

Un metodo veloce per studiare l'effetto della temperatura sulle reazioni chimiche

Riduci i tempi eseguendo esperimenti cinetici a quattro temperature simultaneamente



Autori

Kevin Grant e Matt Quinn
Agilent Technologies,
Australia

Introduzione

Molte applicazioni nel campo della chimica e delle bioscienze richiedono una profonda comprensione delle dinamiche dei processi di reazione. Variabili come temperatura, pH, pressione e la presenza di componenti chimici e macromolecole aggiuntive possono avere un effetto significativo sulla velocità di reazione. Comprendere l'influenza di tali parametri è essenziale per un'ampia gamma di applicazioni, quali caratterizzazione di enzimi, sintesi chimica, produzione di alimenti e settori che fanno affidamento su condizioni di conservazione e stabilità del prodotto ottimizzate. Gli spettrofotometri UV-Vis sono normalmente impiegati quale ausilio nella caratterizzazione e nella quantificazione dalla cinetica delle reazioni, in quanto sono in grado di misurare in modo continuo i cambiamenti nella concentrazione in funzione della variazione nel tempo dell'assorbanza.

Esaminare gli effetti di temperature diverse sulla velocità di reazione richiede molto tempo: è necessario ripetere gli esperimenti a diverse temperature, utilizzando apparecchiature specializzate che devono essere installate nel vano per i campioni dello spettrofotometro. Queste apparecchiature spesso utilizzano sistemi di circolazione dell'acqua per controllare la temperatura dei campioni, con conseguenti rischi di allagamento, rumori e un aggravio per il laboratorio in termini di attività di manutenzione.

I recenti progressi nella strumentazione per la spettrofotometria dipendente dalla temperatura consentono significativi risparmi di tempo e maggiore accuratezza nel controllo della temperatura. Lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Multizone Cary 3500 permette di misurare i campioni a quattro temperature diverse in un solo esperimento. Cary 3500 utilizza sonde di temperatura integrate nella cuvetta per un controllo preciso della temperatura delle soluzioni durante l'esperimento; in alternativa può operare mediante la temperatura del blocco, un metodo estremamente adatto per esperimenti a temperatura statica. Il supporto multicella integrato utilizza il sistema Peltier in assenza d'acqua e con raffreddamento ad aria per controllare la temperatura dei campioni da 0 a 110 °C.

Questo studio si prefigge di esaminare il possibile risparmio di tempo grazie a misurazioni di velocità cinetiche a quattro temperature diverse in un unico esperimento. A questo scopo è stata utilizzata l'idrolisi di p-nitrofenile acetato. Si tratta di una reazione ben conosciuta, la cui velocità varia in funzione della temperatura.

Condizioni sperimentali

In una soluzione alcalina, il p-nitrofenile acetato (pNPA) subisce rapidamente idrolisi convertendosi in p-nitrofenolo (PNP). Il pNPA ha un massimo di assorbanza a 270 nm mentre il PNP tra 405 e 410 nm, a seconda della temperatura. Sono state eseguite scansioni delle lunghezze d'onda a tempi diversi per monitorare sia il consumo di pNPA sia la produzione di PNP con il progredire della reazione. L'esperimento è stato condotto a pH 7 e la velocità di reazione del campione è stata determinata a 80 °C.

Campioni

È stata preparata una soluzione di pNPA 0,0001 M in metanolo. Una soluzione tampone fosfato (PBS) di NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM e fosfato di sodio 10 mM è stata preparata e portata a pH 7,0.

PBS non diluito è stato usato per stabilire una linea di base e impiegato come riferimento durante ciascuna misurazione. Per questo esperimento sono state impiegate cuvette di quarzo standard da 3,5 mL, con lunghezza del percorso ottico di 10 mm, sottoposte ad agitazione magnetica con agitatori a stella a 500 rpm.

Strumentazione e metodo

Per tutte le misurazioni è stato usato uno spettrofotometro UV-Vis Multizone Cary 3500 (Figura 1). I parametri del metodo sono riportati nella Tabella 1.



Figura 1. Il vano per i campioni dello spettrofotometro UV-Vis Multizone Cary 3500 è dotato di un supporto multicella integrato. Ogni coppia campione/ riferimento può essere mantenuta a una temperatura diversa.

