

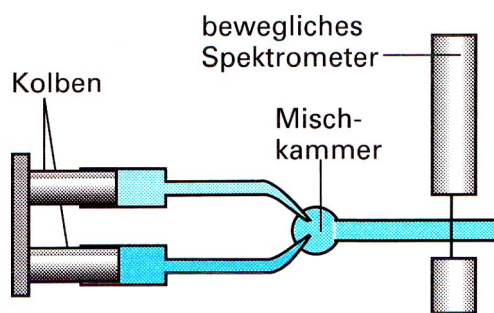
# Stopped Flow

## Grundlagen

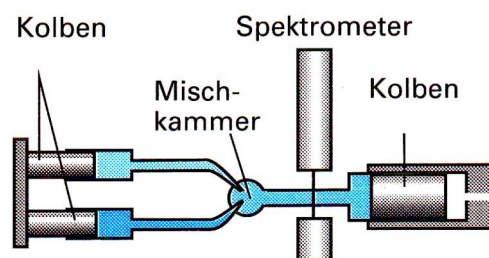
### Messmethoden

Zur Messung sehr schneller Reaktionen mit Halbwertszeiten im Sekunden- bzw. Millisekundenbereich bedient man sich so genannten Strömungsverfahren. Man unterscheidet zwischen „Continuous Flow“ und „Stopped Flow“.

Beim **„Continuous Flow“-Verfahren** werden die Reaktionslösungen mit konstanter Geschwindigkeit in eine Mischkammer gedrückt. Die Reaktion läuft ab, während die vollständig vermischten Lösungen durch eine Beobachtungszelle strömen, in der die Lösung z.B. spektroskopisch untersucht werden kann. Verschiedene Positionen in der Beobachtungszelle entsprechen dann verschiedenen Zeiten nach dem Vermischen. Die Vorteile dieser Methode sind lange Beobachtungszeiträume und geringer apparativer Aufwand, da schnelle Speicher und Sensoren nicht nötig sind. Nachteile sind der Verbrauch großer Substanzmengen und die Bestimmung des Auflösungsvermögens durch die Totzeit.

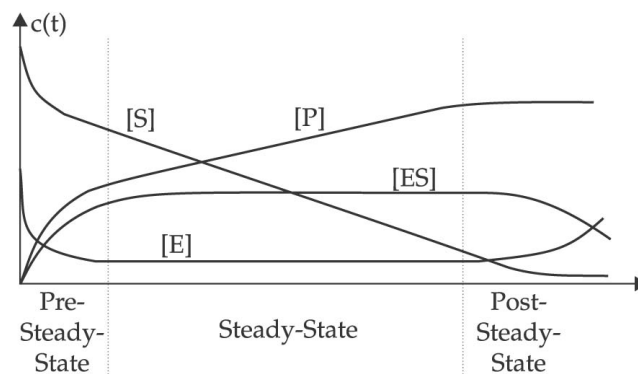


Eine verbesserte Variante ist die **„Stopped Flow“-Methode**. Die Reaktionslösungen werden sehr schnell miteinander vermischt, indem man sie in eine Reaktionskammer injiziert. Die Zusammensetzung der Mischung in der Kammer kann spektroskopisch verfolgt werden. Der geringe Substanzverbrauch ist ein Vorteil dieser Methode, allerdings benötigt man sehr schnelle Detektoren und Speicher.



## Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen

Enzymkatalysierte Reaktionen unterscheiden sich von anderen katalysierten Reaktionen in homogener Phase durch das Auftreten von Sättigung an Substrat, ähnlich wie bei heterogen katalysierten Reaktionen. Auf relativ einfacher Weise beschreibt die Michaelis-Menten-Kinetik den Ablauf solcher Reaktionen. Man geht von folgendem Reaktionsschema aus:



Beide Teilreaktionen werden als reversibel betrachtet, allerdings geht man davon aus, dass das zweite Gleichgewicht weit auf der Seite der Produkte liegt ( $k_{-p} \ll k_p$ ).

Im Pre-Steady-Bereich baut sich der ES-Komplex auf:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_s ([E]_0 - [ES])[S]$$

ES verschwindet wieder nach zwei Mechanismen: Der Rückbildung von E + S und dem Zerfall in E + P, durch den die ES-Konzentration im Post-Steady-Bereich auf null abfällt.

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-s} [ES] + k_p [ES]$$

Nach einer gewissen Anlaufzeit erreicht das System einen stationären Zustand (Steady-State), in dem die Substratkonzentration linear mit der Zeit abnimmt und die Produktkonzentration zunimmt. Die Konzentrationen an ES und E bleiben konstant. Es gilt:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \Rightarrow k_s ([E]_0 - [ES])[S] = k_{-s} [ES] + k_p [ES]$$

und

$$\frac{[S]([E]_0 - [ES])}{[ES]} = \frac{k_{-s} + k_p}{k_s} = K_M \quad K_M = \text{Michaelis-Konstante}$$

Für die Konzentration an ES im stationären Zustand gilt nun:

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]}{K_M + [S]}$$

Die Anfangsgeschwindigkeit  $v$  einer enzymatischen Reaktion ist proportional der ES-Konzentration:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_p \frac{[E]_0 [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten-Gleichung})$$

Für  $[S] \gg K_M$  ergibt sich ein Geschwindigkeitsgesetz nullter Ordnung bezüglich S (blauer Abschnitt in der Abbildung). Man erhält den Grenzwert der Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$ :

$$v_{\max} = k_p [E]_0$$

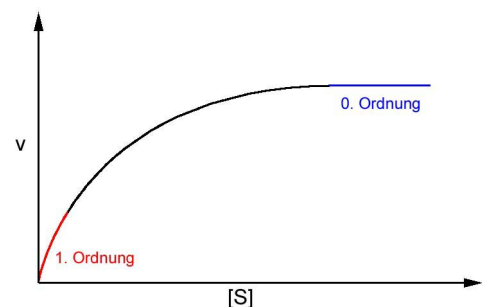
Dividiert man die Michaelis-Menten-Gleichung durch diese Gleichung erhält man:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{k_p \frac{[E]_0 [S]}{K_M + [S]}}{k_p [E]_0} \Rightarrow v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Für  $[S] \ll K_M$  liegt eine Kinetik erster Ordnung vor (roter Abschnitt):

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k_p \frac{[E]_0 [S]}{K_M} = K' [S]$$

Im Zwischenbereich (schwarzer Abschnitt liegt eine komplizierte Kinetik zwischen nullter und erster Ordnung vor.



## Lambert-Beersches-Gesetz

Dringt ein Lichtstrahl mit der Intensität  $I$  durch ein absorbierendes Medium, z.B. eine Lösung der Schichtdicke  $dx$  mit der Konzentration der absorbierenden Teilchen  $c$ , ergibt sich für die Intensitätsabnahme  $dI$ :

$$dI = -\alpha \cdot c \cdot I \cdot dx$$

$\alpha$ : Proportionalitätskonstante

Mit der Annahme, dass  $c$  überall gleich ist erhält man nach Integration das Lambert-Beersche-Gesetz:

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha \cdot c \cdot d}$$

$I$ : Intensität nach Verlassen der Probe

$I_0$ : Anfangsintensität

$d$ : Schichtdicke

Meist wird das Gesetz noch logarithmiert und umgeformt:

$$-\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$E$ : Extinktion

$\varepsilon$ : molarer Absorptionskoeffizient

Da die Konzentration also direkt proportional zu der spektralphotometrisch leicht messbaren Extinktion ist, kann sie in Geschwindigkeitsgesetzen durch diese ersetzt werden.

