

Zur spektroskopischen Analyse von Redoxgleichgewichten am Beispiel NAD(P)H-abhängiger Dehydrogenasen

J. Konstanczak und J. Polster

Lehrstuhl für Allgemeine Chemie und Biochemie der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan

Z. Naturforsch. **41 a**, 1352 – 1356 (1986); eingegangen am 17. Juli 1986

Spectroscopic Analysis of Redox Equilibria as Shown by NAD(P)H-Dependant Dehydrogenases

Equilibria of the form $A + B \xrightleftharpoons{K} C + D$ can be analysed spectroscopically in a significant way by means of absorbance diagrams. Two methods are described for the determination of the equilibrium constant K . They are valid for different domains of K . For both methods the knowledge of the absorbance coefficients of C and D is not required. The determination of K is demonstrated in case of the enzyme catalysed redox reaction by β -hydroxybutyrate dehydrogenase: acetoacetic acid + NADH + H^+ \rightleftharpoons β -hydroxybutyric acid + NAD^+ .

1. Einleitung

Es kann vorkommen, daß Redoxpaare an den Elektroden von galvanischen Zellen keine stabilen Redoxpotentiale ausbilden [1–3]. Trotzdem können sie mit anderen Redoxpaaren völlig reversibel reagieren. Die elektrometrische Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten kann dann problematisch sein. Von diesen Schwierigkeiten unberührt ist die spektroskopische Analyse.

Im folgenden werden zwei Verfahren zur spektroskopischen Analyse von Gleichgewichten des Typs $A + B \xrightleftharpoons{K} C + D$ beschrieben. Das eine Verfahren ist für kleine und das andere für große Gleichgewichtskonstanten (K) geeignet. Im Mittelpunkt stehen dabei Extinktions-Diagramme. Als Meßbeispiel dient die NADH-abhängige Reaktion der 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase.

2. Theorie

2.1. Bestimmung der Gleichgewichtskonstante durch sukzessive Erhöhung einer Redoxkomponente (1. Verfahren)

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K des Systems



Reprint requests to Priv.-Doz. Dr. J. Polster, Technische Universität München, Lehrstuhl für Allgemeine Chemie und Biochemie, D-8050 Freising-Weihenstephan.

wird nachfolgend die Komponente A im Titriergefäß vorgelegt und die Lage des Gleichgewichtes durch Titration mit B sukzessiv verschoben. Es gelten dann die Erhaltungssätze

$$a_0 = a + c, \quad b_0 = b + d. \quad (2)$$

Dabei ist a_0 die (molare) Einwaagekonzentration von A und b_0 die Gesamtkonzentration von B, die dem System in jedem Titrationsschritt zugeführt wird (a ist dann die tatsächliche Konzentration von A in der Titrationslösung; entsprechendes gilt für b , c und d). Demnach ist b_0 Variable. a_0 ist konstant, wenn die durch Titration verursachte Volumenänderung vernachlässigbar klein ist.

Da die Menge an gebildetem C und D gleich ist

$$c = d, \quad (3)$$

gilt für die Gleichgewichtskonstante:

$$K = \frac{c \cdot d}{a \cdot b} = \frac{c^2}{a \cdot b}. \quad (4)$$

Um K über das E-Diagramm zu bestimmen, wird zunächst das charakteristische Konzentrations-Diagramm [4] b_0 vs. c betrachtet (siehe Abbildung 1). Aus (2)–(4) folgt für die Funktion der Kurven in diesem Diagramm:

$$b_0 = c + \frac{c^2}{K(a_0 - c)}. \quad (5)$$

Hieraus erhält man für die Steigungen bei den Grenzwerten $c \rightarrow 0$ und $c \rightarrow a_0$:

$$\left. \frac{db_0}{dc} \right|_{c \rightarrow 0} = 1 \quad \text{und} \quad \left. \frac{db_0}{dc} \right|_{c \rightarrow a_0} \rightarrow \infty. \quad (6)$$

0340-4811 / 86 / 1200-1352 \$ 01.30/0. – Please order a reprint rather than making your own copy.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

