

# Die Kunst zu Titrieren

Vom klassischen Endpunktverfahren zur modernen  
differentiellen und dynamischen Analyse<sup>[\*\*]</sup>

Von Ruthild Winkler-Oswatitsch und Manfred Eigen<sup>[\*]</sup>

*In memoriam Gerold Schwarzenbach*

Titrieren heißt, eine Stoffmenge durch chemische Umsetzung mit einer kalibrierten Standardsubstanz quantitativ zu bestimmen. Detaillierte Information über die Gleichgewichtsparameter erhält man im allgemeinen aus der Form der Titrationskurve. Im vorliegenden Beitrag werden die Ableitungen der Titrationsfunktionen nach den Konzentrationen einerseits und nach den Massenwirkungsparametern andererseits einander gegenübergestellt. Die Gleichgewichtsparameter können direkt aus den Amplituden und Zeitkonstanten der dynamischen Veränderungen des Systems als Folge einer Störung der Gleichgewichtsbedingungen bestimmt werden. Die Störung kann z. B. durch schnelle Änderung der Temperatur, des Druckes oder der elektrischen Feldstärke hervorgerufen werden.

Ganz allgemein sind drei Grundtypen von Reaktionssystemen zu unterscheiden: 1. Ist die Wechselwirkung zwischen den Reaktanden sehr stark (d. h. die Stabilität der Komplexverbindung sehr hoch:  $K \rightarrow \infty$ ), so kann die (mittlere) Teilchenzahl einer Meßprobe direkt anhand der Reaktion mit einer bekannten Anzahl von Teilchen einer Standardlösung verglichen und somit „abgezählt“ werden. – 2. Ist im Gegensatz dazu die Wechselwirkung relativ schwach (d. h. die Stabilität des Komplexes gering), so findet eine quantitative Umsetzung der zu bestimmenden Substanz nur in Gegenwart eines großen Überschusses an Standardlösung statt; der zur Erreichung des Halbwertpunktes notwendige Überschuß ist ein direktes Maß für die Bindungskonstante. – 3. Lediglich bei mittelstarken Wechselwirkungen ist es möglich, Titrationskurven zu beobachten, deren Verlauf charakteristisch für die Bindungsstärke der reagierenden Substanz ist, während in den Fällen 1 und 2 nur einheitliche Standardkurven für die jeweilige Titrationsfunktion erhalten werden.

Im Fall 1 haben wir es vor allem mit der Anwendung der klassischen Endpunktmetode zu tun. Sie ist für die quantitative Analyse, d. h. für die Bestimmung der Konzentrationen einer Probe, optimal geeignet. Die dynamischen Verfahren, die auf die Bestimmung der Gleichgewichtsparameter adaptiert sind, erweisen sich hier als ziemlich unempfindlich. Im Fall 2 liefern die klassische und die dynamische Methode vergleichbare Aussagen: Die Massenwirkungsparameter erhält man aus den Extremwerten der Kurven, welche erst nach Zugabe eines Überschusses an Standardreagens auftreten. Im Fall 3 dagegen sind die dynamischen Meßverfahren von Vorteil; sie ermöglichen eine direkte Bestimmung sowohl der Mengenverhältnisse der Reaktionsteilnehmer, der Gleichgewichtskonstanten, der Reaktionsenthalpien oder -volumina als auch der Geschwindigkeitskonstanten des Reaktionssystems. Der Vorteil der dynamischen Methode beruht darauf, daß in den beiden Ableitungen der Titrationsfunktion  $dT_i/d\ln q$  und  $dT_i/d\ln p$  die Terme, die sich aus der Variation nach  $p$  ergeben, in engerer Beziehung zu den Reaktionsparametern stehen als diejenigen, die aus der Ableitung nach  $q$  hervorgehen. ( $q$  ist das Verhältnis von Standard- zu Probenkonzentration, d. h. die eigentliche Titrationsvariable, und  $p$  symbolisiert den Massenwirkungsparameter, d. h. eine reduzierte Bindungskonstante.)

Die zunächst für einstufige Systeme erläuterte dynamische Analyse wird für die Anwendung auf mehrstufige Reaktionssysteme verallgemeinert. Es ergibt sich daraus die Möglichkeit einer Bestimmung sämtlicher Gleichgewichts- und Geschwindigkeitsparameter einzelner Reaktionsschritte in einer vielstufigen Umwandlung, also auch der Meßgrößen, die aus klassischen Bindungsstudien nicht erhältlich sind. Eine einheitliche Darstellung der Relationen wird durch Verwendung trigonometrischer Funktionen erzielt, in denen der Singularitätscharakter des Endpunktes klarer zum Ausdruck kommt. Die Beziehungen sind in mehreren Tabellen zusammengefaßt, welche in Verbindung mit den graphischen Illustrationen die Grundlage für eine vergleichende Diskussion bilden.

## 1. Einleitung

[\*] Prof. Dr. M. Eigen, Dr. R. Winkler-Oswatitsch  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie,  
Abt. Biochemische Kinetik  
D-3400 Göttingen

[\*\*] Diese Arbeit geht auf eine am Max-Planck-Institut für Physikalische Chemie in Göttingen durchgeföhrte und an der Technischen Hochschule Wien im November 1969 eingereichte Dissertation [1] zurück.

Ein Materiesystem komplizierter Zusammensetzung ist durch die räumliche und zeitliche Verteilung seiner einzelnen Bestandteile – ausgedrückt durch deren jeweilige Besetzungsichten – vollständig charakterisiert. Die Bestimmung dieser

Besetzungsdichten der verschiedenen molekularen Anteile ist eine der grundlegenden Aufgaben der Chemie. Normalerweise kann sie durch „Auszählen“ aufgrund quantitativer chemischer Umsetzung erreicht werden: Die unbekannte Molekülmenge wird dazu gebracht, mit einer bekannten oder meßbaren Anzahl spezifischer Partner zu reagieren. Dieses Verfahren heißt allgemein *Titration*.

Die klassische Methode der Titration basiert auf der (mehr oder weniger) vollständigen Umsetzung der zu analysierenden Probe, wobei ein gut definierter Endpunkt angestrebt wird. Selbstverständlich eignen sich dazu nur Reaktionen, die schnell genug, d. h. innerhalb der Beobachtungszeit ablaufen. Die Vollständigkeit der Umsetzung hängt dann einzig und allein von der relativen Größe der Gleichgewichtskonstante ab, deren Ermittlung oft das eigentliche Ziel der Titration ist. Dabei ist es erforderlich, die Konzentrationen der an der Umwandlung beteiligten Reaktionspartner und -produkte quantitativ zu bestimmen.

Die Messung einer extensiven, d. h. mengenabhängigen thermodynamischen Größe als Funktion der Einwaagekonzentrationen der Reaktionspartner ist ein weiteres Verfahren zur Messung von Stabilitätskonstanten. Hierbei ist es erforderlich, die Gibbs-Energie oder ihre Ableitung nach einer der intensiven Variablen (wie Temperatur  $T$ , Druck  $P$ , elektrische Feldstärke  $E$ ) möglichst genau zu ermitteln.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die besonderen Vorteile der dynamischen Titrationsmethoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten aus den Relaxationsanteilen extensiver thermodynamischer Funktionen aufzuzeigen und die Resultate dieser dynamischen Studien mit den Ergebnissen klassischer Titrationsuntersuchungen zu vergleichen.

Hier soll vor allem der Chemiker angesprochen werden, der aus seiner Laborerfahrung weiß, daß Titrieren nicht eine Routineangelegenheit ist, sondern daß man für jedes Problem die optimal angepaßte Verfahrensweise finden muß. Daher ist ein Verständnis der physikalischen Grundlagen – deren Prinzipien im folgenden erarbeitet werden sollen – unabdingbare Voraussetzung. „Die Kunst des Titrierens“ erschöpft sich ebenso wie die „Kunst des Kochens“ in einer bloßen und schematischen Befolgung von Rezepten.

## 2. Binäre Komplexbildung

### 2.1. Titrationskurven und Stabilitätskonstanten

Der Ablauf einer chemischen Reaktion kann praktisch trägeheitslos verfolgt werden, wenn Edukt und Produkt aufgrund der Umsetzung beobachtbare Veränderungen ihrer elektromagnetischen Eigenschaften aufweisen. Als Beispiel betrachten wir die binäre Assoziations-Dissoziationsreaktion:



wobei A und B eine Säure und eine Base, ein Metallion und einen Liganden, ein Enzym und ein Substrat, einen Antikörper und ein Hapten oder – ganz allgemein – irgendwelche Reaktionspartner eines Koordinationsprozesses bedeuten können. Das Beispiel mag ebenso repräsentativ für einen Elektronen-, Protonen- oder Ligandenaustausch sein, obwohl diese Prozesse formal als Substitutions- und nicht als Additionsreak-

tionen einzuordnen sind. Mindestens einer der beiden Reaktionspartner muß ein registrierbares Signal hervorbringen, anhand dessen sich die chemische Umsetzung verfolgen läßt.

Sind die beiden Einwaagekonzentrationen  $c_A^0$  und  $c_B^0$  bekannt, so nimmt das Massenwirkungsgesetz die folgende Form an:

$$K = K_0 \Pi f = \frac{c_{AB}}{(c_A^0 - c_{AB})(c_B^0 - c_{AB})} \quad (2.1-2)$$

$K_0$  ist die thermodynamische Gleichgewichtskonstante, die sich jeweils auf die vorgegebenen intensiven thermodynamischen Variablen bezieht.  $\Pi f = f_A f_B / f_{AB}$  ist ein Term, der die Aktivitätskoeffizienten der Reaktionspartner und -produkte enthält. In den folgenden Gleichungen wollen wir diesen Term ( $\Pi f$ ) nicht mehr explizit anführen. Seine Veränderungen im Verlaufe der Titration, vor allem bei einer Ladungs-Neutralisation können, falls es sich als notwendig erweist, berücksichtigt werden; sie sind jedoch bei kleinen Konzentrationen von A, B und AB vernachlässigbar. In Gegenwart eines Überschusses an Neutralsalz kann der Term generell als konstanter Faktor in die Konstante  $K$  mit einbezogen werden.

Gl. (2.1-2) liefert explizite Ausdrücke für die Gleichgewichtskonzentration der einzelnen Spezies in Abhängigkeit von  $c_A^0$ ,  $c_B^0$  und  $K$ :

$$c_{AB} = \frac{c_A^0 + c_B^0 + K^{-1}}{2} - \frac{1}{2} \sqrt{(c_A^0 + c_B^0 + K^{-1})^2 - 4 c_A^0 c_B^0} \quad (2.1-3)$$

$$c_A = c_A^0 - c_{AB} \quad (2.1-4)$$

$$c_B = c_B^0 - c_{AB} \quad (2.1-5)$$

Wir nehmen nun an, daß A oder (und) B bei seiner Umwandlung in AB eine meßbare Änderung im Absorptionsspektrum aufweist, die sich in einer (endlichen) Differenz der Extinktionskoeffizienten:  $\varepsilon_A + \varepsilon_B + \varepsilon_{AB}$  ausdrückt. Die optische Dichte pro Einheitslänge ( $E/l$ ) ist dann durch

$$\begin{aligned} E/l &= c_A \varepsilon_A + c_B \varepsilon_B + c_{AB} \varepsilon_{AB} \\ &= c_A^0 \varepsilon_A + c_B^0 \varepsilon_B + c_{AB} (\varepsilon_{AB} - \varepsilon_A - \varepsilon_B) \end{aligned} \quad (2.1-6)$$

gegeben.

Wenn wir den Grenzwert der optischen Dichte für  $c_{AB}=0$  mit

$$E_0/l = c_A^0 \varepsilon_A + c_B^0 \varepsilon_B \quad (2.1-7)$$

und den für  $c_B=0$ , d. h. nach vollständiger Umwandlung von B in AB, in Gegenwart eines Überschusses von A mit

$$E_\infty/l = c_A^0 \varepsilon_A + c_B^0 (\varepsilon_{AB} - \varepsilon_A) \quad (2.1-8)$$

bezeichnen, kann der „Grad der Komplexbildung“ direkt durch die meßbaren Extinktionswerte

$$\frac{c_{AB}}{c_B^0} = \frac{E - E_0}{E_\infty - E_0} \equiv \eta \quad (2.1-9)$$

ausgedrückt werden.

Aus Gl. (2.1-9) in Kombination mit dem Massenwirkungsgesetz läßt sich eine Reihe von zweckmäßigen Darstellungen der Titrationsfunktion herleiten, aus denen die Gleichgewichtskonstante jeweils unmittelbar bestimmt werden kann. Eine bekannte Form ist z. B. die Hildebrand-Benesi-Gleichung<sup>[21]</sup>:

$$\frac{c_A^0}{E - E_0} = \frac{c_B^0}{E_s - E_0} + \frac{K^{-1}}{E_s - E} \quad (2.1-10)$$

Trägt man  $c_A^0/(E - E_0)$  gegen  $1/(E_s - E)$  auf (vgl. Abb. 1 a), so erhält man eine Gerade, deren Steigung der gesuchten Dissoziationskonstanten  $K^{-1}$  entspricht. Für eine solche Auftragung muß nicht einmal der genaue Konzentrationswert  $c_B^0$  bekannt sein; er resultiert aus dem Ordinatenschnittpunkt der sich ergebenden Geraden.

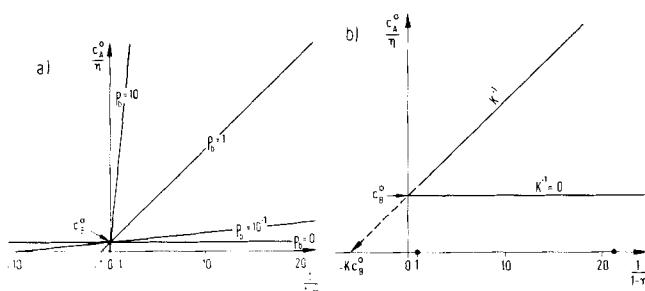


Abb. 1. a) Hildebrand-Benesi-Auftragung zur Ermittlung der Stabilitätskonstanten ( $K$ ) aus dem Verhältnis der Extinktionen  $\eta$  bzw.  $1-\eta$  (Variation von  $c_A^0$  oder  $q_b = c_A^0/c_B^0$  bei konstantem  $c_B^0$ ; der Parameter  $p_b = K^{-1}/c_B^0$  wird ermittelt). Für  $\eta$ -Werte nahe Eins oder Null wird die Bestimmung ungenau. Wenn  $p_b$  groß ist, kann der Quotient  $q_b = c_A^0/c_B^0$  entsprechend groß gewählt werden, so daß eine empfindliche Messung der Änderung von  $\eta$  möglich wird. Wenn  $p_b$  klein ist, erfolgt praktisch keine Änderung von  $c_A^0/\eta$  in dem der Messung zugänglichen Bereich (nämlich  $\eta \sim c_A^0$ ). Deshalb können kleine Werte von  $p_b$  nicht bestimmt werden (siehe auch Abb. 3). b) Die beiden Punkte auf der Abszisse markieren den günstigsten Meßbereich.

Die spezielle Form der Darstellung hängt von der Art der zur Verfügung stehenden Meßparameter ab. Sie kann so abgewandelt werden, daß sie dem jeweiligen Problem optimal angepaßt ist. Die Biochemiker sind in dieser Hinsicht besonders einfallsreich gewesen, denn gerade bei einer Enzym-Substrat-Reaktion hat man es oft mit extremen Konzentrationsverhältnissen zu tun. Eine Zusammenstellung zweckmäßiger Auftragungen findet sich in Abbildung 2a.

So nützlich Beziehungen dieser Art (innerhalb ihres Gültigkeitsbereiches) auch sein mögen, ihre Aussagekraft für eine genaue Bestimmung der Stabilitätskonstanten wird um so geringer, je größer die Werte von  $K$  werden, oder explizit ausgedrückt, sobald

$$K(c_A^0 + c_B^0) \gg 1 \quad (2.1-11)$$

Dies kann man aus Abbildung 1 b ersehen, oder noch besser, aus Abbildung 3a, in der die Titrationskurven für verschiedene Werte der Stabilitätskonstante ( $K \cdot c_B^0$  als Parameter) gegen den Logarithmus der Titrationsvariablen  $q_b = c_A^0/c_B^0$  aufgetragen sind. Sowohl die Meßkurven als auch deren Ableitungen (Abb. 3b) zeigen, daß für den Fall  $K \cdot c_B^0 \gg 1$  der zur Bestimmung von  $K$  geeignete Bereich sich zunehmend auf die unmittelbare Umgebung des Äquivalenzpunktes ( $c_A^0 = c_B^0$ ) beschränkt.

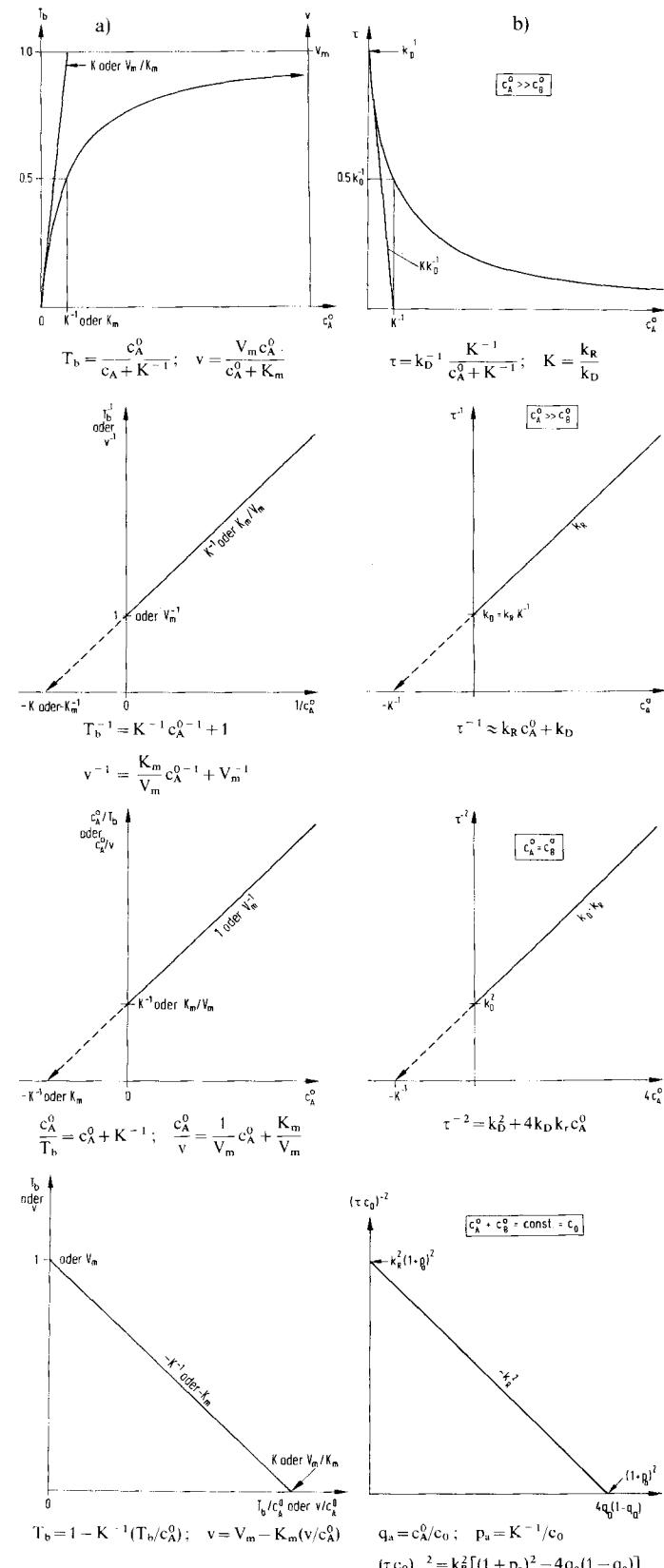


Abb. 2. a) Auftragungen der Titrationsfunktion ( $T_b$ ) (siehe Tabelle 1) sowie der stationären Umsatzgeschwindigkeit ( $v$ ), wie sie vor allem in der Enzymchemie häufig Verwendung finden (von oben nach unten): Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Woolf, Angustisson. Alle genannten Auftragungen haben zur Voraussetzung, daß die Konzentration an freiem Substrat bekannt ist. Dies trifft immer zu, wenn die Einwaagekonzentration des Substrats sehr viel größer als die des Enzyms ist:  $c_A^0 \gg c_B^0$ .

b) Analoge Auftragungen für die Auswertung von Relaxationszeiten ( $\tau$ ). Wiederum sind Bedingungen zu erfüllen, die im einzelnen aus den Diagrammen hervorgehen. (Ähnliche einfache lineare Beziehungen bestehen nicht für den Amplitudenfaktor  $\Gamma_b$ , welcher als Produkt aus  $\tau_b$  und  $T_b$  darstellbar ist.)

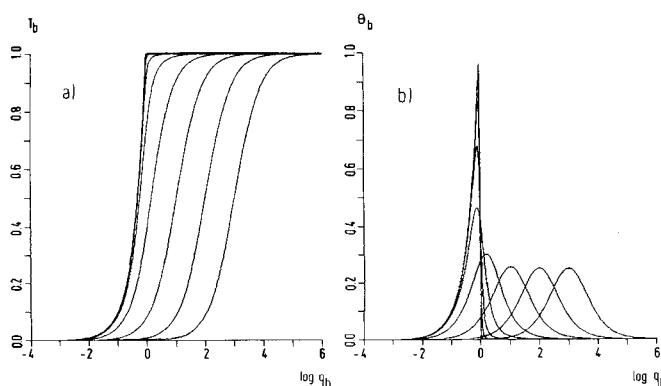
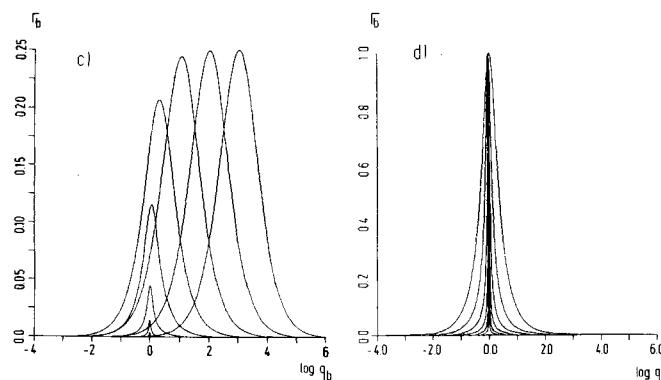


Abb. 3. a) Klassische Titrationskurven: Auftragung der Titrationsfunktion ( $T_b$ ) gegen den Logarithmus des Konzentrationsverhältnisses ( $q_b = c_A^0/c_B^0$ ) für mehrere  $p_b$ -Werte (siehe Tabelle 1). A bezieht sich auf den Standard, B auf die Meßprobe ( $c_B^0 = \text{const.}$ ,  $c_A^0 = \text{variabel}$ ).

b) Steigung der Titrationskurven:  $\theta_b = d T_b / d \ln q_b$ . Für  $p_b > 1$  ist die Lage der maximalen Steigung (Wendepunkt) ein direktes Maß für  $p_b$ . Wenn  $p_b$  gegen 0 geht, wird eine Grenzkurve erreicht. Die Kurvenform zeigt nur relative Differenzen an; sie können durch Verstärkung der Meßsignale nicht verbessert werden.



c) Der Amplitudenfaktor  $I_b = \partial T_b / \partial \ln p_b$  ist zum Vergleich in derselben Weise aufgetragen wie  $\theta_b$ . Für  $p_b \gg 1$  ergeben sich die gleichen Resultate für  $I_b$  und  $\theta_b$ . Die Amplitudenfaktoren können direkt aus den Relaxationsamplituden ermittelt werden und erfordern nicht die Bildung von Differentialquotienten. Für  $p_b < 1$  verkleinern sich die Absolutwerte proportional zu  $1/\sqrt{p_b}$ , doch ändert sich auch die Kurvenform in charakteristischer Weise. Durch Verstärkung des Signals lassen sich die Effekte so vergrößern, daß sie leicht auswertbar werden. Sie sind dann ein empfindliches Maß für  $p_b$ .

d) Normierung von  $I_b$  auf gleiche Maximalwerte (vgl. Tabelle 1).

Tatsächlich beinhaltet nur die zweite Ableitung der Titrationskurve

$$\frac{d^2 c_{AB}}{dc_A^0} = -\frac{2c_B^0 K^{-1}}{[(c_A^0 - c_B^0 + K^{-1})^2 - 4c_B^0 K^{-1}]^{3/2}} \quad (2.1-12)$$

eine direkte Proportionalität zu  $K^{-1}$ . Im Fall  $K^{-1} \rightarrow 0$  tritt eine echte Singularität auf; die Steigung der Titrationskurve klappt abrupt von Eins nach Null um:

$$\frac{dc_{AB}}{dc_A^0} \rightarrow \frac{1}{2} \left[ 1 - \frac{c_A^0 - c_B^0}{|c_A^0 - c_B^0|} \right] \quad (2.1-13)$$

( $|c_A^0 - c_B^0|$  ist der Absolutbetrag der Differenz und somit immer positiv, während die Differenz selbst ihr Vorzeichen am Äquivalenzpunkt ändert.)

Es ist gerade die differentielle Änderung der Steigung, mit anderen Worten, die Krümmung der Titrationskurve, die man – vor allem für große Werte von  $K$  – mit der differentiellen Veränderung vergleichen sollte, die durch eine Störung eines thermodynamischen (intensiven) Parameters hervorgerufen wird. Dieses Problem soll im nächsten Abschnitt im einzelnen behandelt werden.

## 2.2. Relaxationsamplituden und Zeitkonstanten

Wir wollen die Änderung der Konzentration  $c_{AB}$  betrachten, die sich aus einer Verschiebung des Gleichgewichtes aufgrund der Variation eines intensiven Parameters ergibt. Hier ändert sich  $K$  bei konstantem  $c_A^0$  und  $c_B^0$ , während man bei der normalen Titration  $c_B^0$  (oder eine Kombination von  $c_A^0$  und  $c_B^0$ ) variiert und  $K$  konstant hält. Die Größe, für die wir uns besonders interessieren, ist der Differentialquotient  $\delta c_{AB}/\delta \ln K$ , der direkt aus einem Relaxationsexperiment gewonnen werden kann.

Eine kleine Störung, hervorgerufen z. B. durch eine plötzliche Änderung der Temperatur, des Druckes oder der elektrischen Feldstärke, löst im allgemeinen einen (linearen) Relaxationseffekt aus. Eine sprunghafte Verschiebung der Kraft hat einen exponentiellen Zeitverlauf der Konzentrationsvariablen zur Folge:

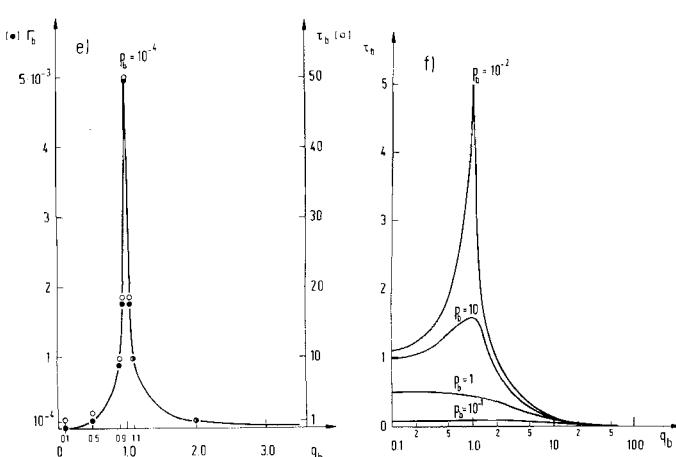
$$\delta_t c_{AB} = \delta_\infty c_{AB} (1 - e^{-t/\tau}) \quad (2.2-1)$$

wobei  $\delta_\infty c_{AB}$  die Konzentrationsverschiebung nach vollständiger Wiedereinstellung des Gleichgewichtes ( $t \rightarrow \infty$ ) bedeutet.  $\tau$  ist die charakteristische Zeitkonstante, die Relaxationszeit des chemischen Gleichgewichts.

Bei periodischen, sinusförmigen Änderungen kann die Reaktionsantwort des Systems in komplexer Form dargestellt werden.

$$\delta_\omega c_{AB} = \frac{\delta_0 c_{AB}}{1 + i\omega\tau} \quad (2.2-2)$$

Wiederum repräsentiert  $\delta_0 c_{AB}$  eine Konzentrationsverschiebung ( $\omega \rightarrow 0$ ), die der *vollständigen* Gleichgewichtseinstellung (in bezug auf die Änderung des Intensivparameters) entspricht. Die komplexe Form von Gl. (2.2-2) weist auf eine Frequenzabhängigkeit der wahren Amplitude hin (d. h. auf den maximalen Wert von  $\delta_\omega c_{AB}$ ) und auf eine Phasenbeziehung zwischen Ursache und Wirkung, ausgedrückt durch  $\delta_0 c_{AB}$  und  $\delta_\omega c_{AB}$ . Dieses Verhalten kommt bei anderer Schreibweise von Gl. (2.2-2) deutlicher zum Ausdruck.



e)  $I_b$  und  $\tau_b$  (nicht normiert) für  $p_b = 10^{-4}$  mit linearer Konzentrationsachse.

f)  $\tau_b$  für mehrere  $p_b$ -Werte mit logarithmischer Konzentrationsachse (siehe auch Tabelle 1).

$$\delta_{0c} c_{AB} = \frac{\delta_0 c_{AB}}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}} e^{-i\varphi} \quad (2.2-3)$$

wobei  $\varphi = \arctg(\omega \tau)$  den Phasenwinkel repräsentiert, während der Wurzelterm die frequenzabhängige Verminderung der Amplitude beschreibt. Es sei betont, daß – als Ausdruck der periodisch sich ändernden Intensivvariablen und der entsprechend variierenden Reaktionskraft – die Verschiebung  $\delta_0 c_{AB}$  ebenfalls eine periodische Funktion der Zeit ist:  $\delta_0 c_{AB} = a_{AB} e^{i\omega t}$ . Die Amplitude  $a_{AB}$  hängt allein von Gleichgewichtsparametern ab und ist durch die Amplitude der Intensivgröße festgelegt.

Ist  $z$  ein allgemeines Symbol für eine intensive Variable (z. B. Temperatur, Druck oder elektrische Feldstärke), so läßt sich  $\delta_0 c_{AB}$  wie folgt mit  $\delta z$  korrelieren.

$$\delta_0 c_{AB} = \left( \frac{\delta c_{AB}}{\delta \ln K} \right)_z \left( \frac{\delta \ln K}{\delta z} \right) \delta z = \frac{\Gamma \Delta Z}{RT} \delta z \quad (2.2-4)$$

$\delta z$  bezeichnet die von außen aufgeprägte (z. B. periodische, stufenförmige) Intensitätsänderung.  $\Gamma = (\partial c_{AB} / \partial \ln K)_z$  ist der Amplitudenfaktor, der die Dimension einer Konzentration besitzt, und  $\Delta Z = RT \partial \ln K / \partial z$  definiert die zu  $z$  konjugierte extensive Reaktionsgröße. Für  $z = T$  bzw.  $z = P$  ist  $\Delta Z$  durch  $\Delta H/T$  bzw. durch  $-\Delta V$  gegeben, wobei  $\Delta H$  die Reaktionsenthalpie und  $\Delta V$  das Reaktionsvolumen sind. Ein kurzer Abriß der allgemeinen thermodynamischen Behandlung von Relaxationsphänomenen findet sich im Anhang 1.

