

## 化学反応に対する温度の影響を評価する 高速メソッド

カイネティクス分析を 4 つの温度で同時実行して  
実験時間を短縮



### 著者

Kevin Grant and Matt Quinn

Agilent Technologies,  
Australia

### はじめに

多くのライフサイエンスおよび化学分析アプリケーションにおいて、反応プロセスのダイナミクスを十分に理解することが求められています。温度、pH、圧力、追加の化学成分や高分子の存在といった可変性要素が、反応速度に大きく影響する場合があります。こうしたパラメータの影響を理解することが重要なアプリケーションは多岐にわたり、例えば酵素の特性解析、化学合成、食品製造のほか、製品の保管や安定性の条件の最適化を重視する産業などが挙げられます。反応のカイネティクス測定による特性解析と定量には通常、UV-Vis 分光光度計が使用されます。これは、吸光度の変化を継続して測定することによって経時的な濃度変化を求めることができるためです。

温度が反応速度に与える影響の評価には、非常に時間がかかります。異なる温度で実験を繰り返さなければならず、分光光度計のサンプルコンパートメント内に設置する特別な機器も必要です。このような機器は多くの場合、冷却水循環装置を使用してサンプルの温度を維持します。しかし、水漏れのリスクや騒音の発生を招き、ラボのメンテナンスの負担が増大します。

近年の昇温機能を有する分光光度計の進歩により、大幅な時間短縮とより高精度な温度制御が可能になりました。Agilent Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計を使用すると、1 回の実験でサンプルを 4 つの異なる温度で測定できます。Cary 3500 は、組み込み型キュベット内温度プローブを使用して、実験中の溶液の温度を正確に制御できるほか、静的温度実験に非常に適したブロック温度制御を用いて測定することができます。マルチセルホルダが内蔵されており、冷却水循環装置を使用しない空冷式ペルチェ素子を用いて 0 ~ 110 °C の間でサンプルの温度を制御します。

この研究では、1 回の実験で異なる 4 つの温度でカインेटクスによる反応速度を測定することにより、時間短縮が可能かどうかを検証します。この目的のために p-ニトロフェニル酢酸 (pNPA) の加水分解を使用しました。これはよく知られている反応で、反応速度は温度の関数として変化します。

## 実験方法

アルカリ溶液中で、p-ニトロフェニル酢酸 (pNPA) は p-ニトロフェノール (PNP) へ簡単に加水分解します。pNPA は 270 nm で最大吸光度を示し、PNP は温度に応じて 405 ~ 410 nm の間で最大吸光度を示します。波長スキャンを経時的に実行し、反応の進行に沿って pNPA の消費と PNP 生成の両方をモニタリングしました。実験は pH 7 で実施し、80 °C のサンプルの反応速度を測定しました。

## サンプル

0.0001 M p-NPA メタノール溶液を準備しました。100 mM NaCl、0.1 nM EDTA、10 mM リン酸ナトリウムのリン酸緩衝液 (PBS) も準備して pH 7.0 に調製しました。

未希釈の PBS を使用してベースラインを測定し、各測定中にリファレンスとしても使用しました。この実験では、標準の 3.5 mL、光路長 10 mm の石英製キュベットと、500 rpm で攪拌する星型のマグネティックスターラを使用しました。

## 機器とメソッド

すべての測定に、Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計を使用しました (図 1)。メソッドパラメータを表 1 に示します。



図 1. Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計のサンプルコンパートメントには内蔵マルチセルホルダがあります。各サンプル/リファレンスペアを異なる温度に維持できます。

表 1. 機器パラメータ

パラメータ	設定
波長範囲 (nm)	220 ~ 520 nm (スキャン)
スキャンスピード (nm/min)	1200
スペクトルバンド幅 (nm)	5
信号平均化時間 (s)	0.1
データ間隔 (nm)	2
攪拌速度 (rpm)	500
温度ゾーン数	4
温度 (°C)	20、40、60、80
温度制御	ブロック

各サンプルキュベットは、2980 µL のリン酸緩衝液を充填してマルチセルホルダに配置しました (図 1)。温度平衡のための 10 分が経過した後、20 µL の p-NPA メタノール溶液を加えました。

220 ~ 520 nm の波長範囲の吸光度スキャンを、30 秒ごとに 30 分間実行しました。これらの測定は各温度設定に対して同時に実行しました。Cary UV ワークステーションソフトウェアに標準搭載されているカインेटクス分析機能を使用して、カインेटクス曲線を生成し、反応速度を求めました。

## 結果

pNPA の加水分解には、塩基性条件下での酢酸基の除去が含まれています。水過剰といった条件が設定されると、反応は擬一次と考えることができます。PBS 緩衝液の pH が 7 に設定されたため、反応速度は遅いものと予想され、二次反応動作が支配的になります。

