

Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem *Baird* double-beam Spektrographen mit Kochsalzoptik bei Zimmertemperatur aufgenommen¹).

Zur Messung der UV.-Absorptionskurven diente ein *Beckman*-Spektrophotometer DU mit einer Wasserstofflampe als Lichtquelle. Als Lösungsmittel wurde spektralreiner Feinsprit (ohne merkliche Absorption bis 220 m μ) verwendet. Ca. 1 mg Picolinpikrat wurde eingewogen, in 2 cm³ Feinsprit gelöst und durch 5 g Aluminiumoxyd, Akt. III, filtriert. Nachdem das Flüssigkeitsniveau der Lösung die obere Grenze des Aluminiumoxyds erreicht hatte, wurde mit Feinsprit nachgewaschen. Die ersten 20 cm³ des Eluats wurden aufgefangen und direkt zur Messung der Spektren verwendet.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

247. Mehrstufige Polarogramme III²)

von P. Rüetschi und G. Trümpler.

(23. VIII. 52.)

1. Einleitung.

Die Ursache für das Auftreten zweier oder mehrerer Stufen bei der polarographischen Reduktion organischer Stoffe liegt häufig an der ungenügenden oder ungeeigneten Pufferung der Lösung³). In zwei vorausgegangenen Arbeiten sind von uns solche mehrstufige Polarogramme am Beispiel des Azobenzols untersucht worden⁴). Um eine einheitliche Stufe zu erhalten, hat man darauf zu achten, dass beim gewählten pH entweder genügend freie H-Ionen, oder eine genügende Menge undissoziierter Puffersäure vorhanden ist. Eine einfache Theorie der Wasserstoffionenverarmung ermöglicht die Berechnung mehrstufiger Polarogramme und gibt auch die Bedingungen, bei denen eine einheitliche Stufe gewährleistet ist.

In der neueren polarographischen Literatur findet man ausserordentlich viele Beispiele, wo die Art der reduzierbaren Molekel, insbesondere die Fähigkeit isomere und ionisierte Formen zu bilden, für die Mehrstufigkeit verantwortlich gemacht wird. Die grundlegenden Arbeiten über solche Polarogramme haben *Brdicka* und Mitarbeiter mit der Polarographie von Brenztraubensäure und Phenylglyoxylsäure ausgeführt⁵). Diese Stoffe zeigen auch bei sorgfältiger

¹) Die IR.-Absorptionsspektren wurden unter Leitung von Herrn P.-D. Dr. *Hs. H. Günthard* aufgenommen, dem an dieser Stelle bestens gedankt sei.

²) Vorläufige Mitteilung aus der Dissertation von *Paul Rüetschi*.

³) Diese Feststellung wurde zuerst von *Winkel & Proske* gemacht, B. **71**, 1785 (1938). Spätere Arbeiten über solche mehrstufige Polarogramme sind: *Müller*, Am. Soc. **62**, 2434 (1940); *Kolthoff & Orlemann*, Am. Soc. **63**, 664 (1941) und **64**, 1044, 1971 (1942).

⁴) *Rüetschi & Trümpler*, Helv. **35**, 1021, 1486 (1952).

⁵) *Brdicka & Wiesner*, Coll. Czech. Chem. Commun. **12**, 138 (1947). *Brdicka*, ibid. **12**, 212 (1947). *Koutecky & Brdicka*, ibid. **12**, 337 (1947).

Pufferung in einem bestimmten pH-Bereich zwei Stufen. Die positivere entspricht der Reduktion der undissoziierten Molekeln, die negativere der Reduktion der Anionen. Interessanterweise tritt die Zweistufigkeit bei pH-Werten auf, wo nur noch ein verschwindender Bruchteil der Säure in undissoziierter Form vorliegt. Die Stufe der undissoziierten Form wird nur deshalb sichtbar, weil diese an der Elektrodenoberfläche durch Zutritt von Anionen und H-Ionen ständig nachgeliefert wird.

Im folgenden sollen die beiden Arten von mehrstufigen Polarogrammen (also solche, die in ungepufferter Lösung durch Wasserstoffionenverarmung entstehen, wie auch solche, die selbst bei guter Pufferung durch die Dissoziation des Depolarisators hervorgerufen werden) miteinander verglichen werden. Im Anschluss an die früheren Arbeiten mit Azobenzol wurde Azobenzolmonocarbonsäure-(p) als Untersuchungsbeispiel gewählt. Dieser Stoff wurde polarographisch noch nie untersucht. Er lässt sich ebenso leicht und nahezu reversibel reduzieren wie Azobenzol.

2. Mehrstufigkeit durch ungenügende Pufferung.

Die Verhältnisse lassen sich in vereinfachter Weise mit Hilfe der Vorstellung eines „Reaktionsraumes“ an der Elektrodenoberfläche und einer „Diffusionsbrücke“, welche das Innere der Lösung abgrenzt, beschreiben¹⁾.

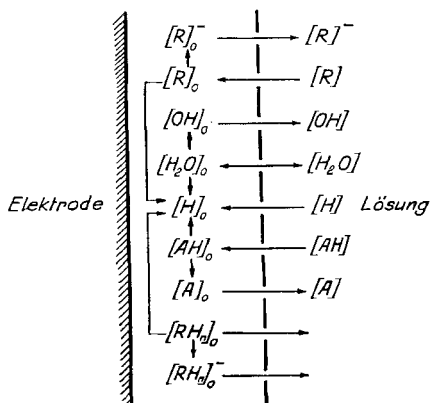


Fig. 1.

In der schematischen Darstellung Fig. 1 bedeuten:

- (H) == Wasserstoffionenkonzentration;
- (OH) == Hydroxylionenkonzentration;
- (R) == Konzentration an undissoziiertem Depolarisator;
- (R)⁻ == Konzentration an Depolarisator-Anionen;
- (RH_n) == Konzentration an undissoziiertem Reduktionsprodukt;
- (RH_n)⁻ == Konzentration an dissoziiertem Reduktionsprodukt;
- (AH) == Konzentration an undissoziierter Puffersäure;
- (A) == Konzentration der Puffersäure-Anionen.

Die Konzentrationen an der Elektrodenoberfläche sind mit dem Index _o bezeichnet. Die Dimension ist Mol/Lit. Im Gegensatz zum Fall des Azobenzols dient jetzt auch, neben den freien H-Ionen, den Puffersubstanzen und dem Wasser, der Depolarisator als Wasserstofflieferant.

