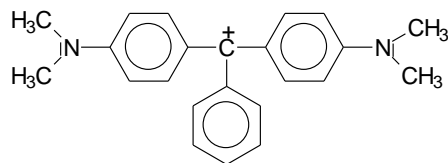


Praktikum Physikalischen Chemie
WS 2021/22
K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

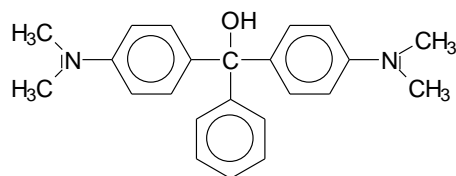
Variante A) Die pH-Abhängigkeit der
Solvolysengeschwindigkeit von Malachitgrün

1. Theorie zum Versuch

In wässriger Lösung reagiert das Kation des Malachitgrüns **[A]**



mit OH^- -Ionen des Wassers zu der entsprechenden Carbinolbase **[B]**.



Diese Reaktion wird durch OH^- -Ionen katalysiert. Bei entsprechend großer OH^- -Konzentration liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Carbinolbase **[B]**.

In alkalischer Lösung ($\text{pH} \geq 10$) gilt somit folgende Reaktionsgleichung:



Außerdem reagiert Malachitgrün **[A]** mit Wasser, allerdings mit kleinerer Reaktionsgeschwindigkeit nach:



k_1 und k_2 sind die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Reaktion (1) und (2). In verdünnter Lösung ist die Konzentration an Wasser so groß, dass diese in sehr guter Näherung konstant gesetzt, und in die entsprechende Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_2 einbezogen werden kann. Für den Zerfall an Malachitgrün erhält man somit [c = Konz. von Malachitgrün]:

$$\begin{aligned} -\frac{dc}{dt} &= k_1 \cdot c_{\text{OH}^-} \cdot c + k_2 \cdot c \\ &= [k_1 \cdot c_{\text{OH}^-} + k_2] \cdot c \end{aligned} \quad (3)$$

Praktikum Physikalischen Chemie

WS 2021/22

K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

Stellt man sicher, dass die Konzentration an OH^- -Ionen während der Reaktion ebenfalls konstant bleibt (in verdünnter Lösung genügt es, dass der pH-Wert größer als 10 gehalten wird), dann gilt mit:

$$k = k_1 \cdot c_{\text{OH}^-} + k_2 \quad (4)$$

$$-\frac{dc}{dt} = k \cdot c \quad (5)$$

Durch bestimmte Integration zwischen den Grenzen c und c_0 und t und t_0 ergibt sich wieder der einfache Ansatz (c_0 = Konzentration an Malachitgrün zur Zeit t_0):

$$\ln \frac{c}{c_0} = -k(t - t_0) \quad (6)$$

Da Malachitgrün **[A]** eine starke Absorptionsbande im sichtbaren Bereich besitzt, die Carbinolbase **[B]** jedoch farblos ist, lässt sich die Konzentrationsabnahme an Malachitgrün spektralphotometrisch verfolgen. Für die Lichtabsorption gilt das vertraute Lambert-Beersche Gesetz:

$$E = \lg \frac{I'}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (7)$$

mit

- E = Extinktion
- I' = Intensität des Lichtstrahls des reinen Lösungsmittel
- I = Intensität des Lichtstrahls der Lösung
- ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
- d = Schichtdicke der Küvette.

Durch Einsetzen von (7) in (6) erhält man direkt das Geschwindigkeitsgesetz, ausgedrückt in den Messgrößen **E** und **E₀**:

$$\lg \frac{E}{E_0} = -\frac{k}{2,303}(t - t_0) \quad (8)$$

Gleichung (8) gilt streng genommen nur unter der Voraussetzung, dass bei derjenigen Wellenlänge, bei der **E** gemessen wird, ausschließlich die Substanz **[A]** und nicht auch die Substanz **[B]** absorbiert. Um zu prüfen, ob diese Voraussetzung erfüllt ist, müssen die Absorptionsspektren der reinen Substanzen **[A]** und **[B]** aufgenommen werden. Das Absorptionsspektrum von **[A]** im sichtbaren Bereich kann direkt ermittelt werden. Das von **[B]** kann nur indirekt ermittelt werden, da **[B]** erst im Verlauf der Reaktion gebildet wird. Zu

Praktikum Physikalischen Chemie

WS 2021/22

K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

diesem Zweck nimmt man die Veränderung des Spektrums der Reaktionslösung in Abständen von ca. 10 Min. nacheinander auf.