Von speziellem Interesse ist die Beziehung zwischen dem Amplitudenfaktor  $\Gamma$  und den Einwaagekonzentrationen  $c_A^0$ ,  $c_B^0$  sowie der Gleichgewichtskonstante  $K$ . Für das Gleichgewicht einer 1:1-Komplexbildungsreaktion gilt:

$$\Gamma = \frac{c_A c_B}{c_A + c_B + K^{-1}} = \frac{K^{-1}}{2} \left[ \frac{1}{\sqrt{1 - 4c_A^0 c_B^0 / (c_A^0 + c_B^0 + K^{-1})^2}} - 1 \right] \quad (2.2-5)$$

$\Gamma$  weist ein Maximum am Äquivalenzpunkt auf, das in der logarithmischen Auftragung dem maximalen Wert der Ableitung der Titrationsfunktionen (vgl. Abb. 3c, d) entspricht. Für  $K^{-1} \ll c_A^0 + c_B^0$  wird dieses Maximum sehr scharf und ist so ein äußerst empfindliches Maß für die Stabilitätskonstante.

Obgleich die Größe  $\delta_{\infty} c_{AB}$  bzw.  $\delta_0 c_{AB}$  sich auf das eingestellte Gleichgewicht bezieht, bedarf es zu ihrer Festlegung zumeist einer vollständigen Aufzeichnung der Zeit- oder Frequenzabhängigkeit der Konzentrationsverschiebung  $\delta c_{AB}$ . Da die Störung durch Änderung einer intensiven Variablen verursacht wird, bewirkt diese im allgemeinen nicht nur eine Veränderung der chemischen Zusammensetzung, sondern auch des Volumens der Lösung (z. B. infolge thermischer Ausdehnung) oder auch der Parameter (z. B. Extinktionskoeffizienten), die zur Messung des chemischen Effektes herangezogen werden.

Mit  $c = n/V$  ( $n$  = Molzahl,  $V$  = Volumen) kann  $\delta c_{AB}$  näherungsweise in zwei Terme aufgespalten werden:  $(\delta c_{AB})_{\text{chem}}$  und  $-c_{AB}(\delta V/V)$ . Nur der Term  $(\delta c_{AB})_{\text{chem}}$  enthält die „chemische Verschiebung“, die durch die Relaxationszeit  $\tau$  charakterisiert ist. Die durch die Störung ausgelösten physikalischen Prozesse (z. B. die Volumenausdehnung  $\delta V$ ) laufen zumeist sehr viel schneller ab als die chemischen Reaktionen. Sie können daher als Vorgänge betrachtet werden, die praktisch ohne Verzögerung (innerhalb der zeitlichen Auflösung) stattfinden. Allerdings beeinflussen sie die Endamplitude und können da-

her nur aufgrund der charakteristischen Zeitabhängigkeit der chemischen Effekte separiert werden (Abschnitt 2.4 enthält ein Auswertungsbeispiel). Aus dieser Tatsache folgt, daß sich die dynamische Methode für eine korrekte Bestimmung der „chemischen Verschiebung“ besser eignet als jedes statische Verfahren. Außerdem bietet die Zeit- oder Frequenzabhängigkeit eine Möglichkeit zur Bestimmung der kinetischen Parameter. Die Methode ist jedoch nur im linearen Bereich der Störeffekte, d. h. bei relativ kleinen Störungen, anwendbar.

Im Gleichgewicht ist die Anzahl der Rekombinationsprozesse von A und B pro Zeiteinheit gleich der Anzahl der Zerfallsprozesse von AB,

$$v = k_R c_A c_B = k_D c_{AB} \quad (2.2-6)$$

wobei  $v$  die Austauschgeschwindigkeit im Gleichgewicht bedeutet. (Im Anhang 1 wird gezeigt, daß eine Beziehung zwischen der Relaxationszeit  $\tau$  und dem Amplitudenfaktor  $\Gamma$  besteht.) Die reziproke Relaxationszeit ist durch

$$\tau^{-1} = k_R(c_A + c_B + K^{-1}) \quad (2.2-7)$$

gegeben, oder in der expliziten Form durch

$$\tau^{-1} = k_R / (c_A^0 + c_B^0 + K^{-1})^2 - 4c_A^0 c_B^0 \quad (2.2-8)$$

Für  $K^{-1} \ll c_A^0 + c_B^0$  durchläuft  $\tau$  in Analogie zu  $\Gamma$  am Äquivalenzpunkt ein scharfes Maximum. Vorschläge für eine zweckmäßige Auftragung von  $\tau$  und  $\tau^{-1}$  sind in Abbildung 2b zusammengefaßt.

Ähnlich einfache funktionelle Zusammenhänge bestehen für  $\Gamma$  nicht, da diese Größe sich als Produkt von Austauschgeschwindigkeit und Relaxationszeit aus den beiden Termen  $c_{AB}$  und  $\tau$  zusammensetzt (siehe Anhang 1).

### 2.3. Die „dynamische“ Analyse im Vergleich zur klassischen Titration

Wir können nun in eine detailliertere Diskussion der Methoden zur Bestimmung von Stabilitätskonstanten eintreten, wobei die verschiedenen Verfahren, die entweder auf einer Variation der Einwaagekonzentrationen ( $c_A^0$ ,  $c_B^0$ ) oder aber auf einer Verschiebung der Gleichgewichtslage ( $K$ ) beruhen, einander gegenübergestellt werden sollen. Als erstes stellen wir fest, daß Verschiebungen von  $c_{AB}$  sich symmetrisch in bezug auf die Änderungen von  $c_A^0$  und  $c_B^0$  verhalten. Bei den klassischen Titrationsmethoden wird meist nur eine der beiden Konzentrationen variiert ( $c_A^0$  oder  $c_B^0$ ), während die andere mit vorgegebenem Wert konstant gehalten wird. Eine Alternative zu dieser Methode – die der Symmetrie der funktionalen Beziehungen besser angepaßt ist – wäre, die Summe von  $c_A^0$  und  $c_B^0$  konstant zu halten und nur deren relatives Verhältnis zu variieren. Beide Konzepte bieten in speziellen Fällen Vorteile. Sie werden daher getrennt behandelt.

Für eine intuitive Beschreibung und für eine vergleichende Analyse der verschiedenen mathematischen Ausdrücke erweist es sich als nützlich, die Substitution

$$Q \equiv \frac{2\sqrt{c_A^0 c_B^0}}{c_A^0 + c_B^0 + K^{-1}} \equiv \sin \alpha \quad (2.3-1)$$

einzu führen. Eine solche Substitution ist rein formaler Natur und dient allein dem Zweck einer einheitlichen und übersichtlichen mathematischen Darstellung.

Der durch Gl. (2.3-1) definierte Winkel  $\alpha$  kann nur Werte zwischen 0 und  $\pi/2$  annehmen. Er besitzt ein Maximum am Äquivalenzpunkt ( $c_A^0 = c_B^0$  bzw.  $c_A^0 + K^{-1} = c_B^0$ ); den Wert  $\pi/2$  erreicht er nur im Grenzfall  $K(c_A^0 + c_B^0) \rightarrow \infty$ . Bei jedem endlichen Wert von  $K$  bleibt  $\alpha$  unterhalb des Wertes von  $\pi/2$ .

Wir leiten nun Ausdrücke ab für

1. die Titrationsfunktion,
  2. die Steigung der Titrationsfunktion, d. h. deren erste Ableitung,
  3. die Krümmung der Titrationsfunktion, d. h. deren zweite Ableitung,
  4. die Relaxationsamplitude und
  5. die Relaxationszeit,
- wobei jeweils die beiden Fälle
- a)  $c_A^0 + c_B^0 = \text{const}$ ,
  - b)  $c_B^0 = \text{const}$ .
- explizit unterschieden werden.

In Tabelle 1 sind alternative Ausdrücke für jede der fünf genannten Funktionen aufgeführt. Der Ausdruck I gibt die explizite Abhängigkeit dieser Funktionen von den beiden Variablen  $p$  und  $q$  an, die ihrerseits von  $c_A^0$ ,  $c_B^0$  und  $K$  abhängen, während der Ausdruck II auf der trigonometrischen Substitution (2.3-1) basiert, und zwar jeweils für beide Nebenbedingungen a) und b). Für letztere sind mehrere Darstellungsformen möglich. Zur Vereinheitlichung wurden alle Ausdrücke in Beziehung zu  $\tan(\alpha/2)$  gesetzt.

Tabelle 1. 1:1-Komplexbildung:

Darstellung der Titrationsfunktion und der Ableitungen nach den Standard-Einwaage-Konzentrationen bzw. nach den Gleichgewichtsparametern. Dabei wird auf das Reaktionsschema (2.1-1) und die Parameter in Gl. (2.1-2) Bezug genommen.

Zwei Verfahren sind zu unterscheiden:

a)  $c_A^0 + c_B^0 = \text{const}$

$K$  als Parameter

Jede Variation von  $c_A^0$  erfordert eine entsprechende Kompensation in  $c_B^0$ .

b)  $c_B^0 = \text{const}$

$K$  als Parameter

$c_A^0$  als Variable, wie sie in den klassischen Titrationsverfahren gebräuchlich ist.

Folgende Abkürzungen werden zur Vereinfachung der Darstellung eingeführt:

a)  $p_a \equiv \frac{K^{-1}}{c_A^0 + c_B^0}$

$q_a \equiv \frac{c_A^0}{c_A^0 + c_B^0}$

$(1 - q_a) \equiv \frac{c_B^0}{c_A^0 + c_B^0}$

Äquivalenzpunkt

$q_a = 0.5$ , d. h.  $c_A^0 = c_B^0$

b)  $p_b \equiv \frac{K^{-1}}{c_B^0}$

$q_b \equiv \frac{c_A^0}{c_B^0}$

(scheinbarer) Äquivalenzpunkt

$q_b = 1 + p_b$ , d. h.  $c_A^0 = c_B^0 + K^{-1}$

Für die durch Gl. (2.3-1) eingeführte Variable  $Q$  ergibt sich damit

$Q = \frac{2\sqrt{q_a(1-q_a)}}{1+p_a}$

oder für  $p \rightarrow 0$

$Q_0 = 2\sqrt{q_a(1-q_a)}$

$Q_0 = \frac{2\sqrt{q_b}}{1+q_b}$

Wir definieren  $Q \equiv \sin \alpha$

$\cos \alpha = \sqrt{1 - Q^2}; \quad \tan \alpha = \frac{Q}{\sqrt{1 - Q^2}}; \quad \tan \frac{\alpha}{2} = \frac{1 - \sqrt{1 - Q^2}}{Q}$

und erhalten die unten aufgeführten Funktionen entsprechend den angegebenen Definitionen.  $\alpha$  ist auf den Existenzbereich von  $1/(1+p_a) \geq \sin \alpha \geq 0$  beschränkt.

$1/[p_a(2+p_a)] \geq \tan^2 \alpha \geq 0$ , oder:  $1 + p_a - \sqrt{p_a(2+p_a)} \geq \tan \frac{\alpha}{2} \geq 0$ . d. h.  $\alpha$  erreicht  $\pi/2$  nur für den Grenzfall  $p_a = 0$ .

Dasselbe gilt für den Fall b), wo der Existenzbereich für  $\alpha$  durch  $1/\sqrt{1+p_b} \geq \sin \alpha \geq 0$  gegeben ist.

Die für die Kurvenzüge 1 bis 8 gewählten Parameter lauten:

- |                |                |
|----------------|----------------|
| 1) $p=0$       | 5) $p=10^{-1}$ |
| 2) $p=10^{-4}$ | 6) $p=1$       |
| 3) $p=10^{-3}$ | 7) $p=10$      |
| 4) $p=10^{-2}$ | 8) $p=100$     |

1. Klassische Titrationsfunktion:

a) Definition:

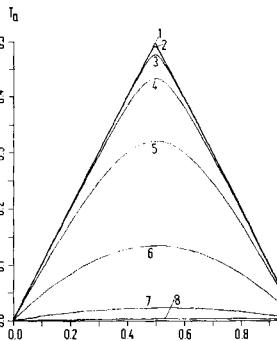
$$T_a = \frac{c_{AB}}{c_A^0 + c_B^0}$$

Ausdruck 1:

$$\frac{1}{2}(1+p_a) \left[ 1 - \sqrt{1 - \frac{4q_a(1-q_a)}{(1+p_a)^2}} \right]$$

Ausdruck II:

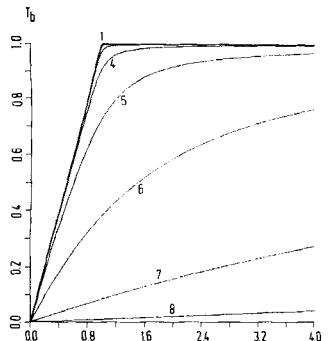
$$(1+p_a) - \frac{\tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 + \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}$$



b)

$$T_b = \frac{c_{AB}}{c_B^0}$$

$$\frac{1}{2}(1+p_b+q_b) \left[ 1 - \sqrt{1 - \frac{4q_b}{(1+p_b+q_b)^2}} \right]$$



2. Steigung der Titrationsfunktion:

a) Definition:

$$\frac{dT_a}{dq_a} \equiv T'_a$$

Ausdruck I:

$$\pm \sqrt{\frac{1}{1+p_a(2+p_a)/(1-2q_a)^2}}$$

Ausdruck II:

$$\pm \sqrt{\frac{1 - p_a(2+p_a)\tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 + p_a}}$$

b)

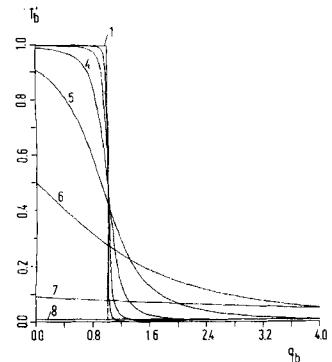
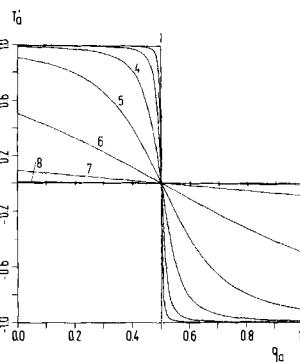
$$\frac{dT_b}{dq_b} \equiv T'_b$$

$$\frac{1}{2} \left[ 1 - \sqrt{1 + \frac{1}{4p_b/(p_b+q_b-1)^2}} \right]$$

Für  $q_b$  und  $p_b \gg 1$  ist die klassische Auftragung von  $T_b$  gegen den Logarithmus der Titrationsvariablen vorteilhaft. Die Steigung, d. h.

$$\theta_b = \frac{d T_b}{d \ln q_b} \sim \frac{q_b/p_b}{(1+q_b/p_b)^2} \quad (\text{für } q_b \text{ und } p_b \gg 1)$$

zeigt bei  $q_b = p_b$  einen Extremwert. (Die Kurve hat eine universelle Standardform, wenn man als Variable  $p_b/q_b$  wählt.)



### 3. Krümmung der Titrationsfunktion:

a) Definition:

$$\frac{d^2 T_a}{dq_a^2} \equiv T_a''$$

Ausdruck I:

$$-\frac{2 p_a (2 + p_a)}{[p_a (2 + p_a) + (1 - 2 q_a)^2]^{3/2}}$$

Ausdruck II:

$$-\frac{2 p_a (2 + p_a)}{(1 + p_a)^3} \left[ \frac{1 + \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)} \right]^3$$

b)

$$\frac{d^2 T_b}{dq_b^2} \equiv T_b''$$

$$-\frac{4 p_b}{[(1 + p_b + q_b)^2 - 4 q_b]^{3/2}}$$

$$-\frac{4 p_b}{(1 + p_b + q_b)^3} \left[ \frac{1 + \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)} \right]^3$$

### 5. Reduzierte Relaxationszeit ( $\tau$ gemäß Gl. 2.2-7)

a) Definition:

$$\tau_a = \tau k_R c_A^0 + c_B^0$$

Ausdruck I:

$$\frac{1}{\sqrt{p_a (2 + p_a) + (1 - 2 q_a)^2}}$$

Ausdruck II:

$$\frac{1}{1 + p_a} \cdot \frac{1 + \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}$$

b)

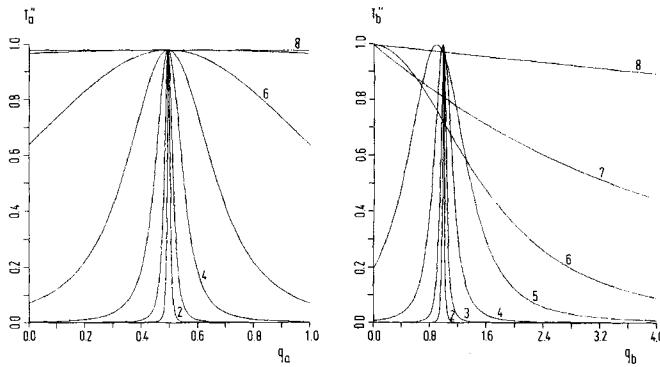
$$\tau_b = \tau k_R c_B^0$$

$$\frac{1}{\sqrt{(p_b + q_b - 1)^2 + 4 p_b}}$$

$$\frac{1}{1 + p_b + q_b} \cdot \frac{1 + \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}$$

Einige Anmerkungen zur Auswertung:

- 1)  $T_a$  und  $T_b''$  weisen stets ein Maximum am Äquivalenzpunkt ( $q_a = 0.5$ ) auf.
- 2) Für  $T_b''$  ergibt sich ein Extremwert nur, wenn  $p_b < 1$ , und zwar an der Stelle  $q_b = 1 - p_b$ .
- 3) Die „Halbsättigung“  $T_b = 1/2$  erscheint immer an der Stelle  $q_b = 1/2 + p_b$ .



### 4. Reduzierte Relaxationsamplituden ( $\Gamma$ gemäß Gl. 2.2-4):

a) Definition:

$$\Gamma_a = \frac{d T_a}{d \ln p_a} = \frac{\Gamma}{c_A^0 + c_B^0}$$

Ausdruck I:

$$\frac{p_a}{2} \left[ \frac{1}{\sqrt{1 - 4 q_a (1 - q_a) / (1 + p_a)^2}} - 1 \right]$$

Ausdruck II:

$$\frac{\operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}$$

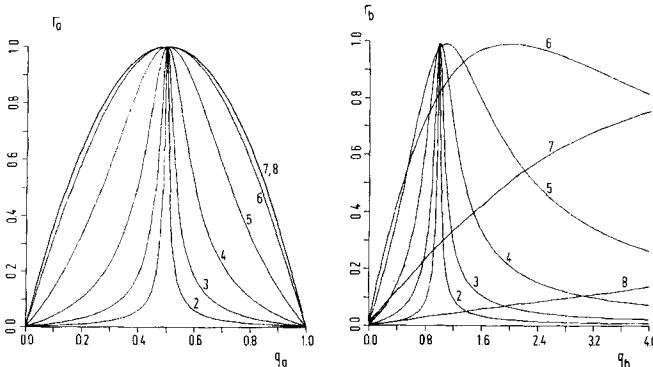
b)

$$\Gamma_b = \frac{d T_b}{d \ln p_b} = \frac{\Gamma}{c_B^0}$$

$$\frac{p_b}{2} \left[ \frac{1}{\sqrt{1 - 4 q_b / (1 + p_b + q_b)^2}} - 1 \right]$$

$$\frac{\operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \operatorname{tg}^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}$$

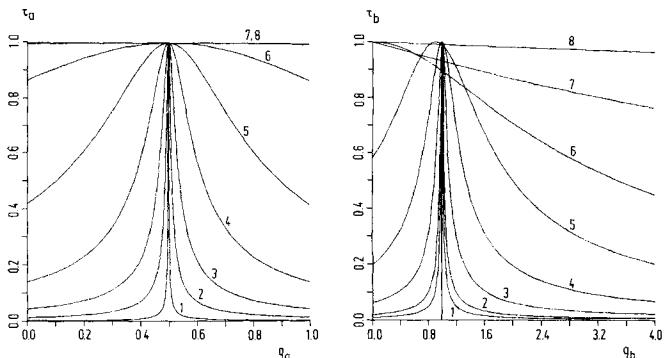
Für den Fall, daß  $p_a$  und  $q_a \gg 1$  sind, zeigen  $\theta_a = d T_a / d \ln q_a$  und  $\Gamma_a = d T_a / d \ln p_a$  analoges Verhalten.



Es ist möglich, eine komplementäre, reduzierte Relaxationszeit zu definieren:

$$\tau^* = \tau k_D = \tau_a p_a = \tau_b p_b = \frac{\Gamma_i}{T_i}$$

( $T_i$  bedeutet  $T_a$  oder  $T_b$ , wenn  $\Gamma_i = \Gamma_a$  bzw.  $\Gamma_b$ )



Einige Anmerkungen für die Auswertung:

- 1) Die Maxima für  $\Gamma_a$  und  $\Gamma_b$  erscheinen immer am Äquivalenzpunkt a)  $q_a = 0.5$  und b)  $q_b = 1 - p_b$ .
- 2) Dasselbe gilt für  $\tau_a$ , während für  $\tau_b$ , aufgrund der Verknüpfung mit  $T_b$ , das Maximum bei  $q_b = 1 - p_b$  auftritt, jedoch nur dann, wenn  $p_b < 1$  ist.
- 3) Methode a) ist für  $p_a \gg 1$  nicht anwendbar, während Methode b) direkt zum Parameter  $p_b$  führt, und zwar aufgrund der Lage des scheinbaren Äquivalenzpunktes  $q_b = p_b$ . Die Funktionen  $\theta_b = d T_b / d \ln q_b$  und  $\Gamma_b = d T_b / d \ln p_b$  zeigen in diesem Fall gleichartiges Verhalten.
- 4) Die Auftragung des reziproken Quadrats der Relaxationszeit gegen die Konzentrationsvariable ergibt eine Gerade, aus der sich die Reaktionsparameter bestimmen lassen.

Das Vorhandensein eines Terms  $[1 - \operatorname{tg}^2(\alpha/2)]^{-1}$  ist für den Grenzfall  $\alpha \rightarrow \pi/2$ , entsprechend  $K \rightarrow \infty$ , gleichbedeutend mit dem Auftreten einer Singularität. Für  $K(c_A^0 + c_B^0) \gg 1$  drückt sich dies in abrupten Änderungen der Funktionswerte aus. Die normierten<sup>[\*]</sup> Relaxationsamplituden und Zeitkonstanten als Funktionen der Titrationsvariablen  $q_a$  sind in dieser Hinsicht besonders charakteristisch. In der Titrationsfunktion hingegen weist erst die zweite Ableitung von  $T_a$  oder  $T_b$  (für  $p_a < 1$ ) ein ähnlich ausgeprägtes Verhalten auf. Für  $K \rightarrow \infty$  zeigen die normierten Kurven von  $\Gamma$ ,  $\tau$  und  $T'$  einen deltafunktionsartigen Verlauf. Eine solche „Endpunkts“-Eigenschaft ist besonders vorteilhaft für Titrationen und ermöglicht in dieser Form zudem eine empfindliche Bestimmung der Stabilitätskonstante  $K$ .

Graphische Darstellungen einiger der in Tabelle 1 zusammengestellten Schlüsselfunktionen finden sich auch in Abbildung 4. Für praktische Anwendungen ist es zweckmäßig, die numerischen Daten aus den angegebenen Funktionen mit dem Computer aufzulisten. Die Illustrationen der Funktions-

[\*] Vgl. Abschnitt 2.4.

verläufe (Abb. 4) lassen die Notwendigkeit exakter Bestimmungen der Konzentrationsvariablen  $q_a$  (oder  $q_b$ ) erkennen und

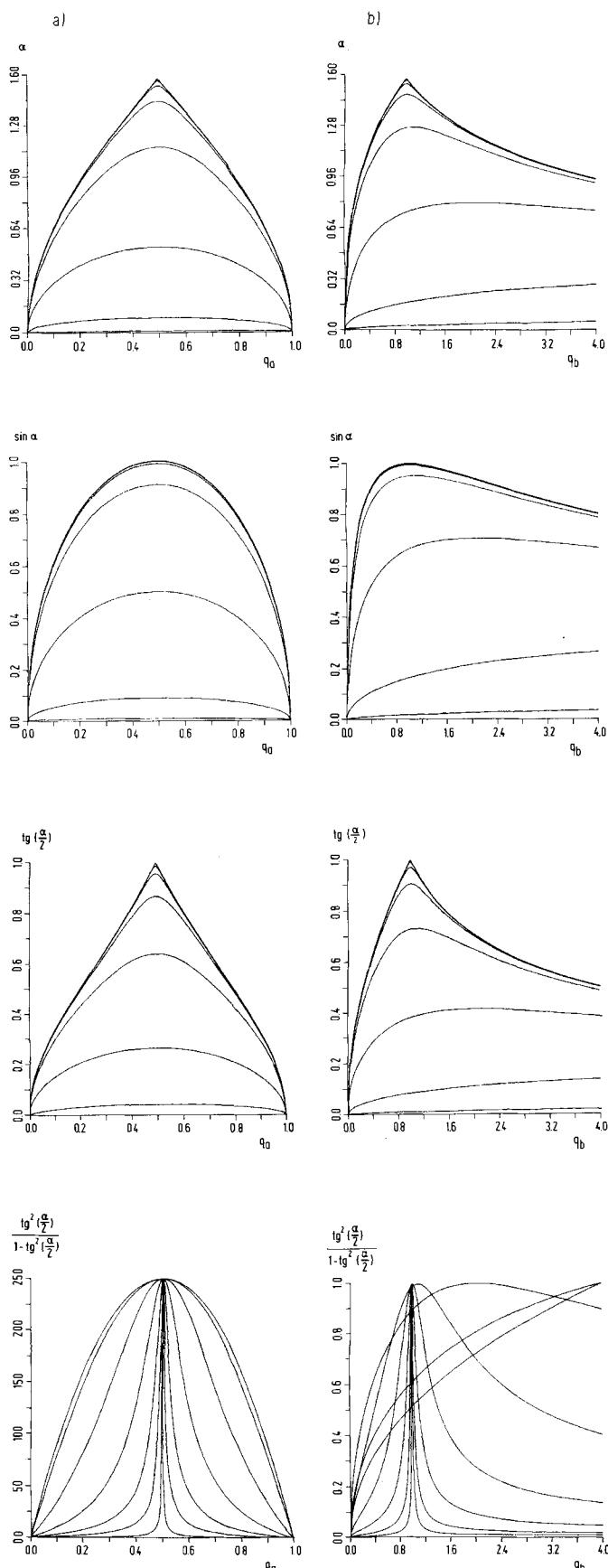


Abb. 4. Einige wichtige Funktionen, die in Tabelle 1a und 1b eingeführt wurden.

weisen insbesondere auf die Bedeutung einer hohen relativen Meßgenauigkeit in der unmittelbaren Umgebung des Äquivalenzpunktes hin.

Vergleichen wir die beiden Alternativen a)  $c_A^0 + c_B^0 = \text{const.}$  und b)  $c_B^0 = \text{const.}$  miteinander, so wird im Fall a) der Vorteil der Erhaltung der Symmetrie erkennbar. Methode b) entspricht dem klassischen Verfahren, bei dem eine unbekannte Konzentration  $c_B^0$  mit einem Standard A von bekannter Konzentration  $c_A^0$  titriert wird. Diese Methode wird auch für die Bestimmung der Stabilitätskonstante des Reaktionsproduktes AB verwendet. Solange die inverse Stabilitätskonstante größer oder gleich der Probenkonzentration ist, erweist sich dieses Verfahren als unkompliziert. Es wird jedoch in zunehmendem Maße unbrauchbar, sobald  $K^{-1} \ll c_B^0$  wird. Unter solchen Umständen bietet die alternative Methode a) Vorteile, setzt allerdings die genaue Kenntnis beider Konzentrationen  $c_A^0$  und  $c_B^0$  voraus (denn ihre Summe muß ja konstant gehalten werden). Können die beiden Konzentrationen unabhängig voneinander eingestellt werden, so geht man zweckmäßig von zwei Stammlösungen gleicher Konzentration ( $c_A^0 = c_B^0$ ) aus und variiert einfach die Volumenverhältnisse der beiden Lösungen. Die Gesamtzahl der Teilchen (A plus B) in einem vorgegebenen Volumenelement ist dann bei allen möglichen Zusammensetzungen die gleiche, sieht man von nicht-additiven Effekten ab, die sich im allgemeinen erst bei höheren Konzentrationen bemerkbar machen.

Die Verfahrensweise a) wurde von Job<sup>[6]</sup> als *Methode der kontinuierlichen Variation* in die Komplexometrie eingeführt. Eine kritische Übersicht über verwandte Techniken und die dazugehörige Literatur ist in einer Monographie von F. J. C. und H. Rossotti<sup>[7]</sup> zu finden. In Verbindung mit Relaxationsuntersuchungen halten wir gerade diese Methode für vielversprechend. In der trigonometrischen Darstellung kommt die Symmetrierelation besonders klar zum Ausdruck, wobei sich eine sehr nützliche Beziehung zwischen Relaxationsamplitude und Relaxationszeit ergibt, die für den Fall b) nicht existiert. Aus den in Tabelle 1 mitgeteilten Ausdrücken folgt

$$\tau_a = \frac{1}{1 + p_a} + \frac{2\Gamma_a}{p_a(1 + p_a)} \quad (2.3-2)$$

oder

$$\tau = \frac{1}{k_R(c_A^0 + c_B^0 + K^{-1})} + \frac{2}{k_R(c_A^0 + c_B^0 + K^{-1})K^{-1}\Delta Z} (\Gamma \Delta Z) \quad (2.3-3)$$

Im Experiment variiert man zweckmäßigerweise  $q_a$  bei konstant gehaltener Summe ( $c_A^0 + c_B^0$ ) und trägt anschließend die jeweils gemessene Relaxationszeit gegen die dazugehörige Relaxationsamplitude auf, die das Produkt von  $\Gamma_a$  und  $\Delta H$  oder  $\Delta V$  enthält [die Größe  $(\Gamma \Delta Z)$  in Gl. (2.3-3) ist als Amplitudenfaktor direkt meßbar]. Der Ordinatenabschnitt der Geraden (vgl. Abb. 5) entspricht dem reziproken Wert von  $k_R(c_A^0 + c_B^0 + K^{-1})$ . Messungen bei verschiedenen Werten der Summe ( $c_A^0 + c_B^0$ ) gestatten somit eine getrennte Bestimmung sämtlicher Parameter. Die Eleganz dieser Methode liegt vor allem darin, daß die Werte für  $k_R$ ,  $(k_D)$ ,  $K$  und  $\Delta H$  bzw.  $\Delta V$  alle direkt aus einer Schar einfacher Kurven gewonnen werden, die aus der gegenseitigen Auftragung der beiden von den Experimenten jeweils gelieferten Meßwerte (nämlich Amplitude und Relaxationszeit) resultieren.

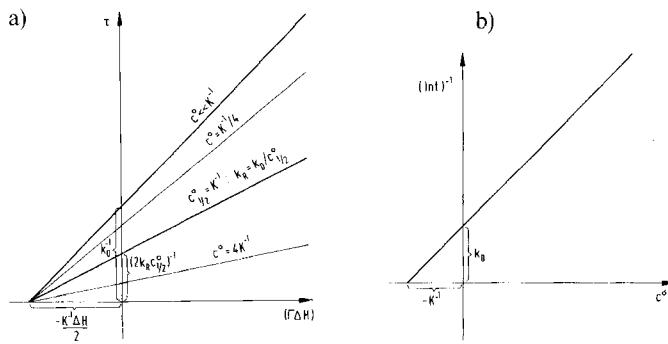


Abb. 5. a) Die Relaxationszeit  $\tau$  als Funktion des Amplitudenfaktors  $\Gamma \Delta H$  bei konstantem  $c^0 = c_A^0 + c_B^0$ .