¹⁾ Rütschi & Trümpler, *Helv.* **35**, 1021 (1952).

Wir wollen wie früher¹⁾ annehmen, dass sich die Ionengleichgewichte im Reaktionsraum unendlich schnell einstellen. Diese Annahme führt bei Polarogrammen in ungepuffelter Lösung im allgemeinen zu keinen falschen Ergebnissen, während bei Polarogrammen in gepuffelter Lösung eine begrenzte, endliche Reaktionsgeschwindigkeit zur Deutung der Zweistufigkeit herangezogen werden muss. Betrachten wir vorerst den Fall eines undissozierbaren Depolarisators, wenn eine ungenügende Menge (etwa polarographische Konzentration) einer schwachen Puffersäure zugegen ist. Diese Puffersäure muss an der Elektrodenoberfläche H-Ionen abgeben, welche zur Reduktion des Depolarisators dienen. Die Zerfallsgeschwindigkeit der Puffersäure wird nun gewöhnlich so gross sein, dass sie erst dann den Strom begrenzen könnte, wenn die Konzentration der Puffersäure an der Elektrodenoberfläche unter polarographisch bestimmbare Werte abgesunken ist. Dann ist aber der Strom sowieso schon durch die Diffusion begrenzt. Ist der reduzierbare Stoff eine schwache Säure und sind daneben H-Ionen in ungenügender Menge vorhanden, so wird sich die endliche Assoziationsgeschwindigkeit der H-Ionen mit den Depolarisator-Anionen erst bemerkbar machen, wenn die H-Ionenkonzentration an der Elektrodenoberfläche so klein geworden ist, dass der Wasserstoff-Diffusionsstrom praktisch schon erreicht ist. Der Strom kann erst wieder ansteigen, wenn die H_0 -Konzentration so weit abgesunken ist, dass die Nachlieferung von H-Ionen aus dem Wasser beginnt. Bei dieser niedrigen H-Ionenkonzentration wird in den meisten Fällen die Bildungsgeschwindigkeit für den undissoziierten Depolarisator so klein, dass sie sich polarographisch nicht mehr bemerkbar macht. Ganz allgemein kann sich die Dissoziations-Zweistufigkeit nur dann im Polarogramm bemerkbar machen, wenn sie in jenen engen pH-Bereichen auftritt, wo der Strom nicht durch Diffusion begrenzt ist, also dort, wo er durch Wasserstofflieferung aus freien H-Ionen oder aus Wasser ansteigt. Die Dissoziations-Zweistufigkeit wird aber äusserst selten bei diesen extremen pH-Werten auftreten. Gewöhnlich ist die Wasserstoffstufe also gleichzeitig die Reduktionsstufe des undissoziierten Depolarisators; der zweite Anstieg, die Wasser-Stufe, entspricht gleichzeitig der Reduktion der Depolarisator-Anionen. In den Fällen endlich, wo neben dem dissoziierbaren Depolarisator eine kleine Menge einer schwachen Puffersäure anwesend ist, kann es vorkommen, dass die Dissoziations-Zweistufigkeit auftritt, bevor der Diffusionsstrom der Puffersäure erreicht ist. Es wird aber auch hier die markante Stufe der Pufferverarmung dem Polarogramm das Gepräge geben, und die Dissoziations-Zweistufigkeit wird sich als verschwommener Absatz in sie einfügen.

¹⁾ Rüetschi & Trümpler, *Helv.* **35**, 1021, 1486 (1952).

Für die Berechnung nehmen wir weiterhin an, dass ein indifferenten Zusatzelektrolyt anwesend ist. Der „Puffer“ oder Wasserstoffdonator soll vorerst nur aus einer einbasischen Säure bestehen.

Unter diesen Annahmen erhalten wir durch Anwendung der Ilkovic-Gleichung bei Berücksichtigung aller Wasserstofflieferanten für den Strom:

$$i = k D_H^{1/2} [(H) - (H)_0] + k D_{OH}^{1/2} [(OH)_0 - (OH)] + k D_{AH}^{1/2} [(AH) - (AH)_0] \\ + k D_{R^-}^{1/2} [(R)_0^- - (R)^-] + k D_{RH_n^-}^{1/2} (RH_n)_0^- \quad (1)$$

Dabei bedeuten:

$$k = m^{2/3} t^{1/6} F 0,627 \cdot 10^{-3},$$

D_X = Diffusionskonstante des Stoffes X.

Ebenso gilt:

$$i = n k D_R^{1/2} [(R) - (R)_0] + n k D_{R^-}^{1/2} [(R)^- - (R)_0^-] \quad (2)$$

und

$$i = n k D_{RH_n}^{1/2} (RH_n)_0 + n k D_{RH_n^-}^{1/2} (RH_n)_0^- \quad (3)$$

Wir führen nun die Dissoziationskonstanten für den Depolarisator, K_R , für das Reduktionsprodukt, K_{RH_n} , für die Puffersäure, K_{AH} und das Ionenprodukt des Wassers, P_w , ein. Mit c_R soll die analytische Gesamtkonzentration des Depolarisators in der Lösung, mit c_{AH} diejenige der Puffersubstanz bezeichnet werden. Die unbekannten Konzentrationen $(R)_0$, $(R)_0^-$, $(RH_n)_0$, $(RH_n)_0^-$ und $(AH)_0$ können aus den Gleichungen (1), (2) und (3) eliminiert werden. Zur Vereinfachung setzen wir noch $D_R = R_R = D_{RH_n} = D_{RH_n^-}$. Wir erhalten dann für den Strom als Funktion von $(H)_0$:

$$i = \frac{k D_H^{1/2} [(H) - (H)_0] + k D_{OH}^{1/2} P_w \frac{(H) - (H)_0}{(H) \cdot (H)_0} \\ + k D_{AH}^{1/2} c_{AH} K_{AH} \frac{(H) - (H)_0}{[K_{AH} + (H)] [K_{AH} + (H)_0]} \\ + k D_R^{1/2} c_R K_R \frac{(H) - (H)_0}{[K_R + (H)] [K_R + (H)_0]}}{1 + \frac{K_R}{n [K_R + (H)_0]} + \frac{K_{RH_n}}{n [K_{RH_n} + (H)_0]}} \quad (4)$$

