

MASTER

De homogene oxidatie van cysteine door moleculaire zuurstof in alkalisch milieu,
gekataliseerd door Cu(++)

van der Cammen, J.C.J.M.

Award date:
1976

[Link to publication](#)

Disclaimer

This document contains a student thesis (bachelor's or master's), as authored by a student at Eindhoven University of Technology. Student theses are made available in the TU/e repository upon obtaining the required degree. The grade received is not published on the document as presented in the repository. The required complexity or quality of research of student theses may vary by program, and the required minimum study period may vary in duration.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain

AFDELING DER TECHNISCHE NATUURKUNDE
TECHNISCHE HOGESCHOOL EINDHOVEN

*de homogene oxidatie van cysteïne door moleculaire
zuurstof in alkalisch milieu, gekatalyseerd door Cu(++)*

Johan C.J.M. van der Cammen

Rapport van het afstudeerwerk, uitgevoerd van september 1974
tot juli 1975 in de groep homogene katalyse van de vakgroep
TA van de afdeling Scheikundige Technologie.

afstudeerhoogleraar : Prof.dr. G.G.A. Schuit
afstudeercoaches : Ir. J. Zwart
Dr.ir. D.C. Koningsberger
kontaktpersoon bij de afdeling N : Prof.dr. P. van der Leeden

Buiten de personen, vermeld op de titelpagina, dank aan mej. M. Kuijer en drs. J.H.M.C. van de Wolput voor hun assistentie bij de experimenten.

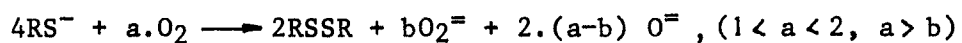
Samenvatting

Doel van het onderzoek is het opstellen van een reactiemechanisme voor de door Cu(++) gekatalyseerde oxidatie van cysteïne in alkalisch milieu.

Hierbij is uitgegaan van de gegevens uit de literatuur, aangevuld met de uitkomsten van eigen metingen.

De eigen metingen hebben zich voornamelijk gericht op de bestudering van de waterstofperoxide-ophoping tijdens de reactie en op het bepalen van de katalytische aktieve vorm van de koperionen.

Uit deze metingen is gebleken dat gedurende de oxidatie alle aanwezige koperionen gekomplexeerd zijn als $\text{Cu(II)(RS}^-\text{)}_2$, en dat de stochiometrie van de overall-reactie voldoet aan de vergelijking:



Het uiteindelijk opgestelde reactiemechanisme geeft een, deels kwantitatieve, deels kwalitatieve verklaring, voor alle tot nu toe bekende experimentele gegevens.

Inhoudsopgave

1.	<i>Inleiding</i>	1
1.1.	Historisch overzicht	1
1.2.	Doel van het onderzoek	2
2.	<i>Apparatuur</i>	3
2.1.	Warburg-apparaat	3
2.2.	H ₂ O ₂ - bepalingen	3
2.2.1.	Monstername	3
2.2.2.	Bepaling van de hoeveelheid H ₂ O ₂	4
2.2.3.	Oxidatieproeven met H ₂ O ₂ als oxidator	5
2.3.	UV/VIS - metingen	6
2.3.1.	Rondpompsysteem	6
2.3.2.	Kuvetproeven	6
2.3.3.	Rapid - mix - experimenten	6
2.3.4.	Stop - flow - experimenten	7
2.4.	ESR - metingen	8
2.4.1.	Bepaling van het absolute aantal spins met behulp van ESR - spektroskopie	8
3.	<i>Resultaten</i>	10
3.1.	Kinetische metingen aan de door Cu(++) gekatalyseerde oxidatie van cysteïne door moleculaire zuurstof	10
3.1.1.	Meting van de zuurstofopname tijdens de oxidatie	10
3.1.2.	Meting van de waterstofperoxidevorming tijdens de oxidatie	11
3.1.3.	Samenhang tussen de zuurstofopname en de waterstofperoxidevorming	13
3.2.	Oxidatieproeven met H ₂ O ₂ als oxidator	15
3.3.	UV/VIS - spektroskopie	21
3.3.1.	Rondpompsysteem	21
3.3.2.	Kuvetproeven	23
3.3.3.	Rapid - mix - experimenten	26
3.3.4.	Stop -flow - experimenten	27
3.4.	ESR - metingen	31
3.4.1.	Bepaling van het absolute aantal spins	31
3.4.2.	Invloed van zuurstof op het ESR - spektrum van Cu(II)(RS ⁻) ₂	35
3.4.3.	ESR - stop - flow - experimenten	37
4.	<i>Diskussie en konklusies</i>	39

Literatuurlijst	45
Appendix 1	46
" 2	51
" 3	52
" 4	53
" 5	60
" 6	66
" 7	72

1. Inleiding

1.1. Historisch overzicht.

De homogene oxidatie van thiolen door moleculaire zuurstof in alkalisch milieu, gekatalyseerd door overgangsmetaalionen en overgangsmetaalkomplexen, is uitgebreid bestudeerd. (litt. 9, 10, 12, 13, 15)

De "overall" reaktievergelijking van deze oxidatie wordt gegeven door :



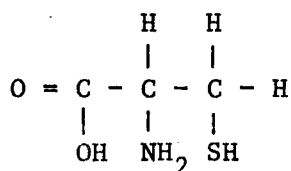
Op grond van kinetische proeven poneerde Wallace (15) een reactiemechanisme waarbij thiylradikalen optreden als intermediare deeltjes.

Swann en Trimm (16) daarentegen poneren een reactiemechanisme waarin de elektronenoverdracht plaats vindt binnen de koördinatiesfeer van het metaalion.

Beide reactiemechanismen veronderstellen de overgang van Cu(++) naar Cu(+) en omgekeerd.

Cavallini et al. toonden aan dat, bij de door koperionen gekatalyseerde oxidatie van cysteïne, de katalytisch aktieve vorm van de koperionen bestaat uit een Cu(++)-dicysteïne-komplex, dat gedurende de gehele oxidatie aanwezig is.

Door middel van ESR-intensiteitsmetingen stelden zij vast dat het complex 80% van de aanwezige koperionen bevatte. (9)



- cysteïne -

Zij stellen een reactiemechanisme voor, waarbij thiylradikalen in de koördinatiesfeer van het complex gevormd worden onder invloed van zuurstof. Cavallini rapporteerde voorts de accumulatie van waterstofperoxide tijdens de oxidatie. (8)

Kuijpers (1) bestudeerde eveneens de oxidatie van cysteïne in alkalisch milieu. Hij sloot op basis van ESR-spintrapmetingen de vorming van thiylradikalen uit en poneerde een mechanisme waarin de elektronenoverdracht van cysteïne naar zuurstof in twee stappen geschiedt : Eerst wordt in een bi-nukleair koper-cysteïne-komplex cysteïne door Cu(++) direkt geoxi-

deerd tot cysteïne; vervolgens wordt het hierbij gevormde Cu(+) gereoxi-
deerd door zuurstof.