Beide Größen ( $\tau$  und  $\Gamma \Delta H$ ) können aus den experimentellen Daten ermittelt werden. Mindestens zwei Meßreihen mit unterschiedlichem  $c^0$  sind notwendig. Innerhalb jeder Meßreihe ist  $c^0 = c_A^0 + c_B^0$  konstant, während das Verhältnis  $c_A^0/c^0$  verändert wird. Aus den Steigungen und Achsenabschnitten der Geraden können die Parameter  $k_R$ ,  $k_D$ ,  $K$  und  $\Delta H$  ermittelt werden. Wenn  $K^{-1}$  klein oder groß im Vergleich zu  $c^0$  ist, ergibt der Ordinatenabschnitt  $k_R \cdot c^0$  bzw.  $k_R \cdot K^{-1} \equiv k_D$ . Die Kombination mit dem Absolutbetrag von  $\tau$  bei einem vorgegebenen Verhältnis  $c_A^0/c^0$  liefert die andere Geschwindigkeitskonstante und damit  $K$ , während  $\Delta H$  aus dem Abszissenabschnitt erhalten wird. Die Konzentration  $c_{1/2}^0$  ergibt sich aus dem Halbwert der Steigung. Es gilt  $c_{1/2}^0 \equiv K^{-1}$ .

b) Auftragung der aus Abb. 5a entnommenen reziproken Ordinatenabschnitte  $(\text{Int})^{-1}$  als Funktion der Konzentration  $c^0$ .

Der Vorteil der dynamischen gegenüber den statischen Titrationstechniken wird beim Studium mehrstufiger Reaktionsvorgänge besonders augenscheinlich. Betrachten wir hierzu ein System von konsekutiven Reaktionsschritten, wie es für die Bindung von Substratmolekülen an ein Enzym, das in verschiedenen Konformationen vorliegen kann, typisch ist:



Die klassische Titrationsprozedur liefert hier lediglich eine „Gesamtbindungskonstante“  $\bar{K}$

$$\bar{K} = \frac{c_{AB_1} + c_{AB_2}}{c_A \cdot c_B} \quad (2.3-5)$$

Nur die dynamische Methode kann zwischen den Konstanten

$$K_1 = \frac{c_{AB_1}}{c_A \cdot c_B}; \quad K_2 = \frac{c_{AB_2}}{c_{AB_1}} \quad (2.3-6)$$

unterscheiden, die den beiden verschiedenen Reaktionsschritten zuzuordnen sind und die in der Gesamt-Bindungskonstante als zusammengesetzter Term erscheinen.

$$\bar{K} = K_1(1 + K_2) \quad (2.3-7)$$

In diesem System können zwei Relaxationszeiten ( $\tau_I$  und  $\tau_{II}$ ) gemessen werden, die beide konzentrationsabhängig sind. Summe und Produkt dieser reziproken Relaxationszeiten,  $1/\tau_I + 1/\tau_{II}$  und  $1/\tau_I \cdot 1/\tau_{II}$ , lassen sich explizit durch die Titrationsvariablen  $q_a = c_A^0/(c_A^0 + c_B^0)$  oder  $q_b = c_A^0/c_B^0$  ausdrücken, wobei die Summe der Spur und das Produkt der Determinante der Matrix der vier Geschwindigkeitskonstanten entsprechen. Beide Funktionen durchlaufen, sofern A und B einen 1:1-Komplex bilden, bei  $q_a = 0.5$  oder  $q_b = 1 - p_a$  ein scharfes Maximum. Auf diese Weise kann auch die Zahl der Bindungsplätze bestimmt werden. Die Analyse der Kurven liefert die vier

Geschwindigkeitskonstanten, mit denen sich wiederum die einzelnen Gleichgewichtsparameter berechnen lassen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2. 1:1-Komplexbildung mit einer angekoppelten Umwandlung erster Ordnung.

Reaktionsschema:



Beide Reaktionen ergeben Titrationskurven, die formal mit den in Tabelle 2 diskutierten identisch sind und die sich auf die Gleichgewichtskonstante  $K$  für das Gesamtsystem beziehen:

1) $K = \frac{c_{AB_1} + c_{AB_2}}{c_A \cdot c_B} = K_1(1 + K_2)$ $K_1 = \frac{c_{AB_1}}{c_A \cdot c_B} = \frac{k_R}{k_D}$ $K_2 = \frac{c_{AB_2}}{c_{AB_1}} = \frac{k_{12}}{k_{21}}$	2) $K = \frac{c_{A_1 B}}{c_B(c_{A_1} + c_{A_2})} = \frac{K_1}{1 + K_2}$ $K_1 = \frac{c_{A_1 B}}{c_{A_1} \cdot c_B} = \frac{k_R}{k_D}$ $K_2 = \frac{c_{A_2}}{c_{A_1}} = \frac{k_{12}}{k_{21}}$
--	---

$T_I$  und  $T_{II}$  können in expliziter Form angegeben werden. Es gelten folgende Mengenerhaltungsgleichungen:

1) $c_A + c_{AB_1} + c_{AB_2} = c_A^0$ $c_B + c_{AB_1} + c_{AB_2} = c_B^0$	2) $c_{A_1} + c_{A_1 B} + c_{A_2} = c_A^0$ $c_B + c_{A_1 B} = c_B^0$
---	---

Jedes der beiden Reaktionsschemata ist durch zwei Relaxationszeiten gekennzeichnet. Diese können aus den linearisierten Geschwindigkeitsgleichungen durch Normalmodenanalyse entsprechend Lit. [5] erhalten werden. Summe und Produkt der Relaxationszeiten als Funktion der Einwaagekonzentrationen, Gleichgewichtskonstanten und Geschwindigkeitskonstanten ergeben sich zu:

1) $X = \frac{1}{1/\tau_I + 1/\tau_{II}}$ $Z = \frac{1}{1/\tau_I \cdot 1/\tau_{II}}$	2) $X' = \frac{1}{1/\tau_I + 1/\tau_{II}}$ $Z' = \frac{1}{1/\tau_I \cdot 1/\tau_{II}}$
---	---

mit den Konstanten:

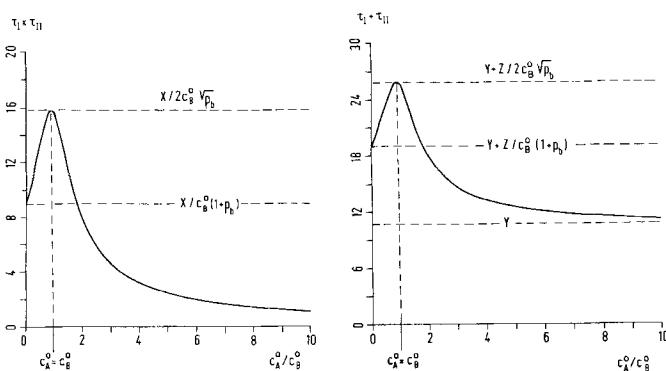
1) $X = [k_R(k_{12} + k_{21})]^{-1}$ $Y = (k_{12} + k_{21})^{-1}$ $Z = k_R^{-1} + (k_{12} + k_{21})^{-1} K_2 R^{-1}$	2) $X' = k_R \cdot k_{21}$ $Y' = k_R \cdot \frac{1 + K_2}{1 + K_2}$ $Z' = k_D + k_{12} + k_{21}$ (für $c_A^0 = c_B^0$ ) Falls $c_A^0 \neq c_B^0$ , muß der Term $-k_R \frac{K_2/2}{1 + K_2} (c_A^0 - c_B^0)$ zu $Z'$ addiert werden. $R^{-1} = \frac{k_D k_{12} + k_{21}}{k_R} = k_D(k_{12} + k_{21})/X'$
--	---

Für die Auswertung kann derselbe Weg wie in Tabelle 1 eingeschlagen werden, indem man die Variablen  $q_a = c_A^0/(c_A^0 + c_B^0)$  (für  $c_A^0 + c_B^0 = \text{const.}$ ) oder  $q_b = c_B^0/c_A^0$  (für  $c_A^0 = \text{const.}$ ) und entsprechend  $p_a = R^{-1}/(c_A^0 + c_B^0)$  oder  $p_b = R^{-1}/c_A^0$  einführt. Der Bindungsparameter  $p$  ergibt sich unmittelbar aus der Form der  $\tau_I \cdot \tau_{II}$ -Kurve. Sodann können die Wurzausdrücke berechnet und als Variable für die reziproke Auftragung zur Ermittlung von  $\tau_I + \tau_{II}$  verwendet werden. Im Falle 2) erscheint ein zusätzlicher Konzentrationsfaktor in Z, falls  $c_A^0 \neq c_B^0$  ist. Es ist daher empfehlenswert, die Bedingung  $c_A^0 = \text{const.}$  lediglich

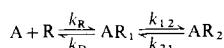
für die Bestimmung von  $K$  aus der Gleichung für  $\tau_1 \cdot \tau_{II}$  zu verwenden, und dann für die Berechnung der Summe von  $\tau_1$  und  $\tau_{II}$  auf die Bedingung  $c_A^0 = c_B^0$  umzuschwenken. Schwierigkeiten dieser Art treten im Fall 1) nicht auf. Wenn einer der beiden Reaktionsschritte schnell im Vergleich zum anderen ist, erhält man separate Gleichungen für  $\tau_1$  und  $\tau_{II}$ . Ist dabei der erste Schritt der schnelle, so können allerdings die beiden diese Stufe kennzeichnenden Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung nicht mehr separiert werden, da sie als Summenterm auftreten, der keine Konzentrationsabhängigkeit enthält.

Das hier angedeutete Konzept kann auf das Schema einer beliebigen Sequenz von Reaktionsschritten erster Ordnung erweitert werden. Die Gauß-Methode für die Darstellung der Kombination von Eigenwerten (wie Summe und Produkt im Fall von zwei Zeitkonstanten) durch die Koeffizienten des charakteristischen Polynoms ermöglicht die direkte Ermittlung der Parameter für die einzelnen Reaktionsschritte. Beispiele für zweistufige Reaktionssysteme werden in Abschnitt 2.3 und 4.2 diskutiert.

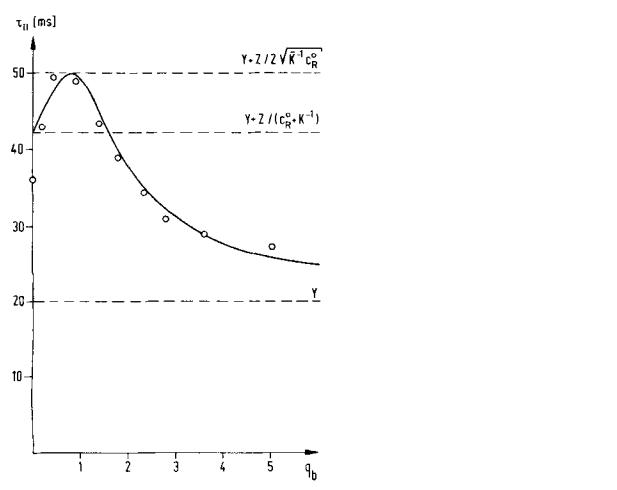
Schematische Kurvenzüge für Produkt und Summe der Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_{II}$  sind hier für den Fall 1) aufgezeichnet. Die Parameter X, Y und Z sind weiter oben in Tabelle 2 definiert. Beide Auftragungen entsprechen der Annahme, daß  $p_b = K/c_B^0 = 10^{-2}$  ist.



Beispiel für die Auswertung gemessener Relaxationszeiten  $\tau$  [14]. Es handelt sich um den Prozeß der Bindung von Acetylcholin (A) an seinen Rezeptor (R), der in zwei verschiedenen Konformationen vorliegt, und zwar entsprechend:



Zwei diesem Reaktionsschema zugehörige Relaxationszeiten konnten gemessen werden. Diese konnten wegen  $\tau_1 \ll \tau_{II}$  ohne weiteres separiert werden. Hier ist lediglich  $\tau_{II}$  als Funktion von  $q_b = c_B^0/c_A^0$  aufgetragen. Als Folge der Bedingung  $\tau_1 \ll \tau_{II}$  ist Z durch  $K^{-1} \cdot K_2 \cdot Y$  gegeben (siehe Mechanismus 1). Werte für  $k_R$  und  $k_D$  (und damit auch für  $K_1$ ) konnten unmittelbar den Meßdaten für  $\tau_1$  entnommen werden. Somit war die vollständige Zuordnung aller vier Geschwindigkeitskonstanten (und damit auch sämtlicher Gleichgewichtskonstanten) möglich. Die Werte lauten:  $k_R = 2.4 (\pm 0.5) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_D = 144 (\pm 30) \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{12} = 43.5 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{21} = 6.5 \text{ s}^{-1}$  ( $K_1 = 1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_2 = 6.7$ ).



Das hier angeführte Beispiel läßt sich auf jede beliebige Folge von Reaktionsschritten 1. Ordnung erweitern, indem

man die Gaußsche Methode der Verknüpfung von Kombinationen verschiedener Eigenwerte mit den Koeffizienten des charakteristischen Polynoms verwendet. Im Fall  $K \gg 1$  besitzen einige dieser Kombinationen ein scharfes Maximum am Äquivalenzpunkt. Das dynamische Titrationsverfahren erlaubt hier einen sehr viel tieferen Einblick in die Bindungsmechanismen als irgendeine der klassischen komplexometrischen Techniken.

## 2.4. Auswertung von Meßdaten und einige experimentelle Beispiele

Der Absolutwert einer Relaxationsamplitude hängt von der im Parameter  $p_a$  zum Ausdruck kommenden relativen Größe des Massenwirkungsparameters ab. Bei *hohen Komplexstabilitäten*, die sich in kleinen  $p_a$ -Werten äußern, wird sowohl bei der klassischen Titrationsmethode als auch bei den Relaxationsmessungen eine hohe Auflösung für das Meßsignal verlangt. Es besteht jedoch ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Verfahren. Die *konventionelle Titration* fordert eine *hohe relative Genauigkeit* für die Bestimmung der Konzentrationen, denn die gewünschte Information ist in (kleinen) Abweichungen von der Standardkurve verborgen. Der relative Fehler läßt sich durch eine Signalverstärkung nicht verringern, es sei denn, man verwendet eine Methode, die die unmittelbare Registrierung eines zweifach differenzierten Signals gestattet, also die direkte Aufzeichnung der zweiten Ableitung der Titrationsfunktion. Die Relaxationsamplituden und Relaxationszeiten sind dagegen in viel direkterer Weise mit  $p_a$  oder  $K$  verknüpft. Hier ist die *absolute Größe* des Signals von Bedeutung. Geht  $p_a$  gegen Null, nimmt auch die Amplitude entsprechend ab. Eine Verstärkung des Signals führt hier jedoch zu einer echten Verbesserung der Auflösung, die letztlich nur noch vom Rauschen des Registrierprozesses begrenzt wird.

Bei der Entwicklung der Relaxations-Meßverfahren wurden in den letzten Jahren beträchtliche Fortschritte gemacht. Die Amplitudentechnik verspricht somit, ein neues wirksames Instrument für die analytische Chemie zu werden. Auf die Möglichkeit für derartige Anwendungen wurde schon früher hingewiesen. Tatsächlich begannen auch unsere ersten Untersuchungen von chemischen Relaxationsphänomenen<sup>[8, 9]</sup> mit einer quantitativen Abschätzung der Amplituden und deren Konzentrationsabhängigkeit. Eine Auswertung der Relaxationsamplituden war allerdings bis jetzt wegen der ungenügenden Empfindlichkeit der älteren Gerätegeneration nur beschränkt möglich. Die Kombination der zur Zeit verfügbaren Relaxationstechniken mit Einrichtungen für eine automatische Kontrolle der Konzentrationen wird ein weites Anwendungsfeld auf dem Gebiet der Komplexometrie eröffnen<sup>[\*]</sup>.

Die wesentliche Information über die Größe der Stabilitätskonstante erhält man eher aus der *Kurvenform* der Funktionen  $T'$ ,  $\Gamma$  und  $\tau$  (bezogen auf die Titrationsvariable  $q_a$ ) als aus den entsprechenden *Absolutwerten*. Für die Auswertung der Daten empfiehlt es sich, diese Kurven zu *normieren* (d.h. sie durch den Maximalwert zu dividieren). Normierte Funktionen sind von den reduzierten – wie sie in Tabelle 1 angegeben sind – zu unterscheiden. Die *reduzierten* Ausdrücke enthalten noch den unbekannten Faktor  $p_a$  oder bestimmte  $p_a$ -abhängige Terme. Abgesehen davon ist die reduzierte Form von  $\Gamma$  nicht

[\*] Bisher sind nur wenige Verfahren dieser Art bekannt, vgl. [1, 10–12].

direkt messbar, da die Relaxationsamplituden auch noch  $\Delta H$  oder  $\Delta V$  enthalten. Die normierten Werte dagegen können direkt aus den experimentellen Daten gewonnen werden, indem man sie durch den Maximalwert dividiert; sie geben dann nicht mehr die absolute Größe des Meßsignals wieder. Die Anpassung an die theoretischen Kurven (Tabelle 1) gestattet eine Bestimmung des Parameters  $p_a$  (oder  $K$ ). Erst eine weitere Auswertung der absoluten Meßwerte ermöglicht auch die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten, Reaktionsenthalpien usw.

Als Beispiel wollen wir ein Temperatursprung-Experiment betrachten. Im allgemeinen wird hier ein optisches Signal registriert, das die durch die Störung des Gleichgewichts hervorgerufene Änderung der Extinktion wiedergibt. Bei bekannter Störung, d.h. bei einem  $T$ -Sprung genau vorgegebener Größe, und bei bekannter Charakteristik des Detektionssystems kann die Amplitude des Relaxationseffektes mit der Konzentrationsverschiebung  $\delta c_{AB}$  korreliert werden, vorausgesetzt, daß man die Differenz der Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{AB} - \epsilon_A - \epsilon_B$ ) kennt. Die unbekannten Faktoren der gemessenen Amplituden sind  $\Gamma$  oder  $p_a$  und  $\Delta H$ . Ist  $p_a$  mittels der Anpassung an die normierte Kurve ausgewertet worden, so läßt sich aus dem Absolutwert der Kurve im Maximum auch  $\Delta H$  bestimmen. Die Konzentrationsänderung  $\delta c_{AB}$  nimmt im Maximum den folgenden Wert an:

$$\text{für (a)} \quad (c_A^0 + c_B^0) \frac{p_a}{2} \left[ \frac{1 + p_a}{\sqrt{p_a(2 + p_a)}} - 1 \right] \frac{\Delta H}{RT} \cdot \frac{\delta T}{T} \quad (2.4-1)$$

$$\text{und für (b)} \quad c_B^0 \frac{p_b}{2} \left[ \sqrt{1 + \frac{1}{p_b}} - 1 \right] \frac{\Delta H}{RT} \cdot \frac{\delta T}{T} \quad (2.4-2)$$

[a) sowie b) analog zu Tabelle 1]. Beide Ausdrücke reduzieren sich für  $p_a \rightarrow 0$  auf den gleichen Grenzwert

$$\frac{1}{2} \sqrt{K^{-1} c_B^0} \frac{\Delta H}{RT} \cdot \frac{\delta T}{T} \quad (2.4-3)$$

In ähnlicher Weise können auch die Relaxationszeiten analysiert werden. Man trägt  $\tau/\tau_{\max}$  als Funktion von  $q_a$  auf, wobei  $\tau_{\max}$  durch

$$\text{a)} [k_R(c_A^0 + c_B^0) \sqrt{p_a(2 + p_a)}]^{-1} \quad (2.4-4)$$

bzw.

$$\text{b)} [2 k_R c_B^0 \sqrt{p_b}]^{-1} \quad (2.4-5)$$

gegeben ist. Im Hinblick auf eine Bestimmung von  $k_R$  und  $k_D$  ist dieser Weg als Alternative zur Auftragung von  $1/\tau^2$  als Funktion von  $c^0$  (Abbildung 2b, 3. Diagramm von oben) anzusehen, was nur dann sinnvoll ist, wenn die Nebenbedingung  $c_A^0 = c_B^0$  erfüllt ist. Für eine Auswertung von  $T''$ , der zweiten Ableitung der Titrationsfunktion, braucht man nicht normierte Kurven heranzuziehen, da hier  $p_a$  die einzige Unbekannte ist, die sowohl Gestalt als auch Maximalwert der Kurve festlegt. Normierung kann jedoch in solchen Fällen von Vorteil sein, in denen  $T''$  mit einer Differentialmethode direkt gemessen wird und die registrierten Meßwerte noch unbekannte Faktoren enthalten. Das Maximum der Funktion  $T''$  ist durch

$$\text{a)} - \frac{2}{\sqrt{p_a(1 + p_a)}} \xrightarrow{p_a \rightarrow 0} -2\sqrt{K c_B^0} \quad (2.4-6)$$

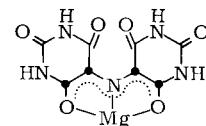
bzw.

$$\text{b)} - \frac{1}{2\sqrt{p_b(1 + p_b)^3}} \xrightarrow{p_b \rightarrow 0} -\frac{1}{2}\sqrt{K c_B^0} \quad (2.4-7)$$

gegeben. Für  $T''$  ergibt sich ein Maximum – übrigens genau wie bei  $\tau_b$  – nur im Fall  $p_b < 1$ , es erscheint dann bei  $q_b = 1 - p_b$ .

Wir beschließen diesen Abschnitt über 1:1-Komplexbildung mit der Diskussion einiger Beispiele experimentell bestimmter Relaxationsamplituden und Zeitkonstanten sowie der Auswertung der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtsparameter.

Als erstes Beispiel wird die Bildung eines Metallkomplexes<sup>[11]</sup> aus  $Mg^{2+}$  und dem Anion der Purpursäure (Murexid) in Methanol behandelt.



Die Daten für die Bestimmung der Stabilitätskonstante stammen aus drei voneinander unabhängigen Quellen: der (klassischen) Titrationskurve, den Relaxationsamplituden und den Zeitkonstanten. In Abbildung 6 sind einige Oszillogramme der Relaxationseffekte wiedergegeben. Aus diesen Bildern wird deutlich, warum der gesamte zeitliche Verlauf des Signals aufgezeichnet werden muß. Die zeitliche Extinktionsänderung besteht aus zwei Abschnitten: einer „nahezu trägeheitslosen“ Verschiebung, die im wesentlichen durch die thermische Ausdehnung verursacht wird, und einem chemischen Relaxa-

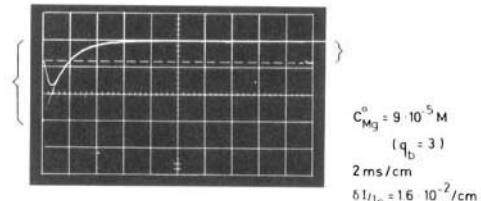
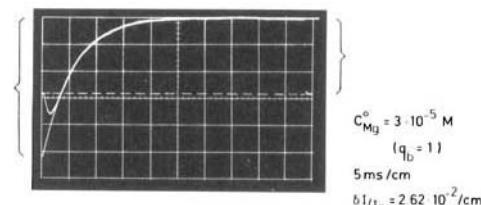
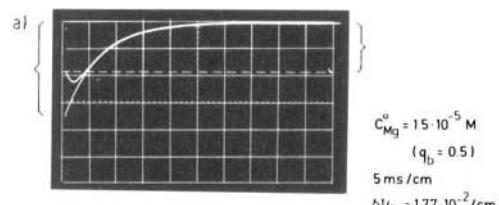
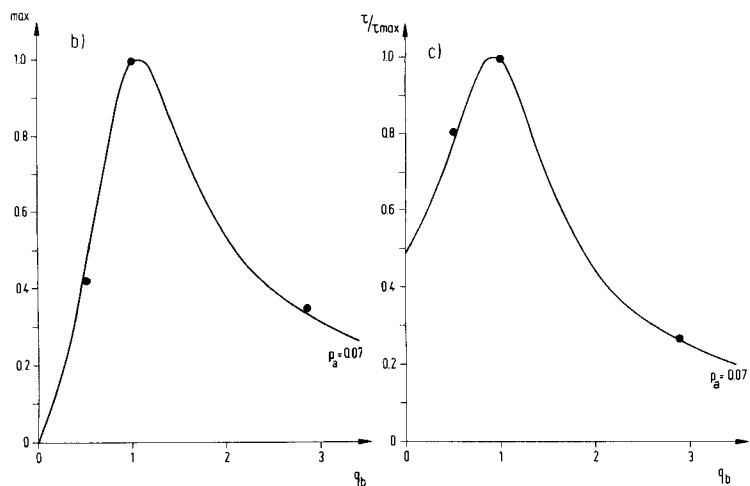


Abb. 6. a) Relaxationskurven aus Temperatursprung-Experimenten (Oszillogramme) am System  $Mg$ -Murexid in Methanol;  $c_{Mg}^0 = 2.9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . Man beachte die verschiedenen Empfindlichkeiten  $\delta I/I_0$ . Das mittlere Oszillogramm hätte bei gleichen Empfindlichkeiten der Registrierung eine fast doppelt so große Amplitude. Die wahren Amplituden, wie sie aus der Extrapolation der Relaxationskurven resultieren (siehe Klammern am linken Rand der Bilder) unterscheiden sich erheblich von den aus Anfangs- und Endwerten resultierenden „statischen“ Verschiebungen (siehe Klammern am rechten Rand der Bilder). Die Basislinie (gestrichelt) gibt den Ausgangspunkt der durch den Temperatursprung induzierten Konzentrationsverschiebung an.

Wasser an 4-Pyridincarbaldehyd. Der Mechanismus dieser Reaktion wurde von Schuster et al.<sup>[13]</sup> eingehender untersucht.

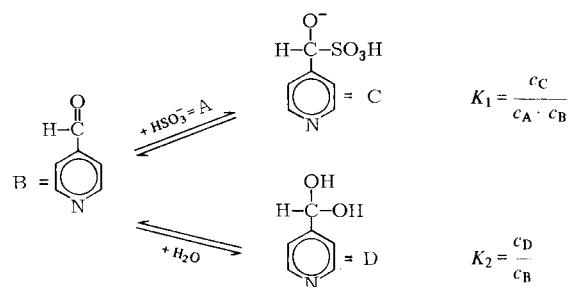


b) Normierte Relaxationsamplituden als Funktion der Titrationsvariablen  $q_b$ . (Experimentelle Werte aus [1].)  
c) Normierte Relaxationszeiten als Funktion der Titrationsvariablen  $q_b$ . (Experimentelle Werte aus [1].)  
Die Auswertung der Daten mit  $c_{\text{Mo}}^0 = 4,2 \times 10^{-5} \text{ M}$  ergibt:  $K = 3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ;  $k_R = 8,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_D = 23 \text{ s}^{-1}$ ;  $\Delta H = +7,3 \text{ kcal/mol}$ .

tionsanteil mit einer endlichen, d.h. meßbaren Zeitkonstante. Der chemische Effekt, der die Grundlage für die Auswertung von  $\Gamma$  bildet, könnte daher mit einer statischen Methode nicht direkt bestimmt werden. Die einfache statische Messung der Temperaturabhängigkeit würde aufgrund der Überlagerung des Ausdehnungseffektes zu fehlerhaften Aussagen führen.

Die Empfindlichkeit der differentiell registrierenden Technik ist sehr hoch. Konventionelle Spektralphotometer, die das Verhältnis zweier Intensitäten aufzeichnen, besitzen keine annähernd vergleichbare Auflösung. Die Relaxationsamplituden und Zeitkonstanten sind in normierter Form in den Abbildungen 6b und 6c aufgeführt.

Als zweites Beispiel sei ein Reaktionsablauf beschrieben, bei dem zwei Prozesse miteinander konkurrieren, und zwar die Addition von Schwefeliger Säure sowie die Addition von



Die Gesamtgleichgewichtskonstante für die Komplexbildung ist durch  $K = K_1/(1 + K_2)$  gegeben.

Die Ergebnisse beziehen sich allein auf die Reaktion des Pyridincarbaldehyds mit der Schwefeligen Säure, da die Bildung des Hydrats sehr viel langsamer erfolgt. Abbildung 7 zeigt die normierten Amplituden  $\Gamma_b$  (aus T-Sprung-Experimenten) als Funktion von  $q_b = c_A^0/c_B^0$  (wobei nur der erste Schritt berücksichtigt ist).

### 3. Substitutionsverfahren

Die Anwendbarkeit der in Abschnitt 2 vorgestellten Titrationsprinzipien beruht im wesentlichen auf zwei Voraussetzungen:

Es tritt eine registrierbare Veränderung von Meß-Parametern wie Extinktion, Fluoreszenz etc. infolge der Kombination von A mit B auf;  
die Stabilitätskonstante des Komplexes AB ist von einer Größenordnung, die die Bildung eines meßbaren Signals zuläßt.

Was kann getan werden, wenn diese Bedingungen nicht erfüllt sind?

Es gibt die Möglichkeit, ein Hilfssystem einzusetzen, z.B. einen Indikator, der mit einem der beiden Reaktionspartner (A oder B) eine Bindung eingeht, dabei spezifische optische (oder andere) Veränderungen induziert und auf diese Weise das Fehlen beobachtbarer Meßgrößen im System ausgleicht. Eine wesentliche Voraussetzung der Methode ist: Die Stabilität der Bindung eines solchen Konkurrenten muß von ähnlicher Größenordnung sein wie die des zu untersuchenden Komplexes.

In der Enzymchemie gibt es einen ganz analogen Fall, nämlich den der konkurrierenden Hemmung. Liegen Substrat und Inhibitor in großem Überschuß relativ zum Enzym vor, so erhält man für die Titrationsfunktion sehr einfache Ausdrücke (Abb. 8). Die diesen Ausdrücken zugrundeliegenden Näherungsannahmen werden jedoch in der folgenden Behandlung nicht gemacht.

Als Hilfssystem führen wir den Indikator I ein, der mit einem der Reaktanden, z.B. B, einen Komplex zu bilden vermag



und zwar in Konkurrenz zur Reaktion

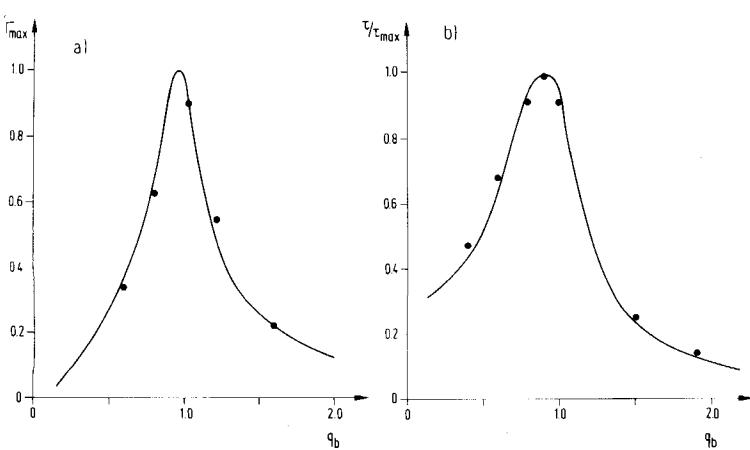
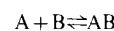


Abb. 7. a) Normierte Relaxationsamplitude ( $\Gamma/\Gamma_{\text{max}}$ ) als Funktion der Titrationsvariablen  $q_b \equiv c_A^0/c_B^0$  für das Sulfit-4-Pyridincarbaldehyd-System (nach [13]). Die Kurve wurde mit  $K_1 = 6,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  und  $c_B^0 = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$  (Hydrogensulfit) angepaßt ( $\text{pH} = 7$ ). Aufgrund der Berücksichtigung des Protonierungsgleichgewichts des Hydrogensulfits erscheint das Maximum nicht exakt bei  $q_b = 1$  (siehe [13]).

b) Normierte Relaxationszeit ( $\tau/\tau_{\text{max}}$ ) als Funktion von  $q_b$  (Daten siehe Abb. 7a).