## Die Versuchsanordnung



**Die Auftragung nach Swinebourne**

Herleitung der Gleichung für die zeitliche Entwicklung der alkalischen Hydrolyse ausgehend vom Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung:

$$-\frac{dc_A}{dt} = k \cdot c_A$$

$$-\int_{c_A^0}^{c_A^0 - c_B} d \ln c_A = k \cdot \int_0^t dt$$

$$-\ln \frac{c_B^{\infty} - c_B}{c_B^{\infty}} = k \cdot t$$

A = Nitrophenylacetat  
 B = Nitrophenolat-Ion  
 $c_{A,B}$  = Konzentration von A, B  
 $c^{\infty}$  = Konzentration bei  $t = \infty$   
 $c^0$  = Konzentration bei  $t = 0$

Da die Extinktion nach dem Lambert-Beerschen Gesetz eine konzentrationsproportionale Größe darstellt, gilt:

$$-\ln \frac{E^{\infty} - E(t)}{E^{\infty}} = k \cdot t$$

$$\Rightarrow E(t) = E^{\infty} (1 - e^{-kt})$$

Herleitung der Gleichung für die zeitliche Entwicklung der alkalischen Hydrolyse nach Swinebourne:

$$(I) : \quad E(t) = E^{\infty} (1 - e^{-kt}) \quad \leftrightarrow \quad E^{\infty} e^{-kt} = E^{\infty} - E(t)$$

$$(II) : \quad E(t + \Delta t) = E^{\infty} (1 - e^{-k(t+\Delta t)})$$

$$= E^{\infty} - E^{\infty} e^{-k(t+\Delta t)}$$

$$(II) - (I) : E(t + \Delta t) - E(t) = E^{\infty} (1 - e^{-k(t+\Delta t)}) - E^{\infty} (1 - e^{-kt})$$

$$= E^{\infty} (-e^{-k(t+\Delta t)} + e^{-kt})$$

$$= E^{\infty} e^{-kt} \cdot (1 - e^{-k\Delta t})$$

$$= [E^{\infty} - E(t)] \cdot (1 - e^{-k\Delta t})$$

$$E(t + \Delta t) = E(t) \cdot e^{-k\Delta t} + E^{\infty} (1 - e^{-k\Delta t})$$

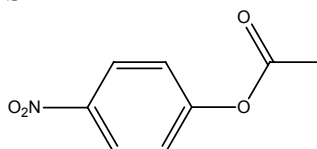
**Sicherheit**

p-Nitrophenylacetat

 $C_8H_7NO_4$ 

R —

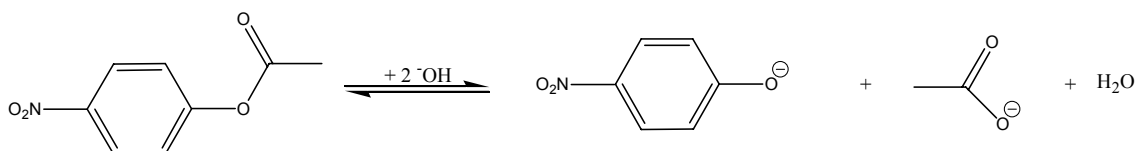
S —

**Durchführung**

Die alkalische sowie die enzymatische Hydrolyse einer para-Nitrophenylacetatlösung der Konzentration  $c = 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$  in Ethanol wurden spektroskopisch beobachtet. Aus der Extinktion des entstehenden Nitrophenolations kann die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden.

Die Messung wird mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 400 \text{ nm}$ , dem Absorptionsmaximum des Ions, durchgeführt.

Als Enzym wurde  $\alpha$ -Chymotrypsin verwendet.

**Messwerte**

Die folgende Tabelle enthält die gemessenen Werte, sowie die benötigten Umrechnungen für die einzelnen Auftragungen. Erklärungen zu den Berechnungen finden sich bei den jeweiligen Graphen.

	$U_0$
$10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$	5.139 V
$10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$	4.922 V

Bei der Messung für  $c = 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$  traten nach 16 s starke Schwankungen auf, weshalb die Messwerte ab diesem Punkt nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden.

Alkalische Hydrolyse für  $c = 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$

t in s	Intensität	U in V	E(t)	E(t+Δt)	ΔE = E <sub>∞</sub> – E	ln(ΔE)
0.00	2630	5.139	0.000	0.043	1.460	0.378
0.25	2380	4.651	0.043	0.024	1.417	0.348
0.50	2486	4.858	0.024	0.064	1.435	0.362
0.75	2272	4.440	0.064	0.072	1.396	0.334
1.00	2226	4.350	0.072	0.090	1.388	0.328
1.25	2138	4.178	0.090	0.112	1.370	0.315
1.50	2032	3.971	0.112	0.118	1.348	0.299
1.75	2005	3.918	0.118	0.148	1.342	0.294
2.00	1871	3.656	0.148	0.143	1.312	0.272
2.25	1892	3.697	0.143	0.173	1.317	0.275
2.50	1765	3.449	0.173	0.172	1.287	0.252
2.75	1771	3.461	0.172	0.199	1.288	0.253
3.00	1662	3.248	0.199	0.211	1.261	0.232
3.25	1617	3.160	0.211	0.215	1.249	0.222
3.50	1603	3.132	0.215	0.244	1.245	0.219
3.75	1498	2.927	0.244	0.239	1.216	0.195
4.00	1518	2.966	0.239	0.271	1.221	0.200
4.25	1409	2.753	0.271	0.267	1.189	0.173
4.50	1423	2.781	0.267	0.282	1.193	0.177
4.75	1375	2.687	0.282	0.296	1.178	0.164
5.00	1330	2.599	0.296	0.298	1.164	0.152
5.25	1324	2.587	0.298	0.331	1.162	0.150
5.50	1226	2.396	0.331	0.329	1.128	0.121
5.75	1232	2.407	0.329	0.357	1.131	0.123
6.00	1156	2.259	0.357	0.347	1.103	0.098
6.25	1184	2.314	0.347	0.375	1.113	0.107
6.50	1108	2.165	0.375	0.383	1.085	0.081
6.75	1088	2.126	0.383	0.393	1.077	0.074
7.00	1063	2.077	0.393	0.418	1.067	0.064
7.25	1005	1.964	0.418	0.402	1.042	0.041
7.50	1041	2.034	0.402	0.440	1.057	0.056
7.75	955	1.866	0.440	0.432	1.020	0.020
8.00	973	1.901	0.432	0.449	1.028	0.028
8.25	935	1.827	0.449	0.459	1.011	0.011
8.50	914	1.786	0.459	0.479	1.001	0.001
8.75	873	1.706	0.479	0.471	0.981	– 0.019
9.00	889	1.737	0.471	0.500	0.989	– 0.011
9.25	831	1.624	0.500	0.500	0.960	– 0.041
9.50	831	1.624	0.500	0.512	0.960	– 0.041
9.75	809	1.581	0.512	0.532	0.948	– 0.053
10.00	773	1.511	0.532	0.527	0.928	– 0.075
10.25	782	1.528	0.527	0.558	0.933	– 0.069
10.50	727	1.421	0.558	0.544	0.902	– 0.104
10.75	752	1.469	0.544	0.570	0.916	– 0.088
11.00	708	1.383	0.570	0.576	0.890	– 0.117
11.25	698	1.364	0.576	0.587	0.884	– 0.123
11.50	681	1.331	0.587	0.591	0.873	– 0.136
11.75	675	1.319	0.591	0.595	0.869	– 0.140
12.00	669	1.307	0.595	0.624	0.865	– 0.145

