

一种研究温度对化学反应影响的快速方法

同步运行四个独立温区的反应动力学实验，大大节省实验时间



作者

Kevin Grant 和 Matt Quinn
安捷伦科技公司，澳大利亚

前言

许多生命科学和化学应用要求对反应过程的动力学有全面的了解。温度、pH、压力以及存在的其他化学成分和大分子等变量对反应速率有显著影响。了解这些参数的影响对各种应用而言至关重要，包括酶的表征、化学合成和食品制造，以及依赖于优化的产品储存和稳定性条件的行业。紫外-可见分光光度计通常用于帮助表征和定量反应动力学，因为它们可以通过测定吸光度随时间的变化，连续监测浓度随时间的变化。

测定不同温度对反应速率的影响较为耗时，因为必须在不同温度下重复实验，并且需要在分光光度计的样品室中安装专门的设备。这种设备通常使用循环水浴来维持样品的温度。而这会带来漏水风险和噪音，并增加实验室的维护负担。

基于温度控制的最新一代分光光度测量仪器可以显著节省实验时间并更准确地控制温度。Agilent Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计，可以在单次实验中同步进行四种不同温度的样品测试。Cary 3500 可以在实验过程中使用集成的比色皿内温度探头精确控制溶液温度，也可以通过模块温度来进行操作，后者非常适合恒温实验。多池支架内置于仪器中，使用无水、风冷的帕尔帖控温模块将样品温度控制在 0–110 °C 之间。

本研究旨在考察单次实验中在四种不同温度下进行反应动力学速率测量的省时潜力。采用乙酸对硝基苯酯 (pNPA) 的水解反应进行此项研究。这是一个已经得到充分研究的反应，反应速率随温度的变化而变化。

实验部分

在碱性溶液中，乙酸对硝基苯酯 (pNPA) 容易水解为对硝基苯酚 (PNP)。pNPA 在 270 nm 处具有最大吸光度，PNP 的最大吸光度在 405–410 nm 之间（取决于温度）。随反应进行连续进行快速波长扫描可以监测 pNPA 的消耗和 PNP 的生成。在 pH 7 下进行实验，测定 80 °C 样品的反应速率。

样品

制备 0.0001 mol/L 的 pNPA 甲醇溶液。制备含 100 mmol/L NaCl、0.1 nmol/L EDTA 和 10 mmol/L 磷酸钠的磷酸盐缓冲液 (PBS)，并将 pH 调至 7.0。

用未稀释的 PBS 建立基线，并在每次测量时将其作为参比。本实验采用 3.5 mL 10 mm 光程的标准石英比色皿，并用星型磁力搅拌器，以 500 rpm 的速度进行搅拌。

仪器和方法

所有测量均使用 Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计 (图 1)。方法参数见表 1。



图 1. Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计的样品室内置有多池支架。每个样品/参比对可以保持在不同的温度

表 1. 仪器参数

参数	设置
波长范围 (nm)	220–520 nm（扫描）
扫描速率 (nm/min)	1200
光谱带宽 (nm)	5
信号采集平均时间 (s)	0.1
数据间隔 (nm)	2
搅拌速度 (rpm)	500
温控区域数量	4
温度 (°C)	20、40、60、80
温度控制	模块

每个样品比色皿加入 2980 µL 磷酸盐缓冲液，放置在多池支架上（图 1）。温度平衡 10 分钟，然后加入 20 µL pNPA 甲醇溶液。

在 220–520 nm 波长范围内，每 30 秒采集一次吸光度扫描，持续 30 分钟。对各个温区同步进行以上测量。采用 Cary 紫外工作站软件内置的动力学分析功能，生成动力学曲线，确定反应速率。

结果

碱性条件下，pNPA 的水解涉及脱去乙酸酯基团。当条件设定为水过量时，该反应可以认为是伪一级反应。当 PBS 缓冲液 pH 值为 7 时，反应速率变慢，以二级反应为主。

温度影响

4 种不同温度下 pNPA 水解的波长扫描结果如图 2 所示。通过测定生成的 PNP 可以发现，样品温度与反应速率之间存在明显关系（图 2）。在 80 °C 时，等吸收点明显，表明此温度下 pNPA 直接转化为 PNP。利用 80 °C 实验的波长扫描动力学数据，根据 408 nm 处 PNP 的吸光度峰值，生成吸光度与时间的曲线图（图 3）。利用二级速率计算（内置于 Cary 紫外工作站软件）确定反应的二级速率常数 (k)， $k = 883.194 \text{ (1/[min.mol])}$ 。