### 温度効果

4 つの異なる温度での pNPA 加水分解の波長スキャンを図 2 に示します。サンプルの温度と、PNP 生成によって測定される反応速度には、明確な関係があります (図 2)。80 °C で等吸収点が見られ、pNPA から PNP への直接的な変換が示されています。80 °C の実験にて得られた波長スキャンカインेटクスデータを使用し、408 nm の PNP ピークから、吸光度対時間プロットを作成しました (図 3)。次に、二次反応速度の計算 (Cary UV ワークステーションソフトウェアに標準搭載) を使用して、この反応の二次速度定数 (k) を  $k = 883.194 \text{ (1/[min.mol])}$  として求めました。

### 波長スキャン

波長スキャンを経時的に実行することによって、pNPA の消費と PNP 生成を観察できました (図 2)。単一波長のみで分析された場合に見逃されることがある追加情報も、波長範囲全体の分析により提供されます。例えば、可能性のある中間生成物の存在、サンプル中のわずかな変化、図 2 に示す等吸収点の検出です。

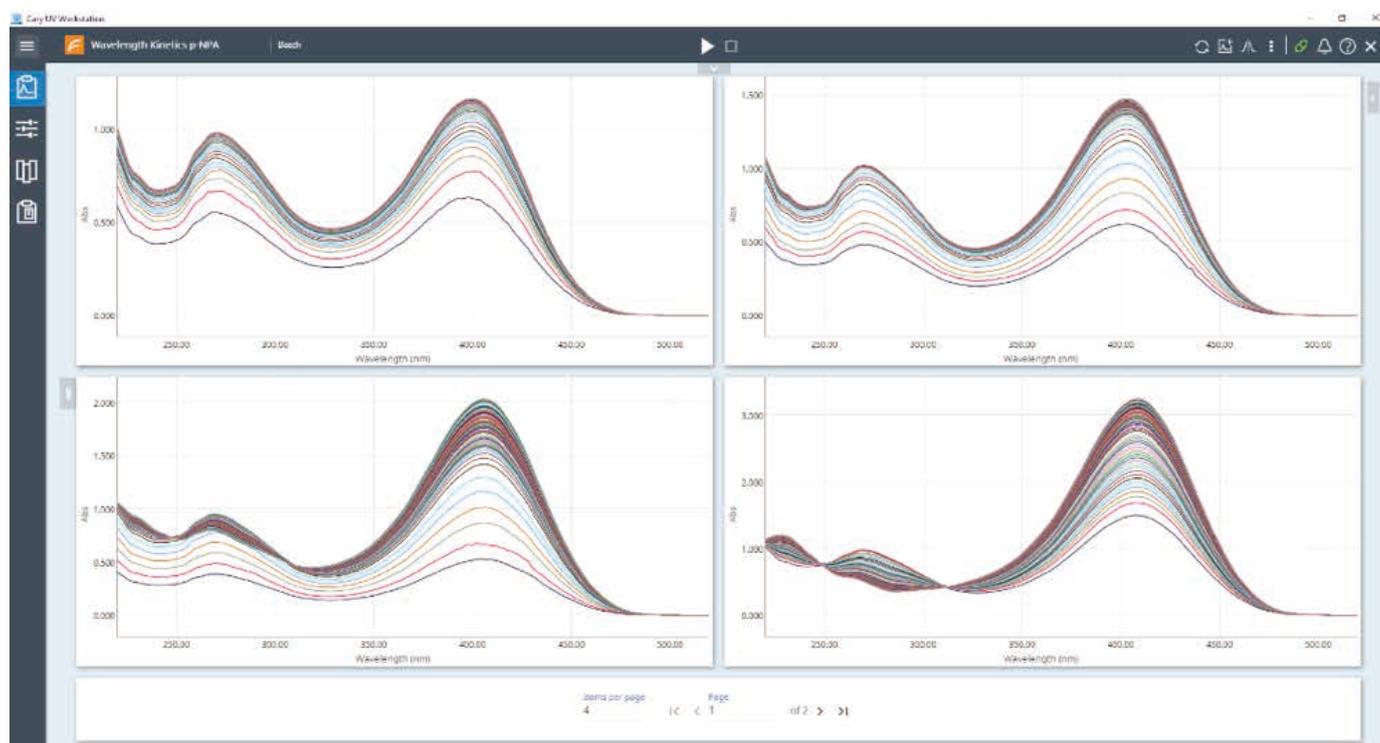


図 2. 2 種類の試薬を混合することによって、反応を始めた後の 30 分間で収集された波長範囲 220 ~ 520 nm の経時的波長スキャンデータ。左上は 20 °C、右上は 40 °C、左下は 60 °C、右下は 80 °C の結果を示す。

