초에 한 번씩 흡광도를 스캔하였습니다(30분간 지속). 각 설정 온도에서 동시에 측정을 수행하였습니다. Cary UV Workstation에 내장된 동역학 분석 기능을 이용해 동역학 곡선을 생성하여 반응 속도를 측정하였습니다.

결과

pNPA의 가수분해는 염기성 조건에서의 아세테이트기의 제거와 연관이 있습니다. 물이 과도한 상태 등으로 조건이 설정되면 반응은 유사 1차 반응으로 간주할 수 있습니다. PBS 완충액의 pH가 7로 설정되어 있기 때문에 반응 속도가 느려질 수 있고 2차 반응이 주로 진행됩니다.

온도의 영향

그림 2는 4가지 온도에서 pNPA 가수분해의 파장을 스캔한 결과입니다. PNP 생성량 측정을 통해 시료 온도와 반응 속도 사이에 명확한 관계가 있음이 드러났습니다(그림 2). 80°C에서 등흡광점이 명확히 나타나며 이는 pNPA에서 PNP로의 직접 변환을 나타냅니다. 80°C 실험에서 얻은 파장 스캔 동역학 데이터를 사용하여 PNP 피크가 408nm일 때 시간에 따른 흡광도 플롯을 생성하였습니다(그림 3). 그런 다음 2차 속도 계산(Cary UV Workstation 소프트웨어에 내장)을 통해 반응의 2차 속도 상수(k) ($k = 883.194(1/[\text{min}\cdot\text{mol}])$)를 확정하였습니다.

파장 스캔

시간에 따라 파장을 스캔하여 pNPA의 소모량과 PNP의 생성량을 관찰할 수 있습니다(그림 2). 전체 파장 범위에서 흡광도를 분석하면 단일 파장 분석에서 놓칠 수 있는 추가 정보를 얻을 수 있습니다. 예를 들어 반응 중간체의 존재 가능성, 시료의 미묘한 변화, 그림 2에 표시된 등흡광점 검출 등을 확인할 수 있습니다.

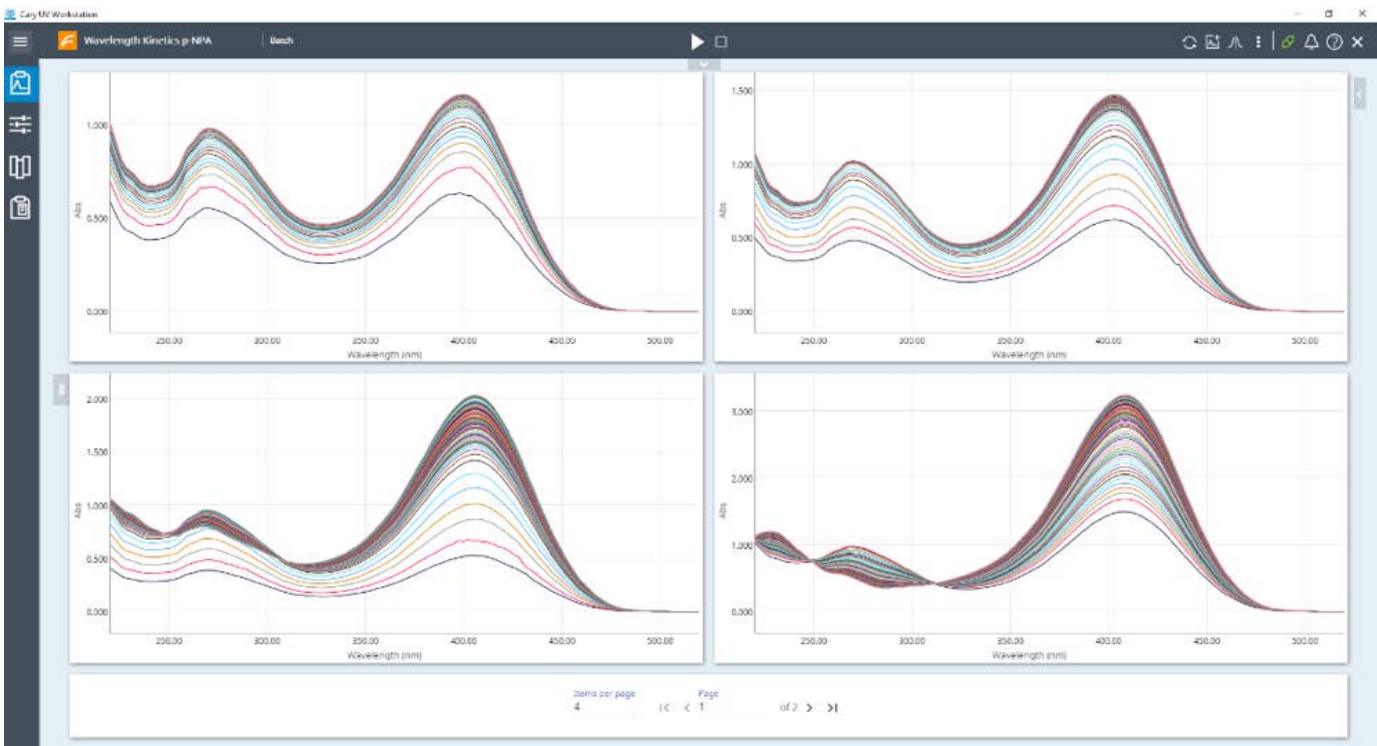


그림 2. 두 시약을 혼합한 뒤 반응이 시작되고 30분 동안 파장 범위 220~520nm에서 시간에 따른 파장 스캔을 수행한 결과입니다. 왼쪽 상단은 20°C, 오른쪽 상단은 40°C, 왼쪽 하단은 60°C, 오른쪽 하단은 80°C입니다.