波长扫描

通过一定时间内的波长扫描，可以观察到 pNPA 的消耗和 PNP 的生成（图 2）。分析整个波长范围的吸光度可以获得额外的信息，而这些信息在只分析单个波长的情况下可能被遗漏。例如，可能存在反应中间体、样品的细微变化以及如图 2 所示的等吸收点的检测。

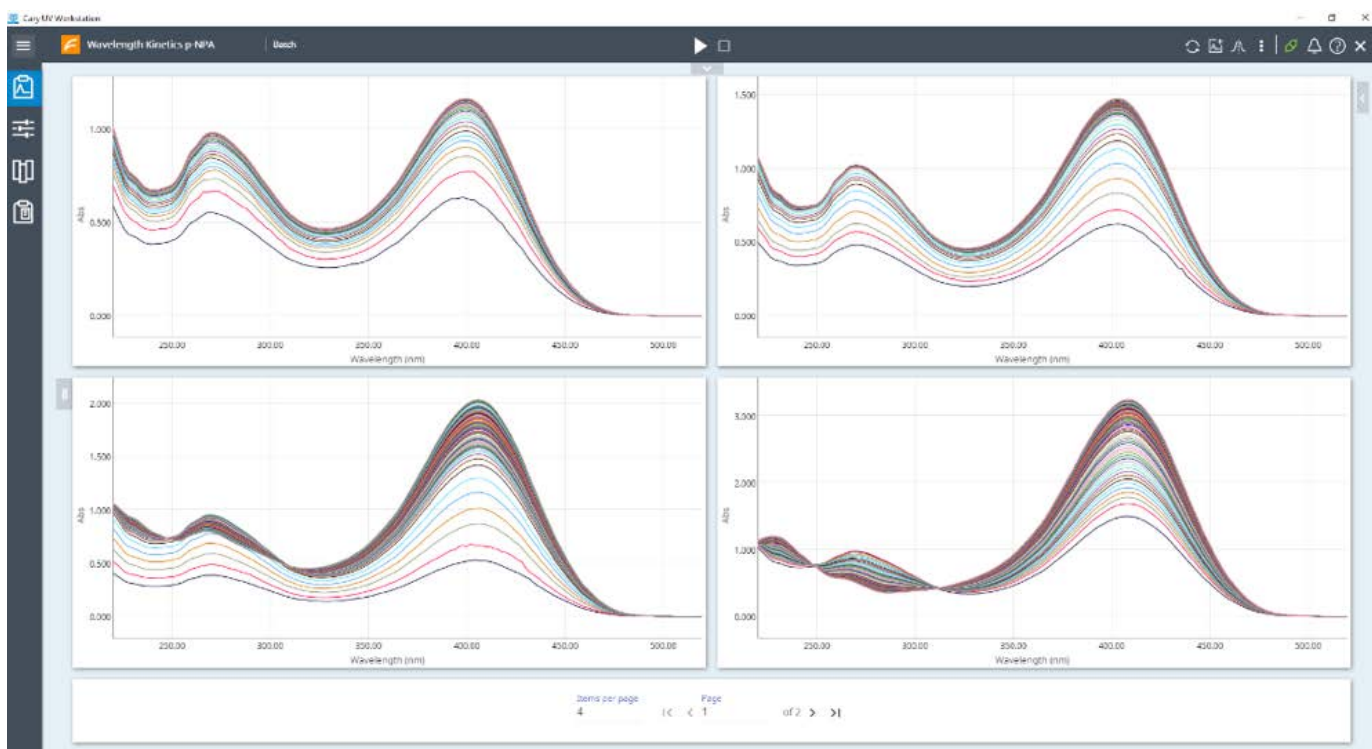


图 2. 混合两种试剂开始反应后，随时间的变化，在 220–520 nm 范围内的波长扫描结果，采集时间为 30 分钟。左上角为 20 °C，右上角为 40 °C，左下角为 60 °C，右下角为 80 °C