Unter der Voraussetzung, dass sich während der Aufnahme des Spektrums die Konzentrationen der Reaktionspartner nicht merklich ändern [Das Spektrum muss also schnell registriert werden], ergibt sich die Extinktion der Reaktionslösung bei jeder Wellenlänge zu

$$E = \varepsilon_A \cdot c \cdot d + \varepsilon_B (c_0 - c) \cdot d \quad (9)$$

mit

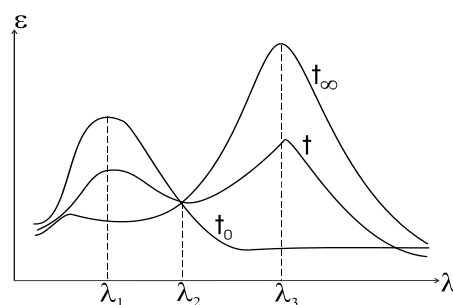
ε_A = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von [A]

ε_B = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von [B]

c_0 = Anfangskonzentration von [A].

Geht man davon aus, dass im betrachteten Bereich des Spektrums die reinen Stoffe [A] und [B] praktisch nur eine ausgeprägte Absorptionsbande bei den zugehörigen Wellenlängen λ_1 und λ_3 aufweisen, so erhält man zur Zeit $t = 0$ ein Spektrum mit nur einer Bande bei λ_1 . Nachdem die Reaktion angelaufen ist, reagiert ein Teil von [A] ab, während die gleiche Menge von [B] neu gebildet wird. Dadurch wird die Bande bei λ_1 erniedrigt, während bei λ_3 eine neue Bande entsteht. Nach genügend langer Zeit würde die Bande bei λ_1 ganz verschwinden, und die Bande λ_3 , die vom reinen Endprodukt [B] herrührt, erreicht ihr Maximum bei vollständigem Umsatz von [A] nach [B].

Man erhält schematisch folgende Kurvenschar:



Man ersieht, dass sich alle drei Kurven in einem Punkt bei der Wellenlänge λ_2 schneiden. Diesen Punkt nennt man **Isosbestischen Punkt**. Die Existenz dieses Punktes lässt sich nach Umformung von Gleichung (9) verstehen:

$$E = d[c(\varepsilon_A - \varepsilon_B) + c_0 \varepsilon_B] \quad (10)$$

Da sowohl ε_A als auch ε_B mit der Wellenlänge variieren, und entsprechende Werte zwischen 0 und einem Maximalwert annehmen, muss es eine Wellenlänge λ_2 geben, bei der ε_A und ε_B

Praktikum Physikalischen Chemie WS 2021/22

K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

gleich groß sind. Nach (10) muss bei dieser Wellenlänge die Extinktion von **[A]** und **[B]** den gleichen Wert besitzen. Dieser Isosbestische Punkt wird deshalb an dieser Stelle diskutiert, weil seine Existenz eine Kontrolle dafür ist, dass aus dem Ausgangsstoff **[A]** nur ein Endprodukt **[B]** entsteht [allerdings erhält man einen gleichen Isosbestischen Punkt, wenn mehrere Endprodukte in einem gleichen Konzentrationsverhältnis zueinander gebildet werden]. Man würde aber keinen solchen Isosbestischen Punkt erhalten, wenn beispielsweise der Stoff **[A]** nach einer Reaktion 1.Ordnung in das Produkt **[B]** und gleichzeitig nach einer Reaktion 2.Ordnung in das Produkt **[C]** umgewandelt würde.

Das gleiche gilt hier für den Fall, dass das Produkt **[B]** in einer Folgereaktion weiterreagieren würde.