Opmerkelijke experimentele gegevens zijn de waargenomen totale zuurstof-
opname, die volgens de stochiometrie van reactie (1.1) doorloopt tot ca.
130% en de orde van de zuurstofopnamesnelheid in de koperionenconcentratie
waarvoor Kuijpers vindt :

$$\frac{do_2}{dt} = k [Cu(++)]_o^{1,2} \quad (1.2)$$

(Ter vergelijking: Swann en Trimm (12), die het substraat ethaanthiol
(CH₃CH₂SH) gebruikten, eveneens in alkalisch milieu, vonden 100% konver-
sie en orde één in koper.)

Het door Schoonbeek (5) gerapporteerde niet verlopen van de oxidatiereak-
tie in neutraal of zuur milieu, wordt tegengesproken door de resultaten
van Rummens (11), die een meetbare oxidatiesnelheid vindt vanaf pH=5,
met een optimum bij pH=8.

Bij pH=8 vindt Rummens een orde 1,05 van de zuurstofopnamesnelheid in de
koperionenconcentratie en een konversie, die de 100% hooguit enkele pro-
centen overschrijdt.^x

1.2. Doel van het onderzoek

Het afstudeerwerk heeft tot doel gehad het reactiemechanisme van de door
koperionen gekatalyseerde oxidatie van cysteïne, in basisch milieu, nader
te ontrafelen.

Met een nieuw teponeren reactiemechanisme zouden in ieder geval te ver-
klaren moeten zijn:

1. De door Kuijpers gevonden konversie van ca. 130%.
2. De eveneens door Kuijpers gesignaleerde orde 1,2 van de zuurstofop-
namesnelheid in de koperionenconcentratie.
3. De door Cavallini gevonden waterstofperoxide-akkumulatie.

^xnoot : Rummens vermoedt dat Schoonbeek onder een neutrale oplossing
heeft verstaan : cysteïne opgelost in gedestilleerd water.
Zo'n oplossing is echter niet neutraal, doch heeft pH=5.
Om deze oplossing neutraal te maken moet hij worden aangelood.

2. Apparatuur

2.1. Warburgapparaat.

Voor het meten van de zuurstofopnamesnelheid tijdens de reactie, wordt gebruik gemaakt van een Warburgapparaat. (appendix 1, fig. 1a)

Voorzieningen werden getroffen om naast de zuurstofopname ook de pH en de temperatuur van het reaktiemengsel te kunnen meten.

Met behulp van de hulpstukken die kunnen worden opgenomen in de rondpomplus, kan het UV/VIS-spektrum of het ESR-spektrum van de oplossing worden opgenomen. Tevens is het mogelijk om uit de oplossing monsters te nemen. (appendix 1, fig. 1b)

Alle oxidatieproeven zijn uitgevoerd bij 24°C in 0,25 N NaOH.

Deze hoeveelheid loog is zo groot dat voor alle cysteïnekonsentraties de aanwezige RSH is geïoniseerd tot RS⁻.

2.2. H₂O₂-bepalingen.

Om de hoeveelheid H₂O₂ te bepalen, die tijdens de oxidatie aanwezig is, worden tijdens de kinetische metingen monsters getrokken uit de reaktievloeistof. In deze monsters wordt de hoeveelheid waterstofperoxide spectrofotometrisch bepaald met behulp van de methode beschreven door Egerton & Everett. (14)

Deze methode berust op de vorming van een geel Ti(4+) - waterstofperoxidekomplex.

2.2.1. Monstername.

Voor het nemen van monsters uit de reaktievloeistof, tijdens kinetische proeven, wordt in de rondpomplus van de Warburgapparatuur het hulpstuk voor monstername aangebracht. (Appendix 1 fig. 1a en fig. 1b, 3)

De "ruststand" van de T-kranen is weergegeven in appendix 1, fig 1b, 3a.

In deze stand stroomt reaktievloeistof door de rondpompleiding.

Bij het nemen van een monster worden de volgende manipulaties verricht:

1. kraan T2 45° linksom draaien (T2 is in alle richtingen gesloten)
2. kraan T1 90° linksom draaien
3. kraan T2 45° verder linksom draaien

Nu is de situatie ontstaan zoals die is afgebeeld in appendix 1, fig. 1b, 3b. Het monster wordt met behulp van zuurstofdruk bij kraan T2 uitgedreven.

Het terugbrengen van de kranen in de ruststand geschiedt volgens :

4. kraan T1 45° rechtsom draaien
5. kraan T2 90° rechtsom draaien
6. kraan T1 45° verder rechtsom draaien

Het voordeel van bovenstaande methode is, dat de zuurstofopnamemeting niet wordt verstoord door de monstername, omdat zuurstof van atmosferische druk de plaats inneemt van het monster.

De grootte van het monster kan worden gevarieerd met behulp van de lengte van de polyteenslang tussen de T-kranen. De absolute monstergrootte wordt bepaald door middel van weging.

2.2.2. Bepaling van de hoeveelheid H_2O_2 .

De bepaling van de hoeveelheid H_2O_2 verloopt als volgt :

Reagens : $1\frac{1}{3}$ ml $TiCl_3$ (15%)
 +60 ml HCl (36%)
 +40 ml H_2O

Deze oplossing is blauwig en moet met behulp van 3% H_2O_2 worden aangekleurd tot stabiel licht geel. (Alle $Ti(3+)$ is dan omgezet in $Ti(4+)$). In een 10 mm spektrofotometercel wordt bijeengebracht : 1ml reagens en 3 ml monster; hiermee is de cel juist vol.

Bevat het monster waterstofperoxide, dan wordt de oplossing intensiever geel en geeft in de spektrofotometer een spectrum, waarvan het absorptie-maximum zich bij 410 nm bevindt.

De extinktie bij 410 nm volgt de wet van Beer tot en met optische dichtheden van 0,8. (fig. 2.2.1.)

Als referentie wordt gebruikt een 10 mm cel, gevuld met 1 ml reagens en 3 ml water.

Om de tijd, die verloopt tussen de monstername en de H_2O_2 -bepaling, zo klein mogelijk te maken, wordt de monsteroplossing via de T-kraan direkt in een kuvet gespoten, waarin zich het reagens bevindt.

Op deze manier is het mogelijk om monster en reagens te mengen, binnen vijf sekonden na het sluiten van de eerste T-kraan.