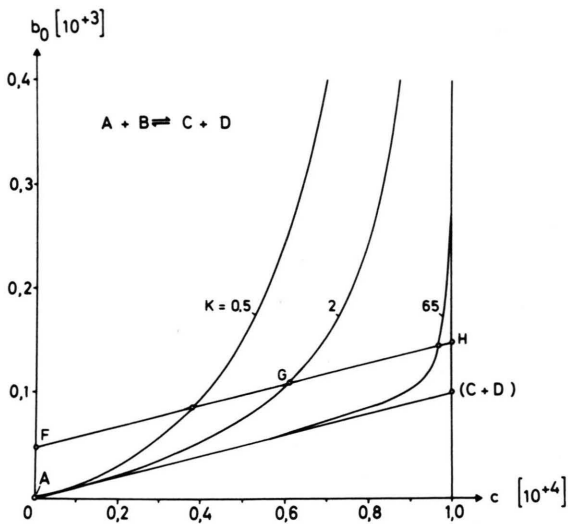


Abb. 1. Charakteristisches Konzentrations-Diagramm b_0 vs. c des Systems (1). Parameter ist K ($K = 0,5; 2; 65$).

Im Grenzwert $c \rightarrow 0$ ist nur A vorhanden ($b_0 = c = 0$). Der entsprechende Punkt (A) liegt daher im Koordinatenursprung. Im Grenzwert $c \rightarrow a_0$ ist alles A in C überführt. Je nach der Größe von K wird der Grenzwert $c \rightarrow a_0$ bei kleinen oder großen b_0 -Werten erreicht: ist K sehr groß ($K \rightarrow \infty$), wird im Bereich $0 < b_0 < a_0$ praktisch alles zugeführte B quantitativ in D umgewandelt. Die Kurve läuft dann entlang der Geraden $A(C+D)$ (siehe Abbildung 1). Bei kleinen K -Werten weicht die Kurve schon im Bereich $0 < b_0 < a_0$ von der Geraden $A(C+D)$ ab, um erst bei großen b_0 -Werten parallel zur b_0 -Achse zu verlaufen.

Die Tangenten, die zu den Grenzwerten $c \rightarrow 0$ und $c \rightarrow a_0$ gehören, schneiden sich im Punkt $(C+D)$ (siehe Abbildung 1). Dieses Verhalten gilt auch im E-Diagramm E_1 vs. E_2 (siehe Abbildung 2), das ein affin verzerrtes charakteristisches Konzentrations-Diagramm ist (siehe Abbildung 2) [4, 5]. Dabei gilt für die Extinktion E_λ (mit $\lambda = 1, 2$):

$$E_\lambda = l(\varepsilon_{\lambda A} \cdot a + \varepsilon_{\lambda B} \cdot b + \varepsilon_{\lambda C} \cdot c + \varepsilon_{\lambda D} \cdot d), \quad (7)$$

l = Schichtdicke der Küvette, $\varepsilon_{\lambda A}$ = Extinktionskoeffizient von A bei der Wellenlänge λ (entsprechend $\varepsilon_{\lambda B}, \varepsilon_{\lambda C}, \varepsilon_{\lambda D}$).

In Abbildung 2 entspricht die eingezeichnete Nullpunktsgerade der b_0 -Achse von Abbildung 1: auf ihr liegen im Fall $a_0 = 0$ sämtliche Titrationspunkte, wenn b_0 variiert wird. Diese Gerade ver-

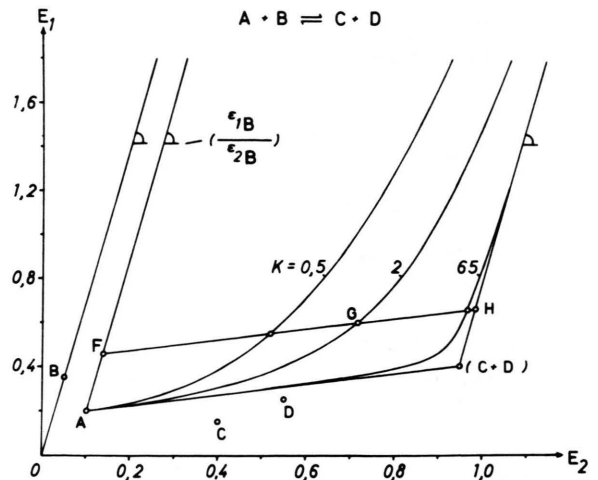


Abb. 2. E-Diagramm von $A + B \rightleftharpoons C + D$. Parameter ist K ($K = 0,5; 2; 65$; $a_0 = 10^{-4}$ M, $l = 1$ cm). Extinktionskoeffizienten (mit $\lambda = 1, 2$, in $[cm \cdot mol/l]^{-1}$):

$$\begin{aligned} \varepsilon_{1A} &= 2000, & \varepsilon_{2A} &= 1000, \\ \varepsilon_{1B} &= 3500, & \varepsilon_{2B} &= 500, \\ \varepsilon_{1C} &= 1500, & \varepsilon_{2C} &= 4000, \\ \varepsilon_{1D} &= 2500, & \varepsilon_{2D} &= 5500. \end{aligned}$$

läuft also parallel zu der bei großen b_0 -Werten an die Extinktions-Kurve angelegten Tangente $(C+D)H$.