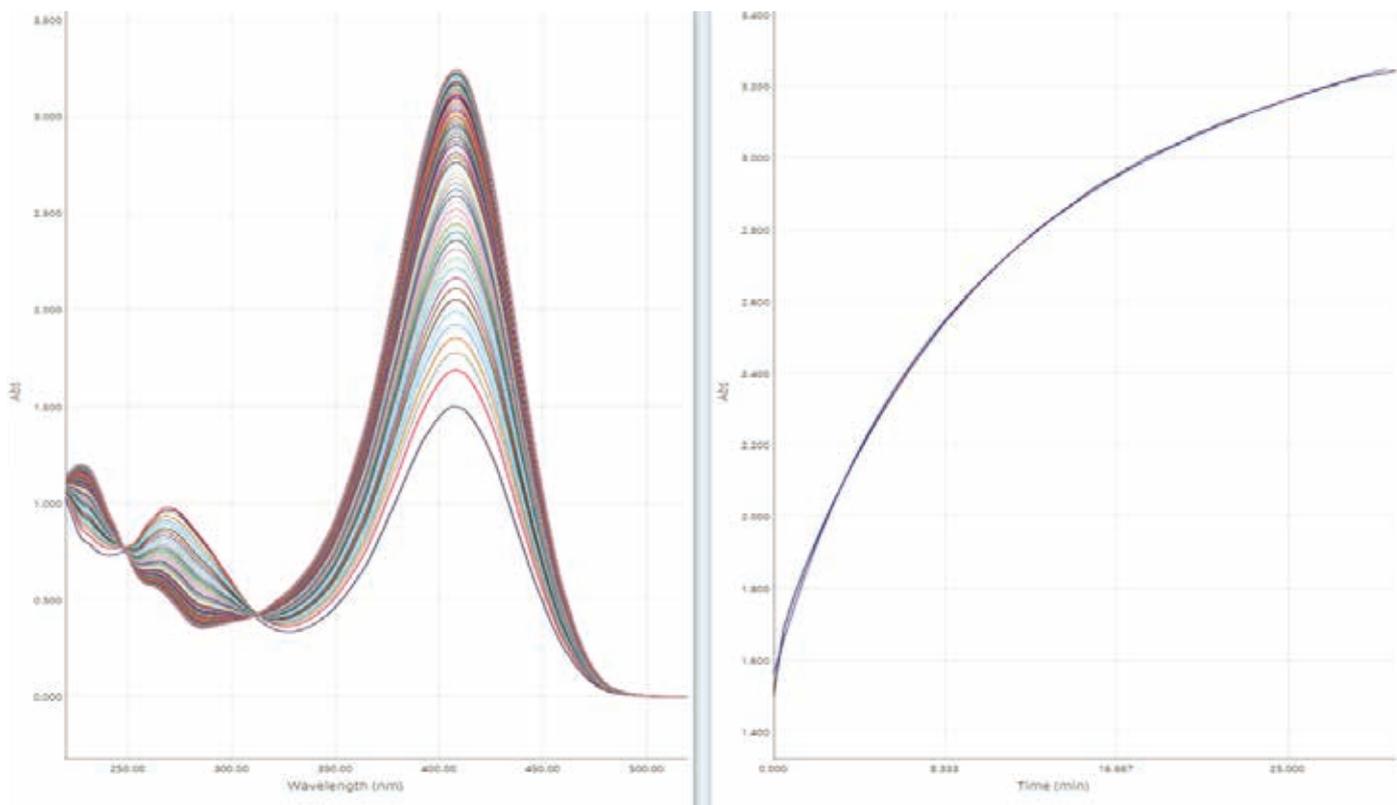


図 3. 特徴的な等吸収点を持つ 80 °C で実行された反応のスペクトル (左)。408 nm での吸光度の経時変化 (右) は Cary UV ワークステーションソフトウェアでプロットされ、反応速度を求めるために使用しました。

## 結論

Agilent Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 分光光度計は 1 回の実験で、4 つの異なる温度での pNPA の加水分解をモニタリングすることができます。所要時間 30 分の 1 回の実験のみで、反応速度に対する温度の影響が、20 °C、40 °C、60 °C、80 °C で同時に実証されました。

実験時の波長スペクトルの高速収集により、データを異なる波長で解釈することもできました。4 つの温度すべてで反応速度を決定できますが、

反応メカニズムは異なる形で進行する可能性があります。反応を波長範囲全体で観察することで、反応メカニズムへの有益な知見を得ることができます。

反応の動的測定への理解を深めることが、化学的相互作用および反応プロセスをより適切に理解するための基礎となります。反応プロセスの温度依存性を評価するための詳細な実験は、多くの情報が得られますが、非常に時間がかかります。Agilent Cary 3500 マルチゾーン UV-Vis 独自のマルチ温度機能を使用すれば、カイネティクスデータを従来の UV-Vis システムの 25 % の時間で収集できるため、他にはない時間節約の利点を得られます。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2018  
Printed in Japan, October 30, 2018  
5994-0385JAJP