

Praktikum der Physikalischen Chemie

Hydrolyse von Harnstoff

Samed Hür (huer@uni-bremen.de)

Janosch Ehlers (jaeh@uni-bremen.de)

Gruppe H

Betreuer: Tobias Borrmann (tobias.borrmann@uni-bremen.de)

21.11.2022

Inhaltsverzeichnis

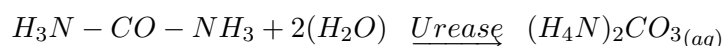
1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	1
3	Durchführung	1
4	Auswertung	2
4.1	Anfangsgeschwindigkeitsbestimmung	2
4.2	Herstellung der Michaelis-Menten Beziehung	2
4.3	Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Harnstoffumsetzung	3
4.4	Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Harnstoffumsetzung	5

1 Einleitung

Ziel ist die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante bei der ureasekatalysierten und unkatalysierten Umsetzung von Harnstoff in Ammoniumkarbonat durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit über die Zeit. **Voll scheiße das ding**

2 Theoretischer Hintergrund

Bei der Hydrolyse von Harnstoff wirkt das Enzym Urease wie ein Katalysator. Bei der Reaktion entsteht Ammoniumkarbonat, welches im Wasser dissoziiert vorliegt.



Die Leitfähigkeit der Lösung ist damit proportional zu dem Reaktionsfortschritt. Über die Bestimmung der Leitfähigkeit einer Lösung mit bekannter Konzentration an Ammoniumkarbonat kann so die Konzentration einer Lösung mit anderer Leitfähigkeit nach Gleichung 1 bestimmt werden.

$$C_l = \kappa_l \cdot \frac{c_{Norm}}{\kappa_{Norm}} \quad (1)$$

Über mehrere Messungen können nun die Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt werden. Es ergibt sich ein Michaelis-Menten-Zusammenhang zwischen Anfangsgeschwindigkeit und Konzentration (Gleichung 2).

$$v = v_0 \cdot \frac{[s]}{[s] + K_M} \quad (2)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V'_0} + \frac{K_M}{V'_0} \cdot \frac{1}{CH,0} \quad (3)$$

Nach Lineweaver-Burk (Gleichung 3) gibt die reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten eine Gerade, deren Abzissenabschnitt, $-K_M$ entspricht, während der Ordinatenabschnitt $\frac{1}{V'_0}$ entspricht. Für $c_{H,0} \ll K_M$ kann die Geschwindigkeitskonstante dieses Versuchs nun über Gleichung 4 bestimmt werden.

$$v_0 = K_2 \cdot c_{U,0} \quad (4)$$

Anschließend wird die Konzentrationsänderung des Ammoniumkarbonats über die Zeit beobachtet. Nach dem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung (Gleichung 5) ergibt die Auftragung von $\ln\left(\frac{[A_0]}{[A_t]}\right)$ über die Zeit eine Gerade deren Steigung der Geschwindigkeitskonstante entspricht.

$$\ln\left(\frac{[A_0]}{[A_t]}\right) = kt \quad (5)$$

3 Durchführung

Als erstes wurde die Enzymlösung mit 204.7 mg Urease und 10 mL destilliertem Wasser erstellt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Harnstofflösung hergestellt. Verwendet wurden jeweils 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL, 25 mL und 40 mL einer $0.1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ Harnstofflösung. Es wurde beim zweiten Messkolben (2 mL) etwa 2 mm zu viel destilliertes Wasser hinzugegeben. Als Nächstes wurde die Elektrode fixiert und der Magnetrührer eingeschaltet. Es wurde draufgeachtet, die Rührgeschwindigkeit konstant zu halten. Anschließend wurden die 6 Messungen

durchgeführt, wobei jede mit 1 mL Enzymlösung gestartet wurde. Anschließend wurde die unkatalysierte Reaktion untersucht. Dabei wurde zuerst das Wasserbad auf 50 °C erhitzt. Danach wurden ca. 50 mL einer $0.5 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ Harnstofflösung auf 48 °C temperiert und die Messung gestartet. Nach 10 min wurde die Messung beendet. Es wurde versäumt, am Ende der Messung 1 mL Urease dazuzugeben, um die drastische Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten. Zum Schluss wurde zur Kalibrierung $4 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ Ammoniumkarbonat für 50 s gemessen.