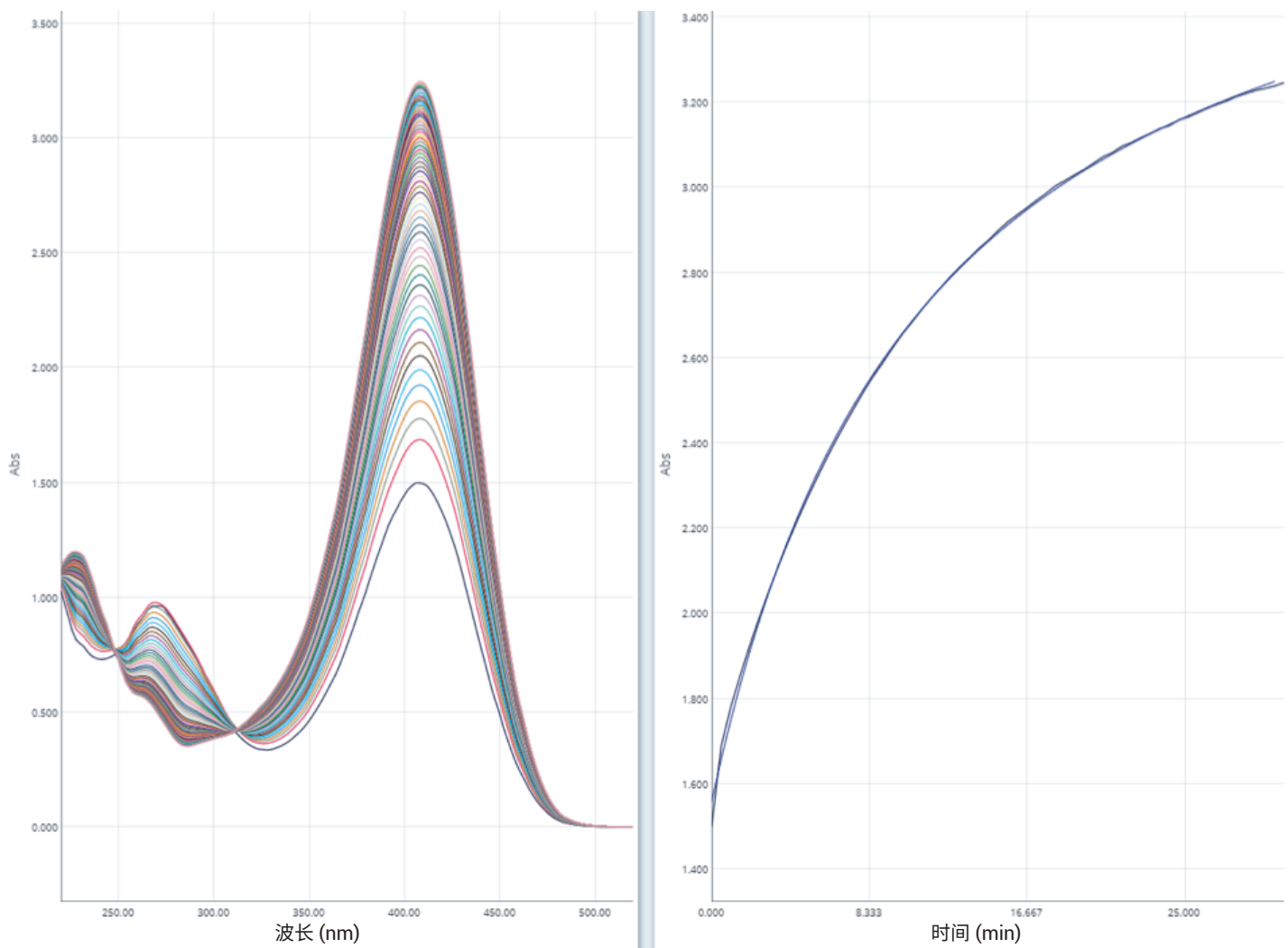


图 3. 80 °C 下反应的光谱图，具有特征等吸收点（左图）。在 Cary 紫外工作站软件中绘制的 408 nm 处吸光度随时间的变化曲线（右图），将此图用于确定反应速率

结论

Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计可在单次实验中同步监测四种不同温度下的 pNPA 水解反应。在一个实验中同步考察 20 °C、40 °C、60 °C 和 80 °C 下温度对反应速率的影响，整个实验过程只需 30 分钟。

实验过程中快速采集波长扫描光谱，从而可对不同波长下的数据进行解析。虽然可以确定四个温度下的反应速率，但反应机理可能有所不同。观察反应的全波长范围扫描结果可以为反应机理提供有用的见解。

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018 年 10 月 30 日，中国出版
5994-0385ZHCN

提高对反应动力学的理解，是更好地理解化学相互作用和反应过程的基础。进行详细的实验来研究反应过程的温度依赖性，虽然可以提供丰富的信息，但却非常耗时。利用 Agilent Cary 3500 多区控温紫外-可见分光光度计独有的多温区功能，只需传统紫外-可见分光光度计系统四分之一的的时间，即可完成反应动力学数据的收集，为实验室带来了独特的省时优势。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

 **Agilent**
Trusted Answers