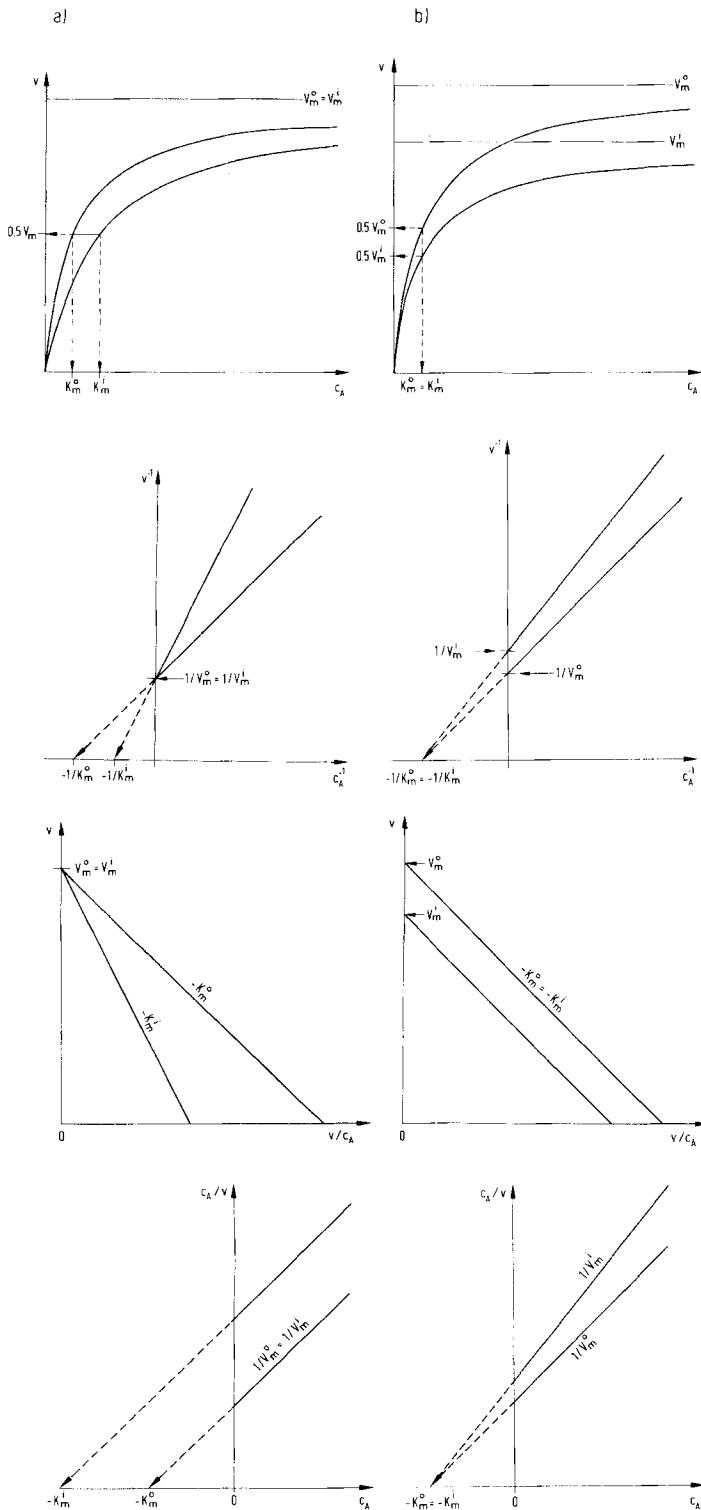


Abb. 8. Einfache lineare – analog zu den in Abbildung 2 angegebenen – Auftragungen für gekoppelte Bindungsprozesse: a) kompetitive Inhibition, b) nicht-kompetitive Inhibition. (Die Daten sind einer Darstellung von Dixon und Webb [3] entnommen.)

Die Diagramme basieren auf der Beziehung (siehe auch Abb. 2a):

$$v = V_m^i c_A / (c_A + K_m^i)$$

wobei  $V_m^i$  und  $K_m^i$  die folgende Bedeutung haben:

a) kompetitiv

$$\begin{aligned} V_m^i &= V_m^0 \\ K_m^i &= K_m^0 (1 + K_i c_i) \end{aligned}$$

b) nicht-kompetitiv

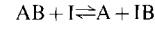
$$\begin{aligned} V_m^i &= V_m^0 / (1 + K_i c_i) \\ K_m^i &= K_m^0 \end{aligned}$$

$K_i$  ist die Stabilitätskonstante für den Enzym-Inhibitor-Komplex,  $c_i$  die Inhibitor-Konzentration;  $V_m^0$  ist die maximale Geschwindigkeit,  $K_m^0$  die Michaelis-Konstante in Abwesenheit des Inhibitors und  $c_A$  die Substratkonzentration.

Eine vollständige Berücksichtigung der dynamischen Eigenchaften erfordert einen Ansatz mit zwei gekoppelten Differentialgleichungen, deren Lösungen dann bestimmten Reaktionsmoden oder Normalvariablen des gekoppelten Systems entsprechen. Für Anwendungen in der Komplexometrie genügt es jedoch, lediglich das Gesamt-Gleichgewicht zu betrachten.

Von besonderem Interesse sind zwei Spezialfälle:

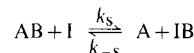
1. Die Stabilität der beiden Komplexe AB und IB ist so groß, daß praktisch kein freies B vorhanden ist. Die Reaktionsgleichung läßt sich dann modifizieren:



2. Das Hilfssystem dient als Indikator, ohne daß das Gleichgewicht der zu untersuchenden Reaktion dabei entscheidend beeinflußt wird. I und IB liegen in diesem Fall in verhältnismäßig kleinen Konzentrationen vor, wobei allerdings gewährleistet sein muß, daß ein optischer oder ein andersartiger Nachweis noch möglich ist. Die Menge von B ist dann von ähnlicher Größenordnung wie die von A und AB.

### 3.1. Vollständiger Austausch eines Liganden B

Der erste der beiden erwähnten Fälle stellt ein echtes einstufiges Reaktionssystem dar.



Wir definieren die dazugehörigen Gleichgewichts- und Geschwindigkeitsparameter:

$$\frac{c_A \cdot c_{IB}}{c_{AB} \cdot c_I} = K = \frac{k_s}{k_{-s}} \quad (3.1-1)$$

Außerdem gelten noch die Erhaltungsbeziehungen

$$\begin{aligned} c_A + c_{AB} &= c_A^0 \\ c_I + c_{IB} &= c_I^0 \\ c_{IB} + c_{AB} &= c_B^0 \end{aligned} \quad (3.1-2)$$

(Man beachte, daß  $c_B$  vernachlässigbar klein ist.)

Mit diesen Gleichungen können wir nun die expliziten Ausdrücke für sämtliche Einzelkonzentrationen im Gleichgewicht berechnen, z. B.

$$c_{IB} = \frac{c_A^0 - c_B^0 + K(c_B^0 + c_I^0)}{2(K-1)} \left[ 1 - \sqrt{1 - \frac{4K(K-1)c_B^0c_I^0}{[c_A^0 - c_B^0 + K(c_B^0 + c_I^0)]^2}} \right] \quad (3.1-3)$$

Die Experimente können auf verschiedenen Wegen ausgeführt werden, z. B.

- man geht von einer vorgegebenen Menge an I (in der nicht-komplexierten Form) aus und gibt definierte Mengen von A und B hinzu, wobei immer  $c_A^0 = c_B^0$  ist;
- man hält die Konzentration von IB konstant (d. h.  $c_I^0 = c_B^0$ ) und variiert die hinzuzufügenden Mengen von (unkomplexiertem) A.

Mathematisch geschen braucht man zwischen diesen beiden Verfahren nicht explizit zu unterscheiden, da das eine aus dem anderen direkt abzuleiten ist. Dies folgt unmittelbar aus

der Symmetrie des Substitutionsverfahrens in bezug auf I und A, deren Konzentrationssymbole ohne weiteres miteinander vertauscht werden können. Unter Verwendung der *Bedingungen* (3.1-2) können wir den Ausdruck (3.1-3) für die Konzentration  $c_{AB}$  umschreiben. Die Ergebnisse beziehen sich dann auf  $c_{IB}$  oder  $c_{AB}$ , vorausgesetzt, daß die zusätzliche Bedingung  $c_A^0 = c_B^0$  erfüllt ist. Die so abgeleiteten Gleichungen sind immer symmetrisch in bezug auf  $c_I^0$  und  $c_B^0$ , d.h. wir können eine der Konzentrationen ändern und die andere konstant halten oder – in Analogie zur Methode a) in Tabelle 1 – die Summe von  $c_I^0$  und  $c_B^0$  konstant halten und das Verhältnis der beiden Konzentrationen variieren.

Es genügt daher, ein einziges Beispiel anzuführen. Wir wählen die Bedingungen

$$c_I^0 = \text{const.}; \quad c_A^0 = c_B^0 = \text{variabel}$$

und definieren als Titrationsvariable  $q_b \equiv c_B^0/c_I^0$  sowie als Titrationsfunktion  $T_b \equiv c_{IB}/c_I^0$ . Der reziproke Wert der (dimensionslosen) Gleichgewichtskonstanten soll entsprechend der Schreibweise in Tabelle 1 mit  $p_b (= K^{-1})$  bezeichnet werden. Daraus resultiert:

$$T_b = \frac{1 + q_b}{2(1 - p_b)} \left[ 1 - \sqrt{1 - \frac{4(1 - p_b)q_b}{(1 + q_b)^2}} \right] \quad (3.1-4)$$

Diese Titrationsfunktion ähnelt einer der schon beschriebenen Funktionen: Bei  $p_b \rightarrow 0$  nähert sie sich der linearen Grenzform:

$$T_b = \frac{(1 + q_b) \pm (1 - q_b)}{2} \quad \text{oder} \quad T_b = \begin{cases} q_b & \text{für } q_b < 1 \\ 1 & \text{für } q_b > 1 \end{cases} \quad (3.1-5)$$

und ändert abrupt ihre Steigung bei  $q_b = 1$ .

Im Falle  $p_b = 1$  lautet die Titrationsfunktion einfach

$$T_b = \frac{q_b}{1 + q_b} \quad (3.1-6)$$

während man im Fall  $p_b \gg 1$  eine weitere Grenzform in bezug auf die verallgemeinerte Variable  $q_b/p_b$  erhält.

$$T_b \rightarrow \frac{q_b}{2p_b} \left[ \sqrt{1 + \frac{4p_b}{q_b}} - 1 \right] \quad (3.1-7)$$

Der Halbwertspunkt für den Übergang ( $T_b = 0.5$ ) wird immer bei  $q_b = (1 + p_b)/2$  erreicht.

Aus diesen Ausführungen wird deutlich, daß die Wahl des günstigsten Titrationsverfahrens sowohl von der Größe des Parameters  $p_b$  als auch vom Ziel des Titrationsexperiments abhängt. Ist das Ziel der Titration, die Konzentration  $c_I^0$  oder  $c_A^0$  einer Probe exakt zu bestimmen, so hält man die Konzentration des schwächeren Komplexpartners konstant und verändert die des stärkeren. In diesem Fall, mit  $p_b \ll 1$ , bekommt man einen gut definierten Endpunkt, der durch eine (Quasi-) Singularität in der Titrationsfunktion (oder  $T_b''$ ) angezeigt wird (genau genommen ist der Übergang nur im Grenzfall  $p_b \rightarrow 0$  singulär). Ist andererseits die Bestimmung von  $K$  oder  $p_b$  das Ziel des Titrationsexperiments, so ist es ratsam, mit dem schwächeren komplexierenden Agens (A) zu titrieren und den für das Erreichen des Halbwertspunktes [bei  $q_b = (1 + p_b)/2$ ] notwendigen Überschuß von  $c_A^0$  über  $c_B^0$  genau zu kalibrieren. Die Substanz, mit der titriert wird, sollte nicht

mit dem Indikator identisch sein, denn ihre Konzentration müßte unter Umständen über mehrere Größenordnungen variiert werden.

Wichtig ist noch, daß man – aufgrund der Symmetrie der Substitutionsreaktion – genausogut eine komplementäre,  $c_{AB}$  (anstelle von  $c_{IB}$ ) berücksichtigende Titrationsfunktion wählen kann. Mit  $T_{-b} = c_{AB}/c_I^0$  erhalten wir  $T_{-b} = q_b - T_b$  und  $T_{-b}' = -T_b'$ ,  $T_{-b}'' = -T_b''$ . Unter Verwendung der Symmetrieeigenschaften von  $T_b$  hinsichtlich  $c_I^0$  und  $c_B^0$  kann außerdem noch die Beziehung  $T_b = c_{IB}/c_B^0$  und folglich  $T_{-b} = c_{AB}/c_B^0 = 1 - T_b$  eingeführt werden. Diese Definition ist vorzuziehen, wenn  $c_A^0 = c_B^0$  konstant gehalten und  $c_I^0$  variiert wird.

Oft ist man in der Wahl der idealen Substanz sehr beschränkt. Von der Titration her gesehen ist die *Löslichkeit* meist der limitierende Faktor. Die alternative „Methode der kontinuierlichen Variation“, bei der die Summe von  $c_I^0$  und  $c_B^0$  (oder  $c_A^0$ ) konstant gehalten wird, bietet in diesen Fällen Vorteile. Die wesentliche Information über die Gleichgewichtskonstante erhält man hier mittels kleiner Variationen von  $p_a$  in der unmittelbaren Umgebung des Äquivalenzpunktes ( $p_a = 0.5$ ).

Ausdrücke für die Titrationsfunktion, deren erste und zweite Ableitung sowie für die Reaktionsamplituden und Zeitkonstanten sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Symbole I und A sind auch hier wegen der Symmetrieeigenschaften des Substitutionsschemas wechselseitig austauschbar. Für eine Darstellung, in der sich die Ausdrücke leicht miteinander vergleichen lassen, ist die Einführung trigonometrischer Funktionen besonders nützlich. Bei dieser Modifikation entsteht jedoch eine formale Schwierigkeit aufgrund der Tatsache, daß der Term  $\sqrt{1 - p_a}$  in allen Ausdrücken auftritt. Da  $p_a$  möglicherweise größer als eins ist, können diese Terme imaginär werden. Wir müssen daher drei Fälle unterscheiden:

$$\begin{aligned} p_a &< 1 \\ p_a &= 1 \\ p_a &> 1 \end{aligned}$$

Für  $p_a < 1$  kann  $\sin \alpha$  in der gleichen Weise wie in den vorangehenden Abschnitten verwendet werden. Im Fall  $p_a > 1$  jedoch müssen alle trigonometrischen Funktionen durch die entsprechenden hyperbolischen Terme ersetzt werden, weil  $-i \sin(ix) \equiv \operatorname{sh}x$  [ $\operatorname{sh}x = \sinh x = (e^x - e^{-x})/2$ ]. Tabelle 3 zeigt, daß zwischen den Ausdrücken für  $p_a < 1$  und  $p_a > 1$  nur *formale* Übereinstimmung besteht. Obwohl die Form nach Substitution der trigonometrischen Terme durch die hyperbolischen (nahezu) erhalten bleibt, ändern sich die funktionalen Zusammenhänge in bezug auf  $q_a$  und  $p_a$  beträchtlich. Für  $p_a < 1$  variiert der Winkel  $\alpha$  zwischen 0 und  $\pi/2$  (wobei der Wert  $\pi/2$  nur im Grenzfall  $p_a \rightarrow 0$  erreicht wird). Während für  $p_a > 1$  der Winkel  $\alpha$  jeden beliebigen Wert annehmen kann, z.B. beliebige Vielfache von  $\pi/2$  mit dem Grenzwert  $\infty$  im Fall  $p_a \rightarrow \infty$ . Wenn  $p_a$  gegen Null geht, erreicht  $\operatorname{tg}(\alpha/2)$  jäh den Wert Eins, sobald  $\alpha$  sich  $\pi/4$  nähert. Dadurch treten überall scharfe Maxima dort auf, wo der Term  $1/(1 - \operatorname{tg}^2(\alpha/2))$  erscheint. Für große  $p_a$  hingegen nähert sich  $\operatorname{tgh}\alpha$  dem Wert Eins asymptotisch, wobei nur ein sehr flaches Maximum in der Umgebung des Äquivalenzpunktes resultiert.

Diese abstrakte Beschreibung soll im folgenden durch ein Beispiel veranschaulicht werden: Gegeben sei eine Lösung von I mit der Konzentration  $c_I^0$ . Durch Zugabe kleiner Mengen

von AB und die gleichzeitige Entnahme äquivalenter Mengen von I wird die Konstanz der Summe  $c_I^0 + c_{AB}^0$  erhalten, wobei gleichzeitig  $c_A^0 = c_B^0$  bleibt. Für große Werte von  $p_a$  ist die Gleichgewichtsverteilung so, daß jeweils nur eine relativ kleine Menge B aus AB in IB übergeführt werden muß. Dieser geringe Austausch setzt ziemlich früh ein und ändert sich kaum noch beim Erreichen des Äquivalenzpunktes, da  $c_I^0$  stetig ab- und  $c_A^0$  entsprechend zunimmt. Eine andere Situation ergibt sich jedoch für kleine Werte von  $p_a$ . Hier wandelt sich beinahe alles verfügbare B bei Zugabe von AB sofort in IB um, aber nur so lange, bis der Äquivalenzpunkt erreicht ist. Der relative Anteil von IB nimmt dann abrupt ab, da jetzt I vollständig zu IB umgesetzt ist und somit allein die Konzentration von AB (aufgrund der Zugabe) weiter ansteigt. Die Krümmung der Titrationsfunktion zeigt dementsprechend im Gegensatz zum vorhergehenden Fall eine scharfe Spitze bei  $q_a = 0.5$  (graphische Darstellung in Tabelle 3).

Wenn wir nun die Ausdrücke für  $T_a''$ ,  $\Gamma_a$  und  $\tau_a$  in Tabelle 3 mit jenen aus Tabelle 1 vergleichen, stellen wir eine ausgeprägtere  $q_a$ -Abhängigkeit von  $\Gamma_a$  – und zwar relativ zu  $T_a''$  und  $\tau_a$  – fest, denn  $\operatorname{tg}^2(\alpha/2)$  ist in  $\Gamma_a$  durch  $\operatorname{tg}^4(\alpha/2)$  ersetzt, während  $\tau_a$  und  $T_a''$  formal unverändert bleiben (hierbei ist allerdings die unterschiedliche Definition von  $\alpha$  zu berücksichtigen). Als Folge dieser verschiedenartigen relativen Veränderungen nehmen die Beziehungen zwischen Relaxationsamplitude und Zeitkonstante eine andere Form als im Falle des binären Dissoziationsgleichgewichts an. Am deutlichsten kommt dies in der komplementären Relaxationszeit  $\tau_{-a}$  (Tabelle 3) zum Ausdruck, die sich explizit wie folgt schreibt:

$$\tau_{-a} = p_a + 2(1-p_a)\sqrt{\Gamma_a \tau_a} \quad (3.1-8)$$

Die aus den Relaxationsexperimenten erhältlichen Größen sind zum einen die Relaxationszeit  $\tau$  und zum anderen der Amplitudenfaktor  $\Gamma \Delta H$ . Die Auftragung von  $\tau$  gegen die Quadratwurzel des Produktes aus  $\tau$  und  $\Gamma \Delta H$  bei konstant gehaltenem  $c_I^0 + c_{AB}^0$  sollte eine Gerade mit dem Ordinatenabschnitt  $[k_s(c_I^0 + c_{AB}^0)]^{-1}$  und der Steigung

$$\frac{2(1-p_a)}{c_I^0 + c_{AB}^0} \sqrt{\frac{1}{k_s p_a \Delta H}} \quad (3.1-9)$$

ergeben. Für die separate Bestimmung der Gleichgewichtsparameter ist diese Beziehung allerdings nicht so zweckmäßig

Tabelle 3. Substitutionsreaktionen  $I + AB \xrightleftharpoons[k_{-s}]{k_s} IB + A$  bei konstantem  $(c_I^0 + c_{AB}^0)$ . Titrationsfunktion und ihre Ableitungen, Relaxationsamplituden und Zeitkonstanten.

Die Gleichgewichtskonstante  $K$  ist durch Gl. (3.1-1) definiert, wobei die Erhaltungsrelationen (3.1-2) zutreffen. Außerdem wird gefordert, daß  $c_I^0 = c_{AB}^0$  und  $c_I^0 + c_{AB}^0 = \text{const.}$ , d. h. eine positive Änderung von  $c_{AB}^0$  wird durch eine äquivalente negative Änderung von  $c_I^0$  kompensiert.

Es erweist sich als nützlich – in Anlehnung an Tabelle 1 – folgende dimensionslosen Parameter einzuführen:

$$p_a = K^{-1}; \quad q_a = \frac{c_{AB}^0}{c_I^0 + c_{AB}^0}; \quad 1 - q_a = \frac{c_I^0}{c_I^0 + c_{AB}^0}$$

Die reduzierten Größen lauten:

- 1) Titrationsfunktion:  $T_a = \frac{c_{AB}^0}{c_I^0 + c_{AB}^0}$
- 2) Steigung der Titrationsfunktion:  $T_a' = \frac{d T_a}{d q_a}$
- 3) Krümmung der Titrationsfunktion:  $T_a'' = \frac{d^2 T_a}{d q_a^2}$

$$4) \text{ Relaxationsamplitudenfaktor: } \Gamma_a = \frac{\Gamma}{c_I^0 + c_{AB}^0}$$

$$5) \text{ Relaxationszeit: } \tau_a = \tau k_s (c_I^0 + c_{AB}^0) \\ \tau_{-a} = \tau k_{-s} (c_I^0 + c_{AB}^0) \equiv p_a \tau_a$$

Analog dazu können auch komplementäre Titrationsfunktionen abgeleitet werden.

$$T_{-a} = \frac{c_{AB}^0}{c_I^0 \cdot c_{AB}^0} = q_a - T_a; \quad T_{-a}' = -T_a'; \quad T_{-a}'' = -T_a''$$

Explizite Ausdrücke für reduzierte Größen:

$$1) T_a = \frac{1}{2(1-p_a)} [1 - \sqrt{1 - 4(1-p_a)q_a(1-q_a)}]$$

$$2) T_a' = \frac{1 - 2q_a}{\sqrt{1 - 4(1-p_a)q_a(1-q_a)}}$$

$$3) T_a'' = -\frac{2p_a}{[1 - 4(1-p_a)q_a(1-q_a)]^{3/2}}$$

$$4) \Gamma_a = \frac{p_a [1 - \sqrt{1 - 4(1-p_a)q_a(1-q_a)}]^2}{4(1-p_a)^2 \sqrt{1 - 4(1-p_a)q_a(1-q_a)}}$$

$$5) \tau_a = \sqrt{1 - 4(1-p_a)q_a(1-q_a)}$$

Diese Beziehungen können wieder – entsprechend Tabelle 1 – trigonometrische oder hyperbolische Funktionen ersetzt werden, wodurch die Zusammenhänge übersichtlicher werden. Hier müssen allerdings drei Fälle unterschieden werden:

$$p_a < 1$$

$$p_a = 1$$

$$p_a > 1$$

Formale Definitionen

$$\sin \alpha \equiv 2\sqrt{(1-p_a)q_a(1-q_a)} \quad — \quad \sinh \alpha \equiv 2\sqrt{(p_a-1)q_a(1-q_a)}$$

„Existenz“-Bereich von  $\alpha$

$$0 \leq \sin \alpha \leq \sqrt{1-p_a} \quad 0 \leq \sinh \alpha \leq \sqrt{p_a-1}$$

$$0 \leq \operatorname{tg} \alpha \leq \sqrt{\frac{1-p_a}{p_a}} \quad 0 \leq \operatorname{tgh} \alpha \leq \sqrt{\frac{p_a-1}{p_a}}$$

$$0 \leq \operatorname{tg} \frac{\alpha}{2} \leq \frac{\sqrt{1-p_a}}{1+\sqrt{p_a}} = \frac{1-\sqrt{p_a}}{\sqrt{1-p_a}} \quad 0 \leq \operatorname{tgh} \frac{\alpha}{2} \leq \frac{\sqrt{p_a-1}}{1+\sqrt{p_a}} = \frac{\sqrt{p_a-1}}{\sqrt{p_a-1}}$$

Reduzierte Funktionen

$$T_a = \frac{1}{1-p_a} \cdot \frac{\operatorname{tg}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}{1+\operatorname{tg}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \quad T_a = q_a(1-q_a) \quad T_a = \frac{1}{p_a-1} \cdot \frac{\operatorname{tgh}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}{1-\operatorname{tgh}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}$$

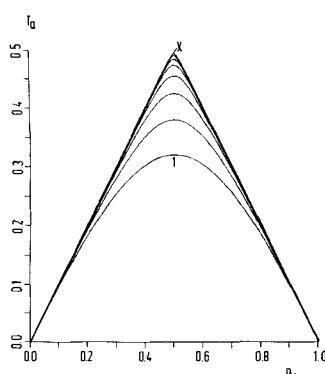
$$T_a = \sqrt{1 - \frac{p_a}{1-p_a} \operatorname{tg}^2 \alpha} \quad T_a = 1 - 2q_a \quad T_a = \sqrt{1 - \frac{p_a}{p_a-1} \operatorname{tgh}^2 \alpha}$$

$$T_a'' = -2p_a \left[ \frac{1+\operatorname{tg}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}{1-\operatorname{tg}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \right]^3 \quad T_a'' = -2 \quad T_a'' = -2p_a \left[ \frac{1+\operatorname{tgh}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}{1-\operatorname{tgh}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \right]^3$$

$$\Gamma_a = \frac{p_a}{(1-p_a)^2} \cdot \frac{\operatorname{tg}^4\left(\frac{\alpha}{2}\right)}{1-\operatorname{tg}^4\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \quad \Gamma_a = T_a^2 = \frac{[q_a(1-q_a)]^2}{\Gamma_a} \quad \Gamma_a = \frac{p_a}{(1-p_a)^2} \cdot \frac{\operatorname{tgh}^4\left(\frac{\alpha}{2}\right)}{1-\operatorname{tgh}^4\left(\frac{\alpha}{2}\right)}$$

$$\tau_a = \frac{1+\operatorname{tg}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}{1-\operatorname{tg}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \quad \tau_a = 1 \quad \tau_a = \frac{1+\operatorname{tgh}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}{1-\operatorname{tgh}^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}$$

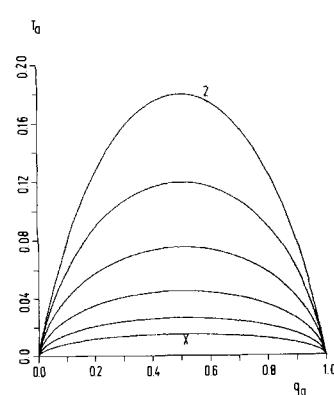
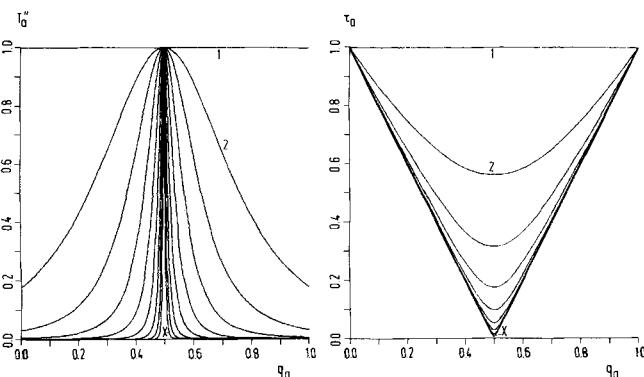
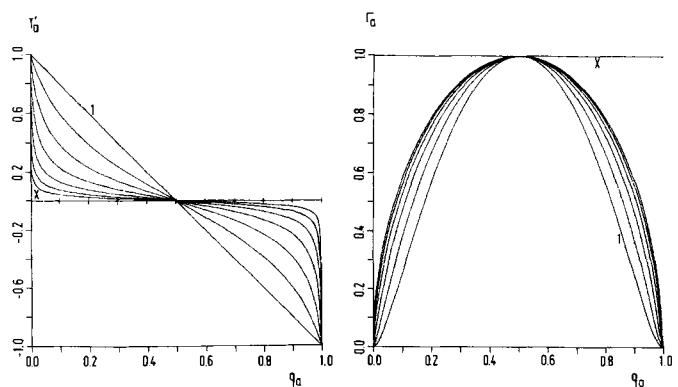
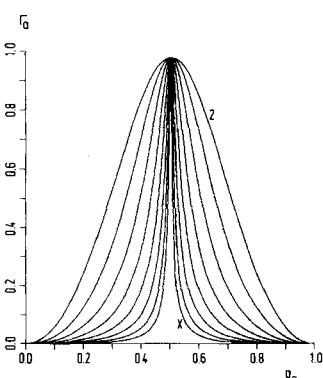
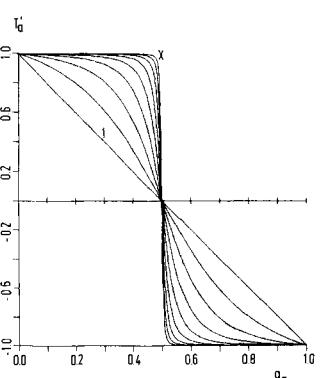
Stellt man einen Vergleich mit den in Tabelle 1 aufgeführten Funktionen an, so fällt vor allem der ausgeprägte Kurvenverlauf auf. Das gilt speziell für  $T_a''$ . Die Dissymmetrie für  $p_a < 1$  und  $p_a > 1$ , die beim Übergang von trigonometrischen zu hyperbolischen Funktionen erscheint, drückt sich besonders deutlich in  $I_a$  und  $\tau_a$  aus. Die trigonometrischen Formen ergeben bedeutend schärfere Übergänge, und zwar vor allem für kleine  $p_a$ -Werte. Für  $\tau_a$  kehren sich die Abhängigkeitsverhältnisse bei  $p_a = 0$  einfach um.



Graphische Darstellung der fünf genannten Funktionen für den Fall  $p_a \leq 1$ .

Kurve 1:  $p_a = 1$   
Kurve 2:  $p_a = 10^{-0.5}$   
Kurve x:  $p_a = 10^{-4}$ .

Für die dazwischenliegenden Kurven ändert sich  $p_a$  jeweils um den Faktor  $10^{-0.5}$ .



Graphische Darstellung der fünf genannten Funktionen für den Fall  $p_a \geq 1$ .

Kurve 1:  $p_a = 1$   
Kurve 2:  $p_a = 10^{0.5}$   
Kurve x:  $p_a = 10^3$ .

Für die dazwischenliegenden Kurven ändert sich  $p_a$  jeweils um den Faktor  $10^{0.5}$ .

wie die entsprechende Relation für die Assoziations-Dissoziationsreaktionen [siehe Gl. (2.3-3)], obwohl der Ordinatenabschnitt hier direkt die Geschwindigkeitskonstante  $k_s$  liefert.

### 3.2. Reaktionssystem mit angekoppeltem Indikatorgleichgewicht

Der zweite Grenzfall, der in diesem Abschnitt diskutiert werden soll, betrifft die Verwendung eines Indikator-Hilfssystems bei einer Reaktion in Gegenwart einer endlichen Konzentration an freien B-Teilchen ( $c_l^0 \ll c_A^0, c_B^0$ ). Die beiden Stabilitätskonstanten

$$K_A = \frac{c_{AB}}{c_A \cdot c_B} \quad \text{und} \quad K_l = \frac{c_{IB}}{c_l \cdot c_B} \quad (3.2-1)$$

müssen nun explizit unterschieden werden.