4 Auswertung

Bei der Auswertung sind wir auf erhebliche Unstimmigkeiten unserer Daten gestoßen. Im weiteren Verlauf konnte keine Michaelis-Menten Beziehung hergestellt werden. Die Auswertungsstrategie kann nicht angewandt werden, somit sind unsere Daten Unbrauchbar.

Ausgewertet werden also die Daten unserer Partnergruppe.

4.1 Anfangsgeschwindigkeitsbestimmung

Die ersten 10 Messpunkte nach Hinzugabe des Enzyms sind in Tabelle 1 zu sehen. Es wurden in jedem Experiment mehr Daten aufgezeichnet als hier angegeben, allerdings im weiteren Verlauf nicht ausgewertet. Wie in Abbildung 1 zu sehen, wurde anschließend für jede Messung eine Ausgleichsgerade für die ersten sechs Messpunkt und die Messpunkte zwei bis sieben berechnet. Für die Umrechnung von Leitfähigkeit zu Konzentration wurde Gleichung 1 verwendet. Die Leitfähigkeit κ_{Norm} hat hier den Wert des Durchschnitts aller erhaltenen Leitfähigkeiten der Kalibrierlösung. Beispielhaft ergibt sich also für den ersten Messwert des ersten Messkolbens:

$$4.5 \frac{\mu\text{S}}{\text{m}} \cdot \frac{4 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}}{545.4 \frac{\mu\text{S}}{\text{m}}} = 0.033 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$$

Durch die Darstellung von Konzentration über die Zeit ist die erhaltene Steigung dieser Geraden direkt die Anfangsgeschwindigkeit dieser Messung. Die beiden Werte spiegeln hier also eine angenommene obere und untere Grenze der Anfangsgeschwindigkeit wieder. Da Leitfähigkeitsmessgerät und Kalibrierlösung als fehlerfrei angesehen werden, ist auch die Konzentration fehlerfrei.

4.2 Herstellung der Michaelis-Menten Beziehung

Die errechneten Anfangsgeschwindigkeiten, werden nun in Abhängigkeit der Eduktkonzentration Dargestellt. Zusehen ist dies in Abbildung 2. Damit nun die Maximalgeschwindigkeit und die Michaelis-Menten Konstante bestimmt werden kann, muss zudem auch die Doppeltreziproke Visualisierung dieser Beziehung erstellt werden (Abb. 3). Die Ausgleichsgeraden der Daten in dieser Darstellung gibt nach Gleichung 3, den Zusammenhang mit den gesuchten Größen.

Für das Erstellen der Abbildungen ist die Konzentration der angesetzten Lösungen zu berechnen. Für Maßkolben eins ergibt sich:

$$C_2 = \frac{0.1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0.001 \text{ L}}{0.051 \text{ L}} = 0.00196 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Ermittelt wurden folgende Ausgleichsgeraden:

$$2310,38 \cdot \frac{1}{c} + 93930 = \frac{1}{v_0} \qquad 2177,73 \cdot \frac{1}{c} + 86987 = \frac{1}{v_0}$$

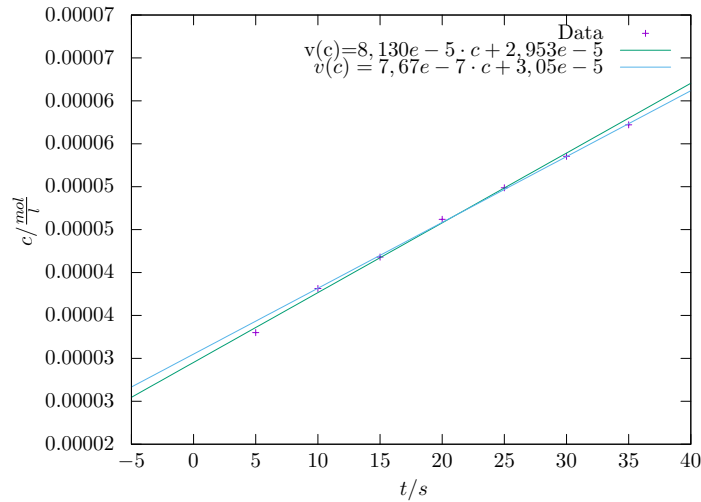


Abbildung 1: Zunahme von Ammoniumkarbonat über die Zeit für Maßkolben 1 (1 mL Harnstoff)

Für die Auswertung wurden die Werte des Maßkolbens mit 2 mL Harstoff, nicht verwendet. Diese liegen Klar ausserhalb der gesuchten Michaelis-Menten Beziehung und müssen daher Anderweitug Fehlerbehaftet sein. Zurückzuführen ist dies liegt wahrscheinlich daran, dass zu viel Wasser in diesen Maßkolben gegeben wurde. Wie der Durchführung zu entnehmen ist. Weiter ergeben sich die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse.