Tabella 1. I parametri dello strumento.

| Parametro | Impostazione |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Intervallo di lunghezza d'onda (nm) | 220 - 520 nm (scansione) |
| Velocità di scansione (nm/min) | 1200 |
| Larghezza di banda spettrale (nm) | 5 |
| Tempo medio del segnale (s) | 0,1 |
| Intervallo dati (nm) | 2 |
| Velocità di agitazione (rpm) | 500 |
| Numero delle zone di temperatura | 4 |
| Temperature (°C) | 20, 40, 60, 80 |
| Controllo della temperatura | Blocco |

Ogni cuvetta di campione è stata riempita con 2980 µL di soluzione tampone fosfato e inserita nel supporto multicella (Figura 1). Dopo aver atteso dieci minuti per permettere alla temperatura di raggiungere l'equilibrio, sono stati aggiunti 20 µL della soluzione di p-NPA in metanolo.

Le scansioni delle assorbanze lungo l'intervallo di lunghezze d'onda da 220 a 520 nm sono state ottenute ogni 30 secondi per 30 minuti. Le misurazioni sono state eseguite simultaneamente per ciascuna temperatura impostata. Le funzioni di analisi cinetica integrate della Workstation Cary UV sono state utilizzate per generare una curva cinetica e determinare la velocità di reazione.

Risultati

L'idrolisi di pNPA avviene mediante rimozione del gruppo acetato in condizioni basiche. Quando vengono impostate condizioni tali per cui l'acqua è in eccesso, la reazione può essere considerata di pseudo primo ordine. Con il tampone PBS a pH 7, la velocità di reazione è più lenta e predomina il comportamento di secondo ordine.

Effetto della temperatura

Le scansioni delle lunghezze d'onda dell'idrolisi di pNPA a quattro temperature diverse sono mostrate in Figura 2. Esiste una chiara relazione tra la temperatura del campione e la velocità di reazione come misurato dalla produzione di PNP (Figura 2). A 80 °C sono evidenti i punti isosbistici, a indicare una conversione diretta da pNPA a PNP. I dati cinetici delle scansioni delle lunghezze d'onda per l'esperimento a 80 °C sono stati usati per produrre un grafico dell'assorbanza in funzione del tempo, usando il picco di PNP a 408 nm (Figura 3). Il calcolo della velocità della reazione di secondo ordine (software integrato Workstation Cary UV) è stato successivamente usato per determinare la costante di velocità della reazione di secondo ordine (k) per la reazione, con $k = 883,194$ (1/[min.mol]).

Scansioni delle lunghezze d'onda

Grazie alle scansioni delle lunghezze d'onda eseguite a tempi diversi, è possibile osservare il consumo di pNPA e la produzione di PNP (Figure 2). L'intero intervallo delle lunghezze d'onda fornisce ulteriori informazioni che potrebbero sfuggire quando si analizza una singola lunghezza d'onda. Per esempio, la potenziale presenza di intermedi di reazione, così come sottili cambiamenti nel campione, e il rilevamento di punti isosbistici, come mostrato in Figura 2.