Für die potentialbestimmenden Konzentrationen $(R)_0$ und $(RH_n)_0$ (nach unserer Annahme wird ja nur der undissoziierte Depolarisator reduziert) ergibt sich:

$$(R)_0 = \frac{(R) \left[1 + \frac{K_R}{(H)} \right] - \frac{i}{n k D_R^{1/2}}}{1 + \frac{K_R}{(H)_0}} = \frac{c_R - \frac{i}{n k D_R^{1/2}}}{1 + \frac{K_R}{(H)_0}} \quad (5)$$

$$(RH_n)_0 = \frac{\frac{i}{n k D_{RH_n}^{1/2}}}{1 + \frac{K_{RH_n}}{(H)_0}} \quad (6)$$

Durch Einsetzen dieser Werte in die *Nernst'sche* Formel erhalten wir die Stromspannungskurve:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(R)_0 (H)_0^n}{(RH_n)_0}, \quad (7)$$

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_d - i}{i} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(H)_0 + K_{RH_n}}{(H)_0 + K_R} + \frac{RT}{F} \ln (H)_0. \quad (8)$$

Dabei bedeutet $i_d = n \cdot k \cdot D_R^{1/2} \cdot c_R$ den Diffusionsstrom des gesamten Depolarisators.

Der Strom, sowie auch die Spannung, lassen sich also als Funktion des Parameters $(H)_0$ darstellen. Aus beliebig angenommenen $(H)_0$ -Werten lässt sich die Stromspannungskurve berechnen. Es muss hier erwähnt werden, dass sowohl die Dissoziationskonstante des Ausgangsstoffes, als auch diejenige des Reduktionsproduktes die Stromspannungskurve beeinflusst. Setzt man in Gleichung (4) und (8) $K_R = K_{RH_n}$, so erhält man Beziehungen, wie sie für einen undissoziierbaren Depolarisator gelten, wenn noch eine Puffersubstanz von der Konzentration des Depolarisators und mit dessen Dissoziationskonstanten anwesend ist.

Das Pufferglied in Gleichung (4) bekommt nur dann die angegebene einfache Form, wenn die Diffusionskonstanten D_{AH} und D_A , der undissoziierten Puffersäure und der Puffersäure-Anionen, gleichgesetzt werden.

Ist die Puffersäure mehrbasisch, so ergeben sich für das Pufferglied andere Ausdrücke.

Das Pufferglied in Gleichung (4) wird für eine einbasische Säure:

$$k D_{AH}^{1/2} c_{AH} \left[\frac{1}{1 + \frac{K_{AH}}{(H)}} - \frac{1}{1 + \frac{K_{AH}}{(H)_0}} \right],$$

für eine zweibasische Säure:

$$k D_{AH_2}^{1/2} c_{AH} \left[\frac{2 + \frac{K_1}{(H)}}{1 + \frac{K_1}{(H)} + \frac{K_1 K_2}{(H)^2}} - \frac{2 + \frac{K_1}{(H)_0}}{1 + \frac{K_1}{(H)_0} + \frac{K_1 K_2}{(H)_0^2}} \right],$$

für eine dreibasische Säure:

$$k D_{AH_3}^{1/2} c_{AH} \left[\frac{3 + \frac{2 K_1}{(H)} + \frac{K_1 K_2}{(H)^2}}{1 + \frac{K_1}{(H)} + \frac{K_1 K_2}{(H)^2} + \frac{K_1 K_2 K_3}{(H)^3}} - \frac{3 + \frac{2 K_1}{(H)_0} + \frac{K_1 K_2}{(H)_0^2}}{1 + \frac{K_1}{(H)_0} + \frac{K_1 K_2}{(H)_0^2} + \frac{K_1 K_2 K_3}{(H)_0^3}} \right].$$

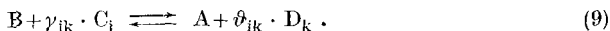
Dabei bedeutet c_{AH} die analytische Gesamtkonzentration; K_1, K_2, K_3 sind die verschiedenen Dissoziationskonstanten der mehrbasischen Puffersäure. Die Diffusionskonstanten der verschiedenen ionisierten Formen einer Säure werden einander gleichgesetzt. Sind mehrere Puffersäuren vorhanden, so müssen diese Ausdrücke summiert werden.

3. Mehrstufigkeit durch Dissoziation.

Die theoretische Behandlung solcher Polarogramme wird dadurch kompliziert, dass die leichter reduzierbare Form, im Fall einer Säure also der undissoziierte Anteil, an der Elektrodenoberfläche durch Zutritt von H-Ionen und Anionen nachgeliefert wird.

Neben *Brdicka* und Mitarbeitern¹⁾ hat in neuerer Zeit auch *Delahay*²⁾ das Problem behandelt, allerdings in vereinfachter Form. Da wir unsere Experimente nach der exakten Theorie von *Koutecký & Brdicka* auswerten wollen, geben wir kurz den Gang und die Ergebnisse der theoretischen Ableitungen dieser Autoren.

Die Nachlieferungsreaktion kann ganz allgemein wie folgt formuliert werden:



A bedeutet den undissoziierten Depolarisator, B sein Dissoziationsprodukt. C_i ist ein Wasserstoffdonator. Die Geschwindigkeit der Nachbildung von A durch den Stoff C_i ist dann gegeben durch

$$v_{ik} = k_{ik} [b c_i^{\nu_{ik}} - K_{ik} a d_k^{\delta_{ik}}].$$

a, b, c_i , d_k bezeichnen die Konzentrationen der Stoffe A, B, C_i , D_k . k_{ik} ist die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion und K_{ik} die Gleichgewichtskonstante für den Vorgang (9).