Ersieht man aus der Schar der aufgenommenen Absorptionsspektren, dass die zu Beginn getroffene Annahme gilt, dass nämlich die Substanz **[B]** bei λ_1 nicht absorbiert, dann erhält man aus (8) die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k für eine bestimmte vorgegebene OH^- -Konzentration. Wiederholt man die Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten für andere OH^- -Konzentrationen und trägt die so gefundenen, zugehörigen Reaktionsgeschwindigkeits-konstanten k gegen die Konzentration an OH^- -Ionen auf, so lassen sich nach (4) die zugehörigen Konstanten k_1 und k_2 berechnen.

2. Aufgaben

- 2.1 Man nehme das Absorptionsspektrum einer Lösung von Malachitgrün in Wasser mit einem registrierenden Spektralphotometer auf.
 $[c[A]] = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$, Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$, Bereich λ : 200 bis 800 nm
Man bestimme daraus die Lage des längstwelligen Absorptionsmaximums, sowie des dazugehörigen dekadischen Extinktionskoeffizienten.
- 2.2 Man wiederhole den Versuch aus Aufgabe 2.1 mit einer Lösung von Malachitgrün in einer Pufferlösung mit dem pH-Wert 10,5 sofort nach dem Ansetzen der Lösung und dann etwa 5 Mal nacheinander im Abstand von je 10 min. Aus der erhaltenen Kurvenschar bestimme man die Lage des Isosbestischen Punktes $[\lambda_2]$.
- 2.3 Das Spektralphotometer wird auf die Wellenlänge des längstwelligen Absorptionsmaximums von Malachitgrün fest eingestellt.
Im Anschluss daran verfolgt man die Abnahme der Extinktion von Malachitgrün-Lösungen, die bei pH-Werten von 10,0; 10,3; 10,6; 11,0 und 11,3 hergestellt wurden.
Aus den erhaltenen Kurven berechne man nach (8) und (4) die Geschwindigkeitskonstanten k , k_1 und k_2 .

Praktikum Physikalischen Chemie

WS 2021/22

K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

3. Geräte

- registrierendes Spektralphotometer [UV/VIS]
- Quarzküvetten [$d = 1 \text{ cm}$]

4. Reagenzien

- Malachitgrün-Lösung in Wasser [$3 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$]
- H_3BO_3 in Wasser [0,2 mol/L]
- KOH [1 mol/L]
- KCl [1 mol/L]

5. Versuchsdurchführung

Je 2 ml Lösung von Malachitgrün [$3 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$] werden für Aufgabe 2.1 mit 2 ml Wasser, für die Aufgabe 2.2 und 2.3 mit je 2 ml Pufferlösung des geforderten pH-Wertes möglichst schnell vermischt. Von der Messlösung werden einige ml in die Quarzküvette gefüllt. Die Extinktion der Lösung wird mit einem registrierenden Spektralphotometer gemessen. Es wird die Raumtemperatur möglichst genau im Protokoll registriert und nach jeder Messung die Küvetten aus dem Photometer entnommen, um eine Aufheizung der Küvetten im Gerät durch die Bestrahlung zu vermeiden.

Der Einfachheit halber werden Stamm- und Pufferlösungen bereitgestellt. Die pH-Werte der vorhandenen Pufferlösungen müssen mit einem pH-Meter überprüft werden.

6. Zusatzfragen

- 6.1 Beschreibe den Bau eines UV-Spektralphotometers.
- 6.2 In welchem Zusammenhang stehen folgende Größen
- Transmission (Durchlässigkeit)
 - Absorption
 - Extinktion
- 6.3 Unter welchen Voraussetzungen gilt das Lambert-Beersche Gesetz?
Wann treten Abweichungen auf?
- 6.4 Wann entstehen Isosbestische Punkte?