12.25	625	1.221	0.624	0.614	0.836	- 0.179
12.50	639	1.249	0.614	0.640	0.845	- 0.168
12.75	603	1.178	0.640	0.640	0.820	- 0.198
13.00	602	1.176	0.640	0.656	0.820	- 0.199
13.25	581	1.135	0.656	0.667	0.804	- 0.218
13.50	566	1.106	0.667	0.664	0.793	- 0.232
13.75	570	1.114	0.664	0.690	0.796	- 0.228
14.00	537	1.049	0.690	0.683	0.770	- 0.261
14.25	546	1.067	0.683	0.705	0.777	- 0.252
14.50	519	1.014	0.705	0.699	0.755	- 0.281
14.75	526	1.028	0.699	0.714	0.761	- 0.273
15.00	508	0.993	0.714	0.726	0.746	- 0.293
15.25	494	0.965	0.726	0.721	0.734	- 0.310
15.50	500	0.977	0.721	0.753	0.739	- 0.303
15.75	464	0.907	0.753	0.736	0.707	- 0.347
16.00	483	0.944	0.736	0.763	0.724	- 0.323
16.25	454	0.887	0.763	0.763	0.697	- 0.361
16.50	454	0.887	0.763	0.775	0.697	- 0.361
16.75	442	0.864	0.775	0.784	0.685	- 0.378
17.00	432	0.844	0.784	0.782	0.675	- 0.392
17.25	434	0.848	0.782	0.805	0.677	- 0.389
17.50	412	0.805	0.805	0.797	0.655	- 0.423
17.75	420	0.821	0.797	0.828	0.663	- 0.411
18.00	391	0.764	0.828	0.814	0.632	- 0.459
18.25	404	0.789	0.814	0.828	0.646	- 0.436
18.50	391	0.764	0.828	0.836	0.632	- 0.459
18.75	384	0.750	0.836	0.853	0.624	- 0.471
19.00	369	0.721	0.853	0.849	0.607	- 0.499
19.25	372	0.727	0.849	0.871	0.611	- 0.493
19.50	354	0.692	0.871	0.861	0.589	- 0.529
19.75	362	0.707	0.861	0.883	0.599	- 0.513
20.00	344	0.672	0.883	0.880	0.577	- 0.551
20.25	347	0.678	0.880	0.881	0.580	- 0.544
20.50	346	0.676	0.881	0.919	0.579	- 0.546
20.75	317	0.619	0.919	0.891	0.541	- 0.614
21.00	338	0.660	0.891	0.913	0.569	- 0.564
21.25	321	0.627	0.913	0.911	0.546	- 0.604
21.50	323	0.631	0.911	0.927	0.549	- 0.599
21.75	311	0.608	0.927	0.927	0.533	- 0.630
22.00	311	0.608	0.927	0.929	0.533	- 0.630
22.25	310	0.606	0.929	0.961	0.531	- 0.632
22.50	288	0.563	0.961	0.940	0.499	- 0.694
22.75	302	0.590	0.940	0.965	0.520	- 0.654
23.00	285	0.557	0.965	0.961	0.495	- 0.704
23.25	288	0.563	0.961	0.976	0.499	- 0.694
23.50	278	0.543	0.976	0.984	0.484	- 0.726
23.75	273	0.533	0.984	0.987	0.476	- 0.742
24.00	271	0.530	0.987	1.005	0.473	- 0.749
24.25	260	0.508	1.005	0.995	0.455	- 0.788
24.50	266	0.520	0.995	1.007	0.465	- 0.766
24.75	259	0.506	1.007	1.015	0.453	- 0.791
25.00	254	0.496	1.015		0.445	- 0.810



Alkalische Hydrolyse für  $c = 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$

t in s	Intensität	U in V	E(t)	E(t+Δt)	ΔE = E <sub>∞</sub> – E	ln(ΔE)
0	2519	4.922	0.000	0.020	0.201	– 1.605
0.25	2408	4.705	0.020	0.032	0.181	– 1.708
0.50	2338	4.569	0.032	0.030	0.168	– 1.781
0.75	2350	4.592	0.030	0.047	0.171	– 1.768
1.00	2258	4.412	0.047	0.042	0.153	– 1.875
1.25	2288	4.471	0.042	0.062	0.159	– 1.839
1.50	2186	4.272	0.062	0.041	0.139	– 1.972
1.75	2291	4.477	0.041	0.071	0.160	– 1.835
2.00	2141	4.184	0.071	0.055	0.130	– 2.039
2.25	2219	4.336	0.055	0.068	0.146	– 1.926
2.50	2155	4.211	0.068	0.062	0.133	– 2.017
2.75	2184	4.268	0.062	0.067	0.139	– 1.975
3.00	2159	4.219	0.067	0.069	0.134	– 2.011
3.25	2151	4.203	0.069	0.062	0.132	– 2.023
3.50	2182	4.264	0.062	0.075	0.138	– 1.977
3.75	2121	4.145	0.075	0.060	0.126	– 2.071
4.00	2192	4.283	0.060	0.081	0.140	– 1.963
4.25	2089	4.082	0.081	0.062	0.120	– 2.124
4.50	2183	4.266	0.062	0.085	0.139	– 1.976
4.75	2071	4.047	0.085	0.085	0.116	– 2.156
5.00	2070	4.045	0.085	0.073	0.116	– 2.158
5.25	2127	4.156	0.073	0.086	0.127	– 2.061
5.50	2067	4.039	0.086	0.082	0.115	– 2.164
5.75	2084	4.072	0.082	0.083	0.118	– 2.133
6.00	2080	4.064	0.083	0.094	0.118	– 2.140
6.25	2028	3.963	0.094	0.085	0.107	– 2.238
6.50	2073	4.051	0.085	0.102	0.116	– 2.153
6.75	1990	3.889	0.102	0.086	0.098	– 2.318
7.00	2067	4.039	0.086	0.113	0.115	– 2.164
7.25	1942	3.795	0.113	0.092	0.088	– 2.432
7.50	2038	3.982	0.092	0.117	0.109	– 2.218
7.75	1925	3.762	0.117	0.100	0.084	– 2.477
8.00	2003	3.914	0.100	0.118	0.101	– 2.290
8.25	1919	3.750	0.118	0.112	0.083	– 2.493
8.50	1946	3.803	0.112	0.123	0.089	– 2.422
8.75	1898	3.709	0.123	0.106	0.078	– 2.553
9.00	1972	3.853	0.106	0.130	0.094	– 2.359
9.25	1866	3.646	0.130	0.112	0.070	– 2.652
9.50	1946	3.803	0.112	0.133	0.089	– 2.422
9.75	1856	3.627	0.133	0.117	0.068	– 2.686
10.00	1925	3.762	0.117	0.130	0.084	– 2.477
10.25	1866	3.646	0.130	0.125	0.070	– 2.652
10.50	1891	3.695	0.125	0.129	0.076	– 2.574
10.75	1873	3.660	0.129	0.134	0.072	– 2.630
11.00	1848	3.611	0.134	0.132	0.066	– 2.714
11.25	1859	3.633	0.132	0.141	0.069	– 2.676
11.50	1822	3.560	0.141	0.130	0.060	– 2.811
11.75	1868	3.650	0.130	0.150	0.071	– 2.646