Die Bildungsgeschwindigkeit für A beträgt somit im ganzen:

$$v = \sum_{i,k} v_{ik} = b \sum_{i,k} k_{ik} c_i^{\nu_{ik}} - a \sum_{i,k} k_{ik} K_{ik} d_k^{\delta_{ik}},$$

also

$$v = \varrho (b - \sigma a), \quad (10)$$

wobei

$$\varrho = \sum_{i,k} k_{ik} c_i^{\nu_{ik}}, \quad \varrho \cdot \sigma = \sum_{i,k} k_{ik} K_{ik} d_k^{\delta_{ik}}.$$

Es lassen sich nun für a und b folgende Differentialgleichungen aufstellen

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial a}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} + \varrho (b - \sigma a) \\ \frac{\partial b}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 b}{\partial x^2} - \varrho (b - \sigma a) \end{aligned} \right\} \quad (11)$$

Die Konzentrationsänderungen setzen sich also aus dem Diffusions- und dem Reaktionsanteil zusammen. Mit Hilfe einer *Laplace*-Transformation gelingt es, das Differentialgleichungssystem (11) zu lösen und einen Ausdruck für $(\partial a / \partial x)_{x=0}$ zu finden. Durch Multiplikation mit dem Diffusionskoeffizienten D, mit der Tropfenoberfläche $0,85 \text{ m}^{2/3} \text{ t}^{2/3}$ und dem Faktor nF (n = Zahl der aufgenommenen

¹⁾ *Brdicka & Wiesner*, Coll. Czech. Chem. Commun. **12**, 138 (1947); *Brdicka*, ibid. **12**, 212 (1947); *Koutecký & Brdicka*, ibid. **12**, 337 (1947).

²⁾ *Delahay*, Am. Soc. **73**, 4944 (1951).

H-Atome, $F = \text{Faraday'sche Zahl}$) erhält man nach Mittelwertsbildung durch Integration über die Tropfzeit für den fließenden Strom

$$i = 0,85 \text{ m}^{2/3} n F D^{1/2} \alpha \frac{1}{t_1} \int_0^{t_1} \sqrt{\frac{\varrho}{\sigma}} \cdot e^{\frac{\varrho t}{\sigma}} \cdot t^{2/3} \left[1 - \Phi \left(\sqrt{\frac{\varrho t}{\sigma}} \right) \right] dt. \quad (12)$$

Hier bedeutet α die analytische Gesamtkonzentration des Depolarisators (undissoziierter und dissoziierter Anteil) im Innern der Lösung. t_1 ist die Tropfzeit.

$$\Phi \left(\sqrt{\frac{\varrho t}{\sigma}} \right) = \text{Fehlerintegral} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\sqrt{\frac{\varrho t}{\sigma}}} e^{-z^2} dz.$$

Bei der Ableitung von Formel (12) wurde die Annahme gemacht, dass $\varrho \gg 1$ und $\sigma \gg 1$ sei. Da sich in die Schlussformel der Ableitungen von *Koutecky & Brdicka* ein Fehler eingeschlichen hat, verlassen wir nun den Gang ihrer Betrachtung und leiten auf unsere Weise die weiteren Ergebnisse ab.

Wenn die Reaktionsgeschwindigkeit unendlich schnell wird ($\varrho \rightarrow \infty$), erhält man für den Strom

$$i_\infty = 0,85 \text{ m}^{2/3} n F \alpha D^{1/2} \frac{6}{7} \frac{1}{\sqrt{\pi}} t_1^{1/6}. \quad (13)$$

Zu diesem Resultat gelangt man durch Einführen von $y = \varrho t / \sigma$. Wir gewinnen dann unter dem Integral den Ausdruck

$$1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\sqrt{y}} e^{-z^2} dz = \frac{e^{-y} \cdot y^{-1/2}}{e^{-y} \cdot y^{-1/2}} t^{1/6}.$$

Nun setzen wir $\sqrt{y} = u$, dann wird Zähler und Nenner nach u abgeleitet, der Grenzwert gebildet und endlich über t integriert.

Wenn man Gleichung (13) mit dem Faktor $\sqrt{7/3}$ multipliziert, wodurch die Anwendung der linearen Diffusionsgleichung korrigiert wird, erhält man die gewöhnliche *Ilkovic*-Gleichung.

Für i/i_∞ ergibt sich¹⁾

$$\frac{i}{i_\infty} = \frac{7\sqrt{\pi}}{6} \frac{1}{y_1^{7/6}} \int_0^{y_1} y^{2/3} e^y [1 - \Phi(\sqrt{y})] dy, \quad (14)$$

wobei

$$y = \frac{\varrho t}{\sigma}, \quad y_1 = \frac{\varrho t_1}{\sigma}.$$

¹⁾ *Koutecky & Brdicka* geben in ihrer Schlussformel vor dem Integral den Faktor $\frac{6}{7\sqrt{\pi}y_1^{7/6}}$. Es handelt sich jedenfalls um einen Schreibfehler, denn ihre numerischen Resultate, die Zahlenwerte i/i_∞ als Funktion von y_1 , sind richtig.

Wird einfachheitshalber nur der Zusammentritt von Depolari-sator-Anionen und freien H-Ionen betrachtet ($B + H \rightarrow A$) und vernachlässigt man die übrigen wasserstoffliefernden Reaktionen ($B + HX \rightarrow A + X$), so ergibt sich für ϱ , σ und y_1 nach den dargelegten Ableitungen von Koutecký & Brdicka:

$$\varrho = k(H), \quad \sigma = \frac{K}{\langle H \rangle}, \quad y_1 = \frac{k(H)^2}{K} t_1. \quad (15)$$

Es lässt sich experimentell zeigen, dass durch diese Vereinfachung keine grossen Fehler entstehen. Vermindert man die Pufferkonzentration bei gleichbleibendem pH zum Beispiel um das Vierfache, so erniedrigt sich die vordere Stufe noch kaum merklich. Hätte die Reaktion der Anionen mit dem Wasser eine erhebliche Bedeutung, so müsste auch in stark alkalischem Gebiet eine kleine vordere Stufe bestehen bleiben, was gewöhnlich nicht zutrifft.

Mit Hilfe von Gleichung (14) lässt sich i/i_∞ als Funktion von y_1 darstellen. Derjenige y_1 -Wert, der zu $i/i_\infty = 0,5$ gehört, ist mit dem pH, bei dem $i/i_\infty = 0,5$ wird, durch Gleichung (15) verbunden. Damit lässt sich die Geschwindigkeitskonstante k berechnen:

$$\log k = \log y_1 + \log K + 2 \text{ pH} - \log t_1. \quad (16)$$

4. Experimentelles.

Die verwendete Azobenzol-monocarbonsäure-(p)¹⁾ wurde durch Umkristallisieren aus Alkohol sorgfältig gereinigt. Sie zeigte am Schluss einen konstanten Smp. von 240° (unkorr.). Zu 10 cm³ einer 10⁻³-m. Lösung in Alkohol fügte man als Leitelektrolyt 5 cm³ KCl 1-n., das pro Liter 0,5 g Gelatine als Maximumunterdrücker enthielt, und als Wasserstofflieferanten 5 cm³ verdünnter Salzsäure oder 5 cm³ Britton-Robinson-Puffer²⁾.