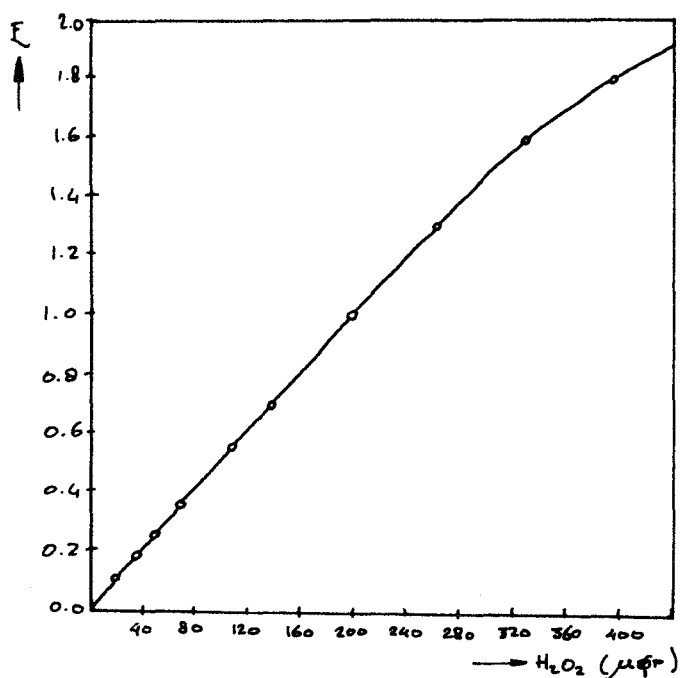


Fig. 2.2.1. Extintkie bij 410 mm als funktie van de hoeveelheid H₂O₂ (overgenomen uit litt. 14)

2.2.3. Oxidatieproeven met H₂O₂ als oxidator.

Oxidatieproeven met H₂O₂ als oxidator worden uitgevoerd in 5 mm kwartkuvetten. De opstelling is gegeven in appendix 1, fig. 2.

In de kuvet wordt 1 ml cysteïne-oplossing gepipetteerd, plus 0 tot 0,5 ml gedeïoniseerd water, afhankelijk van de benodigde hoeveelheid Cu(++)-oplossing. Dit mengsel wordt 5 tot 10 minuten doorgeborreld met stikstof. Hierna wordt 0 tot 0,5 ml Cu(++)-oplossing toegevoegd, die van te voren met behulp van stikstof is ontzuurstoft.

Als laatste wordt, onder voortdurend doorleiden van stikstof, 0,5 ml H₂O₂-oplossing in de kuvet gespoten. Het totale volume is nu 2 ml. Het verloop van de oxidatie wordt spektroskopisch gevolgd aan de hand van de UV-absorptie van cysteïne.

2.3. UV/VIS - metingen.

De UV/VIS-absorptiespektra worden opgenomen met een Unicam SP-800 spektrofotometer.

Dit apparaat is behalve voor het registreren van absorptiespektra ook geschikt voor het maken van zogenaamde "fixed- λ -scans".

Hierbij wordt de absorptie bij vaste golflengte geregistreerd als functie van de tijd.

2.3.1. Rondpompsysteem.

Om UV/VIS-absorptiespektra op te kunnen nemen tijdens de kinetische metingen, wordt gebruik gemaakt van kwartskuvetten, die met behulp van in- en uitleidbuisjes worden opgenomen in de rondpomplus van het Warburgapparaat. (appendix 1, fig. 1b 1)

2.3.2. Kuvetproeven.

Om eenvoudig en snel het gedrag van het UV/VIS-absorptiespektrum tijdens het reactieverloop te kunnen bepalen, worden oxidatieproeven uitgevoerd in kwartskuvetten. Met behulp van een in- en uitleidbuisje kan de reactievloeistof naar keuze met zuurstof of stikstof worden doorgeborreld. (appendix 1, fig. 2)

Afhankelijk van de te gebruiken concentraties wordt gebruik gemaakt van kuvetten met een optische weglengte van 5, 10 of 20 mm. Deze kuvetten worden gevuld met respectievelijk 2, 4 en 8 ml oplossing.

2.3.3. Rapid - mix - experimenten.

Het doel van de rapid-mix-techniek is het meten van kortlevende reactieproducten. Daartoe worden twee te reageren vloeistofstromen snel gemengd en direct daarna "gemeten".

In het geval van UV/VIS-spektroskopie bestaat dit "meten" uit het bepalen van de optische dichtheid; in het geval van ESR-spektroskopie uit het bepalen van de magnetische karakteristieken van het mengsel.

Een schema van de gebruikte opstelling is gegeven in appendix 1, fig. 3a. De tijd die verloopt tussen het mengen en het meten wordt de dode tijd t_d genoemd. Deze wordt bepaald door het dode volume v_d van het mengsel en door de stroomsnelheid ϕ van de gemengde vloeistofstroom.

$$t_d = v_d / \phi \quad (2.1)$$

Om de stroomsnelheid te kunnen bepalen zijn in de aanvoerleidingen flowmeters opgenomen. Met behulp van deze meters kan tevens de verhouding van de stroomsnelheden van de vloeïstofstromen worden ingesteld. In alle experimenten wordt voor deze verhouding 1:1 genomen.

Fig. 4 van appendix 1 geeft de gemeten ijkcurven van de flowmeters naast de ijkcurve van de fabrikant.

Bij het ijken van de flowmeters is gebleken dat de spreiding in de stroomsnelheden 5% bedraagt : $\phi = \phi \pm 5\%$.

De onnauwkeurigheid in de stofkonsentraties na mengen wordt daardoor 10%. De te mengen oplossingen kunnen van te voren zuurstofvrij of zuurstofverzadigd worden gemaakt door ze te borrelen met respektievelijk stikstof of zuurstof. Dit doorborrelen geschiedt steeds gedurende minimaal dertig minuten.

Bij rapid-mix-UV/VIS-metingen wordt gebruik gemaakt van kwartskuvetten of van een speciale rapid-mix-cel.

De optische weglengte van de kuvetten is, afhankelijk van de te gebruiken konsentraties, 5, 10 of 20 mm.

De optische weglengte van de speciale rapid-mix-cel bedraagt 0,4 mm.

(appendix 1, fig. 3b 1, fig. 3b 2)

2.3.4. Stop-flow-experimenten.

In stop-flow-experimenten wordt het verloop van de UV/VIS-absorptiespektra bestudeerd na het stilzetten van de mengstroom in een rapid-mix-experiment.

Het stoppen van de flow geschiedt door het sluiten van de kraan in de afvoerleiding van de mengcel. Om te voorkomen dat er vloeïstof via de mengcel van het ene naar het andere reservoir stroomt, wordt daarna ook één toevoerleiding gesloten. (appendix 1, fig. 3a respektievelijk K2 en K1 dicht)

2.4. ESR - metingen.

De ESR-spektra worden opgenomen met een Varian E-15 spektrofotometer. Zowel voor metingen met behulp van het rondpompsysteem als voor rapid-mix- en stop-flow-experimenten, wordt gebruik gemaakt van een speciale ESR-rapid-mix-cel van het type Scanco S 804.

Met behulp van deze vloeistofcel wordt de kwaliteitsfaktor van de trilholte zo min mogelijk gedempt.