12.00	1783	3.484	0.150	0.132	0.051	– 2.981
12.25	1859	3.633	0.132	0.156	0.069	– 2.676
12.50	1758	3.435	0.156	0.139	0.045	– 3.110
12.75	1827	3.570	0.139	0.156	0.061	– 2.792
13.00	1758	3.435	0.156	0.146	0.045	– 3.110
13.25	1801	3.519	0.146	0.156	0.055	– 2.899
13.50	1757	3.433	0.156	0.157	0.044	– 3.116
13.75	1754	3.427	0.157	0.168	0.044	– 3.133
14.00	1709	3.340	0.168	0.167	0.032	– 3.432
14.25	1714	3.349	0.167	0.153	0.034	– 3.394
14.50	1769	3.457	0.153	0.176	0.047	– 3.051
14.75	1678	3.279	0.176	0.161	0.024	– 3.715
15.00	1739	3.398	0.161	0.182	0.040	– 3.222
15.25	1657	3.238	0.182	0.164	0.019	– 3.969
15.50	1725	3.371	0.164	0.182	0.036	– 3.314
15.75	1657	3.238	0.182	0.173	0.019	– 3.969
16.00	1693	3.308	0.173	0.188	0.028	– 3.567
16.25	1635	3.195	0.188	0.197	0.013	
16.50	1600	3.127	0.197	0.180	0.004	
16.75	1663	3.250	0.180	0.192	0.020	
17.00	1619	3.164	0.192	0.181	0.009	
17.25	1661	3.246	0.181	0.195	0.020	
17.50	1607	3.140	0.195	0.214	0.006	
17.75	1540	3.009	0.214	0.202	– 0.013	
18.00	1581	3.089	0.202	0.185	– 0.001	
18.25	1647	3.218	0.185	0.208	0.016	
18.50	1559	3.046	0.208	0.189	– 0.008	
18.75	1631	3.187	0.189	0.200	0.012	
19.00	1591	3.109	0.200	0.202	0.001	
19.25	1581	3.089	0.202	0.206	– 0.001	
19.50	1567	3.062	0.206	0.195	– 0.005	
19.75	1609	3.144	0.195	0.217	0.006	
20.00	1528	2.986	0.217	0.199	– 0.016	
20.25	1593	3.113	0.199	0.221	0.002	
20.50	1513	2.957	0.221	0.202	– 0.021	
20.75	1581	3.089	0.202	0.222	– 0.001	
21.00	1510	2.951	0.222	0.209	– 0.021	
21.25	1558	3.044	0.209	0.221	– 0.008	
21.50	1514	2.958	0.221	0.221	– 0.020	
21.75	1515	2.960	0.221	0.219	– 0.020	
22.00	1522	2.974	0.219	0.231	– 0.018	
22.25	1480	2.892	0.231	0.217	– 0.030	
22.50	1529	2.988	0.217	0.236	– 0.016	
22.75	1462	2.857	0.236	0.217	– 0.035	
23.00	1529	2.988	0.217	0.238	– 0.016	
23.25	1455	2.843	0.238	0.221	– 0.038	
23.50	1514	2.958	0.221	0.240	– 0.020	
23.75	1451	2.835	0.240	0.223	– 0.039	
24.00	1507	2.945	0.223	0.238	– 0.022	
24.25	1455	2.843	0.238	0.236	– 0.038	
24.50	1463	2.859	0.236	0.230	– 0.035	
24.75	1484	2.900	0.230	0.247	– 0.029	
25.00	1425	2.785	0.247		– 0.047	

Enzymatische Hydrolyse für  $c = 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ 

t in s	Intensität	U in V	E	E <sub>Gerade</sub>	$\Delta E = E_{\infty} - E$	$\ln(\Delta E)$	k in s <sup>-1</sup>
0	2239	4.375	0.026	0.277	0.250	-1.385	
12	2171	4.242	0.040	0.279	0.239	-1.431	0.0122
24	2134	4.170	0.047	0.281	0.234	-1.454	0.0070
36	2037	3.980	0.068	0.283	0.216	-1.534	0.0069
48	1947	3.805	0.087	0.285	0.198	-1.618	0.0069
60	1769	3.457	0.129	0.288	0.159	-1.840	0.0092
72	1784	3.486	0.125	0.290	0.165	-1.804	0.0072
84	1714	3.349	0.142	0.292	0.149	-1.900	0.0073
96	1568	3.064	0.181	0.294	0.113	-2.180	0.0093
108	1582	3.091	0.177	0.296	0.119	-2.128	0.0078
120	1509	2.949	0.198	0.299	0.101	-2.295	0.0084
132	1551	3.031	0.186	0.301	0.115	-2.164	0.0067
144	1435	2.804	0.220	0.303	0.083	-2.485	0.0083
156	1469	2.871	0.209	0.305	0.096	-2.347	0.0068
168	1374	2.685	0.239	0.307	0.069	-2.677	0.0083
180	1401	2.738	0.230	0.310	0.079	-2.533	0.0069
192	1349	2.636	0.246	0.312	0.065	-2.730	0.0075
204	1300	2.540	0.263	0.314	0.051	-2.970	0.0083
216	1282	2.505	0.269	0.316	0.047	-3.048	0.0082
228	1291	2.523	0.266	0.318	0.053	-2.943	0.0073
240	1299	2.538	0.263	0.320	0.058	-2.855	0.0065
252	1226	2.396	0.288	0.323	0.035	-3.363	0.0082
264	1258	2.458	0.277	0.325	0.048	-3.036	0.0066
276	1237	2.417	0.284	0.327	0.043	-3.149	0.0068
288	1257	2.456	0.277	0.329	0.052	-2.956	0.0058
300	1183	2.312	0.304	0.331	0.028	-3.580	0.0077
312	1186	2.318	0.302	0.334	0.031	-3.468	0.0070
324	1190	2.325	0.301	0.336	0.035	-3.358	0.0064
336	1127	2.202	0.325	0.338	0.013	-4.314	0.0090
348	1120	2.189	0.327	0.340	0.013	-4.353	0.0088
360	1102	2.153	0.334	0.342	0.008	-4.826	0.0098
372	1075	2.101	0.345	0.345	-0.001		
384	1079	2.108	0.343	0.347	0.003	-5.733	0.0116
396	1118	2.185	0.328	0.349	0.021	-3.871	0.0065
408	1066	2.083	0.349	0.351	0.002	-6.052	0.0117
420	1038	2.028	0.360	0.353	-0.007		
432	1064	2.079	0.350	0.355	0.006	-5.130	0.0089
444	1051	2.054	0.355	0.358	0.003	-5.891	0.0104
456	1073	2.097	0.346	0.360	0.014	-4.272	0.0066
468	1066	2.083	0.349				
480	1066	2.083	0.349				
492	1035	2.022	0.362				
504	1053	2.058	0.354				
516	1035	2.022	0.362				
528	996	1.946	0.378				
540	1020	1.993	0.368				
552	978	1.911	0.386				
564	1002	1.958	0.376				
576	966	1.888	0.392				