Nehmen wir an, daß jede Veränderung der Extinktion (oder einer anderen registrierbaren Größe) einzig und allein dem Indikator zugeordnet werden kann, so erhalten wir – in Analogie zu dem vorher in Abschnitt 2.1 abgehandelten Beispiel – für die entsprechenden Extinktionsquotienten die Ausdrücke

$$\frac{E - E_0}{E_\infty - E_0} \equiv \eta = \frac{c_{IB}}{c_l^0} \quad \text{oder} \quad \frac{E_\infty - E}{E_\infty - E_0} \equiv (1 - \eta) = \frac{c_l}{c_l^0} \quad (3.2-2)$$

Die Menge an unkomplexiertem B ist, sofern  $K_l$  bekannt, vollständig durch das Extinktionsverhältnis bestimmt.

$$c_B = \frac{\eta}{1-\eta} K_I^{-1} \quad (3.2-3)$$

Die Herleitung eines expliziten Ausdruckes für  $c_{IB}$ , die von den Erhaltungsbedingungen

$$c_I^0 = c_I + c_{IB}; \quad c_A^0 = c_A + c_{AB}; \quad c_B^0 = c_B + c_{AB} + c_{IB} \quad (3.2-4)$$

ausgeht, läuft auf die Lösung einer kubischen Gleichung hinaus. Mit der Beziehung (3.2-3) können wir jedoch leicht eine implizite Form angeben, die die Extinktionsquotienten mit den Einwaagekonzentrationen verknüpft und die bei bekanntem  $K_I$  den Wert für das unbekannte  $K_A$  liefert.

$$\frac{\eta}{1-\eta} + K_I(c_A^0 - c_B^0 + \eta c_I^0) = \frac{K_I^2}{K_A} \left( c_B^0 \frac{1-\eta}{\eta} - c_I^0(1-\eta) \right) - \frac{K_I}{K_A} \quad (3.2-5)$$

Für eine direkte Substitutiontitration ist es am besten, von einer vorgegebenen Menge an Indikator  $I$  ( $c_I^0 = \text{const.}$ ) auszugehen und A und B in stöchiometrischen Mengen ( $c_A^0 = c_B^0$ ) hinzuzufügen. Angenommen, die Indikatorkonzentration ist im Vergleich zu  $K_I^{-1}$  klein ( $c_I^0 \ll K_I^{-1}$ ), so reduziert sich Gl. (3.2-5) auf die leicht handhabbare Form

$$\frac{\eta}{1-\eta} = \frac{K_I^2}{K_A} \frac{1-\eta}{\eta} c_B^0 - \frac{K_I}{K_A} \quad (3.2-6)$$

Trägt man den Quotienten  $\eta/(1-\eta)$  gegen seinen mit  $c_B^0$  multiplizierten reziproken Wert auf, so erhält man eine Gerade mit folgenden Merkmalen

$$\begin{aligned} \text{Steigung: } & K_I^2 / K_A \\ \text{Abszissenabschnitt: } & K_I^{-1} \\ \text{Ordinatenabschnitt: } & -K_I / K_A \end{aligned} \quad (3.2-7)$$

Ein experimentelles Beispiel ist in Abbildung 9 wiedergegeben. Sowohl  $K_A$  als auch  $K_I$  können durch diese vereinfachte Methodik der Substitutiontitration bestimmt werden. Sie ähnelt in gewisser Hinsicht der Hildebrand-Benesi-Methode und erweist sich als besonders vorteilhaft in der Komplexometrie.

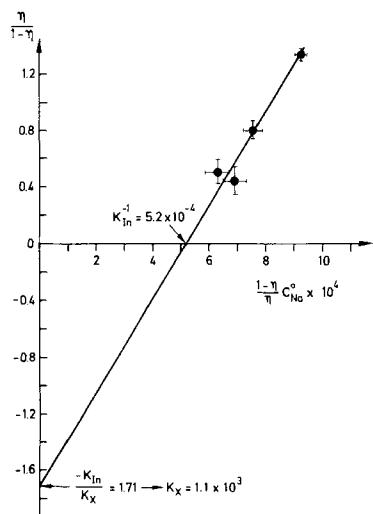


Abb. 9. Substitutiontitrations-Methode nach Gl. (3.2-6), angewendet auf die Komplexbildung von Dinactin mit  $\text{Na}^+$  in Methanol [15]. Die Gleichgewichtskonstante ergibt sich zu  $K = 1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

Indikatoren sind für den analytisch arbeitenden Chemiker ein Hilfsmittel von größter praktischer Bedeutung. Ihr allgemeines Wirkungsprinzip ist letztlich an die Existenz von Gleichungen der Art (3.2-3), (2.1-10) und (3.2-6) gebunden. Diese zeigen, wie eine Substanz (I), deren beobachtbare physikalische Eigenschaften für ihren Bindungszustand in bezug auf einen Reaktionspartner (B) charakteristisch sind, zur Ermittlung der Bindungszustände irgendwelcher anderer Reaktanden (A) verwendet werden kann, mit denen sie (I) besagten Reaktionspartner (B) gemeinsam hat. Da der gemeinsame Partner als Bindeglied zwischen den verschiedenen miteinander gekoppelten Gleichgewichten fungiert, bedeutet die Bestimmung seiner Konzentration [z. B. mittels des Extinktionsquotienten (3.2-3)] eine Entkopplung der zugehörigen Massenwirkungsbeziehungen und führt damit das analytische Problem auf die Auswertung einfacher Mengenbeziehungen (wie z. B.  $c_B^0 = c_{IB} + c_{AB} + c_B$ ) zurück.

In dieser Hinsicht sind ein idealer Indikator und ein idealer Puffer zueinander komplementär. In beiden Fällen ist die Festlegung des Kopplungsfaktors, d. h. der Konzentration des gemeinsamen Reaktionspartners B erforderlich. Der Indikator, der in relativ kleinen Konzentrationen vorliegt, fixiert zwar nicht die Konzentration  $c_B$ , ermöglicht jedoch deren Messung nach Gl. (3.2-3). Der Puffer andererseits fixiert die Konzentration  $c_B$  infolge seines Überschusses in bezug auf die Konzentrationen aller Konkurrenten.

Das soeben aufgezeigte Verfahren eignet sich im Prinzip auch für die Auswertung der entsprechenden Relaxationsamplituden. Zu diesem Zweck müssen die Relaxationsmessungen sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit des zu untersuchenden Reaktionssystems (also auch für den Indikator allein) durchgeführt werden.

Die dazugehörigen impliziten Ausdrücke lauten:

$$\delta c_{IB} = \Gamma_I(\delta \ln K_I) \quad (3.2-8)$$

$$\delta c_{IB}^\pm = \Gamma_I^\pm \left( \delta \ln K_I - \frac{\Gamma_A}{c_B} \delta \ln K_A \right) \quad (3.2-9)$$

wobei  $\Gamma_I$ ,  $\Gamma_A$  und  $\Gamma_I^\pm$  wie folgt definiert sind:

$$\Gamma_I = \frac{c_I \cdot c_B}{K_I^{-1} + c_B + c_I}; \quad \Gamma_A = \frac{c_A \cdot c_B}{K_A^{-1} + c_B + c_A} \quad (3.2-10)$$

$$\Gamma_I^\pm = \frac{c_I \cdot c_B}{K_I^{-1} + c_B + c_I} \left( 1 - \frac{\Gamma_A}{c_B} \right) \quad (3.2-11)$$

Daraus geht klar hervor, daß das A-System die Amplitude  $\delta c_{IB}$  in zweifacher Hinsicht beeinflußt: einerseits aufgrund seines Puffereffekts, welcher im Term  $\Gamma_I^\pm$  zum Ausdruck kommt, und andererseits aufgrund der endlichen Änderung  $\delta \ln K_A$ , die eine Konzentrationsverschiebung von B bewirkt und die sich schließlich auf das Indikatorgleichgewicht überträgt. Die Pufferwirkung ist dann dominant, wenn die Zustände A, AB, I und IB verglichen mit B in großem Überschuß vorhanden sind. Dieser Fall wurde bereits in Abschnitt 3.1 behandelt. Jetzt wollen wir uns mit dem anderen Fall beschäftigen, bei dem der Indikator in kleiner Konzentration vorliegt, wobei speziell die Bedingung  $c_I \ll K_I^{-1} + c_B$  gelten soll ( $c_B$  wird

durch die AB-Reaktion kontrolliert).  $\Gamma_1$  und  $\Gamma_1^*$  sind hier identisch, da der  $c_1$ -Term vernachlässigbar klein ist. Die Amplitudendifferenz  $\Delta(\delta c_{1B}) = \delta c_{1B}^* - \delta c_{1B}$  ist dann einfach durch

$$\Delta(\delta c_{1B}) = -\frac{\Gamma_1 \Gamma_A}{c_B} \delta \ln K_A \quad (3.2-12)$$

gegeben.  $\Gamma_1$  wird als bekannt vorausgesetzt, da es entweder mit  $K_1$  berechnet oder direkt – in Abwesenheit des AB-Systems – gemessen werden kann.

Die Gleichung für  $\Gamma_A/c_B$  ist bei kleinen  $c_1^0$  identisch mit dem Ausdruck, den man für ein nicht-gekoppeltes System erhält:

$$\frac{\Gamma_A}{c_B} = \frac{c_A}{c_A + c_B + K_A^{-1}} = \frac{1}{2} \left[ 1 - \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{4K_A^{-1}c_A^0}{(K_A^{-1} + c_B^0 - c_A)^2}}} \right] \quad (3.2-13)$$

und unter der zweckmäßigen Annahme  $c_A^0 = c_B^0$ :

$$\frac{\Gamma_A}{c_B} = \frac{1}{2} \left[ 1 - \frac{1}{\sqrt{1 + 4K_A \cdot c_A^0}} \right] \quad (3.2-14)$$

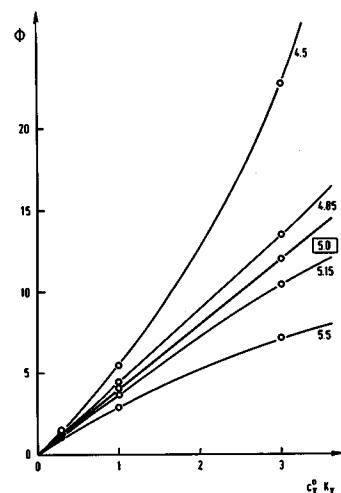
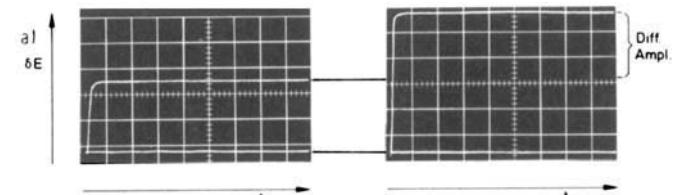


Abb. 10. Ermittlung der Stabilitätskonstante und Reaktionsenthalpie aus den Differenzen der Relaxationsamplituden nach der (im Text beschriebenen) Substitutionsmethode. Die Funktion  $\phi$  enthält neben experimentellen Daten noch einen angenommenen Wert für  $\Delta H$ . Dieser ist neben jeder Kurve einge tragen (in kcal/mol). Bei Annahme des richtigen Wertes für  $\Delta H$  (hier 5.0 kcal/mol) ergibt sich eine Gerade mit der Steigung  $4K_x$ . Die Funktion  $\phi$  ist hier gegen die reduzierte Konzentration  $c_x^0 K_x$  aufgetragen.

Dieser Term kann selbstverständlich nicht direkt gemessen werden. Die Größe, die das Experiment liefert, entspricht nach Gl. (3.2-12)

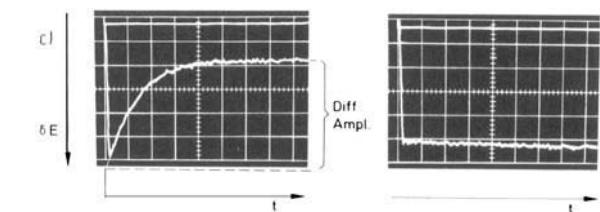
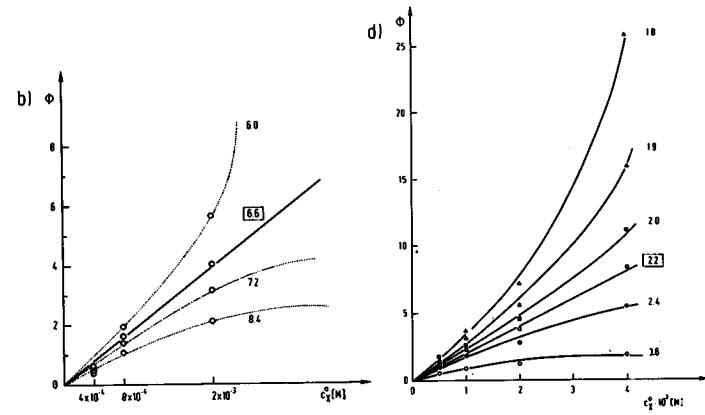
$$f_{\text{exp}} = \frac{\Gamma_A}{c_B} \delta \ln K_A \quad (3.2-15)$$

wobei  $\delta \ln K_A$  im Falle eines Temperatursprungs durch  $(\Delta H_A/RT)(\Delta T/T)$  gegeben ist. Es gibt nun einen einfachen Trick, die Meßgröße  $f_{\text{exp}}$ , die ja immer noch zwei unbekannte Faktoren enthält, auszuwerten.



Mit Monactin:  
 4 · 10<sup>-5</sup> M Murexid  
 2 · 10<sup>-3</sup> M Monactin  
 2 · 10<sup>-3</sup> M Natrium (gesamt)  
 $\delta E = 1.5 \cdot 10^{-3}$ /gr. Teilstrich  
 Zeitauslenkung: 10 ms/gr. Teilstrich

Ohne Monactin:  
 4 · 10<sup>-5</sup> M Murexid  
 1.3 · 10<sup>-3</sup> M Natrium (gesamt)  
 $\delta E = 1.5 \cdot 10^{-3}$ /gr. Teilstrich  
 Zeitauslenkung: 10 ms/gr. Teilstrich



Mit Antamanid:  
 4 · 10<sup>-5</sup> M Murexid  
 1 · 10<sup>-3</sup> M Antamanid  
 1 · 10<sup>-3</sup> M Natrium (gesamt)  
 $\delta E = 3.5 \cdot 10^{-4}$ /gr. Teilstrich  
 (kompensiert auf 6.03 · 10<sup>-3</sup>)  
 $\tau = 2.3$  ms

Ohne Antamanid:  
 4 · 10<sup>-5</sup> M Murexid  
 0.75 · 10<sup>-3</sup> M Natrium (gesamt)  
 $\delta E = 3.7 \cdot 10^{-4}$ /gr. Teilstrich  
 (kompensiert auf 6.34 · 10<sup>-3</sup>)

(Man beachte, daß die Empfindlichkeiten der Messung von  $\delta E$  in beiden Fällen etwas verschieden sind. Die anfänglichen (schnellen) Extinktionsänderungen  $\delta E$  sind in beiden Fällen gleich.)

Abb. 11. Experimentelle Daten zur Erläuterung der Amplituden-Substitutionsmethode.

a) und c) sind Relaxations-Oszillogramme für die Bildung der  $\text{Na}^+$ -Monactin-[1] und  $\text{Na}^+$ -Antamanid-Komplexe [1a] in Methanol unter den angegebenen Bedingungen. Die Konzentrationen von freien Natriumionen und Indikator (Murexid) sind bei den Amplitudenmessungen in Gegenwart und in Abwesenheit der Komplexbildner Monactin oder Antamanid gleich.

b) und d) zeigen die Auswertung nach der in Abb. 10 beschriebenen Methode. Bei  $T = 293^\circ\text{K}$  ergibt sich für:

$$\begin{array}{ll} \text{Na}^+-\text{Monactin:} & K = 5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \quad \Delta H = -6.6 \text{ kcal/mol} \\ \text{Na}^+-\text{Antamanid:} & K = 5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \quad \Delta H = -2.2 \text{ kcal/mol} \end{array}$$

Wir schätzen zunächst einen Wert für  $\delta \ln K_A$  ab und betrachten den Ausdruck

$$\frac{f_{\text{exp}}}{(\delta \ln K_A)_{\text{angenommen}}} = f^* = \frac{1}{2} \left[ 1 - \frac{1}{\sqrt{1 + 4K_A \cdot c_A^0}} \right] \quad (3.2-16)$$

der wie folgt umgeordnet werden kann:

$$\phi = (1 - 2f^*)^{-2} - 1 = 4K_A c_A^0 \quad (3.2-17)$$

Trägt man  $\phi$  gegen  $c_A^0$  auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung  $4K_A$  – jedoch nur dann, wenn für  $\delta \ln K_A$  der richtige Wert eingesetzt wurde. Was passiert, wenn man einen falschen oder ungenauen Wert gewählt hat, ist aus Abbildung 10 ersichtlich. Für zu große Werte von  $(\delta \ln K_A)_{\text{angenommen}}$  sind alle Kurven nach unten und für zu kleine Werte nach oben gekrümmmt. Aus dieser Eigenschaft ergibt sich eine sehr empfindlich konvergierende Methode für iterative Schätzungen, so daß man schließlich gezielt zum richtigen Wert für  $\delta \ln K_A$  (d.h.  $\Delta H_A$  oder  $\Delta V_A$  usw.) gelangt. Damit wird auch  $K_A$  selbst – aus der Steigung der interpolierten Geraden – eindeutig festgelegt. Das Ganze kann man natürlich auch vom Computer ausführen lassen, der für solche iterative Verfahren prädestiniert ist.

Das Beispiel in Abbildung 10 zeigt, wie empfindlich diese Methode im Hinblick auf eine Bestimmung von  $\Delta H$  ist. Bei den üblichen van't Hoff-Auftragungen muß man einen beträchtlich größeren Temperaturbereich durchfahren, um vergleichbar genaue Werte für  $\Delta H$  zu erhalten. Viele Substanzen, insbesondere Enzyme, die ihre Konformation in Abhängigkeit von der Temperatur ändern – und daher sogar denaturieren können – lassen eine größere Variation der Temperatur nicht zu. Bei dem hier beschriebenen Relaxationsverfahren benötigt man nur relativ kleine Temperaturverschiebungen ( $\delta T \approx 5$  bis  $10^\circ\text{C}$ ), wobei man von einer geeigneten Referenztemperatur ausgeht.

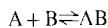
Wie nützlich beide Substitutionsverfahren sind, mag man aus den Beispielen in Abbildung 11a–d ersehen. Hier ist die Auswertung einiger experimenteller Daten für die Komplexbildung von Metallionen mit Antibiotika<sup>[1]</sup> und verwandten Substanzen<sup>[15a]</sup> wiedergegeben. Über weitere Anwendungsmöglichkeiten haben wir gemeinsam mit P. B. Chock und F. Eggers berichtet<sup>[15b]</sup>.

#### 4. Vielstufige Reaktionssysteme

Sowohl aus der Theorie als auch aus der Praxis läßt sich eine Reihe von Verallgemeinerungen ableiten. Wie schon bemerkt, ist es aber nicht das Ziel dieser Arbeit, die allgemeinen theoretischen Grundlagen der Relaxationstheorie chemischer Systeme zu erörtern. Die zur Lösung dieses Problems benötigten Ansätze der linearen Algebra sind wohlbekannt<sup>[5, 16]</sup>. Hier sollen vielmehr die praktischen Anwendungen in der analytischen Chemie diskutiert werden. Die gewünschte Information über die Eigenschaften bestimmter Komplexverbindungen erhält man nur aus einer detaillierten Analyse der zutreffenden Reaktionsmechanismen.

Drei Fälle, die für die Komplexometrie von besonderem Interesse sind, werden im folgenden behandelt.

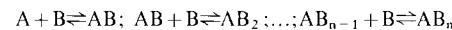
1. Zwei Reaktionspartner A und B sind vorgegeben, die nach



einen Komplex AB bilden. Jeder der beiden Partner vermag darüber hinaus mit einer Reihe weiterer Reaktanden Bindungen einzugehen.

In einem für die komplexometrische Titration typischen Beispiel bildet ein Metallion (oder allgemeiner ein Elektronophil) in gepufferter Lösung mit einem potentiellen Liganden, der in verschiedenen protonierten Formen vorliegt, koordinative Bindungen aus. Der Ligand muß dabei mit dem Puffer konkurrieren, der ebenfalls in multiplen Proportionen an das Metallion gebunden werden kann und gleichzeitig den pH-Wert des Systems kontrolliert.

2. Ein Bindungszentrum A geht eine multiple Koordination mit dem Liganden B ein, und zwar nach dem Schema



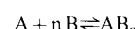
Solch ein System von aufeinanderfolgenden Koordinierungsschritten läßt sich unter bestimmten Voraussetzungen durch einen einzigen Gleichgewichtsparameter charakterisieren:

- 2a) Die wahre Bindungskonstante hat für jeden einzelnen Schritt den gleichen Wert, d.h. wir haben es mit einer „Entartung“

$$K_1 = K; \quad K_2 = 2K; \dots; K_n = nK$$

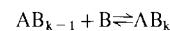
zu tun. Ein bekanntes Beispiel ist das allosterische Enzym, das aus mehreren Untereinheiten besteht, von denen jede das Substrat mit gleicher Stärke zu binden vermag.

- 2b) Die Zwischenzustände ( $AB_i$  für  $1 \leq i < n$ ) haben eine so geringe Stabilität, daß der Gesamtprozeß wie eine einstufige Reaktion



behandelt werden kann.

- 2c) Die einzelnen Schritte unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bindungskonstanten so stark, daß innerhalb eines vorgegebenen Konzentrationsintervalls jeweils nur ein Komplex in großem Überschuß vorhanden ist. Kann der Halbwertspunkt der einzelnen Reaktionsschritte mit einer endlichen und abmeßbaren Menge von unkomplexiertem B erreicht werden, so hat man es mit einer Reihe separater 1:1-Komplexbildungen zu tun, wie sie in Abschnitt 2 diskutiert wurden, z.B.



Sind andererseits die Stabilitätskonstanten sämtlicher Reaktionsstufen so groß, daß die Konzentration des freien Liganden B im Vergleich zu den Komplexkonzentrationen verschwindend klein ist, so lassen sich die einzelnen Reaktionen jeweils als Disproportionierung



formulieren.

3. Vom Komplexbildner A wird angenommen, daß er an verschiedenen miteinander konkurrierenden 1:1-Bindungsreaktionen mit den Liganden X, Y, Z beteiligt ist. Wichtige Beispiele hierzu sind die ternären Systeme (Probe,

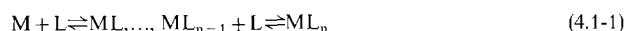
Puffer, Indikator} oder {Probe 1, konkurrierende Probe 2, Indikator}.

Die meisten der sonst noch vorkommenden Mehrfach-Komplexbildungsreaktionen können auf einen der hier genannten Grundtypen von Mechanismen zurückgeführt werden.

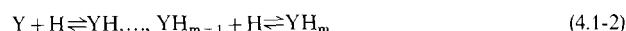
#### 4.1. Komplexometrische Titration

Die Überschrift dieses Abschnitts ist identisch mit dem Titel einer dem Chemiker wohlbekannten Monographie von *Gerold Schwarzenbach*<sup>[17]</sup>. Dort wird auch der Prototyp einer mehrstufigen Komplexbildungsreaktion beschrieben. Übernehmen wir *Schwarzenbachs* Bezeichnungen, so wird das Metallion durch  $M^{+v}$ , der für die Titration verwendete Ligand durch  $Y^{-\mu}$  und der Komplexpartner des Hilfssystems durch L charakterisiert. Letzterer kann mit dem Puffer identisch sein, der für die Konstanz des pH-Wertes sorgt und deshalb im Überschuß vorhanden sein muß. Alle Änderungen im ML- und HY-Gleichgewicht sollten – verglichen mit der zu untersuchenden Komplexbildungsreaktion  $M + Y \rightarrow$  schnell verlaufen. Ein Beispiel, das von *Schwarzenbach* ausführlich diskutiert wird, bezieht sich auf zwei- und dreiwertige Metallionen, den Komplexpartner Ethyldiamintetraacetat (EDTA) und das Puffersystem  $NH_3$ . Besitzt Y registrierbare optische Eigenchaften, so läßt sich die Konzentration des Komplexes MY spektroskopisch bestimmen. Andernfalls kann die Anzeige durch ein Zusatzsystem vermittelt werden, das in sehr niedriger Konzentration vorliegen muß, damit die Erhaltungsbeziehungen gültig bleiben. Die Indikatorreaktion soll außerdem im Vergleich zur Probe schnell ablaufen. Sind diese Voraussetzungen nicht erfüllt, so ist der Indikator wie ein zusätzlicher Reaktionspartner entsprechend dem Konzept in Abschnitt 4.2 oder 4.3 zu behandeln.

Für die beiden Serien von Gleichgewichten



und



definieren wir die Konzentrationen

$$\begin{aligned} c'_M &= c_M + c_{ML} + \dots + c_{ML_n} \\ &= c_M(1 + K_1 c_L + K_2 c_L^2 + \dots + K_n c_L^n) \equiv \beta_L c_L \end{aligned} \quad (4.1-3)$$

wobei  $\beta_L$  bei gleichbleibenden Werten von  $c_L$  und großem Überschuß an L konstant ist. Analog dazu gilt

$$\begin{aligned} c'_Y &= c_Y + c_{YH} + \dots + c_{YH_m} \\ &= c_Y(1 + K_1 c_H + K_2 c_H^2 + \dots + K_m c_H^m) \equiv \alpha_H c_H \end{aligned} \quad (4.1-4)$$

wobei  $\alpha_H$  jeweils für gegebene pH-Werte (gepufferte Lösung) konstant ist. Für die Komplexbildung zwischen M und Y erhalten wir dann

$$K_{MY}^{APP} = \frac{c_{MY}}{c'_M \cdot c'_Y} = \frac{c_{MY}}{c_M \cdot c_Y} \cdot \frac{1}{\alpha_H \beta_L} = \frac{K_{MY}}{\alpha_H \beta_L} \quad (4.1-5)$$

#### Die Erhaltungsbedingungen

$$c_M^0 = c_{MY} + c'_M \quad \text{und} \quad c_Y^0 = c_{MY} + c'_Y \quad (4.1-6)$$

liefern das noch fehlende Glied für eine explizite Lösung in Form der Titrationsfunktion, die – wie in Abschnitt 2 erläutert – aus einer quadratischen Gleichung

$$\frac{c_{MY}}{(c_M^0 - c_{MY})(c_Y^0 - c_{MY})} = \frac{K_{MY}}{\alpha_H \beta_L} \quad (4.1-7)$$

resultiert. Die Lösung besitzt exakt die Form von  $T_b$ , wie sie in Tabelle 1 eingeführt wurde. Die Größe  $K = K_{MY}/\alpha_H \beta_L$  ist durch Variation von  $\alpha_H$  und  $\beta_L$  adaptierbar.

In ähnlicher Weise können alle anderen Ausdrücke, wie z. B.  $T_b''$ ,  $\Gamma_b$  und  $\tau_b$  aus der Lösung von Gl. (4.1-7) abgeleitet werden. Einzelheiten hierzu sind in den Abschnitten 2.1 bis 2.3 zu finden. (Anwendungen für die Titrationsfunktion wurden von *Schwarzenbach*<sup>[17]</sup> diskutiert.)

#### 4.2. Sequentielle Komplexbildung und Ligandenaustausch

In der Einführung zu Abschnitt 4 sind drei Grenzfälle unterschieden worden. Die ersten beiden sind typisch für Proteinmoleküle mit mehreren (aktiven) Untereinheiten: 2a) Entartung der charakteristischen Bindungskonstanten bei homotropen Bindungsplätzen; 2b) „Alles oder Nichts“-Bindung an mehreren Bindungszentren, vermittelt möglicherweise durch „konzertierte“ Konformationsumwandlungen. Die klassischen Titrationsprozeduren, wie die wohlbekannten Methoden von *Bjerrum*<sup>[18]</sup>, *Scatchard*<sup>[19]</sup> und weitere (beschrieben von *Edsall* und *Wyman*<sup>[4]</sup>), ermöglichen auf einfache Weise, die Anzahl der Bindungsplätze eines Moleküls zu bestimmen (die verschiedenen Auftragungsmöglichkeiten sind in Abbildung 12 zusammengestellt). Ganz ähnlich können die Relaxationsparameter ausgewertet werden, wobei die in Tabelle 1 aufgeführten Prinzipien zu verwenden sind. Besitzt ein Molekül n gleichwertige Bindungsplätze, so muß der Term  $c_A^0$  durch  $nc_B^0$  ersetzt werden, wodurch für  $\Gamma_a$ ,  $\Gamma_b$ ,  $\tau_a$ ,  $T_a''$  die Maxima der Titrationskurven zu den Äquivalenzpunkten:

$$\text{a)} \quad c_A^0 + nc_B^0 = 0.5$$

bzw.

$$\text{b)} \quad c_A^0 = nc_B^0 + K^{-1}$$

und für  $\tau_b$  und  $T_b''$  nach  $c_A^0 = nc_B^0 - K^{-1}$  verschoben werden.

Abweichungen von der jeweiligen Standardkurve weisen auf das Vorhandensein von nicht gleichwertigen Bindungsplätzen hin. Man erhält in diesem Fall ebenso viele Relaxationszeiten wie Gruppen von nicht gleichwertigen Bindungsplätzen. Sind diese voneinander unabhängig, so erweist sich die Auswertung als relativ einfach (vgl. Tabelle 4). Als Beispiel ist das Enzym Glutamat-Dehydrogenase zu nennen, das zwei Gruppen von je sechs gleichwertigen Bindungsplätzen besitzt<sup>[20]</sup>.

Bei einem System mit nicht gleichwertigen und miteinander in Wechselwirkung befindlichen Bindungsplätzen ergeben sich komplizierte Beziehungen für die Relaxationsparameter. Sie

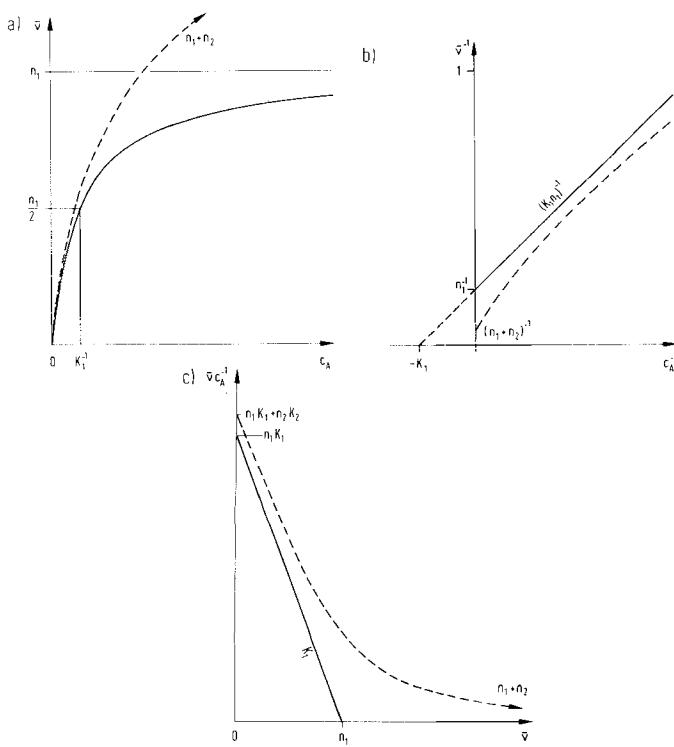


Abb. 12. Die in der Enzymchemie üblichen Auftragungen der Bindungsfunktionen für den Fall, daß mehrere Gruppen von äquivalenten Bindungsplätzen vorhanden sind. Die ausgezogene Kurve repräsentiert ein System mit einer Gruppe von  $n_1$  gleichwertigen Bindungsplätzen, die gestrichelte Kurve ein System mit zwei Gruppen von  $n_1$  bzw.  $n_2$  Bindungsplätzen und den dazugehörigen Bindungskonstanten  $K_1$  und  $K_2$  ( $< K_1$ ) (nach Edsall und Wyman [4]). a) entspricht der Michaelis-Menten- und b) der Lineweaver-Burk-Auftragung (siehe Abb. 2). Die Auftragung c) ist nach Scatchard benannt [19].