Die Konzentrationen sämtlicher Komponenten können in einfacher Weise aus Streckenverhältnissen bestimmt werden, wenn der Tangentenschnittpunkt $(C+D)$ und die zu den Titrationspunkten G gehörenden b_0 -Werte bekannt sind (siehe Abb. 1 bzw. 2):

$$\begin{aligned} a &= \frac{\overline{GH}}{\overline{A(C+D)}} a_0, \\ c &= d = \frac{\overline{FG}}{\overline{A(C+D)}} a_0. \end{aligned} \quad (8)$$

Die noch fehlende Konzentration b kann aus (2) erhalten werden. Damit sind alle Konzentrationen für K bekannt. Bei diesem Verfahren wird die Kenntnis der Extinktionskoeffizienten von C und D nicht vorausgesetzt. Das Verfahren ist für $K > 2$ geeignet (siehe Abbildung 2). Bei kleineren K -Werten ist die Bestimmung des Tangentenschnittpunktes $(C+D)$ problematisch, sofern $\varepsilon_{\lambda C}$ und $\varepsilon_{\lambda D}$ nicht bekannt sind.

2.2. Bestimmung der Gleichgewichtskonstante nach der Methode der kontinuierlichen Veränderungen (2. Verfahren)

Bei nicht zu großen Gleichgewichtskonstanten (K etwa < 10) kann für die Analyse des Systems



die Titrationstechnik der „Methode der kontinuierlichen Veränderungen“ [6, 7] mit Erfolg herangezogen werden. Dazu werden die Einwaagekonzentrationen von A und B so variiert, daß ihre Summe (c_0) konstant bleibt. Mit (2) und (3) gilt dann

$$c_0 = a_0 + b_0 = a + b + 2c. \quad (9)$$

Da c_0 konstant ist, wird demnach das System von zwei linear unabhängigen Konzentrationen (z. B. a und b) beschrieben, die das charakteristische Konzentrations-Diagramm bilden (siehe Abbildung 3). Die Funktion der Kurven im Diagramm a vs. b lautet in impliziter Darstellung

$$F = a^2 + a(2b - 4Kb - 2c_0) - b^2 - 2bc_0 + c_0^2 = 0. \quad (10)$$

Für die Steigung da/db gilt dann [8]

$$\frac{da}{db} = - \frac{\frac{\partial F}{\partial b}}{\frac{\partial F}{\partial a}} = - \frac{a(2 - 4K) + 2b - 2c_0}{b(2 - 4K) + 2a - 2c_0}.$$

Hieraus folgt für die Grenzwerte $b = 0$ ($c_0 = a$) und $b = c_0$ ($a = 0$):

$$\left. \frac{da}{db} \right|_{b=0} = -\infty \quad \text{und} \quad \left. \frac{da}{db} \right|_{b=c_0} = 0. \quad (11)$$

Demnach sind die Koordinatenachsen die Tangenten der Punkte A und B (siehe Abbildung 3), oder anders ausgedrückt: der Koordinatenursprung ist Pol der Polare \overline{AB} [8]. Im Koordinatenursprung ist $a = b = 0$ und damit

$$c = d = c_0/2. \quad (12)$$

Hieraus folgt, daß der Koordinatenursprung zugleich der Punkt (C + D) ist, in dem nur C und D vorliegen.

Aus dem Dreieck mit den Eckpunkten A, B und (C + D) kann K aus einfachen Streckenverhältnissen bestimmt werden. Dazu werden in der Abb. 3 die Seitenhalbierenden H_1B und H_2A konstruiert und