588	1004	1.962	0.375
600	941	1.839	0.403
612	993	1.940	0.380
624	968	1.892	0.391
636	914	1.786	0.416
648	961	1.878	0.394
660	951	1.858	0.398
672	960	1.876	0.394
684	947	1.851	0.400
696	939	1.835	0.404
708	952	1.860	0.398
720	907	1.772	0.419
732	900	1.759	0.422
744	904	1.766	0.420
756	869	1.698	0.437
768	890	1.739	0.427
780	908	1.774	0.418
792	913	1.784	0.416
804	883	1.725	0.431
816	853	1.667	0.446
828	855	1.671	0.445
840	852	1.665	0.446
852	864	1.688	0.440
864	895	1.749	0.425
876	872	1.704	0.436
888	846	1.653	0.449
900	871	1.702	0.436
912	878	1.716	0.433
924	864	1.688	0.440
936	858	1.677	0.443
948	849	1.659	0.448
960	850	1.661	0.447
972	854	1.669	0.445
984	833	1.628	0.456
996	857	1.675	0.444
1008	845	1.651	0.450
1020	814	1.591	0.466
1032	818	1.598	0.464
1044	821	1.604	0.462
1056	799	1.561	0.474
1068	787	1.538	0.481
1080	797	1.557	0.475
1092	810	1.583	0.468
1104	806	1.575	0.470
1116	754	1.473	0.499
1128	769	1.503	0.491
1140	775	1.514	0.487
1152	786	1.536	0.481
1164	786	1.536	0.481
1176	771	1.507	0.489
1188	791	1.546	0.478
1200	770	1.505	0.490

## Auswertung

### Eichmessung

Zunächst wird eine Eichmessung ohne Absorption durchgeführt. Für die maximale Durchlässigkeit  $I_0$  bei der maximalen Spannung  $U_0$  wurde folgender Wert erhalten:

$$U_0 = 8 \text{ V} = 4094 \text{ a.u.}$$

Mit Hilfe dieses Zusammenhangs können die gemessenen Werte in Spannungen umgerechnet werden, die der Intensität direkt proportional sind.

Aus diesen Spannungen lässt sich daher die Extinktion berechnen:

$$E = \log\left(\frac{U_0}{U}\right) \quad U_0: \text{Spannung ohne Substanz}$$

### Auftragung nach Swinebourne

Für Reaktionen erster Ordnung kann aus der Auftragung der Extinktion  $E(t)$  gegen  $E(t+\Delta t)$  die Geschwindigkeitskonstante bestimmt werden.

Es gilt:

$$E(t + \Delta t) = e^{-k \cdot \Delta t} \cdot E(t) + E_\infty \cdot (1 - e^{-k \cdot \Delta t})$$

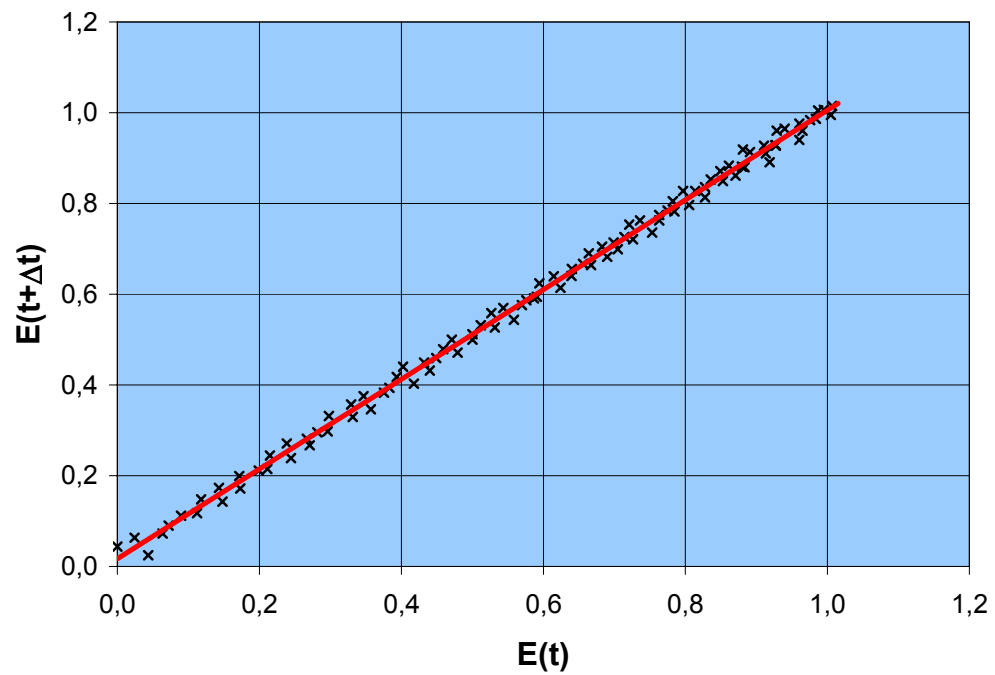
Gleichzeitig kann so aus dem Achsenabschnitt der Endwert  $E_\infty$  berechnet werden. Die Messungen erfolgen in Abständen von  $\Delta t = 250 \text{ ms}$ .

Zu Beginn der Messung wird über die Spannung  $U_0$  abgelesen, welche die Intensität des durchgelassenen Messstrahles vor Beginn der Messung repräsentiert. Beim Einspritzen der Reaktionslösungen treten durch die Turbulenzen Störungen auf, wodurch es sein kann, dass zunächst eine abweichende Intensität gemessen wird.

In diesem Fall müsste die Zeitskala korrigiert und nur die Messwerte in die Auswertung einbezogen werden, die kleiner als  $U_0$  sind, da nur so eine sinnvolle Extinktion ( $0 < E < 1$ ) berechnet werden kann. Im Experiment trat dieses Problem jedoch nicht auf.

Die Auftragung nach Swinebourne hat den Vorteil, dass der Endwert  $E_\infty$  nicht benötigt wird, bzw. aus der Regressionsgeraden berechnet werden kann. Da die gemessenen Graphen für eine Bestimmung des Endwertes zu ungenau waren, wird dieser mit Hilfe der Swinebourne-Auftragung ermittelt.