In het geval dat de rapid-mix-cel wordt gebruikt in het rondpompsysteem, worden de invoerpijpjes "kortgesloten" met behulp van een verdeelstukje. (appendix 1, fig. 1b 2)

2.4.1. Bepaling van het absolute aantal spins met behulp van ESR-spektroskopie.

Bij het bepalen van relatieve en absolute intensiteiten bij ESR-metingen kunnen grote fouten worden gemaakt. (17, 18)

De grootste foutenbron schuilt in de beïnvloeding van kwaliteitsfaktor en veldlijnenverdeling (E.M.-veld, modulatieveld) van de ESR-trilholte. De beïnvloeding wordt bepaald door het geleidingsvermogen en de diëlektrische konstante van het sample en is van preparaat tot preparaat verschillend.

Om deze moeilijkheden te vermijden is voor de volgende werkwijze gekozen: We gebruiken de Warburgapparatuur met in de rondpomplus de ESR-doorstroomcel. (appendix 1, fig. 1a en fig. 1b 2)

De reaktor wordt gevuld met een oplossing van kopersulfaat, histidine en natriumhydroxide, waarbij de koper- en loogkonsentratie hetzelfde worden genomen als in het katalytisch systeem. Het histidine fungeert als complexerend middel voor de koperionen waardoor wordt voorkomen dat het koper neerslaat als koper-hydroxide.

Van deze referentieoplossing wordt het ESR-spektrum opgenomen bij de geschikt gekozen instelling van het centrale veld, de scanbreedte, de scantijd en de dode tijd, de modulatieamplitude, het cm-golfvermogen en de versterkingsfaktor.

Hierna wordt cysteine aan de oplossing toegevoegd, eveneens in de hoeveelheid die gebruikelijk is voor het katalytisch systeem en wordt de oplossing zodanig geroerd en van zuurstof voorzien dat de oxidatiereactie onbelemmerd verloopt.

Van deze oplossing wordt nu eveneens het ESR-spektrum opgenomen, waarbij alle bovengenoemde variabelen hetzelfde blijven, met uitzondering van de verterkingsfaktor, die zodanig wordt gekozen dat een "bladvullend" spektrum wordt geregistreerd.

Ook de stand van de cel in de trilholte en de stand van de koppelschroef tussen de golfpijp en de trilholte blijft hetzelfde als bij de opname van het referentiespektrum.

Daar het ESR-spektrum de afgeleide is van het absorptiespektrum, dient het ESR-spektrum twee maal geïntegreerd te worden, wil men een maat hebben voor het aantal deeltjes : de dubbele integraal van het spektrum is recht evenredig met het aantal spins.

De integratie van het spektrum wordt uitgevoerd met behulp van een programmeerbare rekenmachine. (Olivetti Programma 101)

Ingevoerd worden hierbij de absis- en funktiewaarde van het spektrum, uitvoer zijn de door de machine berekende waarden van de enkele en dubbele integraal van het spektrum, tot en met het laatst ingevoerde punt. Voor de intervalgrootte op de absis wordt 2 mm genomen bij een totale signaalbreedte van 200 mm.

De juiste keuze van de nullijn kan gecontroleerd worden met behulp van de eindwaarde van de enkele integraal; deze moet namelijk nul opleveren. Bij niet al te grote afwijking van nul van de eindwaarde van de enkele integraal, kan de waarde van de dubbele integraal hiervoor eenvoudig gekorrigeerd worden. (appendix 2)

3. Resultaten

3.1. Kinetische metingen aan de door Cu(++) gekatalyzeerde oxidatie van cysteïne door moleculaire zuurstof.

De kinetische metingen vallen uiteen in:

- a. meting van de zuurstofopname (3.1.1.)
- b. meting van de waterstofperoxidevorming (3.1.2.)

Door het combineren van de resultaten van deze metingen, trachten wij een verklaring te vinden voor de door Kuijpers gerapporteerde konversie van 130% en de orde 1,2 van de zuurstofopnamesnelheid in de koperionen-konsentratie. (vergelijk paragraaf 1.1.)

Wat betreft de totale konversie kunnen we het volgende opmerken: indien disulfide, waterstofperoxide en water de enige reactieproducten zijn, moet op elk moment tijdens de oxidatie gelden:

$$O_2 \text{ (tot op dat moment verbruikt)} = \frac{1}{4} \text{ RSH (tot op dat moment verbruikt)} + \frac{1}{2} H_2O_2 \text{ (tot op dat moment gevormd)} \quad (3.1)$$

Op het einde van de oxidatie moet dus gelden:

$$O_2 \text{ (totaal verbruikt)} = \frac{1}{4} \text{ RSH (oorspronkelijk ingebracht)} + \frac{1}{2} H_2O_2 \text{ (totaal gevormd)} \quad (3.2)$$

3.1.1. Meting van de zuurstofopname tijdens de oxidatie.

In figuur 3.1.1. is voor drie verschillende Cu(++)-konsentraties, de zuurstofopname tijdens de katalytische oxidatie uitgezet als functie van de tijd.

In de zuurstofopnamekurves van figuur 3.1.1. zijn tevens de punten aangegeven, waarop de kleur van het reactiemengsel omslaat van geel naar groen. Cavallini toonde aan dat deze kleuromslag optreedt op het moment dat alle cysteïne is opgebruikt. (9)

In appendix 5.1. zijn de resultaten van de overige zuurstofmetingen weergegeven.

Uitgezet zijn slechts de meetpunten tot de eerste monsternamen voor H₂O₂-bepaling. Deze eerste meetpunten zijn voldoende voor het bepalen van de zuurstofopnamesnelheid.

De waardes van de zuurstofopnamesnelheid zijn in de grafieken aangegeven (appendix 5.1.);

Tevens zijn zij terug te vinden in tabel 3.1.2. (pgf. 3.1.3.).

In appendix 5.2. zijn de zuurstofopnamesnelheden logaritmisch uitgezet tegen de logaritme van de koperionenconcentratie.

Binnen de meetnauwkeurigheid levert dit rechte lijnen op, d.w.z.:

$$\log (dO_2/dt) = k \log Cu(++) + \text{konstante} \quad (3.3)$$

of:

$$dO_2/dt = Cu(++)^k \quad (3.4)$$

In tabel 3.1.1. zijn de waarden van k uit (3.4) weergegeven voor vier verschillende cysteïne-konsentraties.

Tabel 3.1.1. De orde van de zuurstofopnamesnelheid in de koperionenconcentratie voor verschillende cysteïne konsentraties.

[Cysteïne] _o x 10 ² (M)	k
2,175	1,6 <u>±</u> 0,2
4,35	1,4 <u>±</u> 0,2
8,70	1,3 <u>±</u> 0,2
17,4	1,3 <u>±</u> 0,2

[NaOH] = 0,25 N NaOH

3.1.2. Meting van de waterstofperoxidevorming tijdens de oxidatie.

In appendix 6.1. is de vorming van waterstofperoxide uitgezet tegen de tijd. (De grafieken van appendix 6.1. hebben betrekking op dezelfde experimenten als de grafieken van appendix 5.1.)

We zien in alle gevallen een vrij geleidelijke opbouw gevolgd door een scherpe daling.