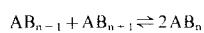
a) Es gilt  $\bar{v} = \sum n_i c_A / (K_i^{-1} + c_A)$ ;  $n_i$  = Zahl der äquivalenten Bindungsplätze der Sorte 1 bzw. 2,  $K_i$  zugehörige Bindungskonstante,  $c_A$  = freie Ligandenkonzentration.

$$b) \frac{1}{\bar{v}} = \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{K_1 n_1 c_A} \right) \cdot f_{12},$$

$$f_{12} = \frac{n_1 K_1 (1 + K_2 c_A)}{n_1 K_1 + n_2 K_2 + (n_1 + n_2) K_1 K_2 c_A}, \quad (f_{12} = 1 \text{ für } K_2 = 0)$$

$$\text{und c)} \frac{\bar{v}}{c_A} = K_1 \left( \frac{n_1}{f_{12}} - \bar{v} \right)$$

Tabelle 4. Beziehungen für einen allgemeinen Ligandenaustausch.



$$p = \frac{c_{n-1} c_{n+1}}{c_n^2}; \quad 4p < 1 \quad [*]$$

a)  $c_A^0 = \text{const.}, c_B^0 = \text{variabel}$

$$q_a \equiv \frac{c_B^0}{c_A^0}$$

$T_a, \Gamma_a, \tau_a$  bezogen auf konstante Konzentration  $c_A^0$

$$\sin \alpha \equiv \sqrt{(1-4p_a)} [1 - (q_a - n)^2]$$

$$n-1 \leq q_a \leq n+1$$

$$0 \leq \sin \alpha \leq \sqrt{1-4p_a}$$

$$\text{oder } 0 \leq \tan \frac{\alpha}{2} \leq \frac{1-2\sqrt{p_a}}{\sqrt{1-4p_a}}$$

b)  $c_B^0 = \text{const.}, c_A^0 = \text{variabel}$

$$q_b \equiv \frac{c_A^0}{c_B^0}$$

$T_b, \Gamma_b, \tau_b$  bezogen auf konstante Konzentration  $c_B^0$

$$\sin \alpha \equiv \sqrt{(1-4p_b)} \left[ 1 - \left( \frac{1}{q_b} - n \right)^2 \right]$$

$$n-1 \leq \frac{1}{q_b} \leq n+1$$

$$0 \leq \sin \alpha \leq \sqrt{1-4p_b}$$

$$\text{oder } 0 \leq \tan \frac{\alpha}{2} \leq \frac{1-2\sqrt{p_b}}{\sqrt{1-4p_b}}$$

[\*] Für  $4p_a > 1$  erfolgt die Substitution durch hyperbolische Funktionen analog zu Tabelle 2.

$$a) \begin{cases} T_a = \frac{1}{1-4p_a} \{ 1 - \sqrt{1 - (1-4p_a)[1 - (q_a - n)^2]} \} \\ T_a = \frac{1}{1-4p_a} \cdot \frac{2 \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 + \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)} \end{cases}$$

$$T_a' = - \frac{q_a - n}{\sqrt{1 - (1-4p_a)[1 - (q_a - n)^2]}}$$

$$T_a'' = -4p_a \left[ \frac{1 + \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)} \right]^3$$

$$\Gamma_a = p_a T_a^2 \tau_a = \frac{4p_a}{(1-4p_a)^2} \cdot \frac{\tan^4 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \tan^4 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}$$

$$\tau_a = 1 - (1-4p_b) [1 - (q_a - n)^2]^{-1/2} \quad \tau_a = \frac{1 + \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}$$

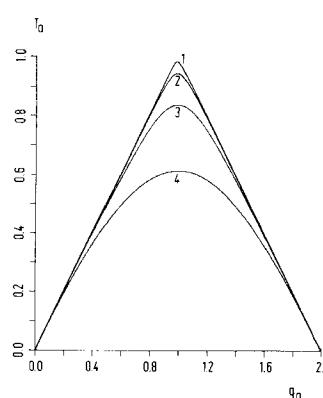
$$b) \begin{cases} T_b = \frac{q_b}{1-4p_b} \left\{ 1 - \sqrt{1 - (1-4p_b) \left[ 1 - \left( \frac{1}{q_b} - n \right)^2 \right]} \right\} \\ T_b = \frac{1}{1-4p_b} \cdot \frac{2 \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 + \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)} \end{cases}$$

$$q_b T_b' = - \left[ \frac{\left( \frac{1}{q_b} - n \right)}{\sqrt{1 - (1-4p_b) \left[ 1 - \left( \frac{1}{q_b} - n \right)^2 \right]}} - T_b \right]$$

$$q_b^3 T_b'' = -4p_b \left[ \frac{1 + \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)} \right]^3$$

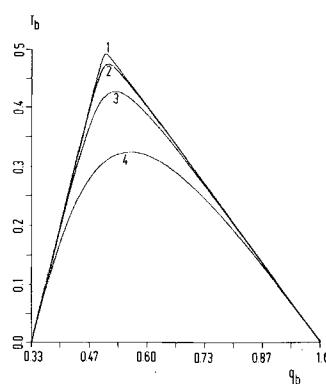
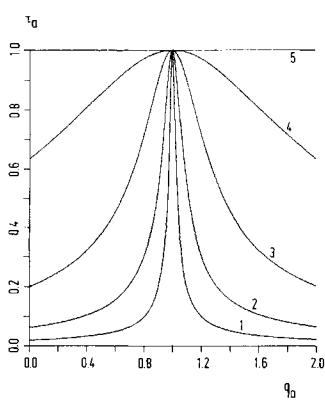
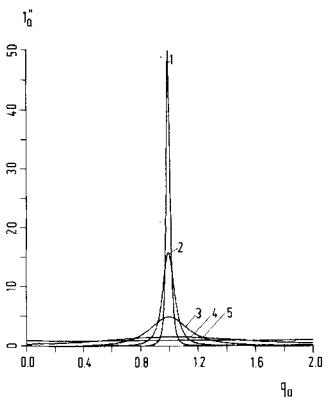
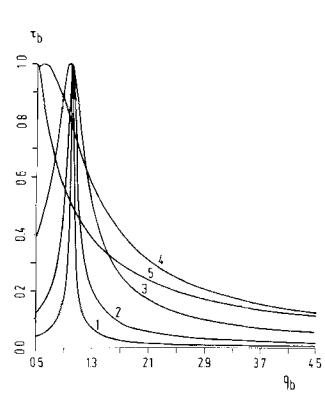
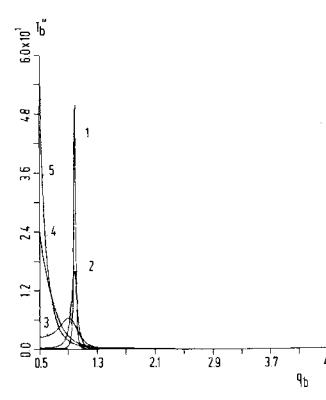
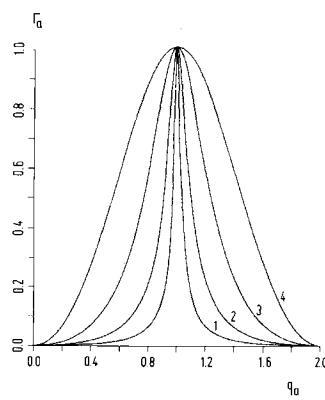
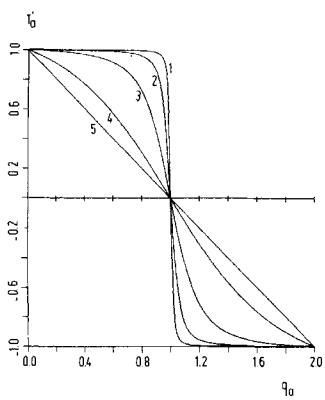
$$\frac{\Gamma_b}{q_b} = \frac{p_b (T_b/q_b)^2}{\sqrt{1 - (1-4p_b) \left[ 1 - \left( \frac{1}{q_b} - n \right)^2 \right]}} = \frac{4p_b}{(1-4p_b)^2} \cdot \frac{\tan^4 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \tan^4 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}$$

$$\tau_b q_b = \frac{1 + \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}{1 - \tan^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}$$

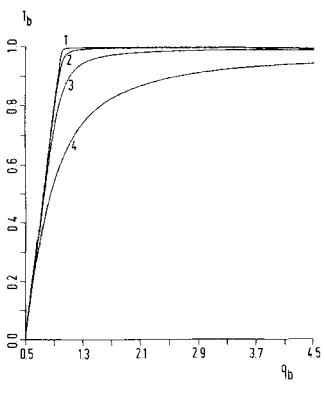


Für den Fall  $n=1$  sind die Parameter:

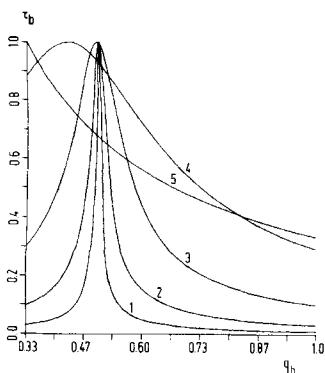
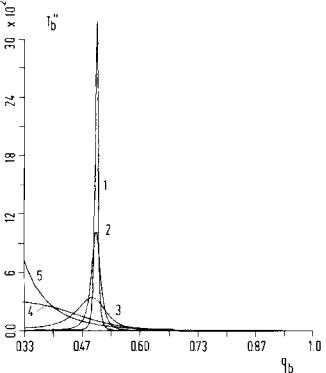
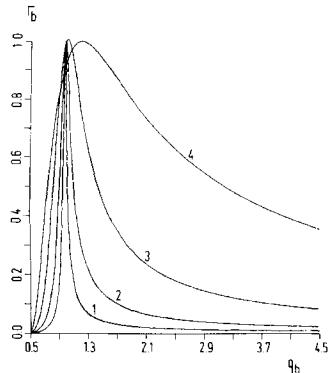
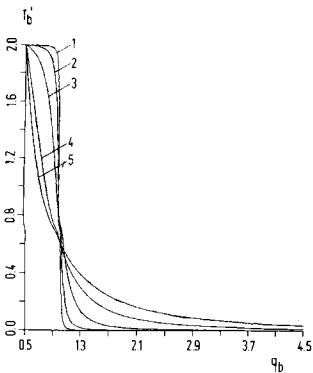
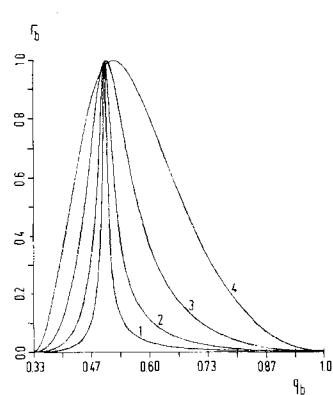
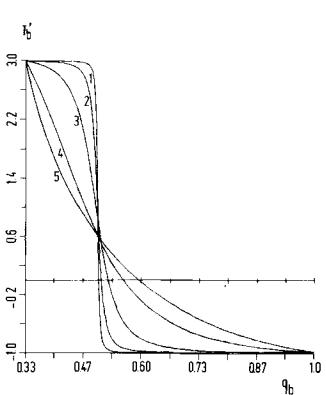
- 1:  $p_a = 1 \times 10^{-4}$
- 2:  $p_a = 1 \times 10^{-3}$
- 3:  $p_a = 1 \times 10^{-2}$
- 4:  $p_a = 1 \times 10^{-1}$
- 5:  $p_a = 2.5 \times 10^{-1}$



Für den Fall  $n=2$  sind die Parameter:  
 Kurve 1:  $p_b = 1 \times 10^{-4}$   
 2:  $p_b = 1 \times 10^{-3}$   
 3:  $p_b = 1 \times 10^{-2}$   
 4:  $p_b = 1 \times 10^{-1}$   
 5:  $p_b = 2.5 \times 10^{-1}$



Für den Fall  $n=1$  sind die Parameter:  
 Kurve 1:  $p_b = 1 \times 10^{-4}$   
 2:  $p_b = 1 \times 10^{-3}$   
 3:  $p_b = 1 \times 10^{-2}$   
 4:  $p_b = 1 \times 10^{-1}$   
 5:  $p_b = 2.5 \times 10^{-1}$



sind für einige bekannte Modelle der allosterischen Enzymwirkung<sup>[21,22]</sup> typisch und werden an anderer Stelle ausführlicher diskutiert<sup>[23]</sup>.

Echtes kooperatives Verhalten beschränkt sich im wesentlichen auf makromolekulare Substanzen, z.B. Proteine, Nucleinsäuren oder Membranvesikeln. Eine sequentielle Bindung mehrerer Liganden an polyfunktionelle Moleküle von niedrigerem Molekulargewicht bewirkt eher das Gegenteil. Man könnte ein solches Verhalten als negative Kooperativität bezeichnen. Im allgemeinen wird der erste Ligand am stärksten gebunden, während mit zunehmender Anzahl von Liganden eine stufenweise Abnahme der Bindungsenergie einhergeht. Den Ausnahmen von dieser Regel liegen zumeist komplizierte Mechanismen zugrunde. So dissoziieren z.B. die phenolischen Protonen im Phenolphthalein infolge der simultan ablaufenden Chinon-Lacton-Umwandlung „kooperativ“.

Unterscheiden sich die Bindungskonstanten der einzelnen Gruppen hinreichend, so kann man (vgl. Abschnitt 2) die einzelnen Reaktionsschritte separat behandeln. Schwierigkeiten treten allerdings auf, wenn die Werte der Bindungskonstanten sämtlich sehr groß sind, so daß alle Bindungsplätze unter normalen Konzentrationsbedingungen immer nahezu vollständig besetzt sind (was bedeutet, daß die gebundenen Liganden im Vergleich zu den freien Liganden in großem Überschuß vorliegen). Der eigentliche Prozeß der Ligandenabgabe muß dann als Austauschreaktion formuliert werden.



Die expliziten Ausdrücke für sämtliche Funktionen ( $T_b$  und seine Ableitungen sowie  $\Gamma_b$  und  $\tau_b$ ) in bezug auf die entsprechende Titrationsvariable sind den in Abschnitt 2 und insbesondere in Tabelle 2 enthaltenen Gleichungen sehr ähnlich. Sie werden jedoch durch das n-fache Auftreten von B in  $AB_n$  geringfügig modifiziert. Die Gleichgewichtskonstante ist wie folgt definiert

$$K = \frac{c_{n-1} \cdot c_{n+1}}{c_n^2} = \frac{k_n}{k_{n-1}} \quad (4.2-2)$$

Die Indices  $n-1$ ,  $n$  und  $n+1$  beziehen sich auf die Spezies  $AB_{n-1}$ ,  $AB_n$  bzw.  $AB_{n+1}$ . Die Erhaltungsrelationen lauten:

$$(4.2-3)$$

$$\begin{aligned} c_A^0 &\approx c_{n-1} + c_n + c_{n+1}; & 2c_{n+1} &= c_A^0 + c_B^0 - nc_A^0 - c_n \\ c_B^0 &\approx (n-1)c_{n-1} + nc_n + (n+1)c_{n+1}; & 2c_{n-1} &= c_A^0 - c_B^0 + nc_A^0 - c_n \end{aligned}$$

Der explizite Ausdruck für  $c_n$  ergibt sich aus einer quadratischen Gleichung:

$$c_n = \frac{c_A^0}{1-4K} \left\{ 1 - \sqrt{1 - (1-4K)(1 - [(c_A^0/c_B^0) - n]^2)} \right\} \quad (4.2-4)$$

Das einfachste und zweckmäßigste Verfahren ist, die Gesamtkonzentration des Komplexbildners  $c_A^0$  konstant zu lassen und die Konzentration  $c_B^0$ , die gegenüber  $c_A^0$  ungefähr n-fachem Überschuß entsprechen soll, zu verändern. Die Konstanz von  $c_A^0$  im Faktor vor dem Klammerausdruck bewirkt, daß die Beziehungen für  $T_a \equiv c_n/c_A^0$ ,  $\Gamma_a = \Gamma/c_A^0$  und  $\tau_a = \tau k_n c_A^0$  symmetrisch werden [analog dem in den Tabellen 1 und 3 aufgeführ-

ten Fall a)]. Diese lassen sich bei einer Auswertung sehr leicht handhaben. Aber mathematische Zweckmäßigkeit ist nicht unbedingt gleichbedeutend mit technischer Praktikabilität. Sind die Komplexverbindungen sehr stabil und nimmt die Bindungsstärke mit zunehmendem  $n$  ab, so ist die Zugabe kleiner Mengen von A zur B-Probe, wobei  $c_B^0$  konstant gehalten wird, vorzuziehen. Die höchste Stufe  $AB_n$  wird dann immer besetzt sein, solange B in n-fachem Überschuß vorliegt. Wird jedoch  $c_A^0$  größer als  $c_B^0/n$ , so treten nach und nach entsprechend dem Reaktionsschema (4.2-1) die niedrigeren Stufen mit  $AB_n$  in Konkurrenz. Die Funktionen  $T_b \equiv c_n/c_B^0$ ,  $\Gamma_{nb} = \Gamma_n/c_B^0$  usw. beziehen sich dann auf eine konstant gehaltene Konzentration  $c_B^0$ .

Die den beiden Verfahrensweisen ( $c_A^0 = \text{const.}$  und  $c_B^0 = \text{const.}$ ) zugrundeliegenden theoretischen Beziehungen sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die enge Beziehung zu den in den Tabellen 1 und 3 aufgeführten Funktionen ist offensichtlich, besonders wenn die trigonometrische Ausdrucksweise gewählt wird.

Gerade bei der Untersuchung sequentieller Ligandenbindung eröffnet die Amplituden-Registrierung (d.h.  $\Gamma$  oder auch  $\Gamma'$ ) für die Komplexometrie neue, interessante Möglichkeiten. Durch Variation der Titrationsvariablen  $q_a$  im Bereich von (unterhalb)  $1/n$  bis (oberhalb) 1 erfährt man mehrere gut definierte scharfe Maxima, die die  $n$  verschiedenen Bindungsstufen eindeutig charakterisieren. Die Ausarbeitung einer Titrationsmethode, die von den im Grenzfall auftretenden Singularitäten ausgeht, macht sich gerade dann bezahlt, wenn eine Reihe von Komplexen innerhalb eines engen Bereiches der varierten Konzentration sukzessive entsteht. Nach dem klassischen Verfahren erhält man eine Bindungskurve, die nur einen mehr oder weniger unscharfen Übergang zeigt.

Um die Nützlichkeit der dynamischen Techniken zu veranschaulichen, wollen wir zwei einfache Beispiele für die Titration mehrstufiger Systeme untersuchen.

Im ersten Fall handelt es sich um die Substitution zweier Liganden in der inneren Koordinationssphäre eines Metallions.



Sind die einzelnen Stabilitätskonstanten so groß, daß bei der geringsten noch messbaren Ligandenkonzentration bereits beide Komplexe vorliegen, so ist es ratsam, Methode b) zu verwenden, d.h.  $c_L^0$  konstant zu halten und mit den Metallionen zu titrieren. Wird  $\Gamma$  oder  $\Gamma'_b$  registriert, erscheint infolge der Bildung des Komplexes  $ML_2$  bei  $c_M^0 \approx c_L^0/2$  ein Maximum. Dieses Maximum verschwindet, wenn  $c_M^0$  größer als  $c_L^0/2$  wird, danach erscheint jedoch ein zweites Maximum, das durch die nun dominierende Austauschreaktion (4.2-1) verursacht wird, die selbstverständlich nur dann auftritt, wenn die Bindungsstärke für den ersten Liganden größer ist als für den zweiten. Abbildung 13 veranschaulicht dieses Verhalten für  $\Gamma_b$ . Die Empfindlichkeit der Bestimmung, die in der Schärfe des Maximums zum Ausdruck kommt, ist beachtlich. Experimentelle Aufzeichnungen dieser Art liegen für die Komplexbildung von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Sr}^{2+}$  mit Murexid in Methanol<sup>[11]</sup> vor. Sowohl Relaxationsamplituden als auch Zeitkonstanten konnten durch elektrische Feldsprung- und Temperatursprungmessungen bestimmt werden. Einige Oszillogramme und die dazugehörigen Auswertungen zeigt Abbildung 14.

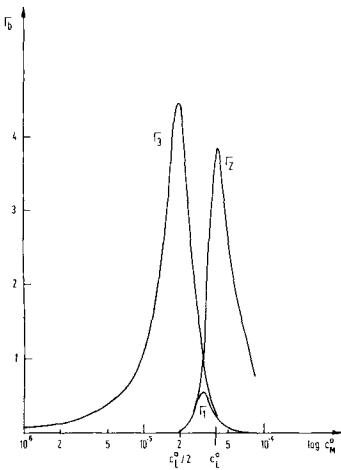
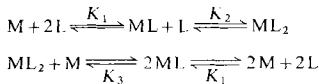


Abb. 13. Reduzierter Amplitudenfaktor für einen zweistufigen Dissoziationsprozess nach Gl. (4.2-5). Die beiden scharfen Maxima entsprechen den beiden Reaktionen:

- 1)  $L + ML \rightleftharpoons ML_2$   
 2)  $ML_2 + M \rightleftharpoons 2ML$

#### Die Parameter für das Schema



$$\text{sind: } K_1 = 10^8 \text{ M}^{-1}$$

$$K_2 = 10^6 \text{ M}^{-1}$$

$$c_1^0 = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Die Registrierung der für die einzelnen Schritte der Komplexbildung nach Schema (4.2-5) charakteristischen Signale – unter der Voraussetzung  $c_L^0 \gg c_M^0$  für beide Schritte und  $c_M^0 = \text{const.}$  – ist nur dann möglich, wenn M mit L (im Sinne von  $ML_2$  und  $ML$ ) gesättigt in verschiedenen Konzentrationsbereichen von L auftritt. Die Auswertung der Meßdaten gelingt in diesem Fall nach dem in Abschnitt 2 angegebenen Verfahren.

Das zweite Beispiel betrifft die Titration einer zweibasisigen Säure. Bis jetzt wurde nur wenig auf pH-Titrationen eingegangen, da man normalerweise einfach mittels geeigneter Puffer den gesamten pH-Bereich durchtesten kann. Im Fall einer mehrbasigen Säure tritt jedoch ein Problem auf, das noch nicht völlig befriedigend gelöst werden konnte. Es ist das Problem der sogenannten „mikroskopischen“ Dissoziationskonstanten<sup>[4]</sup>. Was darunter zu verstehen ist, wird aus dem Reaktionsschema (4.2-6) deutlich.

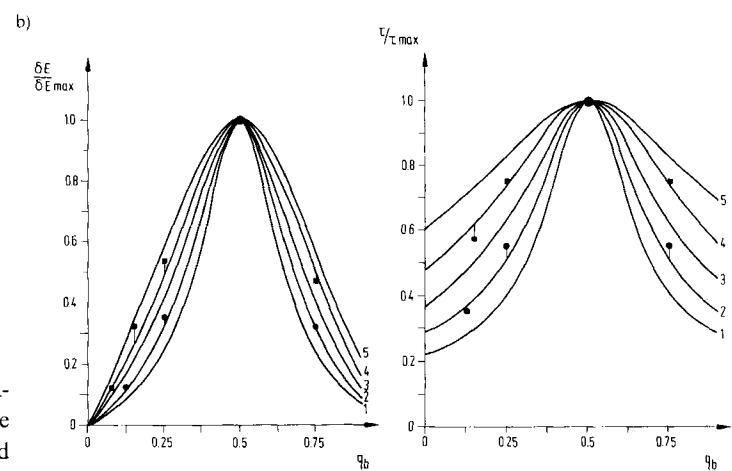
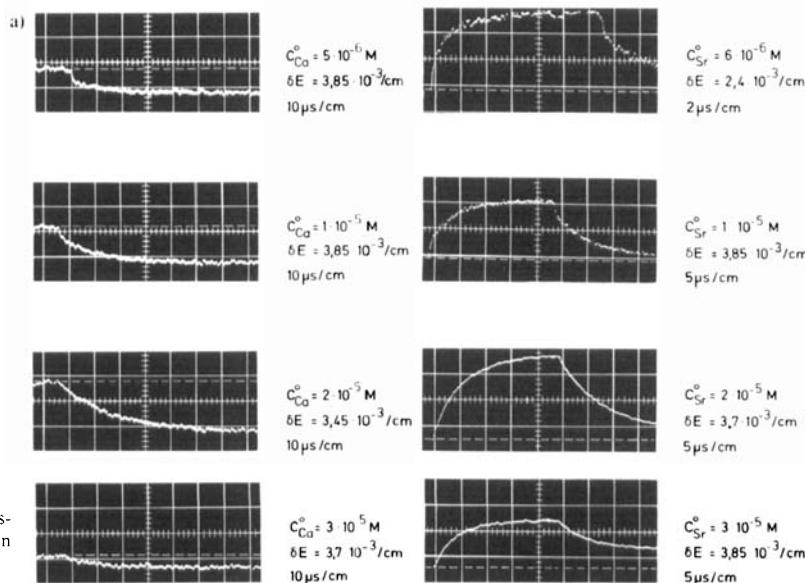
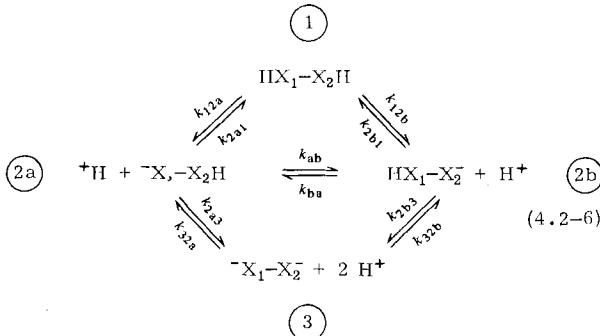


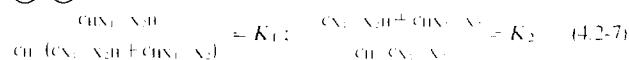
Abb. 14. Relaxationskurven, hervorgerufen durch (elektrischen) Feldsprung im System Ca oder Sr und Murexid in Methanol. Die Ergebnisse beziehen sich auf den Schritt  $ML + L \rightleftharpoons ML_2$ . Die Maxima von  $F$  und  $\tau$  liegen bei  $\zeta_M^0 = \frac{1}{2} \zeta_L^0$ . Ein zweiter (langsamerer) Relaxationseffekt, der bei höheren Konzentrationen des Metallions zu erwarten ist, bezieht sich auf die Stufe  $ML_2 + M \rightleftharpoons 2ML$ .

### a) Oszillogramme:

b) Normierte Diagramme für  $I'(E)$  und  $\tau$ . Die ermittelten Werte sind für Ca:  $K_2 = 5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  und für Sr:  $K_2 = 1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ .  $c_0^M$  bezieht sich auf die Gesamt Konzentration des Metallions.  $c_0^I$  beträgt in beiden Serien  $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . Die Kurven 1 bis 5 beziehen sich auf folgende angenommene Werte für  $K_2$ :  
 1)  $1.0 \times 10^6$ , 2)  $5.6 \times 10^5$ , 3)  $3.1 \times 10^5$ , 4)  $1.8 \times 10^5$  und 5)  $1.0 \times 10^5$ .

Die beiden pK-Werte, die man aus der Titration erhält,

beziehen sich auf die Gesamt-Gleichgewichte  $\text{C}_2\text{H}_4$  und  $\text{C}_2\text{H}_6$ .

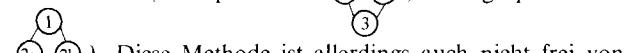


Die pK-Werte können um Größenordnungen differieren, was jedoch nicht unbedingt bedeutet, daß die pK-Werte der einzelnen Gruppen  $X_1$  und  $X_2$  sehr verschieden sind. Stark unterschiedliche pK-Werte findet man sogar bei Säuren mit identischen Gruppen  $X_1$  und  $X_2$ . Der Grund dafür ist in Nachbarschaftseffekten zu suchen, die aus der Änderung der elektri-

schen Ladung resultieren. Die wahren oder „mikroskopischen“ Konstanten lassen sich nur dann bestimmen, wenn man zusätzlich zu den Werten  $pK_1$  und  $pK_2$  die Konstante des Isomerisierungsgleichgewichts  $\textcircled{2a} \rightleftharpoons \textcircled{2b}$  kennt. Eine direkte Zuordnung wäre möglich, wenn sich die beiden Zustände  $\textcircled{2a}$  und  $\textcircled{2b}$  experimentell identifizieren ließen, z. B. aufgrund unterschiedlicher spektroskopischer Eigenschaften. Im allgemeinen ist eine solche Zuordnung aber sehr schwierig und gelingt nur mit (mehr oder weniger zutreffenden) Annahmen, die auf speziellen Analogien zu den Spektren ähnlicher (z. B. methylierter) Verbindungen beruhen. Infolge der schnellen gegenseitigen Umwandlung von  $\textcircled{2a}$  und  $\textcircled{2b}$  ist es im allgemeinen nicht möglich, einen der beiden Zustände chemisch abzufangen und den anderen dann separat mittels einer spezifischen Reaktion zu titrieren.

Mit dynamischen Methoden ließe sich im Prinzip der Isomerisierungsschritt im Relaxationsspektrum erfassen. Denn im Zeitspektrum tritt eine Geschwindigkeitskonstante auf, die unter geeigneten pH-Bedingungen direkt der Umwandlungsreaktion 1. Ordnung  $\textcircled{2a} \rightleftharpoons \textcircled{2b}$  zugeordnet werden kann. Unglücklicherweise sind die Zeitkonstanten und die Amplituden von Reaktionen 1. Ordnung, sofern diese direkt registriert werden, konzentrationsunabhängig<sup>51</sup>. Daher kann man nicht unmittelbar (d. h. ohne Verwendung von Analogien) aus einer der Isomerisierung zugeschriebenen Relaxationszeit die *einzelnen* Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{ab}$  und  $k_{ba}$ ) bestimmen. Es ist auch nicht möglich, die Relaxationsamplitude aufzuspalten in die unbekannten Größen: Gleichgewichtskonstante und Reaktionsenthalpie (oder Reaktionsvolumen) sowie in die für die Anzeige notwendigen Parameter (wie z. B. die Differenz der Extinktionskoeffizienten von Zustand  $\textcircled{2a}$  und  $\textcircled{2b}$ ). Wiederum ist die Interpretation nur im Rahmen vereinfachender Annahmen möglich.

Man könnte diese Schwierigkeit umgehen, indem man das gesamte Relaxationsspektrum sorgfältig registriert und die Konzentrationsabhängigkeiten aller Zeitkonstanten und Amplituden genau aufzeichnet. Unter günstigen pH-Bedingungen läßt sich das Reaktionssystem auf jeweils ein Dreieckschema beschränken (hohe pH-Werte:  $\textcircled{2a}-\textcircled{2b}$ ; niedrige pH-Werte:

  
 $\textcircled{2a}-\textcircled{2b}$ ). Diese Methode ist allerdings auch nicht frei von Schwierigkeiten: Die protolytischen Reaktionen verlaufen im allgemeinen diffusionskontrolliert, d. h. sehr schnell, so daß die Geschwindigkeiten der einzelnen Reaktionsschritte nicht ohne weiteres voneinander unterscheidbar sind. Die Schritte  $\textcircled{1}-\textcircled{2a}$  und  $\textcircled{1}-\textcircled{2b}$  bzw.  $\textcircled{2a}-\textcircled{3}$  und  $\textcircled{2b}-\textcircled{3}$  können daher nicht als getrennte Reaktionen aufgelöst werden.