4.3 Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Harnstoffumsetzung

Wie oben gezeigt, wurde die Urease Konzentration berechnet. Diese ist gleich für alle Versuchsteile. In unserem Versuch wurde eine Urease Stammlösung von $3.412 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ angesetzt. Nach Versuchsstart hatte die Lösung dann eine Urease Konzentration von $6.69 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$. Verwendet wurden drei fehlerbehaftete Messgeräte. Die Waage hat einen Messfehler von $1 \times 10^{-4} \text{ g}$, die Pipette hat einen Messfehler von $3 \times 10^{-5} \text{ L}$ und der Maßkolben einen Fehler von $6 \times 10^{-5} \text{ L}$.

Es wurde zuerst ein Stammlösungsfehler von $C_U = 1.037 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und ein Messlösungsfehler von $C_{U2} = 2.281 \times 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ ermittelt. Der Messlösungsfehler setzt sich aus dem Abwiegefehler

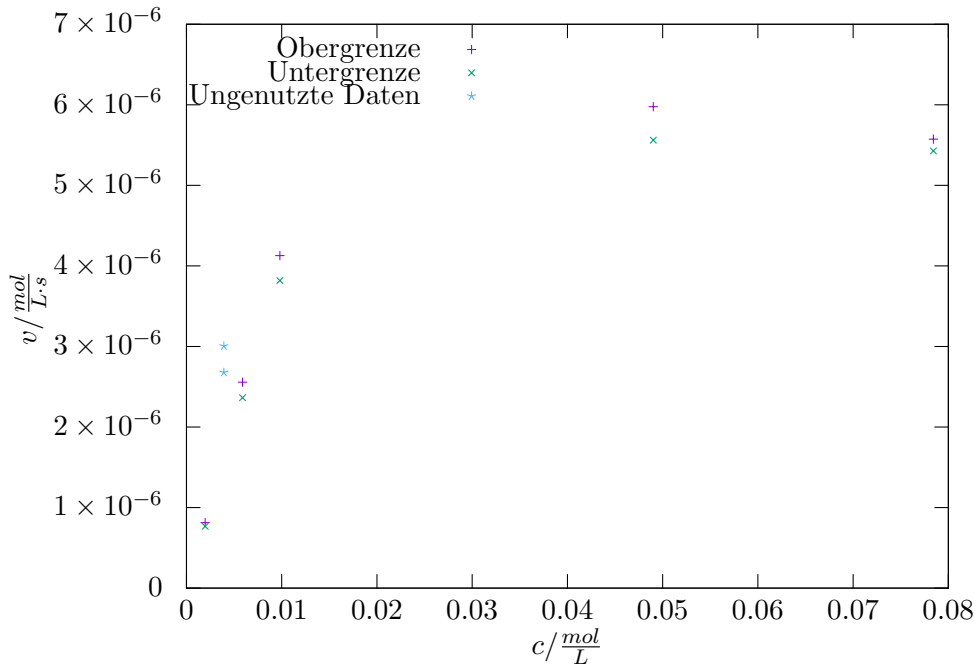


Abbildung 2: Michaelis-Menten Beziehung

und den jeweiligen Verdünnungsfehlern zusammen und wird wie folgt berechnet:

$$\Delta C_U = \frac{1}{M} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{V} \cdot \Delta m\right)^2 + \left(-\frac{m}{V^2} \cdot \Delta V\right)^2}$$

$$\Delta C_U = \frac{1}{6 \times 10^5 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{0.01 \text{ L}} \cdot 1 \times 10^{-4} \text{ g}\right)^2 + \left(-\frac{0.2047 \text{ g}}{0.01 \text{ L}^2} \cdot 3 \times 10^{-5} \text{ L}\right)^2}$$

$$\Delta C_U = 1.037 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$\Delta C_{U2} = \sqrt{\left(\frac{1}{V_2} \cdot \sqrt{(V_1 \cdot \Delta C_1)^2 + (C_1 \Delta V_1)^2}\right)^2 + \left(-\frac{C_1 \cdot V_1}{V_2^2} \cdot \Delta V_2\right)^2}$$