Auftragung nach Swinebourne für  $c = 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$



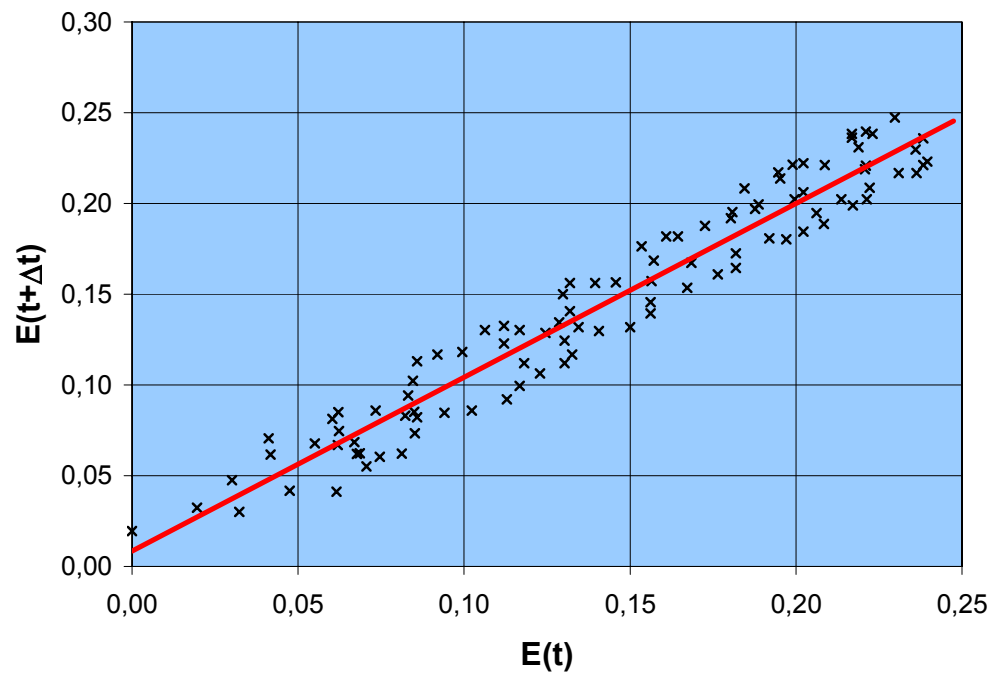
Gleichung der Regressionsgeraden:

$$y = 0.9884 \cdot x + 0.0169$$

$$k = -\frac{\ln(0.9884)}{0.250 \text{ s}} = 0.0466 \frac{1}{\text{s}}$$

$$E_{\infty} = \frac{0.0169}{1 - 0.9884} = 1.460$$

Auftragung nach Swinebourne für  $c = 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$



Gleichung der Regressionsgeraden:

$$y = 0.9574 \cdot x + 0.0086$$

$$k = -\frac{\ln(0.9574)}{0.250 \text{ s}} = 0.1742 \frac{1}{\text{s}}$$

$$E_{\infty} = \frac{0.0086}{1 - 0.9574} = 0.2008$$

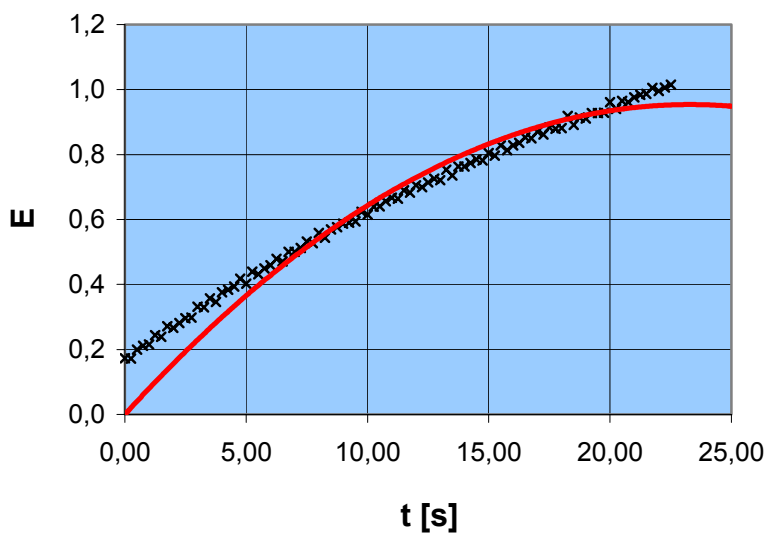
### Auftragung von $E(t)$ gegen $t$

Die Auftragung der Extinktion  $E$  gegen die korrigierte Zeit zeigt den exponentiellen Verlauf der Extinktion des gebildeten Produktes. Die Kurve nähert sich für  $t \rightarrow \infty$  an den Endwert  $E_\infty$  an. Ihre Gleichung lautet

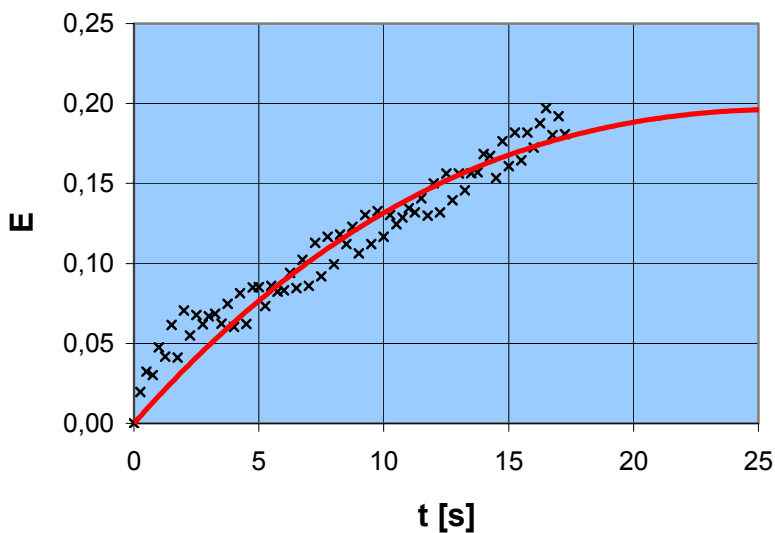
$$E(t) = E_\infty \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$$

Die im Experiment erhaltene Kurve lässt leider eine Bestimmung des Endwertes  $E_\infty$  und der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  nicht zu. Es wird daher im Folgenden auf die erhaltenen Werte der Auftragung nach Swinebourne zurückgegriffen.