Mittels Durchleiten von gereinigtem Stickstoff wurde der Sauerstoff ausgetrieben. Während der Aufnahme der Polarogramme betrug die Temperatur 20°. Für alle Polarogramme wurde die Empfindlichkeit 1/10 gewählt, bei welcher 1 mm einem Strom von 2,56 · 10⁻⁸ Amp. entspricht.

In den untersuchten Lösungen wurde das pH mit einer Glaselektrode und einem pH-Meter gemessen. Durch den Alkohol- und Gelatinegehalt der Lösung wird die pH-Messung systematisch etwas verfälscht. Der Fehler bleibt aber kleiner als 0,1 pH.

Die Potentiale beziehen sich auf die 1-n. Kalomelektrode. Die verwendete Kapillare zeigte bei einer Quecksilberhöhe von 57 cm eine Tropfzeit von 3,00 sek und eine Ausflussgeschwindigkeit von 1,225 · 10⁻³ g/sek. Damit ergab sich für die Ilkovic-Konstante $k = 0,833$. Der Diffusionsstrom einer 5 · 10⁻⁴-m. Lösung betrug 12,8 · 10⁻⁷ Amp. Aus der Ilkovic-Gleichung $i_d = n k D_R^{1/2} (R)$ errechnet sich $D_R^{1/2} = 1,54 \cdot 10^{-3} \text{ (cm}^2\text{/sek)}^{1/2}$. Für Azobenzol hatte sich früher³⁾ ergeben $D_R^{1/2} = 1,80 \cdot 10^{-3} \text{ (cm}^2\text{/sek)}^{1/2}$. Die Carboxylgruppe bringt also eine wesentliche Verkleinerung der Diffusionskonstanten mit sich.

5. Ergebnisse und Diskussion.

a) Ungepufferte Lösung (Pufferverarmungsstufen). Fig. 2 zeigt Polarogramme von Azobenzol-monocarbonsäure-(p) in ungepuffelter Lösung. Das pH wurde durch geringe Zusätze von HCl oder NaOH variiert. Es ergeben sich ähnliche Kurven wie beim

¹⁾ Hergestellt nach H. D. Anson, Org. Synth. **25**, 86 (1945).

²⁾ Kolthoff & Rosenblum, Acid-Base Indicators, Macmillan Company, New York (1937), S. 263.

³⁾ Rüetschi & Trümpler, Helv. **35**, 1021, 1486 (1952).

Azobenzol. Die Dissoziierbarkeit wirkt sich im Polarogramm eigentlich nur dadurch aus, dass der Diffusionsstrom der ersten Stufe bei gleichem pH grösser geworden ist, indem nun auch der Depolarisator Wasserstoff liefert.

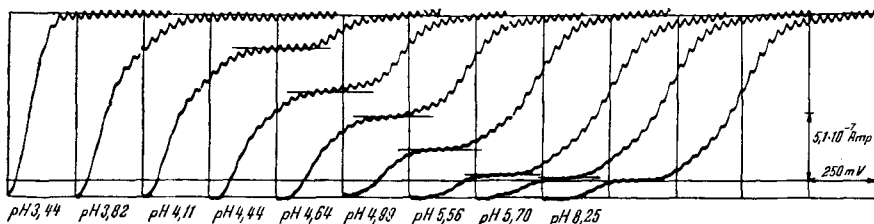


Fig. 2.

Polarogramme von Azobenzol-monocarbonsäure-(p) $5 \cdot 10^{-4}$ -m. in ungepufferter Lösung. Elektrolytzusammensetzung: 10 cm^3 Azobenzol-monocarbonsäure-(p) 10^{-3} -m. in Alkohol, 5 cm^3 KCl 1-n. (pro Liter 0,5 g Gelatine enthaltend), 5 cm^3 verdünnte HCl oder NaOH (zur pH-Variation). Die Kurven beginnen bei $-0,1$ Volt gegen die 1-n. Kalomelektrode. Der Säure-Diffusionsstrom ist aus zwei Anteilen zusammengesetzt: Lieferung von Wasserstoff aus H-Ionen und aus undissoziiertem Depolarisator.

Die berechnete und die experimentell gefundene pH-Abhängigkeit der Stufenhöhe ist in Fig. 3 dargestellt. Um die Rechnung zu vereinfachen, wurden hier die Dissoziationskonstanten von Azobenzol-monocarbonsäure-(p) und von Hydrazobenzol-monocarbonsäure-(p) einander gleichgesetzt. Wenn dazu noch völlige Dissoziation der Salzsäure angenommen wird, vereinfacht sich Gleichung (4) für die Berechnung des Diffusionsstromes ($(H)_0 \cong 1/1000 (H)$) zu:

$$i_d = k D_H^{1/2} (H) + k D_R^{1/2} c_R \frac{(H)}{K_R + (H)}. \quad (17)$$

Für die Dissoziationskonstante der Azobenzol-monocarbonsäure-(p) in der untersuchten wässrig-alkoholischen Lösung wurde durch potentiometrische Titration der Wert $1,0 \cdot 10^{-5}$ ermittelt¹⁾. Für die Diffusionskonstante des Depolarisators wurde der polarographisch bestimmte Wert $D_R = 2,36 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sek}$ eingesetzt, für diejenige des H-Ions der Wert $7,05 \cdot 10^{-5}$. (Der theoretische, aus der Äquivalentleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung berechnete Wert, beträgt in Wasser bei 25° $9,34 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sek}^2$). In den früheren Arbeiten wurde $8,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sek}$ verwendet. Es musste hier ein kleinerer Wert eingesetzt werden, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass entgegen unserer Annahme, die Salzsäure unvollständig dissoziiert ist. Der hier verwendete Wert liegt zwischen dem Diffusionskoeffizienten des H-Ions und demjenigen der undissoziierten Salzsäure.)