Praktikum Physikalischen Chemie
WS 2021/22
K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

7. Literatur

- Försterling/Kuhn, Praxis der Physikalischen Chemie, VCH Verlagsgesellschaft 1991, Seite 170 ff
- Chylewski, C., Verallgemeinerung des isosbestischen Punktes, Angew.Chemie. 83, 214 (1971)
- Hesse/Meier/Zeh, Spektroskopische Methoden in der org. Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1987

Praktikum Physikalischen Chemie

WS 2021/22

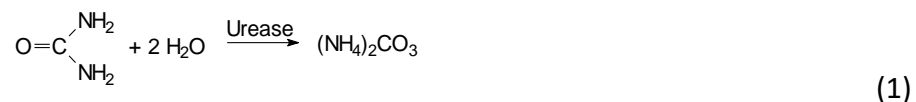
K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

Variante B) Die Hydrolyse von Harnstoff

1. Theorie zum Versuch

Mit Hilfe von Enzymen ist es möglich die Aktivierungsenergie von chemischen Reaktionen so weit herabzusetzen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit um Größenordnungen erhöht wird. Dabei wirkt das Enzym wie ein Katalysator. Es wird nur in geringer Konzentration benötigt. Am Ende der Reaktion liegt es unverändert vor.

Als Beispiel betrachten wir die Hydrolyse von Harnstoff mit dem Enzym Urease:



Die Enzymreaktion läuft in zwei Teilschritten ab. Bezeichnen wir den Harnstoff mit **[H]**, die Urease mit **[U]** und das Endprodukt Ammoniumcarbonat (das in Wasser natürlich dissoziiert vorliegt) mit **[P]**, dann gilt:



Im ersten Schritt lagert sich das Enzym an den Harnstoff an.

[Enzym-Harnstoffkomplex = **[HU]**, Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1}]

Im zweiten Schritt zerfällt **[HU]** unter Bildung von **[P]** und Rückbildung des Enzyms **[U]** [Geschwindigkeitskonstante k_2].

Stationärer Zustand:

[HU] durchläuft nach einer kurzen Anlaufphase ein Konzentrations-Maximum. An dieser Stelle ist die Bildungsgeschwindigkeit von **[HU]** gleich 0, also

$$\frac{dc_{\text{HU}}}{dt} = k_1 \cdot c_{\text{H}} \cdot c_{\text{U}} - (k_{-1} + k_2) \cdot c_{\text{HU}} = 0 \quad (4)$$

Wir wollen annehmen, dass diese Beziehung auch näherungsweise in der näheren Umgebung des Maximums erfüllt ist [Annahme eines stationären Zustandes].

Weiterhin ist aus Gründen der Stöchiometrie $c_{\text{U},0}$ die Anfangskonzentration der Urease

Praktikum Physikalischen Chemie

WS 2021/22

K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

$$c_U + c_{HU} = c_{U,0} \quad (5)$$

Damit folgt aus (4) für die stationäre Konzentration an **[HU]**:

$$c_{HU} = \frac{k_1 \cdot c_H \cdot c_{U,0}}{k_1 \cdot c_H + k_{-1} + k_2} \quad (6)$$

und wir erhalten aus

$$\frac{dc_P}{dt} = k_2 \cdot c_{HU} \quad (7)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = \frac{k_2 \cdot c_H}{c_H + \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right)} \cdot c_{U,0} \quad (\text{stationärer Zustand}) \quad (8)$$

Diese Gleichung nennt man *Michaelis-Menten-Beziehung*.

Die Größe

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad (9)$$

bezeichnet man als *Michaelis-Menten-Konstante*.

Durch Messen der Anfangsgeschwindigkeit

$$v_0 = \left[\frac{dc_P}{dt} \right]_{t=0} = \frac{k_2 \cdot c_{U,0} \cdot c_{H,0}}{c_{H,0} + K_M} \quad (10)$$

kann man K_M und k_2 ermitteln. Dazu führt man die Reaktion mit verschieden großen Anfangskonzentrationen $c_{H,0}$ an Harnstoff aus und bestimmt jeweils v_0 . Ist $c_{H,0} \gg K_M$, dann wird v_0 nach (10) unabhängig von $c_{H,0}$. Bezeichnen wir die Anfangssteigung in diesem Fall mit v'_0 dann ist:

$$v'_0 = k_2 \cdot c_{U,0} \quad \text{für } c_{H,0} \gg K_M \quad (11)$$

Solange $c_{H,0}$ klein gegen K_M ist, sollte v_0 linear mit $c_{H,0}$ ansteigen

Praktikum Physikalischen Chemie

WS 2021/22

K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

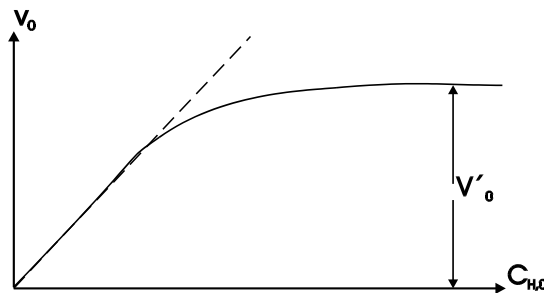


Abb.1 Anfangsgeschwindigkeit $v_0 = \left[\frac{dc}{dt} \right]_{t=0}$ in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration $c_{H,O}$ an Harnstoff.

Bei großer Harnstoffkonzentration wird v_0 konstant, weil dann gemäß (2) praktisch alle Urease in den Komplex **[HU]** überführt worden ist, also die Konzentration von **[HU]** nicht weiter gesteigert werden kann. Aus (10) und (11) folgt :

$$v_0 = v'_0 \cdot \frac{c_{H,O}}{c_{H,O} + K_M} \quad (12)$$

bzw.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v'_0} + \frac{K_M}{v'_0} \cdot \frac{1}{c_{H,O}} \quad (12.a)$$

Trägt man $1/v_0$ in Abhängigkeit von $1/c_{H,O}$ auf, dann erwartet man eine Gerade mit der Steigung K_M/v'_0 und dem Achsenabschnitt $1/v'_0$. Daraus kann man K_M und k_2 berechnen (Lineweaver-Burk-Auftragung).

2. Aufgaben

- 2.1 Man verfolge die Hydrolyse von Harnstoff durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Reaktionsprodukte NH_4^+ und HCO_3^- . Die Messung erfolgt bei konstanter Enzymkonzentration. Enzymaktivitäten werden häufig in units angegeben.

Definition unit: Eine Unit setzt bei pH 7, 25°C und Substratsättigung 1,0 μmol Substrat pro Minute um.

Praktikum Physikalischen Chemie

WS 2021/22

K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

Gemessen wird bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen. Dazu wird folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

Harnstofflösung aus
Harnstoffstammlösung 0,1 mol/L

-
- 1 ml auf 50 ml dest. H₂O auffüllen
 - 2 ml auf 50 ml dest. H₂O auffüllen
 - 3 ml auf 50 ml dest. H₂O auffüllen
 - 5 ml auf 50 ml dest. H₂O auffüllen
 - 25 ml auf 50 ml dest. H₂O auffüllen
 - 40 ml auf 50 ml dest. H₂O auffüllen

Die Harnstoffkonzentrationen beziehen sich auf 51 ml, da jede Reaktion mit 1 ml Enzymlösung gestartet wird und das Endvolumen somit 51 ml beträgt.
Die Harnstoffkonzentrationen müssen errechnet werden.

Diese 6 Harnstoffkonzentrationen werden zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten K_M sowie der Maximalgeschwindigkeit v_{\max} [bzw. v_0] gemessen.

Von Urease stellt man eine Stammlösung von 200 mg in 10 ml dest. H₂O her.

Mit jeweils 1 ml Urease wird dann die Reaktion gestartet.

2.2 Man entnehme den Messkurven die Anfangssteigung v_0 und trage v_0 gemäß Abb.1 in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration $c_{H,0}$ auf.

2.3 Bestimmung von K_M und v_{\max} [v_0].

Man trägt jetzt die Reziprokwerte der Substratkonzentrationen auf der Abszisse gegen die Reziprokwerte der gemessenen Geschwindigkeit auf der Ordinate auf. Daraus müsste eine Gerade resultieren. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Ordinate ergibt den Reziprokwert der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} . Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt sich $-1/K_M$. Diese Art der graphischen Auftragung wird als Lineweaver-Burk-Darstellung bezeichnet. Diese graphische Auftragung wird gewählt, da sich daraus K_M und v_{\max} [v_0] genauer bestimmen lassen, als aus der direkten Auftragung von v_0 gegen die Substratkonzentration, wie in Abb.1 dargestellt.