Auftragung für  $c = 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$



Auftragung für  $c = 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$





### Alternative Bestimmung von k und Halbwertszeit $t_{1/2}$

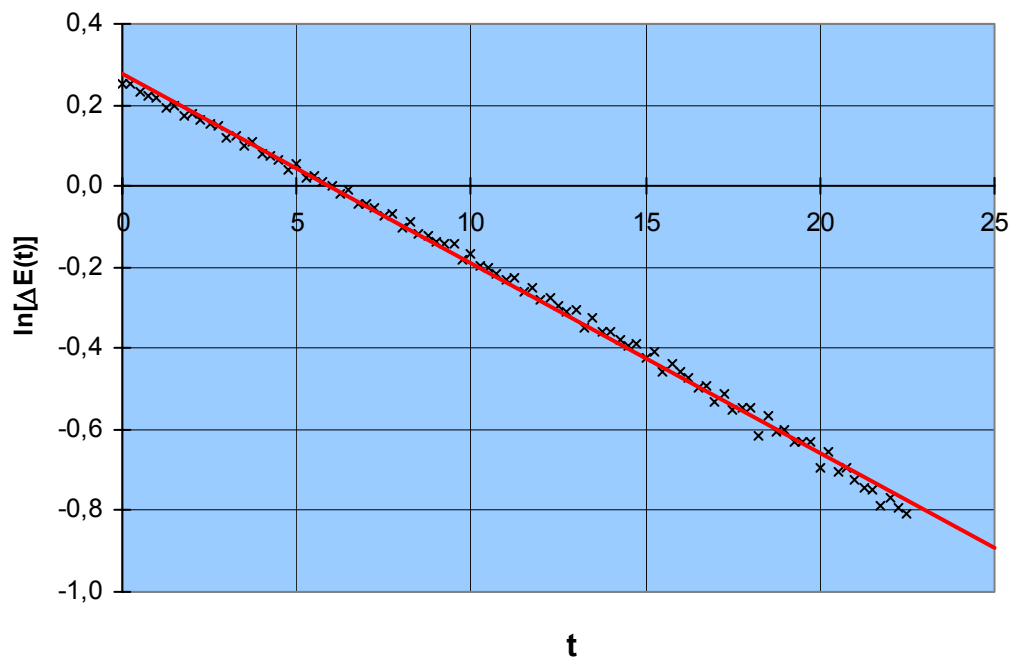
Aus der Auftragung nach Swinebourne ist der Endwert  $E_{\infty}$  bekannt. Die Differenz  $\Delta E$  berechnet nach

$$\Delta E = E_{\infty} - E$$

Wird  $\ln(\Delta E)$  gegen die korrigierte Zeit aufgetragen, erhält man eine Gerade, aus deren Steigung die Geschwindigkeitskonstante k sowie die Halbwertszeit ermittelt werden kann:

$$\ln[\Delta E(t)] = \ln(E_{\infty}) - k \cdot t$$

### Gleichgewichtskonstante und Halbwertszeit für $c = 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$

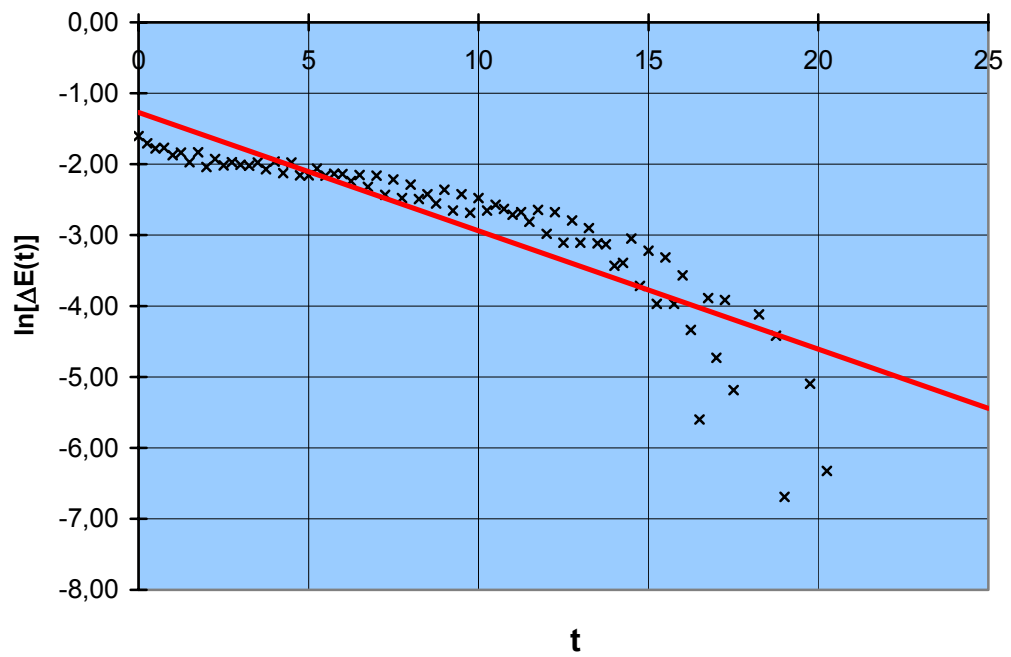


$$y = -0.0467 \cdot x + 0.277$$

$$k = 0.0467 \frac{1}{s}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = 14.84 \text{ s}$$

Gleichgewichtskonstante und Halbwertszeit für  $c = 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$



$$y = -0.1669 \cdot x - 1.268$$

$$k = 0.1669 \frac{1}{s}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = 4.153 \text{ s}$$

## Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse verläuft nach der Michaelis-Menten-Kinetik. Aus dem Substrat S und dem Enzym E bildet sich zunächst in einer Gleichgewichtsreaktion der Enzym-Substrat-Komplex ES, welcher daraufhin in das Enzym und das Produkt zerfällt.

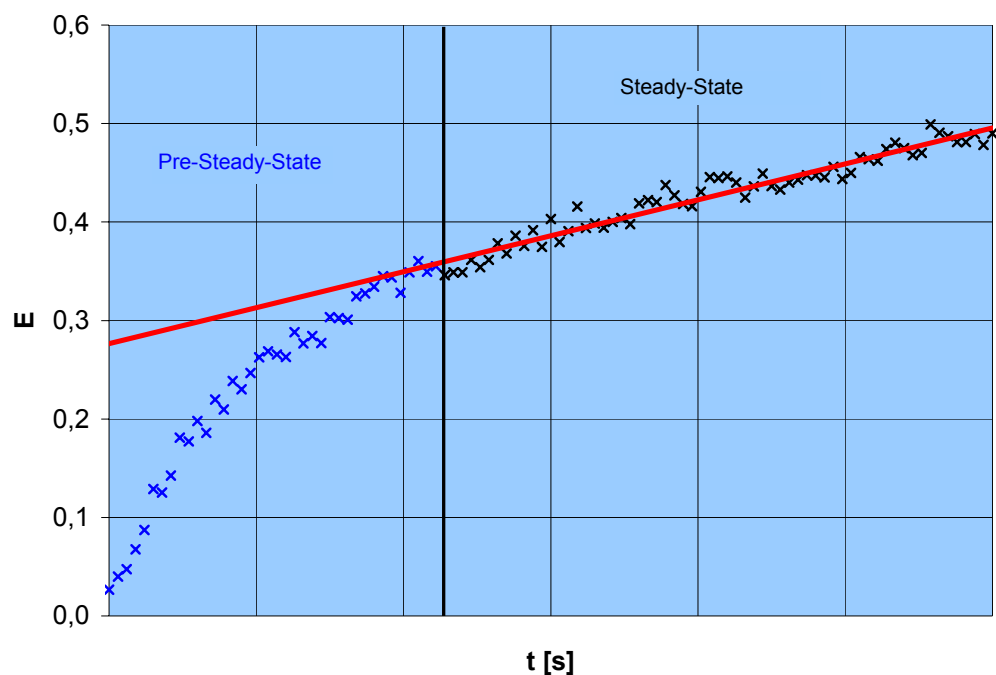
### Bestimmung von k

Für die Extinktion der Probe gilt der Zusammenhang

$$E(t) = a \cdot t + b \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$$

$$E(t) = a \cdot t + b - b \cdot e^{-k \cdot t}$$

Aufgetragen wird also die Extinktion E gegen die Zeit t:



Der Graph wird in den Pre-Steady-State und den Steady-State-Bereich eingeteilt. Durch die Werte des Steady-State-Bereichs wird eine Regressionsgerade gelegt, von welcher sodann Steigung und Achsenabschnitt bestimmt werden.

$$y = 1.82 \cdot 10^{-4} \cdot x + 0.277$$

$$a = 1.82 \cdot 10^{-4}$$

$$b = 0.277$$

Mit Hilfe der erhaltenen Werte für die Steigung  $a$  und den Achsenabschnitt  $b$  der Regressionsgeraden werden nun die Werte für die Extinktion des Pre-Steady-State-Bereichs berechnet, wenn sie durchgehend linear wären. Die Gleichung für diese extrapolierte Gerade lautet

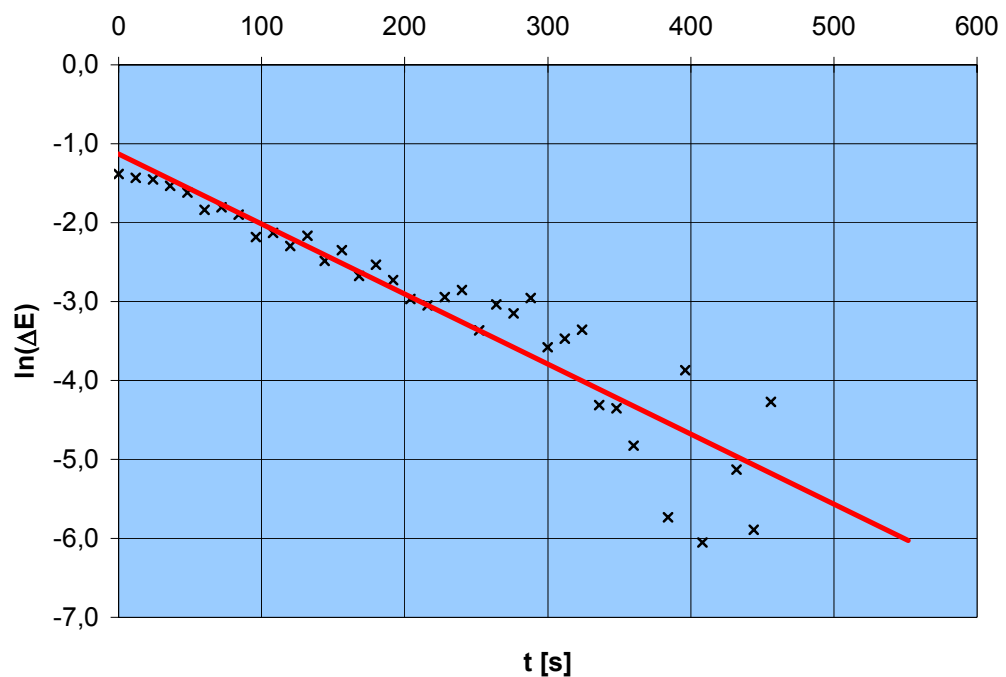
$$E_{\text{Gerade}} = a \cdot t + b = 1.82 \cdot 10^{-4} \cdot t + 0.277$$

Bildet man nun die Differenz zwischen der extrapolierten Geraden und der gemessenen Kurve, so erhält man die Exponentialfunktion einer Reaktion erster Ordnung, die leicht mittels einer Logarithmierung linearisiert werden kann.

Es wird also zunächst  $\Delta E$  ermittelt.

$$\Delta E = E_{\infty} - E = E_{\text{Gerade}} - E$$

und daraufhin  $\ln(\Delta E)$  gegen  $t$  aufgetragen:



$$y = -0.0089 \cdot x - 1.1302$$

Die negative Steigung dieser Regressionsgeraden ist wiederum die Geschwindigkeitskonstante  $k$ :

$$k = 0.0089 \frac{1}{s}$$

Eine weitere Möglichkeit,  $k$  zu bestimmen, verläuft über die bereits bestimmten Werte der Regressionsgeraden im Steady-State-Bereich, die Steigung  $a$  und den Achsenabschnitt  $b$ .

$$E(t) = a \cdot t + b \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$$

$$E(t) = a \cdot t + b - b \cdot e^{-k \cdot t}$$

$$k = -\frac{\ln\left(\frac{b - E + a \cdot t}{b}\right)}{t}$$

Die errechneten Werte für  $k$  sind aus der Messwerte-Tabelle zu entnehmen. Eine weitere Auswertung war jedoch leider nicht möglich, da die Schwankungen zu groß sind, um ein sinnvolles Ergebnis für  $k$  erhalten zu können.

### **Fehlerbetrachtung**

Aus den teilweise stark schwankenden Messwerten sowie den Vergleichen zwischen verschiedenen Methoden, die eigentlich zum gleichen Ergebnis führen sollten, ist ersichtlich, dass beträchtliche Fehlerquellen vorhanden sind.

Die üblichen Fehler beim Abwiegen der Substanz sowie Verdünnungsfehler beim Ansetzen der Reaktionsmischung aus der Stammlösung tragen vermutlich keinen allzu großen Teil zu den Abweichungen bei.

Weitaus gravierender wirken sich die Unterschiede beim Einspritzvorgang aus. Da dieser manuell vorgenommen wurde, konnte weder eine kontinuierliche noch eine reproduzierbare Geschwindigkeit sichergestellt werden.

Fein justierbare, automatisierte Einspritzapparaturen könnten diese Fehler auf ein Minimum reduzieren.

Eine weitere Fehlerquelle sind die Zuleitungsschläuche zur Reaktionskammer. Zum einen konnten eingeschlossene Luftblasen nie völlig ausgeschlossen werden und zum anderen können auch nach mehrmaligem Spülen mit Lösungsmittel immer noch Reste von vorangehenden Messungen zurückbleiben, welche dann die neue Messung stören.

## Gesamtdiskussion

### Berechnete Werte für die alkalische Hydrolyse

Konzentration	$10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ alkalisch	$10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ alkalisch
k (Swinebourne)	$0.0466 \frac{1}{\text{s}}$	$0.1742 \frac{1}{\text{s}}$
k (aus $\ln \Delta E$ )	$0.0467 \frac{1}{\text{s}}$	$0.1669 \frac{1}{\text{s}}$
$E_{\infty}$	1.460	0.2008
$t_{1/2}$	14.84 s	4.153 s

Ein Vergleich mit dem Wert  $0.0089 \text{ s}^{-1}$  für die enzymatische Reaktion zeigt, dass dieser Prozess wesentlich langsamer abläuft als die basenkatalysierte Variante.

---

Dieses Protokoll wurde selbstständig erstellt.