Cavallini toonde aan dat de plotselinge afbraak van de geaccumuleerde waterstofperoxide wordt veroorzaakt door de Cu(++)-ionen, die vrijkomen als de cysteïne is opgebruikt. (8)

De top van de H₂O₂-kurve valt dus samen met het einde van de oxidatie. We zien dat voor [Cysteïne]_o = 2,175 x 10⁻² M de waterstofperoxideopbouw nagenoeg lineair verloopt. De richtingscoëfficiënten van de curves voor [Cu(++)] = 1 x 10⁻⁴ M en [Cu(++)] = 0,5 x 20⁻⁴ M lijken een faktor vier te verschillen. Om dit te verifiëren is in appendix 6.2. voor beide koperkonsentraties uitgezet [H₂O₂] / ([Cu(++)] x 10⁴)² tegen de tijd.

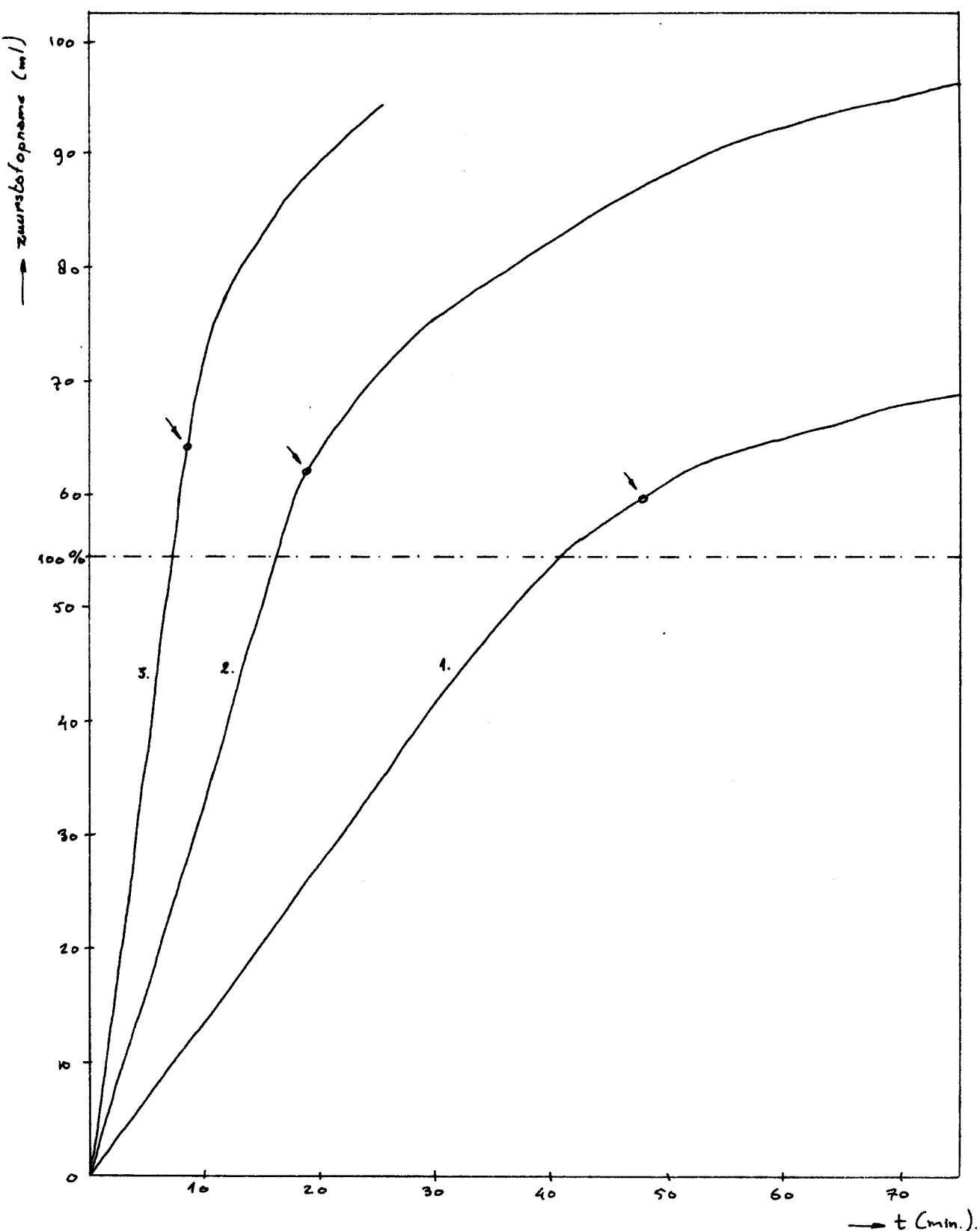


Fig. 3.1.1. Zuurstofopname in de tijd, gedurende de oxidatie van cysteïne. De pijlen duiden op het einde van de oxidatie. (kleuromslag van geel naar groen). De streep-stippelijne geeft de zuurstofopname, waarbij de conversie volgens de stochiometrie van vergelijking (1.1), 100% bedraagt. $[Cysteïne]_0 = 4,35 \times 10^{-2} \text{ M}$
 $[NaOH] = 0,25 \text{ M}$; 1. $[Cu(++)] = 0,5 \times 10^{-4} \text{ M}$;
 2. $[Cu(++)] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; 3. $[Cu(++)] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Hetzelfde is gedaan voor de waterstofperoxideopbouw bij $[Cysteïne]_0 = 4,35 \times 10^{-2}$ M.

Voor $[Cysteïne]_0 = 2,175 \times 10^{-2}$ M blijken de op deze manier genormeerde punten van de waterstofperoxideopbouw goed op één lijn te liggen, dat wil zeggen :

$$\frac{dH_2O_2}{dt} \sim [Cu(++)]^2 \quad (3.5)$$

Voor $[Cysteïne]_0 = 4,35 \times 10^{-2}$ M is vergelijking (3.5) wel van toepassing op $[Cu(++)] = 1 \times 10^{-4}$ M en $[Cu(++)] = 2 \times 10^{-4}$ M ; de waterstofperoxideopbouw behorende bij $[Cu(++)] = 0,5 \times 10^{-4}$ M wijkt daarentegen duidelijk af.

Bij hogere cysteïnekonsentraties wijkt de waterstofperoxideopbouw te veel af van een rechte lijn om rechtstreeks "overall"-opbouwsmnelheden te kunnen vergelijken.

3.1.3. Samenhang tussen de zuurstofopname en de waterstofperoxidevorming.

In appendix 7 is de waterstofperoxide-akkumulatie uitgezet tegen de zuurstofopname.

In deze grafieken zijn ook de lijnen weergegeven:

$$y = 2 \left(O_2 - \frac{1}{4} [RSH]_0 \right) \quad (3.5a)$$

waarbij y de H_2O_2 -equivalenten zijn van de meer dan nominaal verbruikte zuurstof. De nominale hoeveelheid zuurstof is hierbij de hoeveelheid, die volgens (1.1) samenhangt met de beginhoeveelheid cysteïne.