Zu einer eleganteren Lösung des Problems gelangt man durch einen kleinen Trick: Man geht von Situationen aus, bei denen die Zustände  $\textcircled{2a}$  und  $\textcircled{2b}$  dominieren, und gibt einen spezifischen Reaktionspartner zu, der nur mit einem der Zustände a oder b reagiert (z. B. bei  $\text{HS}-\text{R}-\text{NH}_2$  ein spezifisches SH-Reagens). Diese spezifische Reaktion darf weder irreversibel sein noch darf sie zu langsam – verglichen mit der Reaktion 1. Ordnung – ablaufen. Mit anderen Worten, das Hilfssystem soll nicht einen der beiden Zustände „beseitigen“, sondern sich mit diesem schnell ins Gleichgewicht setzen und damit an die Isomerisierung  $a \rightleftharpoons b$  ankoppeln. Für ein solches System gelten die in Tabelle 4b hergeleiteten Beziehungen. Zur Auswertung ist nur die Kenntnis meßbarer Größen (z. B. zwei Relaxationszeiten und die Einwaagekonzentrationen der Probe und des Hilfssystems) erforderlich. Das Beispiel der Reak-

tion von Sulfit mit 4-Pyridincarbaldehyd, das in Abschnitt 2.4 diskutiert wurde, gehört in diese Kategorie von Reaktionen. Im Teil 2.4 befaßten wir uns ausschließlich mit dem schnellen und damit getrennt auftretenden Schritt zweiter Ordnung. Die Terme für die langsame Hydratationsreaktion (1. Ordnung) in Gegenwart von Sulfit enthalten tatsächlich konzentrationsabhängige Faktoren, so daß alle Geschwindigkeits- und Gleichgewichtsparameter auf diese Weise bestimmt werden könnten. Obwohl sich diese langsamens Hydrationsprozesse auch mit anderen Methoden untersuchen ließen, zeigt dieses Beispiel eine Anwendungsmöglichkeit auf, die besonders im Bereich der Biochemie von großem Nutzen sein könnte.

### 4.3. Ternäre Systeme

Für Relaxationsuntersuchungen muß ein System generell zwei Voraussetzungen erfüllen: Erstens muß es auf eine von außen aufgezwungene Änderung eines intensiven Parameters ( $T, P, E$ ) reagieren und zweitens muß es ein registrierbares Signal hervorbringen, anhand dessen die Verschiebung des Gleichgewichts aufgezeichnet werden kann. Der Effekt der Gleichgewichtsstörung hängt von der Größe der Reaktionsparameter wie z. B. der Enthalpie ( $\Delta H$ ) oder des Reaktionsvolumens ( $\Delta V$ ) ab. Sind diese bei einem gegebenen System zu klein, so kann dennoch über ein Hilfssystem, das typische Puffereigenschaften hat und empfindlicher auf externe Kräfte reagiert, eine Störung des betreffenden Gleichgewichts erzwungen werden. Dieses Prinzip ist von besonderer Bedeutung in solchen Fällen, in denen die Gleichgewichtsstörung durch Verwendung starker elektrischer Felder hervorgerufen wird. Einen meßbaren Dissoziations-Feldeffekt erhält man aber nur, wenn beide Reaktionspartner eine Überschußladung besitzen. Metallkomplexe mit neutralen Liganden erfüllen diese Voraussetzungen nicht. Ein „sekundärer“ Feldeffekt kann dann immer noch mit Hilfe konkurrierender, geladener Liganden erzeugt werden, die die freien Metallionen puffern und damit deren Wechselwirkung mit neutralen Reaktionspartnern beeinflussen.

Binäre Gleichgewichte wurden schon in Abschnitt 3 diskutiert. In manchen Fällen braucht man jedoch zwei Hilfssysteme, und zwar einen Puffer *und* einen Indikator. Eine Verallgemeinerung der Beziehungen für binäre Systeme ist daher von besonderem Interesse und wird hier explizit für zwei Arten von ternären Systemen ausgeführt. Das Beispiel in Anhang 2 zeigt darüber hinaus, wie die Behandlung auf eine beliebige Anzahl von Reaktionspartnern, Metallionen oder Liganden, rekursiv erweitert werden kann.

#### 4.3.1. Probe, Puffer, Indikator

Es sei angenommen, daß drei Arten von Liganden X, Y, Z um Bindung an dasselbe Metallion M konkurrieren. Dabei wird zunächst offengelassen, welche der drei Spezies die Probe, der Puffer oder der Indikator ist. Später wird es natürlich notwendig, die speziellen Eigenschaften einer jeden der drei Verbindungen festzulegen, da diese die an ihre jeweilige Rolle geknüpften Bedingungen nur unter ausgewählten Konzentrationsverhältnissen erfüllen können. Die entsprechenden Gleichgewichte sind



Es gelten die Massenwirkungsbeziehungen

$$\frac{c_{MX}}{c_M c_X} = K_X; \quad \frac{c_{MY}}{c_M c_Y} = K_Y; \quad \frac{c_{MZ}}{c_M c_Z} = K_Z \quad (4.3-2)$$

denen die Amplitudenfaktoren

$$\Gamma_X = \frac{c_M c_X}{K_X^{-1} + c_M + c_X}; \quad \Gamma_Y = \frac{c_M c_Y}{K_Y^{-1} + c_M + c_Y}; \quad \Gamma_Z = \frac{c_M c_Z}{K_Z^{-1} + c_M + c_Z} \quad (4.3-3)$$

zuzuordnen sind. Weist nur ein System, nämlich der Indikator Z, beobachtbare Veränderungen bei der Komplexbildung auf, so ist dessen Konzentrationsverschiebung die einzige Größe, die registriert wird. In Abwesenheit von X und Y ist diese Änderung gegeben durch:

$$\delta c_{MZ} = \Gamma_Z \delta \ln K_Z \quad (4.3-4)$$

In Abschnitt 3.2 wurde schon darauf hingewiesen, daß in Gegenwart des X-Systems das aufgezeichnete Signal modifiziert wird:

$$\delta c_{MZ}^{\pm\pm} = \Gamma_Z^{\pm\pm} \left( \delta \ln K_Z - \frac{\Gamma_X}{c_M} \delta \ln K_X \right) \quad (4.3-5)$$

mit

$$\Gamma_Z^{\pm\pm} = \frac{c_M c_Z}{K_Z^{-1} + c_M + c_Z (1 - \Gamma_X / c_M)} = \Gamma_Z \frac{1}{1 - \Gamma_Z \Gamma_X / c_M} \quad (4.3-6)$$

Kommt auch das Y-System hinzu, so erhält man den in bezug auf X und Y symmetrischen Ausdruck:

$$\begin{aligned} \delta c_{MZ}^{\pm\pm} &= \frac{\Gamma_Z}{1 - \Gamma_Z \Gamma_{XY} / c_M^2} \left\{ \delta \ln K_Z - \frac{\Gamma_X / c_M (1 - \Gamma_Y / c_M)}{1 - \Gamma_X \Gamma_Y / c_M^2} \delta \ln K_X - \right. \\ &\quad \left. - \frac{\Gamma_Y / c_M (1 - \Gamma_X / c_M)}{1 - \Gamma_X \Gamma_Y / c_M^2} \delta \ln K_Y \right\} \end{aligned} \quad (4.3-7)$$

mit

$$\Gamma_{XY} = \frac{\Gamma_X + \Gamma_Y - 2 \Gamma_X \Gamma_Y / c_M}{1 - \Gamma_X \Gamma_Y / c_M^2} \quad (4.3-8)$$

Da hier der Indikator Z die einzige Spezies ist, die ein endliches Signal zur Registrierung beisteuert, ist  $c_M$  durch  $K_Z^{-1} \cdot \eta / (1 - \eta)$  gegeben, wobei  $\eta / (1 - \eta)$  dem in Abschnitt 2.1 eingeführten Extinktionsquotienten  $(E - E_0) / (E_\infty - E)$  entspricht. Bei einer durch einen Temperatursprung hervorgerufenen Störung erhält man:

$$\begin{aligned} \delta c_{MZ}^{4+} &= \frac{\Gamma_Z}{1 - \Gamma_Z \Gamma_{XY} / c_M^2} \left\{ \Delta H_Z - \right. \\ &\quad \left. - \frac{(\Delta H_X \Gamma_X + \Delta H_Y \Gamma_Y) / c_M - (\Delta H_X + \Delta H_Y) \Gamma_X \Gamma_Y / c_M^2}{1 - \Gamma_X \Gamma_Y / c_M^2} \right\} \frac{\delta T}{RT^2} \end{aligned} \quad (4.3-9)$$

Bis hierher wurde zwischen X und Y nicht speziell unterschieden. Wie man erkennt, bewirkt der Einfluß einer sekundären Verschiebung selbst dann noch einen Beitrag beider Systeme zur Amplitude, wenn eine der Reaktionenthalpien praktisch gleich Null ist. Vollständige Pufferung von M, sowohl durch das X- als auch durch das Y-System bedeutet:

$$c_X, c_{MX}, c_Y, c_{MY} \gg c_M \quad (4.3-10)$$

oder explizit ausgedrückt:

$$c_X \gg c_M + K_X^{-1}; \quad c_Y \gg c_M + K_Y^{-1} \quad (4.3-11)$$

$$\Gamma_X \approx \Gamma_Y \approx c_M; \quad \Gamma_{XY} \approx 1 \quad (4.3-12)$$

Die Amplitude des gemessenen Signals hängt von der relativen Stärke beider Puffer-Effekte ab, die in der Größe des Verhältnisses

$$\frac{c_i}{c_M + K_i^{-1}} \gg 1 \quad (4.3-13)$$

zum Ausdruck kommt, wobei der Index i für X oder Y steht. Ist die Wirkung des einen Puffers (i) viel stärker als die des anderen, so vereinfacht sich Gl. (4.3-7) zu

$$\delta c_{MZ}^{\pm\pm} = \frac{c_M c_Z}{c_M + K_Z^{-1}} (\delta \ln K_Z + \delta \ln K_i) \quad (4.3-14)$$

Die Eigenschaften des Konkurrenten von i können dann aber nicht mehr registriert werden. Haben andererseits X und Y die gleiche Pufferwirkung, so tragen beide, unabhängig von ihrer absoluten Pufferkapazität, zur Amplitude bei:

$$\delta c_{MZ}^{\pm\pm} = \frac{c_M c_Z}{c_M + K_Z^{-1}} (\delta \ln K_Z + \frac{1}{2} \delta \ln K_X + \frac{1}{2} \delta \ln K_Y) \quad (4.3-15)$$

Der Kunstgriff, ein endliches Signal für die zu untersuchende Reaktion zu bekommen, besteht darin, einen Puffer auszuwählen, der eine mit der Probe vergleichbare Komplexstabilität besitzt. Wirkt dagegen nur einer der beiden Konkurrenten X oder Y als starker Puffer, so kann dessen Gleichgewichtskonstante nicht mehr aus dem Relaxationssignal gewonnen werden. Die Tatsache, daß das Signal nur in Gegenwart beider Spezies X und Y beobachtet werden kann, charakterisiert die Gesamtreaktion als Substitutionsreaktion.

Die Möglichkeit, „sekundäre“ Verschiebungen zu induzieren, eröffnet einen neuen und sehr allgemeinen Weg zur Bestimmung von Stabilitätskonstanten. Diese Methode ist zur Untersuchung der Wechselwirkung von Alkalimetall-Ionen mit elektrisch neutralen Antibiotika, die die Eigenschaften von Ionen-Carriern zeigen, benutzt worden. In diesem Fall wird der „sekundäre“ Feldeffekt mit geladenen ionophoren Verbindungen (z. B. Nigericin, Monensin) erzeugt.

#### 4.3.2. Indirekte Anzeige

In diesem Abschnitt soll noch ein weiteres binäres System, dem für die Titration eine wichtige Rolle zukommt, beschrieben werden: Zwei Substrate A und B konkurrieren miteinander um denselben Bindungsplatz, z. B. an einem Enzym P, wobei jedoch das eine Substrat – beispielsweise B – zusätzlich noch mit einem Konkurrenten von P reagieren kann. Dieser Konkurrent kann ein Indikator (I) sein, der sein Absorptionsspektrum durch die Bindung des Substrats B verändert. Eine andere, formal sehr ähnliche Situation liegt vor, wenn B mit dem Indikator zwar keinen Komplex bildet, jedoch ein Proton, ein Elektron oder ein Metallion auf diesen überträgt. Ein Titrationsverfahren, das diesen speziellen Gegebenheiten Rechnung trägt, kann sehr nützlich sein, denn oft besitzen

weder das Protein noch das Substrat registrierbare optische Eigenschaften. Andererseits ist es durchaus möglich, eine Substanz zu finden, die sowohl an das Protein als auch an einen Indikator gebunden wird. So geben viele Proteine bei der Anlagerung eines Substrats ein Metallion ab, z. B. wird  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Bindung von Acetylcholin an das zugehörige Rezeptorprotein freigesetzt<sup>[14]</sup>. Keine der drei Komponenten  $\text{Ca}^{2+}$ , Acetylcholin oder der Rezeptor weisen optische Eigenschaften auf, die für die Aufzeichnung der Titrationsmessungen herangezogen werden könnten.  $\text{Ca}^{2+}$  jedoch lagert sich an einen Indikator, z. B. Murexid, an und verändert dadurch dessen Spektrum. Diese spektrophotometrische Anzeige gibt Auskunft über die Konkurrenz zwischen  $\text{Ca}^{2+}$  und Acetylcholin (siehe hierzu Tabelle 2 und Abb. 4). Viele ähnliche Fälle, sowohl in der Proteinchemie als auch in der Komplexometrie, lassen eine Behandlung dieses Problems, das von besonderem praktischen Interesse ist, als wünschenswert erscheinen.

Wir bezeichnen das Protein mit P, den Indikator mit I und die beiden Konkurrenten mit A und B.

Die Bindungsgleichgewichte und die dazugehörigen (vereinfachten) Massenwirkungsbeziehungen sind durch

$$\left. \begin{array}{l} A + P \rightleftharpoons AP \\ B + P \rightleftharpoons BP \\ B + I \rightleftharpoons BI \end{array} \right\} \quad \begin{array}{l} K_A = \frac{c_{AP}}{c_A \cdot c_P} \\ K_B = \frac{c_{BP}}{c_B \cdot c_P} \\ K_I = \frac{c_{BI}}{c_B \cdot c_I} \end{array}$$

oder

$$B + I' \rightleftharpoons B' + I \quad K_I = \frac{c_{B'} \cdot c_I}{c_{I'} \cdot c_B}$$

gegeben. Die gesamte Zusammensetzung des Systems genügt den Erhaltungsbeziehungen

$$\begin{array}{ll} c_P^0 = c_P + c_{AP} + c_{BP} & c_B^0 = c_B + c_{BP} + c_{BI} \\ c_A^0 + c_A + c_{AP} & c_I^0 = c_I + c_{BI} \\ \text{oder} & \\ c_I^0 = c_I + c_{I'} & \text{und } c_{I'} = c_{B'}, \text{ falls } c_{I'} + c_{B'} \\ \text{und } c_I = c_{B'} & \text{auch gleich } c_I^0 \text{ gesetzt werden kann} \end{array}$$

Hier ist anzumerken, daß für alle mit einem „Strich“ versehenen Symbole, was immer dieser auch bedeutet (z. B. ein Proton oder ein Elektron), entsprechende Erhaltungsbeziehungen erfüllt sein müssen. Die oben angegebenen Gleichungen gelten nur, wenn es keine weiteren Aczeptoren für das so symbolisierte Teilchen (z. B. Proton oder Elektron) gibt und dieses selbst nicht in freier Form auftreten kann (zumindest nicht in einer mit  $c_I$  oder  $c_B$  vergleichbaren Menge).

Die Art und Weise, nach der sich die einzelnen Konkurrenzreaktionen überlagern, wird im obigen Schema durch die beiden Klammern angedeutet. Die verschiedenen Indikatorformen I und IB sowie I und I' sind die einzigen Verbindungen, die zur meßbaren Absorption beitragen. Folglich kann  $c_B$  direkt anhand des Extinktionsquotienten bestimmt werden:

$$c_B = K_I^{-1} \frac{\eta}{1-\eta} \quad \text{oder} \quad c_B = K_I^{-1} \cdot c_I^0 \frac{\eta^2}{1-\eta}$$

mit

$$c_{IB} = \eta c_I^0 \quad \text{und} \quad c_I = (1-\eta) c_I^0 \quad (\text{vgl. Abschnitt 3.2})$$

oder

$$c_I = \eta c_I^0 \quad \text{und} \quad c_{I'} = (1-\eta) c_I^0$$

Für die erfolgreiche Ausarbeitung einer Titrationsmethode muß man diese Terme in geeigneter Weise kombinieren, so daß man eine Beziehung zwischen den *meßbaren* Extinktionsverhältnissen oder ihren differentiellen Veränderungen, den Einwaagekonzentrationen (die optimal gewählt sein müssen) und den zu bestimmenden Stabilitätskonstanten bekommt. Im Anhang 3 haben wir die so erhaltenen Beziehungen zusammengestellt. Die Relaxationsamplituden sind in impliziter Form angegeben. Die allgemeinen Ausdrücke haben eine ziemlich komplexe Struktur und müssen daher für eine optimale Anwendung im Detail analysiert werden. Die Tatsache, daß man es mit zwei einander überlappenden, konkurrierenden Systemen zu tun hat, schränkt die Wahl günstiger Bedingungen wesentlich ein.  $K_A$  und  $K_B$  dürfen sich nicht zu sehr voneinander unterscheiden. Der Indikator sollte in einer Konzentration vorliegen, bei der Veränderungen von  $c_B$  am empfindlichsten registriert werden können. Außerdem müssen für die Einstellung der Konzentrationen  $c_A$ ,  $c_B$  und  $c_P$  speziell die Werte der Konstanten  $K_A^{-1}$  und  $K_B^{-1}$  berücksichtigt werden.

Der vollständige Ausdruck für die Amplitude  $(\delta c_{BI})_{III}$  ist im Anhang 3 angegeben.  $K_A$  kann am einfachsten bestimmt werden, indem man die zugehörige Relaxationszeit  $\tau_{III}$  bei einem Überschuß von  $c_A^0$  mißt. Eine lineare Auftragung, entsprechend dem in Abbildung 2 gezeigten Beispiel, liefert die zwei Geschwindigkeitskonstanten, deren Verhältnis  $K_A$  definiert. Aus der Gleichung für  $(\delta c_{BI})_{III}$  ist zu entnehmen, unter welchen Bedingungen sich endliche Signale registrieren lassen.

Die Anwendung der indirekten Indikation erfordert ein grundlegendes Verständnis der Theorie und läßt sich keineswegs auf die schematische Befolgung von Meßvorschriften reduzieren.

## 5. Das Procedere

Das Interesse des Chemikers an Titrations ist natürlich eher praktischer als fundamental-theoretischer Natur. Es scheint daher geboten, diesen Fortschrittsbericht mit einer kritischen und vergleichenden Übersicht über die Titrationsprinzipien und ihre praktische Anwendbarkeit abzuschließen. Natürlich darf man aber hier keine vollständige Zusammenstellung der Titrationsverfahren oder eine Spezifizierung aller notwendigen Eigenschaften erwarten, die einen Komplexbildner, Indikator oder Puffer auszeichnen sollten. Dazu verweisen wir auf die einschlägige Literatur<sup>[7, 17]</sup>.

Eine gute Titrationskurve ist durch einen scharfen Übergang gekennzeichnet, gleichbedeutend einem definierten Endpunkt. Im Grenzfall entspricht ein solcher Endpunkt einer echten Diskontinuität, das heißt, daß in einem kritischen Konzentrationsbereich, nämlich in der unmittelbaren Umgebung des Äquivalenzpunkts, die Zugabe einer geringen Menge Standardlösung die Konzentration der noch nicht umgesetzten Probensubstanz (oder eines angekoppelten Reaktionspartners) um Größenordnungen ändert. Wo immer sich eine solche Situation verwirklichen läßt, ist die konventionelle Titrationsmethode unschlagbar – vorausgesetzt, Ziel der Untersuchung ist die quantitative Analyse. Soll andererseits der Gegenstand der Untersuchung die Bestimmung der Komplexstabilität sein, so bietet ein extrem scharfer Endpunkt

keinen Vorteil. Im Gegenteil, hier ist der allmähliche Übergang erwünscht, denn gerade die Abweichung von der Diskontinuität enthält die gesamte Information über die Stabilitätskonstante: Mit der Verbreiterung der Titrationskurve geht gleichzeitig eine Verschiebung des Halbwertspunktes längs der Konzentrationsachse einher, wobei schließlich im Falle von  $K \cdot c_B \ll 1$  die relative Lage des Halbwertspunktes ein direktes Maß für  $K^{-1}$  wird. Trägt man dann  $T_b$  gegen den Logarithmus der Konzentration der Standardlösung ( $c_A^0$ ) auf, so tritt der Wendepunkt der Titrationskurve genau bei  $\log c_A^0 = -\log K$  auf. Unter dieser Voraussetzung nimmt die Kurve für verschiedene Komplexstabilitäten dieselbe Standardform an (vgl. Abb. 3). Die klassischen Anwendungen in der Enzymchemie – kinetische Untersuchungen unter stationären Bedingungen eingeschlossen – beziehen sich auf die oben erwähnten idealen Gegebenheiten (vgl. Abbildungen 2, 8 und 12). Es ist offensichtlich, daß die Voraussetzungen für eine solche Situation nur im Falle nicht allzu großer Komplexstabilität erfüllbar sind. Die meisten Detektionstechniken sprechen auf Konzentrationen unterhalb  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  M kaum oder gar nicht mehr an. Dies gilt mit Sicherheit für die polarimetrischen (ORD und CD), spektrophotometrischen (selbst für Substanzen mit hohen Extinktionskoeffizienten) und die konduktometrischen Verfahren (angewandt auf wäßrige Lösungen). Die Fluorimetrie<sup>[1]</sup>, soweit sie anwendbar ist, erlaubt im allgemeinen ein Arbeiten bei niedrigeren Konzentrationen, auch unterhalb von  $10^{-6}$  M. Im Hinblick auf eine selektive Erfassung sehr kleiner Konzentrationen kommt der Polarographie und anderen elektrochemischen Verfahren besondere Aufmerksamkeit zu. Nichtsdestoweniger muß man immer dann, wenn die Stabilität der zu untersuchenden Komplexverbindungen sehr groß wird, schließlich doch auf Hilfssysteme zurückgreifen und nach den Regeln der Substitutionsmethoden vorgehen.

Die in diesem Beitrag eingeführten dynamischen Titrationsverfahren sind im Bereich geringer und mäßiger Komplexstabilität den gebräuchlichen statischen Methoden ebenbürtig, bei Komplexen mit hohen Stabilitäten und insbesondere bei mehrstufigen Systemen sind sie ihnen eindeutig überlegen. Alle bekannten reversiblen Reaktionstypen, die mit den klassischen Titrationsverfahren untersucht wurden<sup>[4, 7, 17]</sup> lassen sich ebensogut mit Relaxationsmethoden studieren. In der Tat ist die Information, welche die dynamischen Verfahren liefern, viel direkter mit den Gleichgewichtsparametern (sowie auch den kinetischen Konstanten) verknüpft. Außerdem ist sie wesentlich detaillierter, wenn es sich um mehrstufige Prozesse handelt. Gerade im Bereich gekoppelter, mehrstufiger Systeme bieten sich der dynamischen Analyse Wege an, die den klassischen Verfahren grundsätzlich versperrt sind (vgl. Tabelle 2, Abb. 7 und 11).

Bei einer 1:1-Komplexbildung, unter der Voraussetzung  $K^{-1} \gg c_{\text{Probe}}$ , zeigen die logarithmischen Ableitungen  $\partial T_b / \partial \ln K$  und  $\partial T_b / \partial \ln c_{\text{Standard}}$  sehr ähnliches Verhalten. In diesem Fall ist es die Position des Maximums auf der  $c_{\text{Standard}}$ -Achse, die die gesamte Information über die Stabilitätskonstante  $K$  liefert, die sonst in der Einheitsform einer Standardkurve verborgen bliebe (siehe Abb. 3). Im Fall  $K^{-1} \ll c_{\text{Probe}}$  ist die Situation völlig anders. Hier entsprechen die Konzentrationsabhängigkeiten der Amplituden, besonders aber der Zeitkonstanten, eher der zweiten Ableitung von  $T_b$  nach  $c_{\text{Standard}}$ .

[\*] Eine Übersicht über fluorimetrische Techniken für Titrations- und Relaxationsuntersuchungen gibt Jorin [12].

Man könnte sagen, daß erst die Verwendung der höheren Ableitungen von  $T_b$  eine vollständige Mobilisierung der über die Stabilitätskonstante erhältlichen Information zuläßt. Wir müssen uns daher vor allem auf solche Beziehungen konzentrieren, in denen eine Annäherung an eine Singularität zum Ausdruck kommt. In der trigonometrischen Darstellung sind dies Funktionen mit dem Term  $1 - \tan^n(\alpha/2)$  im Nenner (wobei  $n$  eine ganze Zahl  $\geq 1$  ist). Diese Ausdrücke verknüpfen die Gleichgewichtsparameter mit einem kritischen Abstand auf der Konzentrationsachse, z. B. mit der Halbwertsbreite der glockenförmigen Kurven von  $T'$ ,  $\Gamma$  sowie  $\tau$  oder mit dem Abstand zwischen zwei Maxima von  $\Gamma'$  (die Ableitung von  $\Gamma$  nach der Konzentrationsvariablen). Je schärfer der Endpunkt definiert ist, um so kürzer werden diese kritischen Abstände und folglich um so höher sind die Anforderungen an die Signalverstärkung und -auflösung, d. h. die Unterscheidung des Signals vom Rauschhintergrund. Eben daher kommt es dann um so mehr auf die Genauigkeit der Konzentrationseinstellung an. Bei mehrstufigen Reaktionssystemen bietet die differentielle Registrierung beträchtliche Vorteile, denn nur die Schärfe der in den Funktionen  $\Gamma$ ,  $\Gamma'$ ,  $\tau$  oder  $T''$  auftretenden Maxima erlaubt eine Unterscheidung der verschiedenen eng überlagerten Reaktionsschritte, die in den einfachen Titrationskurven nur als Kontinua erscheinen.

In diesem Zusammenhang sollten wir vor allem auf die differentielle Konzentrationsverschiebung  $\delta c$  selbst aufmerksam machen. Da Einwaagekonzentrationen nur innerhalb gewisser Genauigkeitsgrenzen festlegbar sind, sollte die Differenz  $\delta c$  auf möglichst direkte Weise gemessen werden können. Das läßt sich auch erreichen – und zwar unabhängig davon, welche Relaxations- und Anzeigetechnik man verwendet – indem man zwei identische Meßzellen mit der gleichen Referenzlösung füllt, so daß sich bei der Differenzbildung alle nur möglichen Unterschiede der Zusammensetzung eliminieren. Dann werden schrittweise exakt geeichte kleine Mengen Standardlösung hinzugefügt. Simultan dazu wird jeweils in einer der beiden Zellen eine Störung des Gleichgewichts induziert. Die differentielle Antwort auf diese einseitige Störung wird registriert. Verfahren ähnlicher Art sind auf dem Gebiet der Polarographie<sup>[24]</sup> wohlbekannt. Gewöhnlich ist es nicht notwendig, die absoluten Werte der Konzentrationen sehr genau zu kennen, denn bei exakter Kalibrierung der Konzentrationsvariation läßt sich der Äquivalenzpunkt eindeutig aus den Kurvenformen (d. h. den Maxima oder Schnittpunkten) rekonstruieren.

Bei der direkten Messung der Relaxationsamplitude ist es die Änderung von  $z$  (=  $T$ ,  $P$  oder  $E$ ), die nur in einer der beiden Zellen induziert wird. Die Dissymmetrie der Störung kann sich aber auch allein auf die Konzentrationsverschiebung  $\delta c$  beziehen.

Will man z. B. die zweite Ableitung der Titrationsfunktion messen, so stellt man beide Lösungen auf eine konstante Differenz in  $c_A^0$  ein. Sodann durchfährt man – schrittweise oder kontinuierlich – durch Zugabe gleicher (geringster) Mengen an Standardlösung in beide Zellen die gesamte Titrationskurve. Auch diese Verfahrensweise ermöglicht die differentielle Registrierung der Relaxationsamplituden, da jetzt die (z. B. durch einen Temperatursprung bewirkte) Störung simultan in beiden Zellen auftritt, die allein hinsichtlich der Zusammensetzung ihres Inhalts um einen Betrag  $\delta c_A^0$  differieren.

Die Verfahren zur Bestimmung von  $T''$  und  $\Gamma$  unterscheiden sich in einem wichtigen Punkt. Die direkte Messung der Krüm-

mung der Titrationsfunktion  $T''$  erfordert die Bestimmung einer differentiellen Verschiebung 2. Ordnung  $\delta^2 c_A^0$ , während die Registrierung der Amplitudendifferenz (d. h.  $\Gamma'$ ) nur mit einer differentiellen Verschiebung 1. Ordnung in der Konzentrationsvariablen korreliert ist. Die Veränderung des intensiven Parameters  $\delta z$  ist unabhängig von  $\delta c_A^0$  und kann so eingestellt werden, daß man ein möglichst großes Signal erhält. Diese Tatsache zeigt deutlich, daß einer der entscheidenden, begrenzenden Faktoren, nämlich  $\delta c_A^0$ , die beiden Titrationsverfahren ganz unterschiedlich beeinflußt. Bei hohen Werten für  $K$  darf man jeweils nur geringste Änderungen in  $c_A^0$  vornehmen, da die beobachtbaren Effekte ausschließlich in der unmittelbaren Umgebung des Äquivalenzpunktes auftreten. Folglich wird die absolute Größe von  $\delta c_A^0$  zum begrenzenden Faktor für die Genauigkeit, und gerade dieser Umstand bewirkt, daß die Fehlergrenzen für beide Methoden ziemlich unterschiedlich ausfallen.

Alle diese Betrachtungen führen unausweichlich auf die Kardinalfrage:

#### *Welche Methode ist optimal für welches Problem?*

Aufgrund der vorangegangenen Diskussion lautet die Antwort, daß vor allem bei hohen Stabilitätskonstanten, d. h. bei kleinen  $p$ -Werten und gut definierten Endpunkten, die dynamischen Methoden auch hinsichtlich der Empfindlichkeit den klassischen Verfahren eindeutig überlegen sind. Die Vorteile geben sich bei allen Arten von Reaktionen – z. B. 1:1-Komplexbildung, Substitutionsreaktionen, besonders aber bei mehrstufigen Reaktionssystemen – eindeutig zu erkennen. Darüber hinaus liefern die Relaxationsamplituden auch noch Informationen über thermodynamische Parameter wie  $\Delta H$  oder  $\Delta V$ .

Die Relaxations-Titration erfordert jedoch ausgeklügeltere Meßtechniken für die dynamische Registrierung von Signalen, und diese gehören normalerweise nicht zur Standardausrüstung eines chemischen Labors. Man könnte vielleicht daran denken, auch statische Perturbations-Methoden zu verwenden, z. B. indem man die Differenz der Titrationsfunktionen zweier Zellen, die auf unterschiedlicher Temperatur gehalten werden, aufzeichnet. Wie in Abschnitt 2.4 bereits gezeigt wurde, sind dann jedoch unbedingt Korrekturen für physikalische Effekte, z. B. für die thermische Ausdehnung notwendig, die zumeist von ähnlicher Größenordnung sind wie die zu erwartenden chemischen Effekte.

Unter den zur Verfügung stehenden *Relaxationstitrationsmethoden* sollte diejenige ausgewählt werden, die gewährleistet, daß das zu untersuchende System auf die Änderung des äußeren Parameters wie  $T$ ,  $P$  oder  $E$  mit maximaler Amplitude reagiert.

Wenn das System selbst keine hinreichend große Gleichgewichtsverschiebung aufweist, kann unter Verwendung eines Puffers eine sekundäre Störung des Gleichgewichts forciert werden.