$$A = \left(\frac{\sqrt{(0.01 \text{ L} \cdot 3.412 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}})^2 + (3.412 \frac{\text{mol}}{\text{L}} 1 \times 10^{-5} \text{ L})^2}}{0.051 \text{ L}}\right)^2$$

$$B = \left(-\frac{3.412 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0.01 \text{ L}}{0.051 \text{ L}^2} \cdot 6 \times 10^{-5} \text{ L}\right)^2$$

$$\Delta C_{U2} = \sqrt{A + B} = 2.281 \times 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Weiter kann nun über die oben errechnete Maximalgeschwindigkeit die Geschwindigkeitskonstante nach errechnet werden:

$$k_2 = \frac{v_{Max}}{c_{U2}} = \frac{1.15 \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}}}{6.69 \frac{\text{mol}}{\text{L}}} = 17.185 \text{ s}^{-1}$$

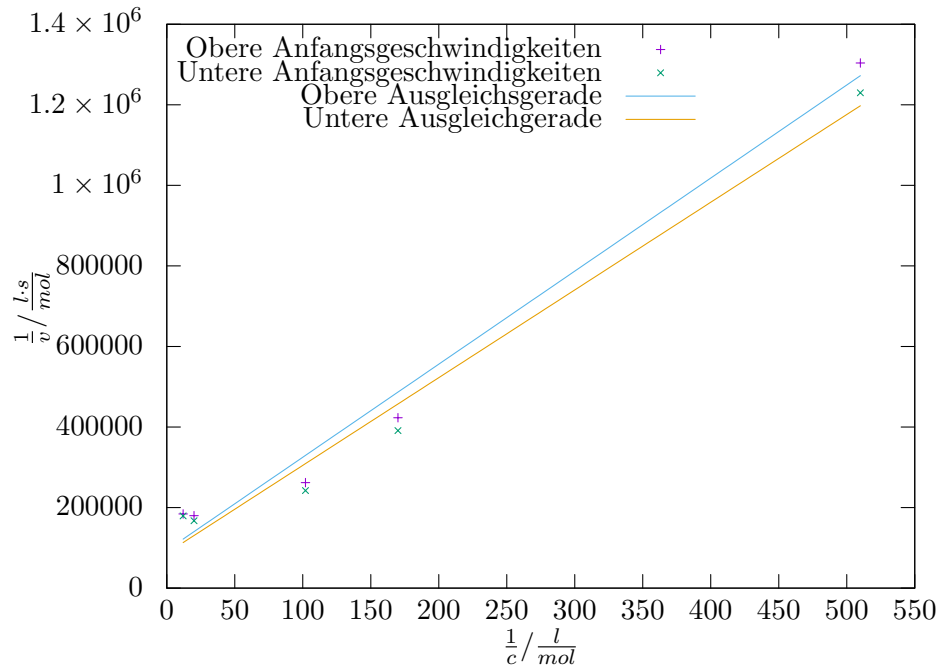


Abbildung 3: Lineweaver-Burk Auftragung und Ausgleichgeraden

Der Fehler wird wie folgt berechnet:

$$\Delta k_2 = \sqrt{\left(\frac{1}{C_{U2}} \cdot \Delta V_0\right)^2 + \left(-\frac{V_0}{C_{U2}^2} \cdot \Delta C_{U2}\right)^2}$$

$$\Delta k_2 = \sqrt{\left(\frac{3.825 \times 10^{-7} \frac{\text{mol L}}{\text{s}}}{6.69 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}}\right)^2 + \left(-\frac{1.126 \times 10^{-5} \frac{\text{mol L}}{\text{s}}}{6.69 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}} \cdot 2.281 \cdot 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}\right)^2}$$

$$\Delta k_2 = 0.572 \text{ s}^{-1}$$

Die Ergebnisse dieses Versuchsteils sind ebenfalls in Tabelle 2 zu sehen. Bewusst wurde hier die Mittelwertabweichung gewählt, anstelle des Einzelfehlers, da diese etwas größer als der Einzelfehler ist, sich aber noch im angemessenen Rahmen bewegt.

4.4 Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Harnstoffumsetzung

Verwendet wurde hier eine $0.5 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ Harnstofflösung. Deren Fehler wird als 0 angenommen. Wie in den vorherigen Versuchen wird auch hier das Leitfähigkeitsmessgerät ebenfalls als fehlerfrei angesehen. Unsere errechnete Geschwindigkeitskonstante ist in diesem Fall ohne Fehler.