De zuurstofopname en de waterstofperoxidevorming op het einde van de reactie hangen samen volgens vergelijking (3.2), indien de top van de experimentele H_2O_2 -kurve op de lijn (3.5a) ligt.

De experimenteel gevonden waarden voor de totale zuurstofopname en de totale waterstofperoxideopbouw, korresponderend met de top van de waterstofperoxidekurve (app.6.1), zijn opgenomen in tabel 3.1.2..

Tabel 3.1.2. geeft tevens de op basis van vergelijking (3.2) te verwachten totale zuurstofopname aan, bij gegeven cysteïne-beginkonsentratie en gegeven hoeveelheid H_2O_2 op het einde van de reactie. (kolom F)

A	B	C	D	E	F	G
$[\text{Cysteïne}]_0 \times 10^3$ (M)	$[\text{Cu}(++)] \times 10^4$ (M)	$d\text{O}_2/dt \times 10^6$ (Ms^{-1})	$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{e.o.}} \times 10^3$ (M)	$[\text{O}_2]_{\text{e.o.}} \times 10^3$ (M)	$\frac{1}{4}(\text{A}) + \frac{1}{2}(\text{D})$ (M)	$\frac{1}{4}\text{A}$ (M)
21,75	0,5	4,0	2,45	6,3	6,7	5,44
21,75	1,0	9,7	3,65	7,2	7,3	5,44
43,5	0,5	3,3	2,0	11,4	11,9	10,88
43,5	0,5	3,0	2,0	11,2	11,9	10,88
43,5	0,5	4,7				10,88
43,5	1,0	11,0	3,4	13,2	12,6	10,88
43,5	1,0	11,7				10,88
43,5	2,0	25,0	5,3	13,5	13,5	10,88
43,5	2,0	28,9	4,9	13,2	13,3	10,88
43,5	2,0	24,7				10,88
87,0	1,0	11,2	2,95	23,1	23,3	21,75
87,0	2,0	29,0	4,35	23,9	23,9	21,75
87,0	4,0	63,5	6,5	24,8	25,0	21,75
174	2,0	30,2	3,45	44,9	44,2	43,5
174	4,0	74,4	4,9	45,7	46,0	43,5

Tabel 3.1.2. De totale opgenomen hoeveelheid zuurstof (E) en de totaal gevormde hoeveelheid waterstofperoxide (D) op de top van de waterstofperoxidekurves voor verschillende Cu(++)- en cysteïnekonzentraties. $[\text{NaOH}] = 0,25 \text{ N NaOH}$. (e.o. = einde oxidatie)

Kolom F geeft de te verwachten zuurstofopname op basis van vergelijking (3.2).

In kolom C zijn de zuurstofopnamesnelheden gegeven.

3.2. Oxidatieproeven met H_2O_2 als oxidator.

Om het gedrag van de door $Cu(++)$ gekatalyseerde oxidatie van cysteïne onder invloed van H_2O_2 nader te onderzoeken, worden een aantal kuvetproeven uitgevoerd. (vergelijk paragraaf 2.2.3.)

Hierbij wordt het reatieverloop gevolgd aan de hand van het verloop van de hoeveelheid cysteïne. De hoeveelheid cysteïne wordt spektrofotometrisch bepaald.

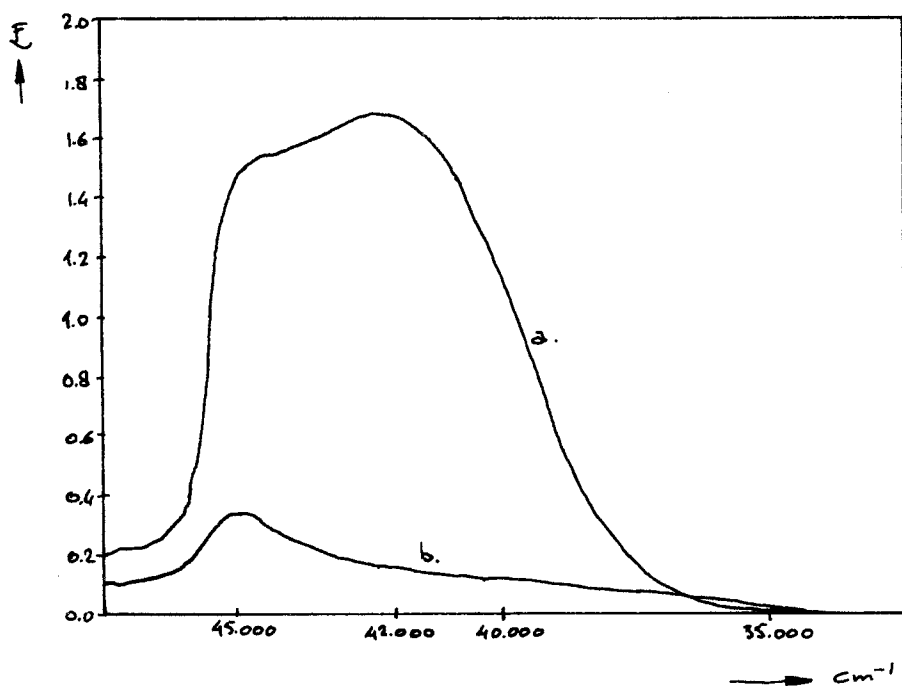


Fig. 3.2.1. a. UV-spektrum van cysteïne
[Cysteïne] = 2×10^{-4} M ; [NaOH] = 0,25 M
Ref.: 0,25 N NaOH, Optische weglengte 20 mm.
b. UV-spektrum van cysteïne, na volledige oxidatie
(cystine).