Die ausgeprägten Kurvenverläufe von  $T''$ ,  $\Gamma$  und  $\tau$  verlangen eine sorgfältige Auswahl des optimalen Konzentrationsbereiches, in dem die differentiellen Messungen auszuführen sind. Andernfalls kann es passieren, daß man überhaupt kein endliches Signal erhält. Bei Relaxationsmessungen muß sowohl die Größe der Amplitude als auch der Zeitbereich, in dem die Relaxationseffekte auftreten, in Betracht gezogen werden. Für die 1:1-Komplexbildung wurde von Brubacher<sup>[25]</sup> eine

Auftragung der reduzierten Amplituden gegen die reduzierten Relaxationszeiten – unter speziellen Einschränkungen hinsichtlich der Konzentrationen  $c_A^0$  und  $c_B^0$  – vorgeschlagen, aus der die optimalen Bedingungen direkt abzulesen sind. Die Darstellung durch trigonometrische Funktionen, wie sie in dieser Arbeit eingeführt wurde, dient dem gleichen Zweck. Die verschiedenen Graphiken, die in diesem Zusammenhang in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt wurden, sprechen für sich. Aus ihnen geht klar hervor, in welchen Fällen die Methode der kontinuierlichen Variation, bei der die Summe von Proben- und Standard-Konzentrationen konstant gehalten wird, mit Vorteil einzusetzen ist. Die Beziehungen zwischen verschiedenen Funktionen ( $T_a$ ,  $\Gamma_a$ ,  $\tau_a$ ,  $T''_a$  usw.) werden aus Symmetriegründen ziemlich einfach und weisen auf bisher ungenutzte Anwendungsmöglichkeiten hin, wie z. B. die Auftragung von  $\Gamma$  gegen  $\tau$  (Abb. 5), bei der alle zu bestimmenden Parameter aus den Steigungen und den Achsenabschnitten einer Schar von Geraden entnommen werden können. Dieses Verfahren sollte gerade bei Mikrotitrationen besonders vorteilhaft sein.

Für die Art der Probleme, die mit den hier diskutierten Methoden untersucht werden können, gibt es praktisch keine Beschränkungen. Dynamische Amplituden-Titrationen haben sich bei komplexometrischen Untersuchungen bereits sehr bewährt, doch könnten sie ebenso gut auf Säure-Base-, Elektronen-Donor-Acceptor- und insbesondere auf Enzym-Substrat-Wechselwirkungen angewandt werden.

*Das optimale Verfahren für jedes Problem zu finden heißt, die Kunst des Titrierens zu beherrschen.*

*Wir danken Fräulein Ursula Wisniewski und Herrn Dipl.-Phys. Gerhard Kessling für die Aufstellung der Rechenprogramme, mit denen eine Reihe von Funktionen berechnet und die graphischen Darstellungen erhalten wurden.*

*Prof. Peter Schuster, Prof. Eberhard Neumann und Dr. Heinz Winkler haben uns freundlicherweise einige noch nicht veröffentlichte experimentelle Ergebnisse zur Verfügung gestellt.*

#### **Anhang 1. Zusammenfassende Darstellung der thermodynamischen Theorie chemischer Relaxationsphänomene<sup>[\*]</sup>**

Als Konzentrationsvariable dient die Reaktionslaufzahl, die die korrelierten stöchiometrischen Veränderungen von Reaktanden und Reaktionsprodukten ausdrückt:  $d\xi = dn_i/v_i$ .  $n_i$  ist die Molzahl und  $v_i$  der stöchiometrische Koeffizient der Komponente. ( $v_i$  ist positiv für Reaktionsprodukte und negativ für Reaktanden.) Ist  $\xi$  auf einen Gleichgewichts-Referenzwert von  $n_i$  bezogen (wobei  $\xi = n_i - n_i^0$ ), so wird für alle Teilnehmer an einer gegebenen Reaktion der  $\xi$ -Wert identisch, weil  $d n_{A\text{R}} = -d n_A = -d n_B$ . Die zu  $\xi$  konjugierte Intensivvariable ist die Affinität  $A$ , die durch die Beziehung als

$$A = -(\partial G / \partial \xi)_z$$

definiert ist, wobei  $G$  die Gibbs-Energie bedeutet. In Bezug auf eine allgemeine intensive Variable  $Z(T, P$  usw.) kann die Verschiebung des chemischen Gleichgewichts

$$\delta\xi = \left( \frac{\partial \xi}{\partial z} \right)_A \delta z = - \left( \frac{\partial A / \partial z}{\partial A / \partial \xi} \right)_z \delta z$$

ausgedrückt werden. Aufrechterhaltung des Gleichgewichts während einer durch die Veränderung von  $z$  bewirkten Variation von  $\xi$  wird durch den Index  $A$  gekennzeichnet, was anzeigt, daß  $A = \text{const.} = 0$  ist. Der Ausdruck  $(\partial A / \partial z)$  entspricht dem  $\Delta$ -Term, z. B. für  $z_1 = T$ :  $\Delta H/T$  oder für  $z_1 = p$ :  $-\Delta V$ . Der reziproke Wert von  $-(\partial A / \partial \xi)_{z, \text{ex}}$  ergibt den Amplitudensfaktor  $\Gamma / RT$ . Dieser Faktor, der auch im Ausdruck für die Relaxationszeit  $\tau$  erscheint, hängt auch von den Variablen  $z$  ab, die während der Variation von  $\xi$  konstant

[\*] Siehe auch [5] und [16].

gehalten werden, d.h. er lautet  $\Gamma_{T,P}$  und  $\tau_{T,P}$ , sofern der Prozeß eine hinreichend langsame Gleichgewichtseinstellung bei konstantem Atmosphärendruck und konstanter Temperatur beinhaltet. Bei kondensierten Systemen, z.B. Titrationslösungen, können wir diese Indices einfach weglassen, da Unterschiede, die sich auf verschiedene externe Bedingungen beziehen (z.B.  $I_{\text{N}}$ ,  $I_{\text{TP}}$  etc.), vernachlässigbar klein bleiben. In stark verdünnten Ionen-Lösungen oder in Fällen, in denen die Ionenstärke konstant gehalten wird, brauchen auch die Aktivitätskoeffizienten nicht explizit mitberücksichtigt zu werden. Der Faktor  $\Gamma$  nimmt dann die einfache Form

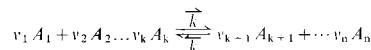
$$\Gamma^* = \frac{1}{\sum_i \frac{v_i}{c_i}}$$

an, die für alle möglichen Reaktionsordnungen gültig ist. In der Summe müssen natürlich sämtliche Reaktanden und Produkte, die am Gleichgewichtsvorgang beteiligt sind, berücksichtigt werden. Der Austausch ist positiv definiert, da  $v_i$  nur in quadratischer Form eingeht. Tragen die Aktivitätskoeffizienten meßbar zur Änderung der Affinität  $A$  in bezug auf die Reaktionslaufzahl  $\xi$  bei, so muß der Amplitudenfaktor durch

$$\Gamma = \frac{\Gamma^*}{1 + \Gamma^* (\partial \sum v_i \ln f_i / \partial \xi)_z}$$

ersetzt werden, wobei  $\Gamma^*$  mit dem oben aufgeführten Ausdruck identisch ist.

Die Relaxationszeit  $\tau$  und der Amplitudenfaktor  $\Gamma$  sind miteinander über die Austauschgeschwindigkeit  $v$  verknüpft, welche für eine allgemeine Reaktion



die Form

$$v = \frac{1}{k} \prod_{i=1}^k c_i^{v_i} = \frac{1}{k} \prod_{i=k+1}^n c_i^{v_i}$$

annimmt.

In Falle einer nicht diffusionskontrollierten Reaktion enthält  $\frac{1}{k}$  den wesentlichen Beitrag der Aktivitätskoeffizienten  $\prod_{i=1}^k c_i^{v_i}$ . Die Parameter  $\tau$ ,  $\Gamma$  und  $v$  sind miteinander durch die Beziehung

$$\tau = \Gamma/v$$

verknüpft.

Wie Katchalsky et al. [26] gezeigt haben, besteht zwischen elektrischen und chemischen Netzwerken eine formale Ähnlichkeit. Die linearisierten Geschwindigkeitsgleichungen, die eine Beziehung zwischen einem chemischen Fluß (Umsatzrate) und einer Kraft (Affinität) herstellen, definieren das chemische Analogon für einen Widerstand  $R_{\text{chem}}$ , und die Abhängigkeit der zeitlichen Ableitung der Kraftgröße von der Flußgröße ermöglicht die Einführung einer „chemischen Kapazität“  $C_{\text{chem}}$ . Der Vergleich ergibt

$$R_{\text{chem}} C_{\text{chem}} = \tau$$

$$R_{\text{chem}} = \frac{RT}{v}$$

$$C_{\text{chem}} = \frac{\Gamma}{RT}$$

„Widerstand“ und „Kapazität“ in einem linearen chemischen „Kreis“ haben somit eine anschauliche physikalische Bedeutung [27].

## Anhang 2. Verallgemeinerung der Ansätze für ein Reaktionssystem mit einer Vielzahl miteinander konkurrierender Liganden

### a) Liganden $L_1, L_2 \dots +$ Komplexpartner M

Gegeben sei eine Anzahl von Liganden  $1, 2, \dots, n$ , die alle um denselben Komplexpartner (oder einen bestimmten Bindungsplatz) konkurrieren, indem sie mit diesem einen 1:1-Komplex bilden. Der gemeinsame Komplexpartner soll mit M (z.B. ein Metallion), die Liganden sollen mit  $L_1, L_2, \dots, L_n$  bezeichnet werden. Die Massenwirkungsbeziehungen lassen sich wie folgt schreiben:

$$M + L_1 \rightleftharpoons ML_1 \quad K_1 = \frac{c_{ML_1}}{c_M \cdot c_{L_1}}$$

$$\begin{aligned} M + L_2 &\rightleftharpoons ML_2 \quad K_2 = \frac{c_{ML_2}}{c_M \cdot c_{L_2}} \\ &\vdots \\ M + L_n &\rightleftharpoons ML_n \quad K_n = \frac{c_{ML_n}}{c_M \cdot c_{L_n}} \end{aligned} \quad (1)$$

wobei die Konzentrationen  $c_i$  und  $c_{Mi}$  sich jeweils auf den entsprechenden Liganden  $L_i$  und den Metallkomplex  $ML_i$  beziehen. Die Erhaltungsrelationen lauten – für beliebige Störungen des Gleichgewichts –:

$$\delta c_i = -\delta c_{Mi} \quad (2)$$

für  $i = 1, 2, \dots, n$

$$\text{und } \delta c_M = -\sum_{k=1}^n \delta c_{Mk} \quad (3)$$

Entwickelt man die Massenwirkungsbeziehungen, so ergibt sich jeweils

$$\delta c_{Mi} = \Gamma_i \delta \ln K_i - \gamma_i \sum_{k \neq i} \delta c_{Mk} \quad (4)$$

mit den bekannten Definitionen für:

$$\Gamma_i = \frac{1}{\frac{1}{c_M} + \frac{1}{c_i} + \frac{1}{c_{Mi}}} = \frac{c_i c_M}{c_M + c_i + K_i^{-1}} \quad (5)$$

und

$$\gamma_i \equiv \frac{\Gamma_i}{c_M} = \frac{c_i}{c_M + c_i + K_i^{-1}} \quad (6)$$

Man hat dabei über alle Partner  $k$  von 1 bis  $n$ , mit Ausnahme des jeweiligen Liganden  $i$ , zu summieren ( $\sum_{k \neq i}$ ).

Ein expliziter Ausdruck für  $\sum_{k \neq i} \delta c_{Mk}$  kann durch Iteration erhalten werden.

Entsprechend Gl. (4) kann man schreiben:

$$\delta c_{M1} = \Gamma_1 \delta \ln K_1 - \gamma_1 \delta c_{M2} - \gamma_1 \sum_{k \neq 1, 2} \delta c_{Mk} \quad (7)$$

$$\delta c_{M2} = \Gamma_2 \delta \ln K_2 - \gamma_2 \delta c_{M1} - \gamma_2 \sum_{k \neq 1, 2} \delta c_{Mk}$$

Die Kombination der beiden Gleichungen ergibt

$$\delta c_{M1} + \delta c_{M2} = \Gamma_{12} \delta \ln K_{12} - \gamma_{12} \sum_{k \neq 1, 2} \delta c_{Mk} \quad (8)$$

mit

$$\Gamma_{12} \delta \ln K_{12} \equiv \frac{\Gamma_1(1-\gamma_2) \delta \ln K_1 + \Gamma_2(1-\gamma_1) \delta \ln K_2}{1 - \gamma_1 \gamma_2} \quad (9)$$

und

$$\frac{\Gamma_n}{c_M} \equiv \gamma_{12} \equiv \frac{\gamma_1(1-\gamma_2) + \gamma_2(1-\gamma_1)}{1 - \gamma_1 \gamma_2} \quad (10)$$

Die Summe  $\sum_{k \neq 1, 2}$  enthält nun sämtliche Terme  $\delta c_{Mk}$  für  $k$  von 3 bis  $n$

(d.h. alle Terme außer  $k=1$  und  $k=2$ ).

Ein entsprechender Ausdruck gilt auch für zwei beliebige Partner  $i$  und  $j$ . Diese Prozedur kann schrittweise für die Einbeziehung beliebiger zusätzlicher Reaktionspartner erweitert werden und bringt schließlich folgenden allgemeinen Ausdruck hervor:

$$\sum_{k=1}^m \delta c_{Mk} = \Gamma_{1\dots m} \delta \ln K_{1\dots m} - \gamma_{1\dots m} \sum_{k=m+1}^n \delta c_{Mk} \quad (11)$$

mit

$$\Gamma_{1\dots m} \delta \ln K_{1\dots m} = \frac{\Gamma_{1\dots m-1}(1-\gamma_m) \delta \ln K_{1\dots m-1} + \Gamma_m(1-\gamma_{1\dots m-1}) \delta \ln K_{1\dots m-1}}{1 - \gamma_{1\dots m-1} \gamma_m} \quad (12)$$

und

$$\frac{\bar{f}_{1 \dots m}}{c_M} = \frac{\bar{\gamma}_{1 \dots m-1}(1-\bar{\gamma}_m) + \bar{\gamma}_m(1-\bar{\gamma}_{1 \dots m-1})}{1-\bar{\gamma}_{1 \dots m-1}\bar{\gamma}_m} \quad (13)$$

Die Gültigkeit dieser allgemeinen Form kann durch vollständige Induktion bewiesen werden. Sie besteht im vorliegenden Fall in einer einfachen Erweiterung des oben für  $k=1$  und  $k=2$  angewandten Verfahrens. Geht man von Gl. (11) mit einem aufgespaltenen Summenterm

$$\sum_{k=1}^m \delta c_{Mk} = \bar{f}_{1 \dots m} \delta \ln \bar{K}_{1 \dots m} - \bar{\gamma}_{1 \dots m} \delta c_{Mm+1} - \bar{\gamma}_{1 \dots m} \sum_{k=m+2}^n \delta c_{Mk} \quad (14)$$

aus und addiert Gl. (4), die wie folgt umzuschreiben ist:

$$\delta c_{Mm+1} = \bar{f}_{m+1} \delta \ln \bar{K}_{m+1} - \bar{\gamma}_{m+1} \sum_{k=1}^m \delta c_{Mk} - \bar{\gamma}_{m+1} \sum_{k=m+2}^n \delta c_{Mk} \quad (15)$$

so erhält man die allgemeine Form von Gl. (11) für  $m+1$ .

Der letzte Schritt besteht nun darin, eine explizite Form für Gl. (4) abzuleiten, die für jeden Komplex gültig ist. Hierzu ersetzt man den Summenterm in Gl. (4) entsprechend Gl. (11) durch

$$\sum_{k \neq i} \delta c_{Mk} = \bar{f}_{k \neq i} \delta \ln \bar{K}_{k \neq i} - \bar{\gamma}_{k \neq i} \delta c_M \quad (16)$$

wobei der Index  $k \neq i$  die  $(n-i)$ -fache Iteration von  $k=1$  bis  $n$ , ausgenommen  $k=i$ , bedeutet (z. B. für  $i=n$  die Iteration von 1 bis  $n-1$ ). Man beachte, daß die Art der Durchnumerierung willkürlich ist.

Die explizite Form von Gl. (4) lautet dann:

$$\delta c_{Mi} = \frac{f_i}{1 - \bar{\gamma}_{k \neq i} \bar{\gamma}_i} (\delta \ln K_i - \bar{\gamma}_{k \neq i} \delta \ln \bar{K}_{k \neq i}) \quad (17)$$

Das im Text behandelte ternäre System ist ein Spezialfall der Anwendung dieser allgemeinen Beziehung, da die Kombinationsterme mit den Indices  $k \neq i$  die Beiträge des Puffers und der Probe erfassen, während  $i$  selbst den Indikator repräsentiert.

Explizite Ausdrücke für  $c_i$  erhält man, indem man für jeden Liganden die jeweilige Massenwirkungs- und Massenerhaltungs-Beziehung miteinander kombiniert.

$$c_i + c_M = c_i^0 \quad (18)$$

$$\frac{c_M}{c_i} = K_i c_M \quad \frac{c_i^0 - c_i}{c_i} = K_i c_M \quad (19)$$

$$c_i = \frac{c_i^0}{1 + K_i c_M} \quad (20)$$

$$c_M = c_i^0 \frac{K_i c_M}{1 + K_i c_M} \quad (21)$$

Falls  $c_M$  unabhängig bestimmt werden kann (z. B. mittels des Extinktionsquotienten), so ist die explizite Darstellung vollständig durch Einwaagekonzentration und meßbare Parameter möglich.

Es ergeben sich drei alternative Wege für die Auswertung:

- 1) Alle außer einem der  $K_i$ -Werte sind bekannt (natürliches System)
- 2) Sukzessive Zugabe der Liganden 1 bis  $n$  (praktikabel nur bis zum ternären System)
- 3a) Die Zeitzkonstanten unterscheiden  
tionsschritte separat bestimbar s
- 3b) Die Bindungskonstanten sind hinreichend verschieden, so daß durch Zugabe von  $M$  alle Bindungsbereiche sukzessive durchfahren werden können (häufig identisch mit 3a).

## b) Ligand L + Makromolekül P mit mehreren Bindungsplätzen

Das gleiche allgemeine Konzept kann auf den Fall der Ligandenbindung an ein Makromolekül  $P$  im allgemeinen ein Protein – angewendet werden. Entsprechende Titrationsverfahren wurden von *Edsall* und *Wyman* [4] diskutiert. Der gemeinsame Ligand  $L$  wird an verschiedenen Stellen (1, 2, ..., n) des Makromoleküls gebunden, wobei jeder Bindungsplatz durch eine spezifische Affinität, repräsentiert durch die Bindungskonstanten  $K_1 \dots K_n$ , charakterisiert ist.

$$K_1 = \frac{c_{PL1}}{c_L \cdot c_P}; \dots; K_n = \frac{c_{PLn}}{c_L \cdot c_P} \quad (22)$$

Der gemeinsame Ligand spielt hier die gleiche Rolle wie das Metallion  $M$  im ersten Beispiel, während die Bindungsplätze 1...n des Makromoleküls  $P$  den vorher erwähnten Liganden entsprechen. Die Massenwirkungs- und Massenerhaltungsbeziehungen sind daher analog. *Edsall* und *Wyman* [4] haben eine Gleichung für den Bindungsgrad angegeben:

$$\bar{v} = \frac{\sum_{k=1}^n c_{PLk}}{\sum_{k=1}^n c_{PLk} + \sum_{k=1}^n c_P} \quad (23)$$

die in unserer (leicht abgeänderten) Terminologie durch

$$\bar{v} = \frac{\sum_{k=1}^n \frac{K_k c_L}{1 + K_k c_L}}{n} = \frac{\bar{K}_{1 \dots n} c_L}{1 + \bar{K}_{1 \dots n} c_L} \quad (24)$$

ersetzt werden kann. In diesen n Gruppen mögen m-fach entartete Untergruppen, d.h. jeweils m Bindungsplätze mit gleicher Bindungskonstante, enthalten sein.  $\bar{K}_{1 \dots n}$  ist wie oben definiert:

$$\bar{K}_{1 \dots n} = \frac{\sum_{k=1}^n c_{PLk}}{c_L \sum_{k=1}^n c_{PLk}} \quad (25)$$

und mit den einzelnen Bindungskonstanten durch die iterativ ableitbare Form

$$\bar{K}_{1 \dots i+1} = \frac{\sum_{k=1}^i c_{PLk}}{\sum_{k=1}^{i+1} c_{PLk}} \bar{K}_{1 \dots i} + \frac{c_{PLi+1}}{\sum_{k=1}^{i+1} c_{PLk}} K_{i+1} \quad (26)$$

verknüpft.

Die allgemeine Amplitudenbeziehung, wie sie in Beispiel a) abgeleitet wurde, gilt analog für die Störung von  $\bar{v}$ :

$$\delta v = \frac{\bar{f} \ln \bar{K}_{1 \dots n}}{\sum_{k=1}^n c_{PLk} + \sum_{k=1}^n c_P} \quad (27)$$

*Edsall* und *Wyman* heben hervor, daß diese Gleichungen für endlos viele Sätze von  $n$ 's und  $K$ 's gelten können und daß es hoffnungslos sei, alle denkbaren Möglichkeiten in allgemeiner Form auszudiskutieren. Es sollte daher betont werden, daß speziell bei mehrstufigen Bindungsprozessen die Relaxationsamplituden-Technik neue Möglichkeiten bietet, individuelle Bindungskonstanten anstelle einer Brutto- oder einer mittleren Bindungskonstante festzulegen. Einige Beispiele dafür sind im Text angegeben; die Bindungseigenschaften allosterischer Proteine sollen an anderer Stelle diskutiert werden [23].

## Anhang 3. Indirekte Anzeige

### a) Anzeige durch Komplexbildung

Die allgemeine Beziehung zwischen Extinktionsquotienten, Gesamtkonzentrationen und Gleichgewichtsparametern lautet

$$\left\{ \frac{c_A^0}{K_B^{-1} + K_I^{-1} \frac{\eta}{1-\eta} - c_P^0/U} \right\} + \{u\} = - \frac{K_B}{K_A} \quad (1)$$

mit

$$u = K_I \frac{1-\eta}{\eta} (c_B^0 - \eta c_I^0) - 1 \quad (2)$$

oder explizit ausgedrückt

$$\begin{aligned} & \left\{ c_A^0 - c_P^0 + \left( c_B^0 - \eta c_I^0 - K_I^{-1} \frac{\eta}{1-\eta} \right) \left( 1 + K_B^{-1} K_I \frac{1-\eta}{\eta} \right) \right\} \\ & = - \frac{K_B}{K_A} \left\{ K_I^{-1} \frac{\eta}{1-\eta} - \frac{c_P^0}{K_I \frac{1-\eta}{\eta} (c_B^0 - \eta c_I^0) - 1} \right\} - K_A^{-1} \end{aligned} \quad (3)$$

oder im Fall  $K_B^{-1} \ll K_I^{-1}, K_A^{-1}$

$$\begin{aligned} & \left\{ c_A^0 + c_B^0 - c_P^0 - \eta c_I^0 - K_I^{-1} \frac{\eta}{1-\eta} \right\} + K_I^{-1} = \\ & = \frac{K_B}{K_A} \left\{ K_I^{-1} \frac{\eta}{1-\eta} - \frac{c_P^0}{K_I^{-1} \frac{\eta}{1-\eta} (c_B^0 - \eta c_I^0) - 1} \right\} \end{aligned} \quad (4)$$

oder für  $K_A^{-1}, K_B^{-1} \ll K_I^{-1}$  zu

$$\left\{ K_I^{-1} \frac{\eta}{1-\eta} (c_B^0 - \eta c_I^0 + c_A^0 - c_P^0) \right\} = \frac{K_B}{K_A} \left\{ \frac{c_P^0}{c_B^0 - \eta c_I^0 - K_I^{-1} \frac{\eta}{1-\eta}} \right\} + 1 - \frac{K_B}{K_A} \quad (5)$$

Die geschweiften Klammern in den Gleichungen geben an, welche Kombinationen von Termen gegeneinander aufgetragen werden sollten. Weitere Vereinfachungen sind möglich für  $c_B^0 = c_P^0$  und für  $c_I^0 \ll c_A^0, c_B^0$  oder  $c_B^0 K_I \gg 1$ . Die Gesamtamplitude ist durch

$$(\delta c_{BI})_{tot} = \frac{I_1}{1 - \gamma_I \gamma_B - \gamma_A \gamma_B'} [ (1 - \gamma_A \gamma_B') \delta \ln K_I - \gamma_B \delta \ln K_B + \gamma_A \gamma_B' \delta \ln K_A ] \quad (6)$$

gegeben mit

$$\begin{aligned} \gamma_I & \equiv \frac{I_1}{c_B} = \frac{c_I}{c_I + c_B + K_I^{-1}}; \quad \gamma_B \equiv \frac{I_B}{c_B} = \frac{c_B}{c_P + c_B + K_B^{-1}} \\ \gamma_B' & \equiv \frac{I_B}{c_P} = \frac{c_B}{c_P + c_B + K_B^{-1}}; \quad \gamma_A \equiv \frac{I_A}{c_P} = \frac{c_A}{c_P + c_A + K_A^{-1}} \end{aligned} \quad (7)$$

Die impliziten Terme sind durch Einwaagekonzentrationen und Extinktionsquotienten ausdrückbar, wenn man die folgenden Beziehungen benutzt:

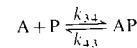
$$c_{BI} = \eta c_I^0; \quad c_I = (1 - \eta) c_I^0; \quad c_B = K_I^{-1} \frac{\eta}{1 - \eta}; \quad (8)$$

$$c_P = K_B^{-1} u; \quad \text{wie in Gl.(2)} \quad (9)$$

$$c_A = c_A^0 - c_P^0 + u \left\{ K_B^{-1} + K_I^{-1} \frac{\eta}{1 - \eta} \right\} \quad (10)$$

Die Differenzen der einzelnen Amplituden können nach dem in Abschnitt 4 besprochenen Verfahren bestimmt werden. Unter gleichen Bedingungen hinsichtlich  $c_I^0, c_P$  und  $c_B$  misst man die Amplituden zum einen in Gegenwart und zum anderen in Abwesenheit des A-Systems.

Ist die Gleichgewichtseinstellung des A-Systems der langsamste Schritt – d.h. Reaktand und Konkurrent B kommen hinreichend schnell ins Gleichgewicht –, so gibt die niedrigste Zeitkonstante  $\tau_{III}$  Auskunft über  $K_A$ . Im System



ist die Relaxationszeit gegeben durch

$$\tau_{III}^{-1} = k_{34} (c_A + c_P + K_A^{-1}) f_{ABI} \quad (11)$$

mit

$$f_{ABI} = \frac{1 - \gamma_I \gamma_B - \gamma_A \gamma_B'}{1 - \gamma_I \gamma_B} \rightarrow 0 \quad \text{für} \quad K_B c_B \rightarrow 0 \quad (12)$$

Diese Zeitkonstante ist mit der Relaxationsamplitude durch die Beziehung

$$(\delta c_{BI})_{III} = I_A \frac{\gamma_I \gamma_B}{1 - \gamma_I \gamma_B - \gamma_A \gamma_B'} \left\{ \delta \ln K_A - \frac{\gamma_B'}{1 - \gamma_I \gamma_B} (\delta \ln K_B - \gamma_I \delta \ln K_I) \right\} \quad (13)$$

verknüpft.

## b) Anzeige durch Austauschreaktion

Die Bindungsgleichgewichte für Probe und Konkurrent sollen die gleichen sein wie im Beispiel a). Die Reaktionsanzeige erfolgt hier jedoch über eine Austauschreaktion:



Ersetzt man den Extinktionsquotienten  $K_I^{-1} \eta / (1 - \eta)$  durch  $K_I^{-1} \cdot c_I^0 \eta^2 / (1 - \eta)$ , so können alle Ausdrücke aus Beispiel a) (unter Verwendung der im Text angegebenen Definitionen) verwendet werden.

Der Amplitudenfaktor des Indikatorgleichgewichts ist hier durch die Beziehungen

$$F_I = \frac{1}{\frac{1}{c_I} + \frac{1}{c_{B'}} + \frac{1}{c_I} + \frac{1}{c_B}} = \frac{c_B c_I}{c_{B'} + c_I + K_I(c_B + c_I)} \quad (15)$$

sowie

$$\gamma_I = \frac{I_1}{c_B} = \frac{K_I c_I'}{c_{B'} + c_I + K_I(c_B + c_I)} \quad (16)$$

definiert.

Eingegangen am 29. September 1976

[A 154]

Die englische Originalfassung wurde Gerold Schwarzenbach 1974 zur Vollendung seines 70. Lebensjahrs gewidmet. Aufgrund mannigfacher Schwierigkeiten hat sich die Drucklegung der übersetzten Fassung verzögert.

- [1] R. Winkler, Dissertation, Technische Universität Wien 1969.
- [2] H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, J. Am. Chem. Soc. 71, 2703 (1949).
- [3] M. Dixon, E. C. Webb: Enzymes, 2. Aufl. Longmans, London 1965.
- [4] J. T. Edsall, J. Wyman: Biophysical Chemistry, Vol. I. Academic Press, New York 1958.
- [5] M. Eigen, L. DeMaeyer, Tech. Org. Chem. VIII b, 895 (1963); siehe auch in G. G. Hammes: Techniques of Chemistry, Vol. VI/2. Wiley, New York 1974, S. 63.
- [6] P. Job, Ann. Chim. Paris 9, 113 (1928).
- [7] F. J. C. Rossotti, H. Rossotti: The Determination of Stability Constants. McGraw-Hill, New York 1961.
- [8] M. Eigen, G. Kurtze, K. Tamm, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 57, 103 (1953).
- [9] M. Eigen, K. Tamm, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 66, 107 (1962).
- [10] G. Czerlinski, Theor. Exp. Biophys. 2, 69 (1969).
- [11] D. Thustius in C. Sadron: Dynamic Aspect of Conformational Changes in Biological Macromolecules. Reidel, Dordrecht 1973, S. 271.
- [12] T. M. Jovin in R. Chen, H. Edelhoch: Biochemical Fluorescence Concepts. Vol. 1. Marcel Dekker, New York 1975, S. 305.
- [13] G. Beier, S. Basu, P. Schuster, noch unveröffentlicht; G. Beier, Dissertation, Universität Wien 1975.
- [14] H. W. Chang, E. Neumann, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 73, 3364 (1976).
- [15] a) W. Burgermeister, Th. Wieland, R. Winkler, Eur. J. Biochem. 44, 305 (1974); b) P. B. Chock, F. Eggers, M. Eigen, R. Winkler, Biophys. Chem. 6, 239 (1977).
- [16] J. Meixner, Kolloid Z. 134, 3 (1953).
- [17] G. Schwarzenbach, H. Flaschka: Die komplexometrische Titration, 5. Aufl. Enke Verlag, Stuttgart 1965.
- [18] J. Bjerrum, Chem. Rev. 50, 381 (1950).
- [19] G. Scatchard, Am. Acad. Sci. 51, 660 (1949); vgl. auch [4].
- [20] H. Sund, K. Markau, R. Koberstein, Biol. Macromol. Ser. 7: „Subunits in Biological Systems“, Vol. C. Marcel Dekker, New York 1975.
- [21] J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux, J. Mol. Biol. 12, 88 (1965).
- [22] D. E. Koshland, G. Nemethy, D. Filmer, Biochemistry 5, 365 (1966).
- [23] M. Eigen, G. Ilgenfritz, noch unveröffentlicht.
- [24] H. V. Malmstadt, Anal. Chem. 26, 1348 (1954); 27, 1757 (1955); P. Delahay, ibid. 20, 1212 (1948).
- [25] L. Brubacher, persönliche Mitteilung.
- [26] G. Oster, A. Perelson, A. Katchalsky, Q. Rev. Biophys. 6, 1 (1973).
- [27] M. Eigen in F. O. Schmitt et al.: Neurosciences, Third Study Program. The MIT Press, Cambridge, Mass. 1973, S. XIX.