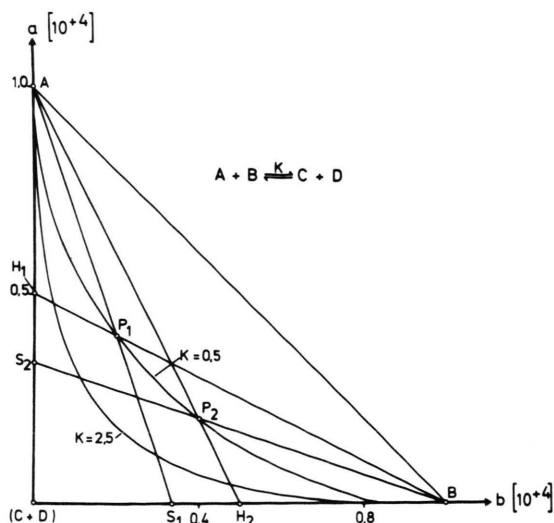


Abb. 3. Charakteristisches Konzentrations-Diagramm des Systems $A + B \rightleftharpoons C + D$ in Abhängigkeit von K (Methode der kontinuierlichen Veränderungen). Der Punkt (C + D) ist Schnittpunkt der Tangenten von A und B. Über S_1 und S_2 kann K nach (13) allein aus Streckenverhältnissen bestimmt werden.

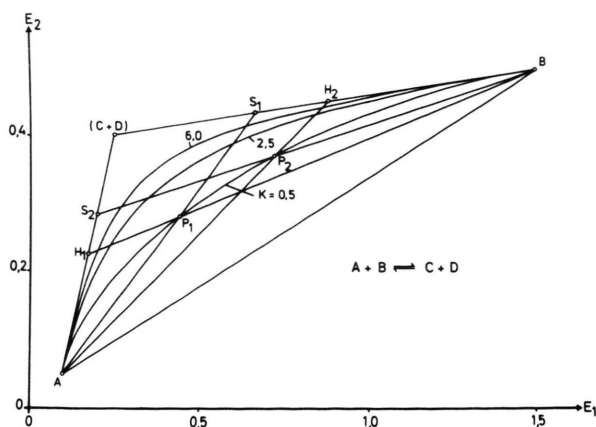


Abb. 4. Berechnete Extinktions-Kurven des Titrationssystems $A + B \rightleftharpoons C + D$ in Abhängigkeit von K (Methode der kontinuierlichen Veränderungen) mit $c_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ und $l = 1 \text{ cm}$ sowie (Extinktionskoeffizienten in $[\text{cm} \cdot \text{mol/l}]^{-1}$):

$\epsilon_{1A} = 1000,$	$\epsilon_{2A} = 500,$
$\epsilon_{1B} = 15000,$	$\epsilon_{2B} = 5000,$
$\epsilon_{1C} = 1500,$	$\epsilon_{2C} = 4000,$
$\epsilon_{1D} = 3500,$	$\epsilon_{2D} = 4000.$

Der Punkt (C + D) ist Schnittpunkt der Tangenten von A und B. Über S_1 und S_2 kann K nach (13) allein aus Streckenverhältnissen bestimmt werden.

deren Schnittpunkte (P_1 und P_2) mit der Kurve bestimmt. Mit diesen können dann die Geraden $\overline{AP_1}$ und $\overline{BP_2}$ weiter konstruiert und deren Schnittpunkte (S_1 und S_2) mit den Dreiecksseiten $\overline{(C+D)B}$ und $\overline{(C+D)A}$ ermittelt werden. Über S_1 und S_2 kann schließlich K aus den Beziehungen

$$4K = \frac{\overline{S_1 B}}{\overline{S_1 (C+D)}} = \frac{\overline{S_2 A}}{\overline{S_2 (C+D)}} \quad (13)$$

bestimmt werden.

Die entsprechenden geometrischen Zusammenhänge gelten auch im Extinktions-Diagramm. So ist in der Abb. 4 ($C+D$) Schnittpunkt der Tangenten von A und B, für den gilt:

$$E_\lambda(C+D) = I(\varepsilon_{\lambda C} + \varepsilon_{\lambda D}) \frac{c_0}{2}. \quad (14)$$

Aus dem resultierenden *Extinktions-Dreieck* kann dann K nach (13) aus Streckenverhältnissen bestimmt werden. – Die Konzentrationen der Komponenten können ebenfalls durch Streckenverhältnisse ermittelt werden. Analog zum Gibbsschen Dreieck der Thermodynamik [9] gelten die Beziehungen (siehe Abbildung 5)

$$\begin{aligned} a &= \frac{\overline{F_1(C+D)}}{\overline{A(C+D)}} c_0 = \frac{\overline{F'_1 B}}{\overline{AB}} c_0, \\ b &= \frac{\overline{F_2(C+D)}}{\overline{B(C+D)}} c_0 = \frac{\overline{F'_2 A}}{\overline{AB}} c_0, \\ c + d &= \frac{\overline{F_3 A}}{\overline{A(C+D)}} c_0 = \frac{\overline{F'_3 B}}{\overline{B(C+D)}} c_0. \end{aligned} \quad (15)$$

Damit kann K nach (4) berechnet werden. Auch hier müssen wie bei (13) die Extinktionskoeffizienten von C und D nicht bekannt sein.

