

# 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. **41a**, 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  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase: acetoacetic acid + NADH +  $H^+$   $\rightleftharpoons$   $\beta$ -hydroxybutyric acid + NAD<sup>+</sup>.

## 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.

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

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  $c \rightarrow a_0$ :

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



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 digitized 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.

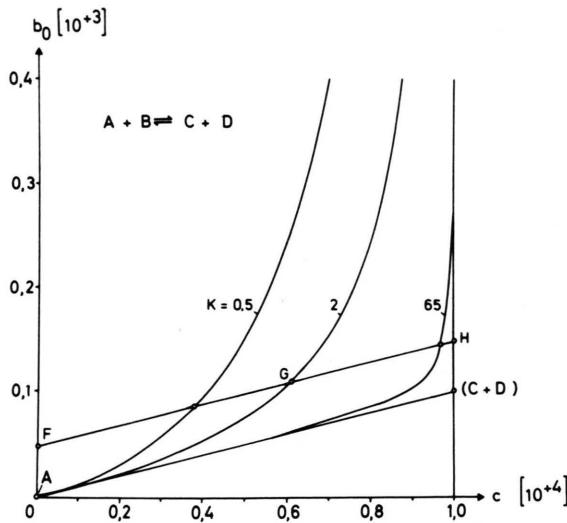


Abb. 1. Charakteristisches Konzentrations-Diagramm  $b_0$  vs.  $c$  des Systems (1). Parameter ist  $K$  ( $K = 0,5; 2; 65$ ).

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  $E_\lambda$  (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  $\lambda$  (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-

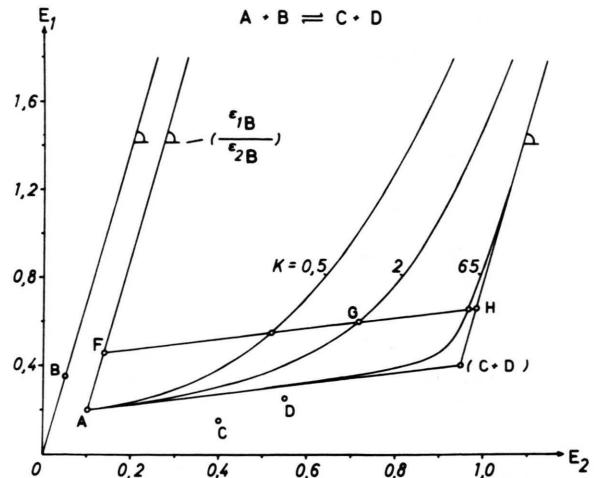


Abb. 2. E-Diagramm von  $A + B \rightleftharpoons C + D$ . Parameter ist  $K$  ( $K = 0,5; 2; 65$ ;  $a_0 = 10^{-4}$  M,  $l = 1$  cm). Extinktionskoeffizienten (mit  $\lambda = 1,2$ , in  $[\text{cm} \cdot \text{mol/l}]^{-1}$ ):

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

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):

$$a = \frac{\overline{GH}}{A(C + D)} a_0, \quad (8)$$

$$c = d = \frac{\overline{FG}}{A(C + D)} a_0.$$

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  $\varepsilon_{1C}$  und  $\varepsilon_{1D}$  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

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

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  $\overline{H_1B}$  und  $\overline{H_2A}$  konstruiert und

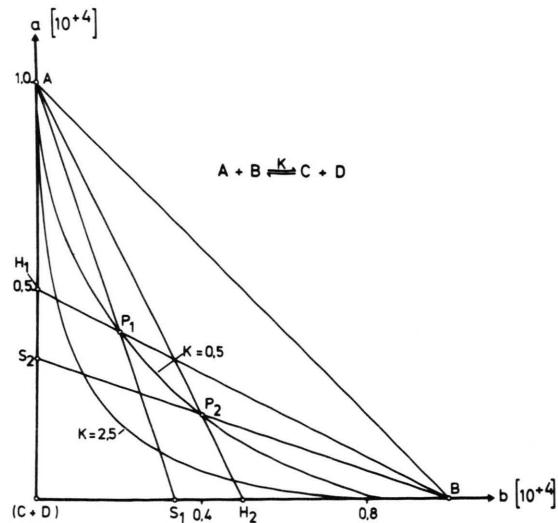


Abb. 3. Charakteristisches Konzentrations-Diagramm des Systems  $A + B \rightleftharpoons C + D$  in Abhängigkeit von  $\bar{K}$  (Methode der kontinuierlichen Veränderungen). Der Punkt (C + D) ist Schnittpunkt der Tangenten von A und B. Über  $S_1$  und  $S_2$  kann  $K$  nach (13) allein aus Streckenverhältnissen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