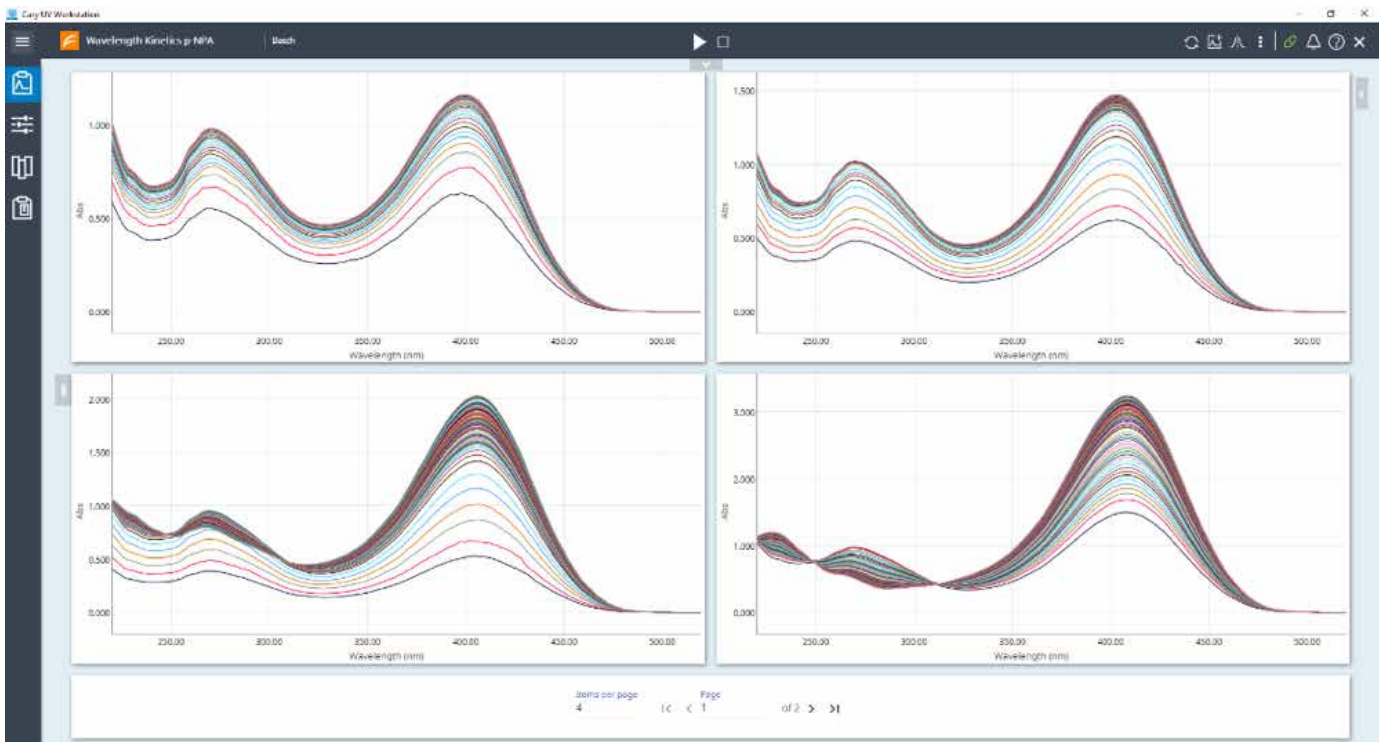


Figura 2. Scansioni delle lunghezze d'onda a tempi diversi nell'intervallo 220 - 520 nm, ottenute per 30 minuti dopo avere avviato la reazione miscelando i due reagenti. In alto a sinistra a 20 °C, in alto a destra a 40 °C, in basso a sinistra a 60 °C e in basso a destra a 80 °C.