3. Meßbeispiel

Gleichgewichtssysteme vom Typ $A + B \rightleftharpoons C + D$ sind in der Chemie und Biochemie weit verbreitet. Als Beispiel hierfür können Komproportionierungsgleichgewichte bei Redoxsystemen [9–10]



die zur Semichinonbildung (S) führen, oder Metallkomplexgleichgewichte angeführt werden. So können z. B. von Porphyrinen (P) neutralgebundene

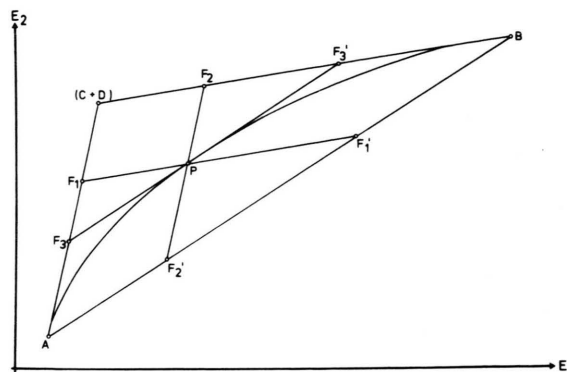
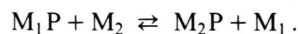
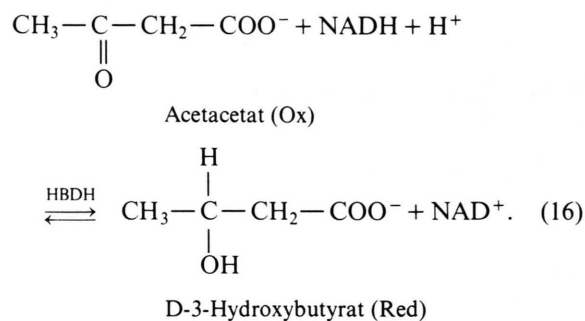


Abb. 5. Konzentrationsbestimmung im Extinktions-Diagramm (siehe (15)).

Metallionen (M_1) durch andere Metallionen (M_2) ausgetauscht werden [11, 12]:



Ebenso sind viele enzymkatalysierte Gleichgewichtsreaktionen vom gleichen Typ, wie z. B. die 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (HBDH)-Reaktion:



Für die Gleichgewichtskonstante K gilt hier

$$K \cdot 10^{-\text{pH}} = \frac{[\text{Hydroxybutyrat}][\text{NAD}^+]}{[\text{Acetacetat}][\text{NADH}]}. \quad (17)$$

Das Extinktions-Diagramm dieser Gleichgewichtsreaktion in Glycin-Puffer (pH = 9,15) ist in Abb. 6 dargestellt. Die Auswertung nach (13) liefert das Ergebnis: $K \cdot 10^{-\text{pH}} = 0,58$. Die Bestimmung von K aus den Konzentrationen der Komponenten nach (15) führt zu $K \cdot 10^{-\text{pH}} = 0,62$ (Mittelwert aus 5 Meßpunkten).

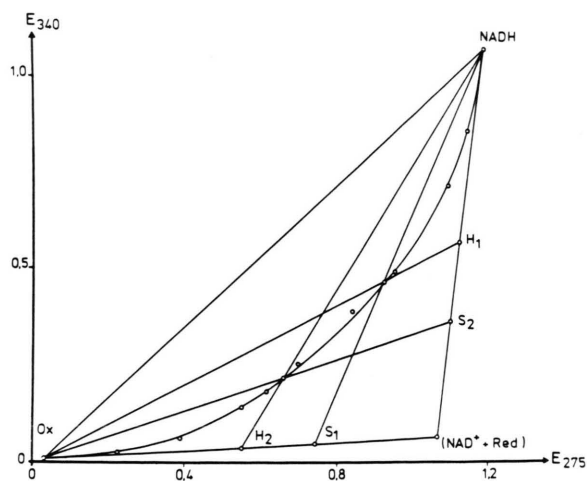


Abb. 6. Extinctions-Digramm der Gleichgewichtsreaktion (16). Die Tangenten der Punkte NADH und Ox (= Acetacetat) schneiden sich im Punkt (NAD⁺ + Red). Aus den entsprechenden Seitenhalbierenden des Extinctionsdreiecks können die Punkte S₁ und S₂ bestimmt werden, die nach (13) zu K führen. Ebenso kann K aus den Konzentrationen der Komponenten mit Hilfe von (15) ermittelt werden. – Da hier das Prinzip der Methode im Vordergrund steht, wurde auf eine Präzisionsstratifikation verzichtet und der Tangentenschnittpunkt (NAD⁺ + Red) ausschließlich graphisch (ohne Zuhilfenahme von Polynomen [4]) bestimmt.