¹⁾ Es soll hier, wie schon in unseren früheren Arbeiten, betont werden, dass K infolge des Alkohol- und Gelatinegehaltes der Lösung in unserem Fall nicht die übliche Dissoziationskonstante bedeutet, sondern nur eine Rechengrösse, definiert als $(H) (A)/(AH)$, wobei (H), (A) und (AH) die wirklichen Konzentrationen der H-Ionen, Anionen und undissoziierten Säuremolekeln bezeichnen. Bei der potentiometrischen Titration ermittelt man aber K aus der Formel $pK = pH + \log(AH)/(A)$, wobei für das pH der mit der Glaselektrode gemessene Wert, für (A) die Konzentration des Kations der Titrierlange und für (AH) die Differenz zwischen Gesamtkonzentration und Anionenkonzentration (A) eingesetzt wird. Der so erhaltene Wert wird von dem oben definierten etwas abweichen. Bei der Berechnung wurde $K = 2,0 \cdot 10^{-5}$ verwendet. Mit diesem Wert erhält man eine gute Angleichung an die experimentell gefundene pH-Abhängigkeit.

²⁾ Kolthoff, Polarography, S. 45. Interscience Publishers, New York 1946.

Die folgende Tabelle gibt die Zahlenwerte zu Fig. 3:

Zusatz zur pH-Variation (5 cm ³)	pH	$i_a = k D_H^{1/2} (H) + k D_R^{1/2} c_R \frac{(H)}{K_R + (H)}$
HCl 2,0 · 10 ⁻³ -n.	3,44	—
HCl 1,0 · 10 ⁻³ -n.	3,82	16,23 · 10 ⁻⁷ Amp.
HCl 5,0 · 10 ⁻⁴ -n.	4,11	10,52
H ₂ O	4,44	6,67
NaOH 4,0 · 10 ⁻⁴ -n.	4,64	5,01
NaOH 1,0 · 10 ⁻³ -n.	4,99	2,87
NaOH 1,4 · 10 ⁻³ -n.	5,56	0,97
NaOH 1,6 · 10 ⁻³ -n.	5,70	0,72
NaOH 2,0 · 10 ⁻³ -n.	8,25	—

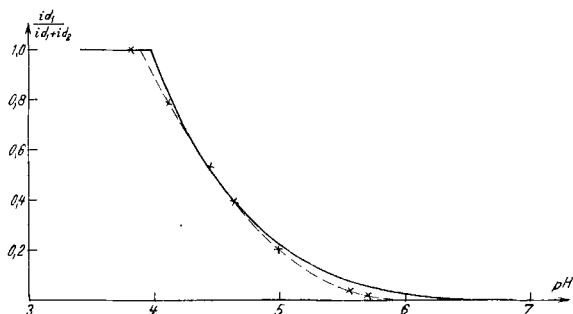


Fig. 3.

Theoretische (ausgezogene Kurve) und experimentelle (punktiierte Kurve) Abhängigkeit des Säurediffusionsstroms vom pH.

In Fig. 4 sind nach Gleichung (4) und (8) berechnete Stromspannungskurven dargestellt. Auch hier wurde bei der Berechnung einfachheitshalber vorausgesetzt, dass neben dem undissoziierten Depolarisator nur noch H-Ionen, und keine undissoziierten Salzsäuremolekeln, als Wasserstofflieferanten in Frage kommen. Die Verschiedenheit der Disso-

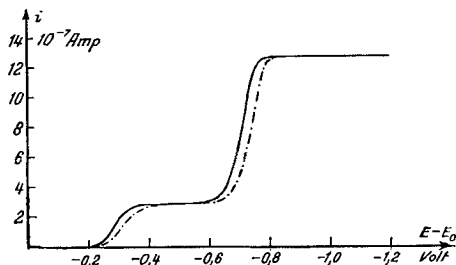


Fig. 4.

Berechnete Polarogramme von Azobenzol-monocarbonsäure in ungepufferter Lösung für ein pH von 5,0. Die ausgezogene Kurve ergibt sich bei $K_R = K_{RH_n} = 2 \cdot 10^{-5}$, die punktiierte erhält man bei $K_R = 2 \cdot 10^{-5}$, $K_{RH_n} = 2 \cdot 10^{-6}$. In die Gleichung (8) müssen $(H)_0$ -Werte zwischen $0,99 \cdot 10^{-5}$ und $4,0 \cdot 10^{-13}$ eingesetzt werden.

zationskonstanten von Ausgangsstoff und Reduktionsprodukt macht sich im Polarogramm durch eine Verschiebung des letzten Anstieges nach negativerem Potential um den Betrag

$$\frac{RT}{nF} \ln \frac{K_{RH_n}}{K_R}$$

und in einer Verflachung der ersten Stufe bemerkbar. Für das Ionenprodukt des Wassers in der wässrig-alkoholischen Lösung diente der abgeschätzte Wert $0,75 \cdot 10^{-16}$, für die Diffusionskonstante der OH-Ionen derjenige von $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sek.}$

Bei der ersten Stufe stimmen die theoretisch berechneten und die experimentell gefundenen Stromspannungskurven recht gut überein. Beim zweiten Anstieg dagegen verlaufen die experimentellen Polarogramme flacher, und man erkennt andeutungsweise eine Vorstufe. Die Abweichungen können damit begründet werden, dass 1. die Anionenreduktion irreversibel verläuft und 2. zuerst auch noch undissoziierte Molekeln reduziert werden.

b) Gepufferte Lösung (Dissoziationsstufen). Fig. 5 stellt Polarogramme von Azobenzolcarbonsäure in gut gepufferter Lösung dar. Die Zweistufigkeit tritt zwischen pH 8 und 11 auf. In diesem pH-Bereich liegt der gesamte Depolarisator in dissoziierter Form vor. Die positivere Stufe wird also durch eine Nachlieferungreaktion hervorgerufen.

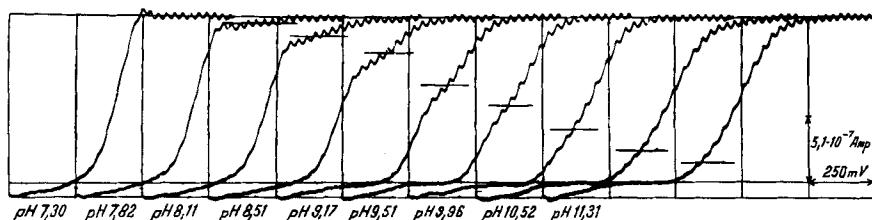


Fig. 5.