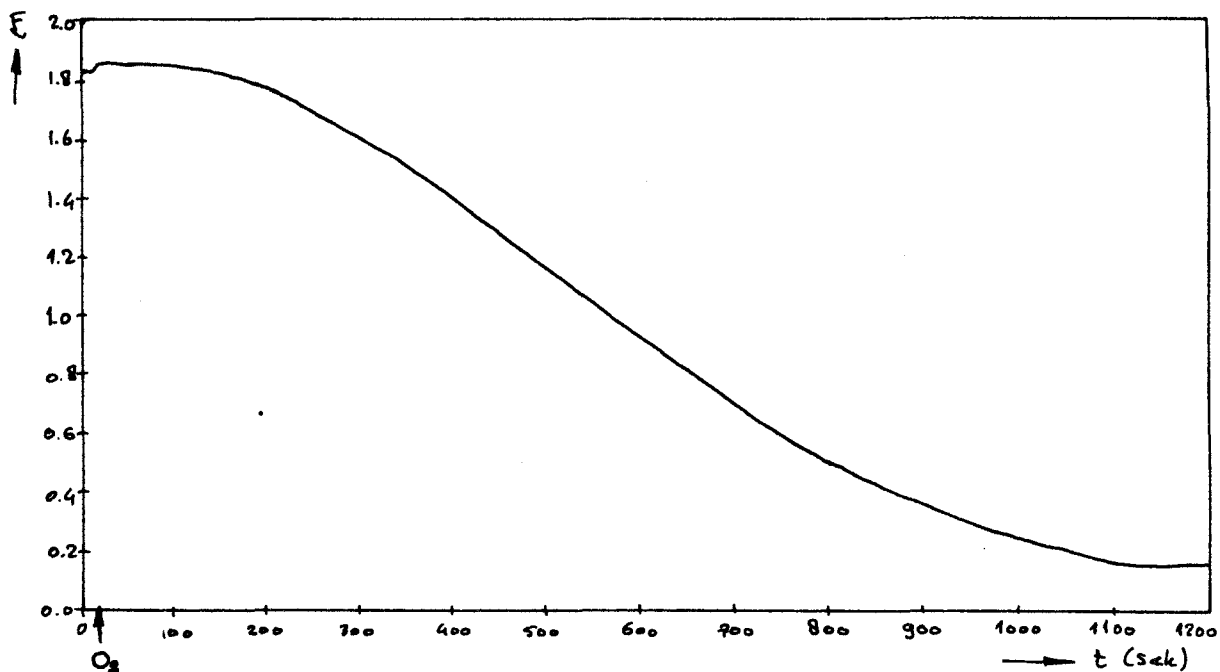


Fig. 3.2.2. Het verloop van de extinktie bij 42.000 cm^{-1} , tijdens de oxidatie van cysteïne onder invloed van O_2 .
 $[\text{Cysteïne}]_0 = 2 \times 10^{-4}\text{ M}$; $[\text{NaOH}] = 0,25\text{ M}$
 $[\text{Cu}(++)] = 2 \times 10^{-6}\text{ M}$
 (Ref. 0,25 N NaOH, Optische weglengte = 20 mm)

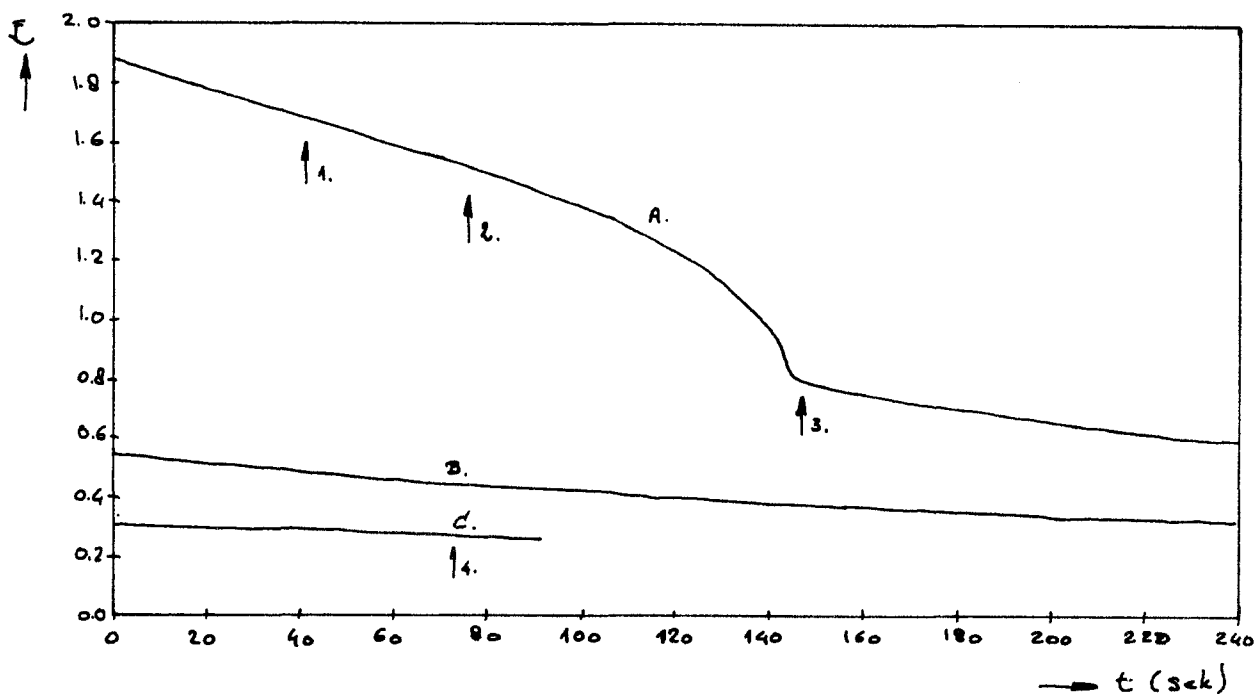


Fig. 3.2.3. Het verloop van de extinktie 42.000 cm^{-1} , tijdens de oxidatie van cysteïne onder invloed van H_2O_2
 $[\text{Cysteïne}]_0 = 8 \times 10^{-4}\text{ M}$; $[\text{NaOH}] = 0,25\text{ M}$
 $[\text{Cu}(++)] = 12 \times 10^{-6}\text{ M}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-3}\text{ M}$
 (Ref. 0,25 N NaOH ; Optische weglengte = 5 mm)
 De genummerde pijlen duiden op H_2O_2 -bepalingen.
 Scan A, B en C zijn direkt na elkaar opgenomen.

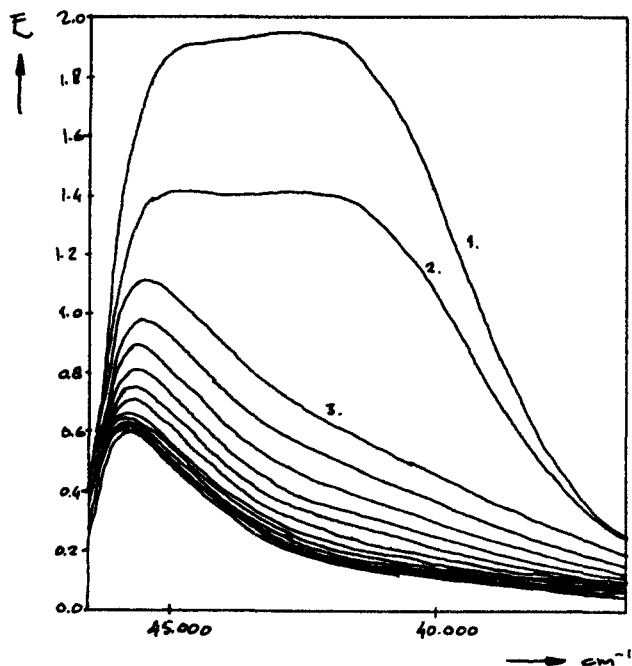


Fig. 3.2.4. "Repeated-scan" van de oxidatie van cysteïne onder invloed van H_2O_2 (1,5 scan per minuut)
 $[Cysteïne]_0 = 8 \times 10^{-4} M$; $[NaOH] = 0,25 M$
 $[Cu(++)] = 12 \times 10^{-6} M$; $[H_2O_2]_0 = 4,4 \times 10^{-3} M$
 (Ref.: 0,25 N NaOH ; Optische weglengte = 5 mm)

Fig. 3.2.2. geeft het verloop van de extinktie bij 42.000 cm^{-1} tijdens de door $Cu(++)$ -ionen gekatalyseerde oxidatie van cysteïne onder invloed van zuurstof.