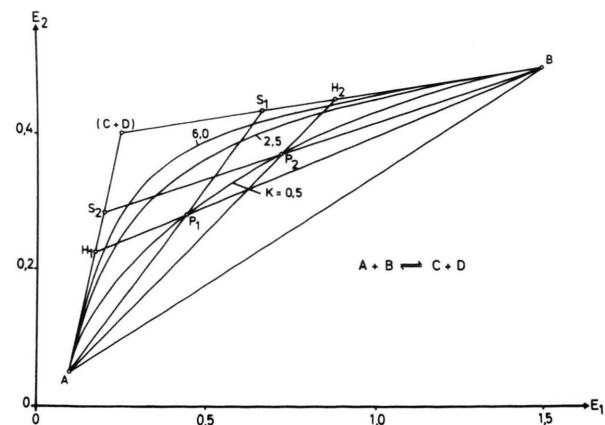


Abb. 4. Berechnete Extinktions-Kurven des Titrationsystems  $A + B \rightleftharpoons C + D$  in Abhängigkeit von  $K$  (Methode der kontinuierlichen Veränderungen) mit  $c_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  und  $l = 1 \text{ cm}$  sowie (Extinktionskoeffizienten in  $[\text{cm} \cdot \text{mol/l}]^{-1}$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

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

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:

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

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 Gibbschen Dreieck der Thermodynamik [9] gelten die Beziehungen (siehe Abbildung 5)

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

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 Komproportionierungs-gleichgewichte bei Redoxsystemen [9–10]



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

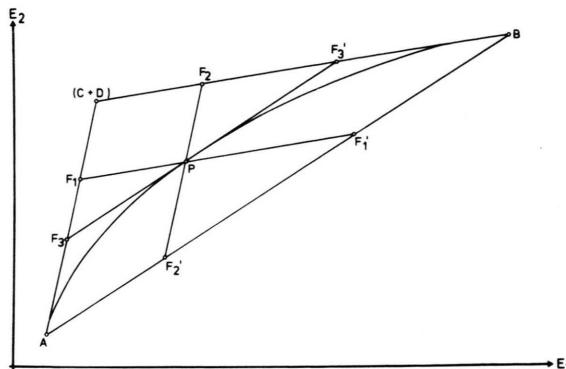
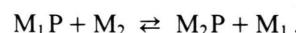
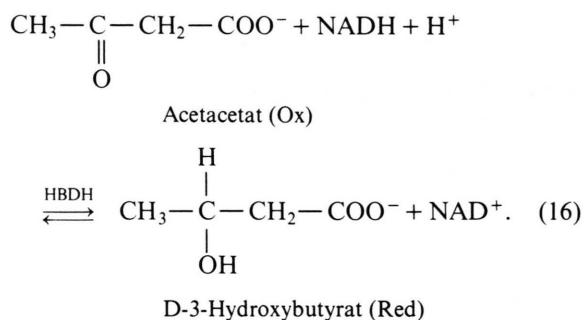


Abb. 5. Konzentrationsbestimmung im Extinktions-Diagramm (siehe (15)).

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 ( $\text{pH} = 9,15$ ) 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).

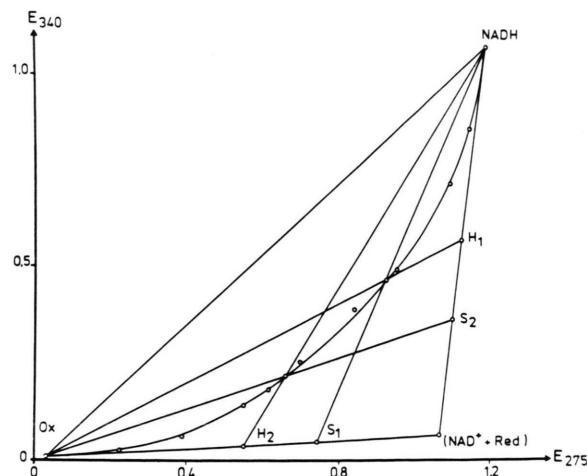


Abb. 6. Extinctions-Diagramm der Gleichgewichtsreaktion (16). Die Tangenten der Punkte NADH und Ox (= Acetacetat) schneiden sich im Punkt (NAD<sup>+</sup> + Red). Aus den entsprechenden Seitenhalbierenden des Extinctionsdreiecks können die Punkte S<sub>1</sub> und S<sub>2</sub> bestimmt werden, die nach (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 Präzisionstribration verzichtet und der Tangentenschnittpunkt (NAD<sup>+</sup> + Red) ausschließlich graphisch (ohne Zuhilfenahme von Polynomen [4]) bestimmt.

Aus dem gemittelten Wert  $K \cdot 10^{-\text{pH}} = 0,60$  erhält man mit 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  $E_{\text{oh}}$  von D-3-Hydroxybutyrat/Acetacetat bei pH = 7 bestimmt werden. Mit  $E_{\text{oh}} = -0,320 \text{ V}$  für NADH/NAD<sup>+</sup> bei 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 sphaeroides* (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; 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, Liebig Ann. Chem. **752**, 196 (1971).
- [11] J. E. Falk, Porphyrins 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.