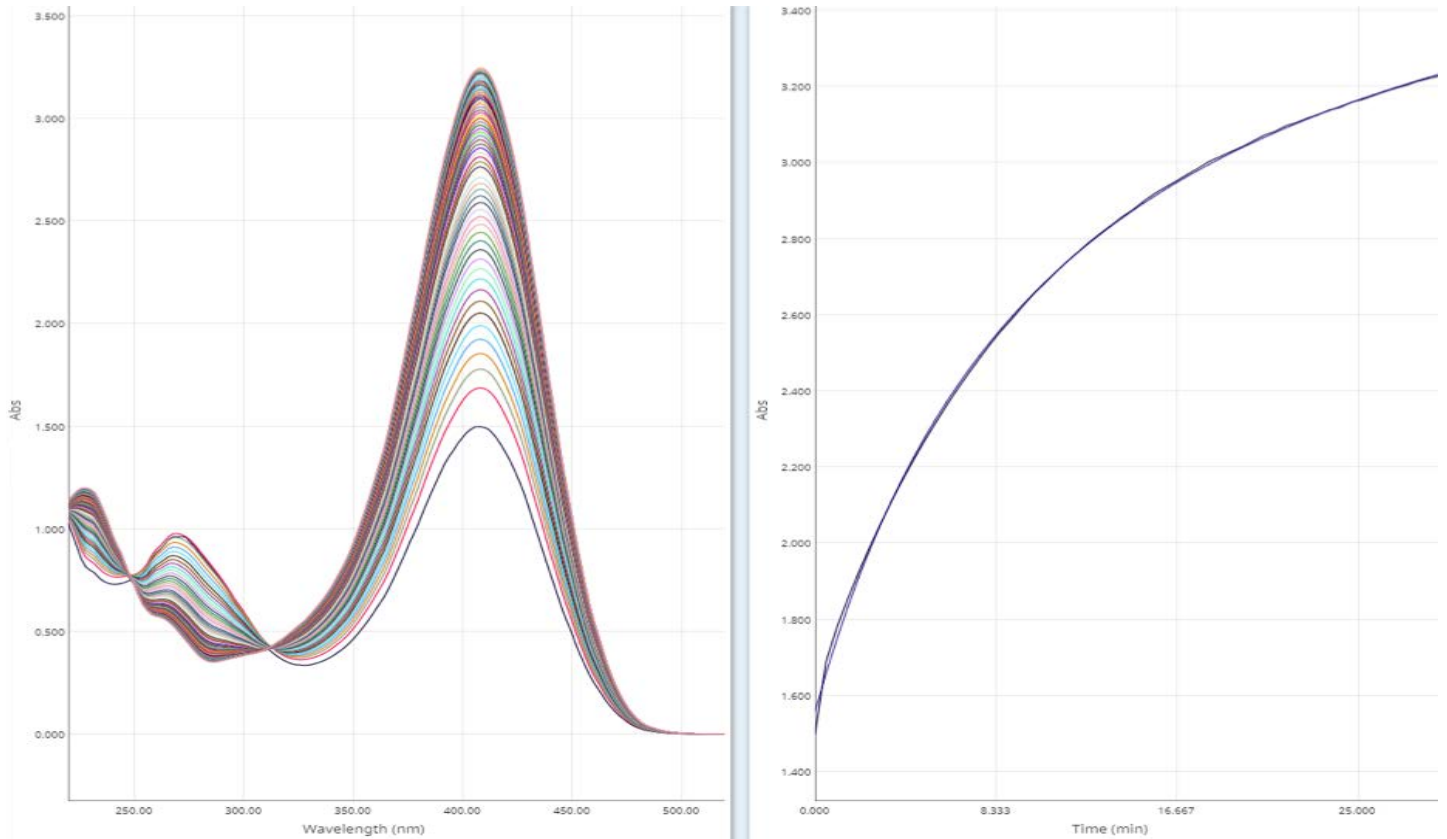


그림 3. 80°C에서 수행한 반응의 스펙트럼과 특징 등흡광점(왼쪽). 408nm에서 시간에 따른 흡광도 변화(오른쪽)를 Cary UV Workstation 소프트웨어를 사용하여 도표화하고 반응 속도를 확인하였습니다.

결론

Cary 3500 Multizone UV-Vis 분광기는 한 번의 실험을 통해 4가지 온도에서의 pNPA 가수분해를 모니터링할 수 있게 합니다. 반응 속도에 미치는 온도의 영향을 30분 동안 진행한 한 번의 실험만으로 20°C, 40°C, 60°C, 80°C 조건에서 확인하였습니다.

실험 중에 파장 스펙트럼을 신속히 수집하기 때문에 데이터를 파장별로 해석할 수 있었습니다. 4가지 온도에서 반응 속도를 모두 확인할 수 있었지만 반응 메커니즘은 다르게 진행될 수 있습니다. 반응의 전체 파장 범위를 관찰하면 반응 메커니즘에 대한 유용한 정보를 얻을 수 있습니다.

반응 동역학에 대한 기본 정보를 더욱 잘 파악한다면 화학적 상호작용과 반응 과정을 깊이 있게 이해할 수 있습니다. 반응 과정에 대한 온도 종속성을 자세하게 연구하는 실험은 매우 유익하지만 매우 시간 소모적입니다. Agilent Cary 3500 Multizone UV-Vis의 고유한 다중 온도 기능을 사용하면 동역학 데이터를 기존 UV-Vis 시스템보다 25% 빠르게 수집해 실험 시간을 단축할 수 있습니다.

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
한국에서 인쇄, 2018년 10월 30일
5994-0385KO

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