Praktikum Physikalischen Chemie WS 2021/22

K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

- 2.4 Um die katalytische Wirkung der Urease abschätzen zu können, wird die Reaktion zum Vergleich unkatalysiert bei 50°C durchgeführt. Dann wird die Geschwindigkeitskonstante k bestimmt.

3. Geräte

- Konduktometer
- Magnetrührer/Rührfische
- Monitor und PC mit Software
- Thermostat
- Bechergläser
- Vollpipetten
- Messkolben [10 ml, 100 ml, 250 ml]

4. Reagenzien

- | | |
|--------------------------------|--|
| • Harnstofflösung | 0,1 mol/L [1,5 g auf 250 ml dest. H ₂ O]
0,5 mol/L [3 g auf 100 ml dest. H ₂ O] |
| • Enzym Urease der Firma SIGMA | 200 mg auf 10 ml dest. H ₂ O
(Die Lösung muss frisch angesetzt werden!) |
| • Ammoniumcarbonat | 4 mM [0,096 g auf 250 ml dest. H ₂ O] |

Urease befindet sich im Gefrierschrank und muss nach Gebrauch sofort wieder dahin zurückgestellt werden. Wegen der Empfindlichkeit des Enzyms kann die Aktivität leicht beeinträchtigt werden [molare Masse von Urease ist $6 \cdot 10^5$ g/mol].

5. Versuchsdurchführung

Wie schon erwähnt, wird die Hydrolyse durch die Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Endprodukte verfolgt. Die Kalibrierung erfolgt mit der bekannten Ammoniumcarbonat-Lösung [4 mM/L], der Messwert wird notiert. Zu jeder Messung werden 50 ml der verschiedenen konzentrierten Harnstofflösung benötigt, in die die Elektrode unter guter Durchmischung mittels Rührmagneten eingetaucht wird. Die Rührgeschwindigkeit sollte während der Versuchsdurchführung möglichst konstant gehalten werden.

Bevor nun die Reaktion mit 1 ml Enzymlösung gestartet wird, muss sichergestellt werden, dass die Schnittstelle des Konduktometers mit dem PC verbunden ist. Mit der Multilab Software werden die Messwerte periodisch an die Schnittstelle ausgegeben. Die Handhabung der Software wird von den Mitarbeitern erklärt. Die Datenübertragung sollte jedoch kurz vor Zugabe der Urease [Enzymlösung] gestartet werden, um die Anfangsgeschwindigkeit V_0 erfassen zu können.

Praktikum Physikalischen Chemie

WS 2021/22

K2: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

Da die Anfangsgeschwindigkeit gemessen werden soll, reicht es, die Reaktion höchstens 5 min. zu verfolgen. Nach jeder Messung sollte die Elektrode gut mit dest. H₂O abgespült werden.

Unkatalysierte Reaktion

Um die unkatalysierte Reaktion zu verfolgen, werden 50 ml einer Harnstofflösung [0,5 mol/L] in einem Becherglas mittels Thermostat auf 50°C temperiert.

Nach Erreichen der Temperatur wird die Leitfähigkeit dieser Lösung gemessen (ca. 10 min). Nachdem man die Leitfähigkeit so lange verfolgt hat, dass man die Anfangssteigung ablesen kann, gibt man zu der Reaktionslösung 1 ml Urease und beobachtet die drastische Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit.

6. Literatur

- Försterling/Kuhn, Praxis der Physikalische, VCH Verlagsgesellschaft, 1991
- P.D. Boyer, The Enzymes, Vol. IV [Kap.1: Ureases], Acad. Press, New York 1971
- H. Bisswanger, Theorie und Methoden der Enzymkinetik, Verlag Chemie, Weinheim 1979
- F. Kanter, Versuche mit dem Enzym Urease, Chemie in unserer Zeit 2,95, 1968