Polarogramme von Azobenzol-monocarbonsäure $5 \cdot 10^{-4}$ -m. in gepufferter Lösung. Elektrolytzusammensetzung: 10 cm^3 Azobenzol-monocarbonsäure-(p) 10^{-3} -m. in Alkohol, 5 cm^3 KCl 1-n. (pro Liter 0,5 g Gelatine enthaltend), 5 cm^3 Britton-Robinson-Puffer.

Die Kurven beginnen bei $-0,1$ Volt gegen die 1-n. Kalomelelektrode.

Die theoretische und die experimentell gefundene Abhängigkeit der Stufenhöhe vom pH ist in Fig. 6 dargestellt. Die vordere Stufe erreicht die Hälfte der Gesamthöhe bei pH 9,4. Mit einer Dissoziationskonstanten von $K = 2,0 \cdot 10^{-5}$, einer Tropfzeit von $t_1 =$

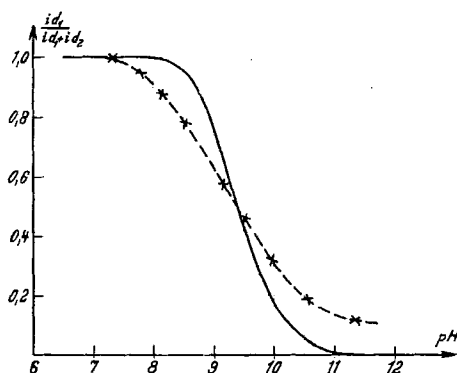


Fig. 6.

Theoretische (ausgezogene Kurve) und experimentelle (punktierte Kurve) Abhängigkeit des Reaktionsstromes vom pH.

3,00 sek und dem der halben Höhe entsprechenden y_1 -Wert $0,400^{1)}$ errechnet sich aus Gleichung (16) eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 1,68 \cdot 10^{13}$. Dieser k -Wert legt die beiden Kurven bei $i/i_\infty = 0,5$ aufeinander. Nach Gleichung (15) sind damit die y_1 -Werte als Funktion des pH festgelegt. Sie bestimmen ihrerseits durch die *Brdicka*-Funktion (14) die Grösse i/i_∞ . *Koutecky & Brdicka* bestimmten für die Brenztraubensäure $k = 1,4 \cdot 10^9$, für Phenylglyoxylsäure $k = 3,2 \cdot 10^{11}$.

Zum Vergleich wollen wir die Geschwindigkeitskonstanten kinetisch berechnen. Die Stosszahl zwischen zwei Teilchensorten 1 und 2 in einer Lösung beträgt²⁾

$$z = 4 \pi (r_1 + r_2) (D_1 + D_2) N_1 N_2,$$

wobei:

$$\begin{aligned} r_1 + r_2 &= \text{Summe der Wirkungsradien,} \\ D_1 + D_2 &= \text{Summe der Diffusionskonstanten,} \\ N_1, N_2 &= \text{Zahl der Teilchen pro cm}^3. \end{aligned}$$

Diese Formel, welche ursprünglich für die Koagulation von Kolloidteilchen abgeleitet wurde, kann verwendet werden, wenn die Aktivierungsenergie sehr klein und die Diffusion der Teilchen zueinander der geschwindigkeitsbestimmende Vorgang ist. Zudem gilt sie eigentlich nur für kugelförmige, ungeladene Teilchen. Eine sterische Hinderung wird durch sie nicht berücksichtigt.

Wenn von den Teilchensorten 1 und 2 je ein Mol pro Liter, oder

$$\frac{6,02 \cdot 10^{23}}{10^3} = N_1 = N_2$$

Teilchen pro cm^3 vorhanden sind, ergibt sich die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k aus $z/N_L \cdot 10^3$ ($N_L = 6,02 \cdot 10^{23}$).

Für die rohe Berechnung wurden folgende Werte verwendet:

Teilchensorte	Diffusionskonstante	Wirkungsradius
Wasserstoffion	$7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sek}$	$2 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$
Brenztraubensäure . . .	$5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sek}$	$6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$
Phenylglyoxylsäure . . .	$4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sek}$	$12 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$
Azobenzolcarbonsäure .	$3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sek}$	$21 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$

Die Teilchenradien könnten aus der Molekularrefraktion nach der Formel

$$r = \sqrt[3]{\frac{3 R_M}{4 \pi N_L}}$$

ungefähr berechnet werden. Da in unserem Falle aber langgestreckte und einseitig negativ geladene Teilchen auftreten, ist es vorzuziehen, den Radius als halbe Molekellänge abzuschätzen. In die Stosszahlformel muss der Wirkungsradius eingesetzt werden, der etwa dreimal so gross ist wie der Teilchenradius³⁾. In der folgenden Tabelle (S. 1969) sind die polarographisch bestimmten und die kinetisch berechneten Geschwindigkeitskonstanten zusammengestellt.


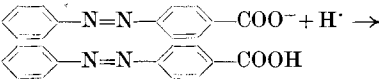
Die grossen Unterschiede bei den polarographisch bestimmten Werten lassen sich nicht allein durch die Zunahme des Anionenradius erklären. Man muss hier beachten, dass ja mit zunehmender Geschwindigkeitskonstanten und abnehmender Dissoziationskonstanten das pH, wo die Reaktionsstufe die halbe Höhe des totalen Diffusionsstromes erreicht, zunimmt. Während bei der Brenztraubensäure dieser charakteristische Wert bei pH 6,0 liegt, befindet er sich bei Phenylglyoxylsäure und Azobenzolmonocarbonsäure-(p) bei

¹⁾ *Koutecky & Brdicka*, Coll. Czech. Chem. Commun. **12**, 354 (1947).

²⁾ *Euken*, Lehrbuch der chemischen Physik, II 2, S. 1142, 1149 (3. Auflage, Geest u. Portig, Leipzig, 1949).