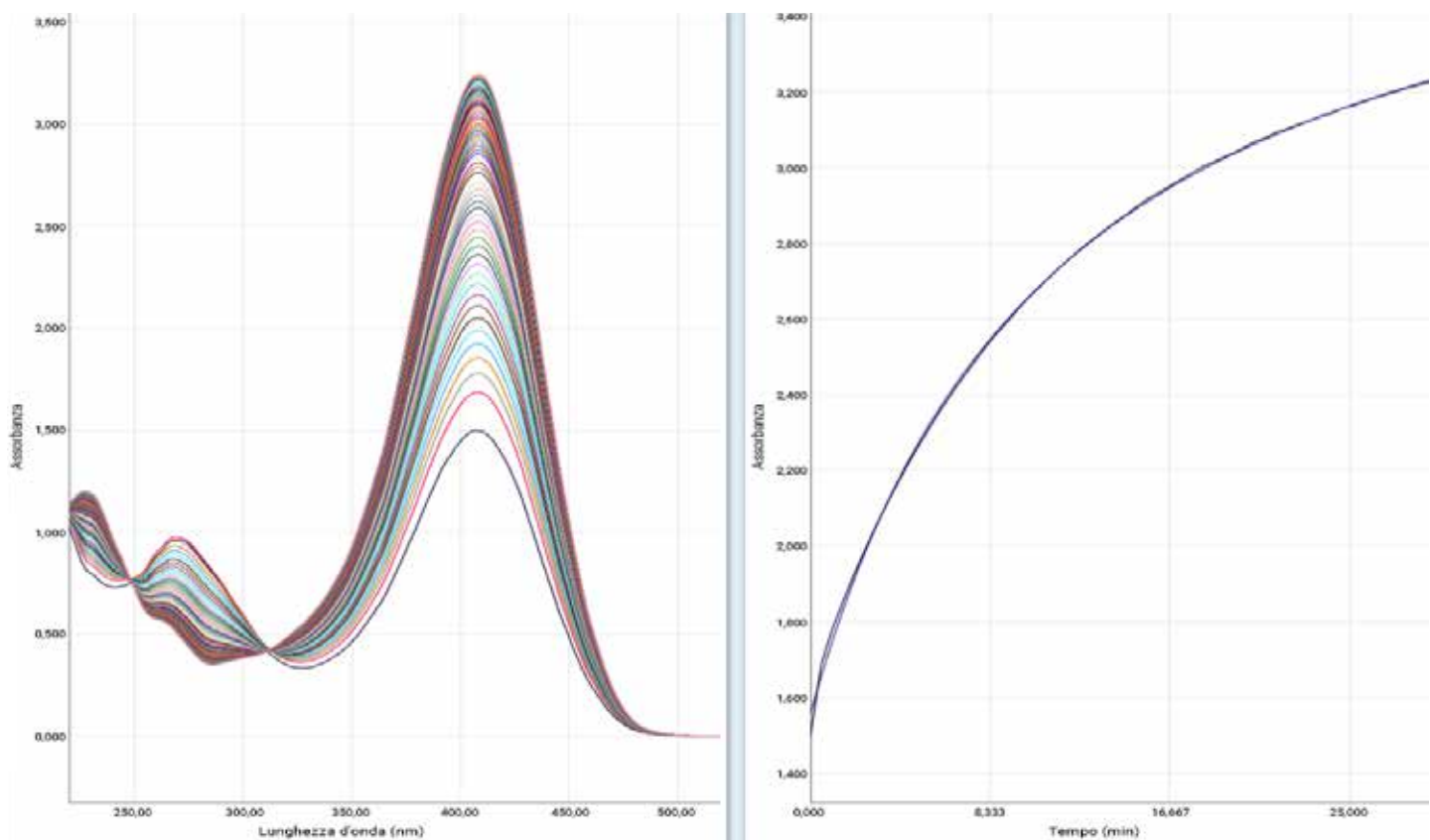


Figura 3. Gli spettri per la reazione eseguita a 80 °C con i caratteristici punti isobestici (sinistra). La curva del cambiamento dell'assorbanza nel tempo a 408 nm (destra) è stata tracciata all'interno del software Workstation Cary UV e usata per determinare la velocità di reazione.

Conclusioni

Lo spettrofotometro UV-Vis Multizona Cary 3500 permette di monitorare l'idrolisi di pNPA a quattro temperature diverse in un unico esperimento. Gli effetti della temperatura sulle velocità di reazione sono stati dimostrati a 20 °C, 40 °C, 60 °C e 80 °C, simultaneamente, in un unico esperimento dalla durata di 30 minuti.

La rapida raccolta degli spettri delle lunghezze d'onda durante l'esperimento ha inoltre permesso l'interpretazione dei dati a diverse lunghezze d'onda. Mentre è possibile determinare una velocità di reazione per tutte e quattro le temperature, è possibile che la reazione proceda con meccanismi diversi. Lo studio dell'intero intervallo delle lunghezze d'onda per la reazione può fornire indicazioni utili sul meccanismo di reazione.

Una maggiore conoscenza delle cinetiche di reazione è fondamentale per una comprensione migliore dell'interazione chimica e dei processi di reazione. Benché fonte di molte informazioni, la conduzione di esperimenti complessi per investigare i processi delle reazioni dipendenti dalla temperatura può richiedere molto tempo. Grazie all'esclusiva funzionalità a più temperature dello spettrofotometro UV-Vis Agilent Multizona Cary 3500, è possibile ottenere i dati di cinetica in un tempo pari a 25% di quello necessario con i sistemi UV-Vis tradizionali.

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.