Für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante wird erst wie oben beschrieben aus der gemessenen Leitfähigkeit die Konzentration errechnet (Gleichung 1). Alle Konzentrationen werden anschließend durch die erste gemessene Konzentration geteilt. Danach wird der natürliche Logarithmus davon ermittelt. Es sind Werte in dem Bereich 0 bis 0,4 ermittelt worden, welche anschließend in Abhängigkeit der Zeit dargestellt worden sind. Eine Ausgleichsgerade durch die errechneten Werte gibt nach dem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung (Gleichung 5) mit seiner Steigung die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion an. In Abbildung 4 sind unsere errechneten Werte sowie die Ausgleichsgerade eingezeichnet. Ermittelt wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $0,000647 \text{ s}^{-1}$

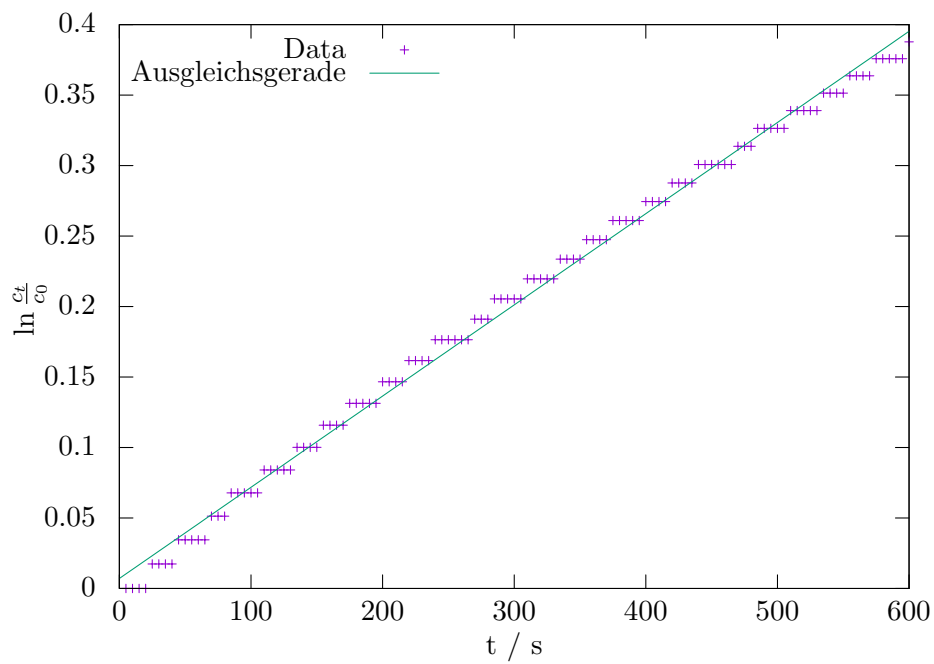


Abbildung 4: Logarithmische Auftragung der relativen Konzentrationsänderung über die Zeit

t/s	$\kappa_1/\frac{\mu\text{S}}{\text{m}}$	$\kappa_2/\frac{\mu\text{S}}{\text{m}}$	$\kappa_3/\frac{\mu\text{S}}{\text{m}}$	$\kappa_5/\frac{\mu\text{S}}{\text{m}}$	$\kappa_{25}/\frac{\mu\text{S}}{\text{m}}$	$\kappa_{40}/\frac{\mu\text{S}}{\text{m}}$
5	4,5	2,5	4,6	2,8	2,7	7,8
10	5,2	5,3	6,7	6,5	8,2	11,7
15	5,7	7,5	8,6	9,4	12,2	15,4
20	6,3	9,5	10,3	12,1	16	19,1
25	6,8	11,2	11,8	14,6	19,8	22,7
30	7,3	12,9	13,4	17,1	23,5	26,3
35	7,8	14,5	14,8	19,6	27,2	29,8
40	8,2	16,1	16,2	21,9	30,8	33,3
45	8,7	17,6	17,6	24,2	34,3	36,7
50	9,1	19	19	26,5	37,8	40

Tabelle 1: Leitfähigkeiten der Verdünnungsreihe nach Enzym-Hinzugabe

	Obergrenze	Untergrenze	MWA
K_M	$39.944 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$	$40.656 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$	$\pm 0.356 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$
V_{Max}	$1.15 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L s}}$	$1.064 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L s}}$	$\pm 4.249 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L s}}$
k_2	17.185 s^{-1}	15.915 s^{-1}	$\pm 0.635 \text{ s}^{-1}$

Tabelle 2: Ergebnisse des ersten Versuchteils