³⁾ *Euken*, Lehrbuch der chemischen Physik, II 2, S. 1139, 1144 (3. Auflage, Geest u. Portig, Leipzig, 1949).

pH 6,8 resp. pH 9,4. Bei so kleinen Wasserstoffionenkonzentrationen dürfte sich die Reaktion zwischen Depolarisator-Anionen und undissoziierter Puffersäure zu undissoziiertem Depolarisator stärker auswirken und die Reaktionsstufe erhöhen, so dass sie neben dem Zusammentritt mit H-Ionen nicht mehr vernachlässigt werden kann. Dies muss sich dann in einer Unsymmetrie der i/i_{∞} -pH-Kurve ausdrücken, indem selbst bei sehr hohen pH-Werten der Reaktionsstrom nicht auf 0 absinkt, was in Fig. 6 tatsächlich auftritt. Man würde also in solchen Fällen k besser aus einem grösseren i/i_{∞} -Wert als 0,5 berechnen und erhielte dann eine erheblich kleinere Geschwindigkeitskonstante.

Reaktion	Geschwindigkeitskonstante, polarographisch bestimmt	Geschwindigkeitskonstante, kinetisch berechnet
$\text{CH}_3\text{COCOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COCOOH}$	$1,4 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^{10}$
 $\text{COCOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{COCOOH}$	$3,2 \cdot 10^{11}$	$7,8 \cdot 10^{10}$
 $\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{COOH}$	$1,7 \cdot 10^{13}$	$1,3 \cdot 10^{11}$

Vergleicht man die Pufferverarmungs- und die Dissoziationszweistufigkeit, so ergeben sich folgende Unterschiede: Die vordere Stufe ist im ersten Fall ein Diffusionsstrom und als solcher proportional $1/\sqrt{h}$ (h = Höhe der Quecksilbersäule). Im zweiten Fall ist der Strom im wesentlichen durch die Reaktionsgeschwindigkeit begrenzt und damit proportional der Oberfläche $m^{2/3} \cdot t^{2/3} \cdot 0,85$. Da $m \cdot t$ für eine Kapillare konstant bleibt, ist der Reaktionsstrom also unabhängig von h^1).

Die Höhe der Pufferverarmungsstufe ist proportional der Pufferkonzentration im Innern der Lösung. Besteht der Puffer aus H-Ionen, so nimmt die Stufenhöhe mit ansteigendem pH logarithmisch ab. Der Reaktionsstrom dagegen ändert sich mit dem pH nach einer Stufenkurve, ähnlich wie sie bei der potentiometrischen Titration entsteht.

Während im Polarogramm des Azobenzols im gesamten pH-Bereich ein Maximum auftritt, beobachtet man diese Erscheinung bei der Azobenzolmonocarbonsäure-(p) nur dann, wenn sie in der undissoziierten Form reduziert wird. Sowohl dort, wo durch ungenügende Pufferung das Polarogramm in zwei Stufen zerfällt und im zweiten Anstieg der zur Reduktion nötige Wasserstoff dem Wasser entrissen werden muss, als auch da, wo bei guter Pufferung das pH so klein gehalten wird, dass die Reaktionsstufe kleiner wird als der totale Diffusionsstrom, wird in der zweiten Stufe eben das schwerer reduzierbare und schwerer adsorbierbare Anion reduziert, welches kein Maximum erzeugt. Die Irreversibilität der Anionenreduktion kann dafür verantwortlich gemacht werden, dass der zweite Anstieg viel flacher verläuft als bei der (unter Annahme reversibler Reduktion) theoretisch berechneten Stromspannungskurve.

6. Zusammenfassung.

I. Die Theorie der Wasserstoffionenverarmung in ungenügend gepufferter Lösung wird erweitert für dissoziierbare Stoffe und am Beispiel von Azobenzolmonocarbonsäure-(p) experimentell geprüft. Stufenhöhe und Kurvenform können berechnet und der Einfluss der Dissoziationskonstanten von Depolarisator und Reduktionsprodukt kann angegeben werden.

¹⁾ Brdicka, Coll. Czech. Chem. Commun. **12**, 220 (1947).

II. Die Theorie von *Koutecky & Brdicka* für Reaktionsstufen in gepufferter Lösung wird auf Azobenzolmonocarbonsäure-(p) angewendet und die Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion zwischen H-Ion und Anion bestimmt. Die polarographisch ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten werden mit kinetisch berechneten verglichen.

III. Die Pufferverarmungs- und die Dissoziationszweistufigkeit werden verglichen und ihre charakteristischen Eigenschaften diskutiert.

Physikal.- und Elektrochem. Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

248. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. VI¹⁾. Über die Phosphatasewirkung des Labes.

von H. Mattenheimer²⁾, Hs. Nitschmann und P. Zahler

(25. VIII. 52.)

Einleitung.

In einer vorangegangenen Arbeit dieser Serie hatten *Nitschmann & Varin*³⁾ nachgewiesen, dass bei der Einwirkung von kristallisiertem Lab auf gelöstes Casein ein hydrolytischer Abbau stattfindet, der bei genügend hoher Dosierung des Enzyms zu einer titrimetrisch gut feststellbaren Zunahme der sauren und basischen Gruppen führt. Wenn jene Messungen den proteolytischen Abbau auch unzweifelhaft nachgewiesen hatten, so blieb doch die Frage offen, ob das Lab neben Peptidbindungen nicht auch noch andere Bindungen gespalten hatte. Neben der Säureamidbindung, die im Casein sehr reichlich vorkommt, ist vor allem die Phosphorsäureesterbindung in Betracht zu ziehen, denn verschiedene Beobachtungen lassen vermuten, dass die Phosphorsäure im Casein bei der Labgerinnung der Milch irgendeine bedeutsame Rolle spielt.

*Rimington & Kay*⁴⁾ haben z. B. festgestellt, dass dephosphoryliertes Casein mit Lab und Ca-Ionen nicht mehr zur Gerinnung gebracht werden kann, dass die Gerinnbarkeit aber nach Rephosphorylierung des Caseins zurückkehrt. *Neuberg & Oertel*⁵⁾ wollen sogar

¹⁾ Nr. V dieser Reihe: *Helv.* **35**, 553 (1952).

²⁾ Derzeitige Adresse: Physiologisch-chemische Anstalt der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem.

³⁾ IV: *Hs. Nitschmann & R. Varin*, *Helv.* **34**, 1421 (1951).

⁴⁾ *C. Rimington & H. D. Kay*, *Biochem. J.* **20**, 777 (1926).

⁵⁾ *C. Neuberg & W. Oertel*, *Bioch. Z.* **60**, 491 (1914).