Aus dem gemittelten Wert $K \cdot 10^{-\text{pH}} = 0,60$ erhält man mit $\text{pH} = 9,15$ als Ergebnis

$$K = 0,60 \cdot 10^{+9,15} \text{ M}^{-1} = 10^{+8,93} \text{ M}^{-1}.$$

Krebs et al. finden den Wert [13]

$$K = \frac{1}{1,42 \cdot 10^{-9} \text{ M}} = 10^{+8,85} \text{ M}^{-1}.$$

Mit Hilfe von K kann die Standard-EMK E_{oh} von D-3-Hydroxybutyrat/Acetacetat bei $\text{pH} = 7$ bestimmt werden. Mit $E_{\text{oh}} = -0,320 \text{ V}$ für NADH/NAD⁺ bei $\text{pH} = 7$ [14] erhält man aus $K = 10^{+8,93} \text{ M}^{-1}$:

$$E_{\text{oh}} = -0,263 \text{ V}.$$

4. Experimenteller Teil

3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (D-3-Hydroxybutyrat: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.30, HBDH) aus *Rhodopseudomonas spheroides* (Grad II, Ammoniumsulfat-Suspension, Boehringer, Mannheim); Acetoacetic acid (lithium salt, 90–95%, Sigma); NADH (Grad I, 100%, Dinatriumsalz, Boehringer, Mannheim); Glycin (z. A. Merck).

Titration (in 1 cm Quarzküvette): in 3 ml Glycin-Puffer (0,1 M; $\text{pH} = 9,15$) wurden jeweils 50 μl , 45 μl , 40 μl , 35 μl , 30 μl , 25 μl , 20 μl , 15 μl , 10 μl und 5 μl (nur Konstruktionspipetten) einer $1,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ NADH-Stammlösung mit der entsprechenden Menge (0 μl , 5 μl , 10 μl , ..., 50 μl) Acetacetat gleicher Konzentration gemischt und die Gleichgewichtsreaktion mit 10 μl HBDH-Suspension gestartet (25,0 °C). Nach ca. 0,5–1,5 h hatten sich die einzelnen Gleichgewichte eingestellt. – Die spektroskopischen Messungen wurden an einem (thermostatisierbaren) registrierenden Spektralphotometer Perkin-Elmer 555 durchgeführt.

Frau G. Roth danken wir herzlich für technische Hilfeleistungen.

- [1] H. Mauser u. B. Nickel, *Angew. Chem.* **77**, 378 (1965).
- [2] B. Nickel, H. Mauser u. U. Hezel, *Z. Physik. Chem. N.F.* **54**, 196 (1967).
- [3] B. Nickel, H. Mauser u. U. Hezel, *Z. Physik. Chem. N.F.* **54**, 214 (1967).
- [4] J. Polster, *Talanta* **31**, 113 (1984).
- [5] R. Blume, H. Lachmann u. J. Polster, *Z. Naturforsch.* **30b**, 263 (1975).
- [6] P. Job, *Ann. Chim. Phys.* **9**, 113 (1928).
- [7] H. L. Schäfer, *Komplexbildung in Lösung*. Springer-Verlag, Berlin 1961.
- [8] J. Dreszer, *Mathematik Handbuch für Technik und Naturwissenschaft*. Verlag Harri Deutsch, Zürich-Frankfurt/Main-Thun 1975.
- [9] S. Hünig u. Fr. Linhart, *Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 2116.
- [10] S. Hünig, G. Kießlich, Fr. Linhart u. H. Schlaf, *Liebigs Ann. Chem.* **752**, 196 (1971).
- [11] J. E. Falk, *Porphyryns and Metalloporphyrins*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1964.
- [12] P. Hambright, *Coord. Chem. Rev.* **6**, 247 (1971).
- [13] H. A. Krebs, J. Mellanby u. D. H. Williamson, *Biochem. J.* **82**, 96 (1962).
- [14] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl u. H. Ziegler, *Biophysik*. Springer-Verlag, Berlin 1982.