Wordt H_2O_2 gebruikt als oxidator in plaats van O_2 dan verloopt de extinktie bij 42.000 cm^{-1} zoals weergegeven in fig. 3.2.3.; fig.3.2.4. geeft de veranderingen van het spectrum gedurende deze oxidatie.

In fig. 3.2.4. is scan 3 precies het absorptiespectrum van H_2O_2 .

Het ligt daarom voor de hand om te veronderstellen dat in fig. 3.2.2. de daling vóór de knik (†3) veroorzaakt wordt door de afname van de cysteïne-koncentratie en dat het stuk na de knik het verloop van de absorptie bij 42.000 cm^{-1} van de H_2O_2 -piek is.

Om deze veronderstelling te toetsen wordt op verschillende tijdstippen tijdens de oxidatie met behulp van Titaanreagens de hoeveelheid H_2O_2 bepaald, die nog in de kuvet aanwezig is. De tijdstippen zijn aangegeven in fig. 3.2.3.

Het blijkt dat de hoeveelheid waterstofperoxide tussen 1 en 2 en tussen 2 en 3 ongeveer met 2 tot 3% daalt.

Bij 4 is nog slechts 30% van de oorspronkelijke hoeveelheid H_2O_2 aanwezig.

Kennelijk is de H_2O_2 dus stabiel zolang het $Cu(++)$ gekomplexeerd is en en kan zij alleen wegreageren met cysteïne. (in onze experimenten is + 10% van de toegevoegde hoeveelheid H_2O_2 nodig voor volledige oxidatie van de cysteïne). Na afloop van de reactie komt $Cu(++)$ vrij en katalyseert de ontleding van H_2O_2 .^x

Als maat voor de reaktiesnelheid van de oxidatiereactie onder invloed van H_2O_2 hebben wij de helling van het eerste stuk van de afvalkurve (fig. 3.2.3.) genomen.

Figuur 3.2.5. geeft de invloed van verschillende koperionenconcentraties op de reaktiesnelheid, fig. 3.2.6. de invloed van de verschillende hoeveelheden H_2O_2 .

We zien dat bij voldoende hoge concentraties de cysteïne-verdwijnsnelheid eerste orde is, zowel in de koperionenconcentratie als in de waterstofperoxide-concentratie.

x noot : De ontledingssnelheid blijkt toe te nemen bij toenemende koperionenconcentratie. Dit verschijnsel is niet nader onderzocht.

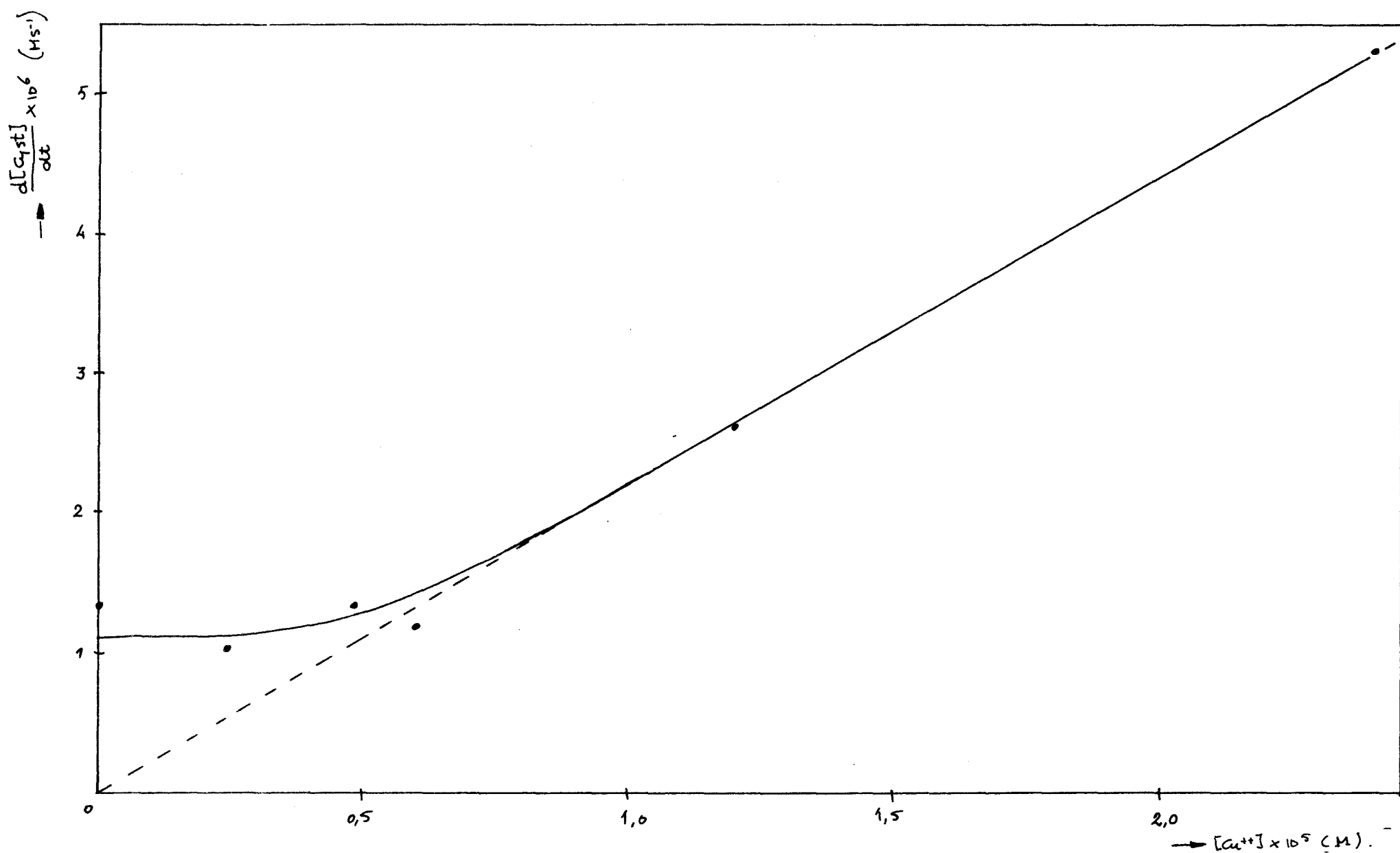


Fig. 3.2.5. De invloed van Cu^{++} op de oxidatiesnelheid van cysteïne. $[\text{Cyst}]_0 = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$;
 $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 4,5 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{NaOH}] = 0,25 \text{ M}$.

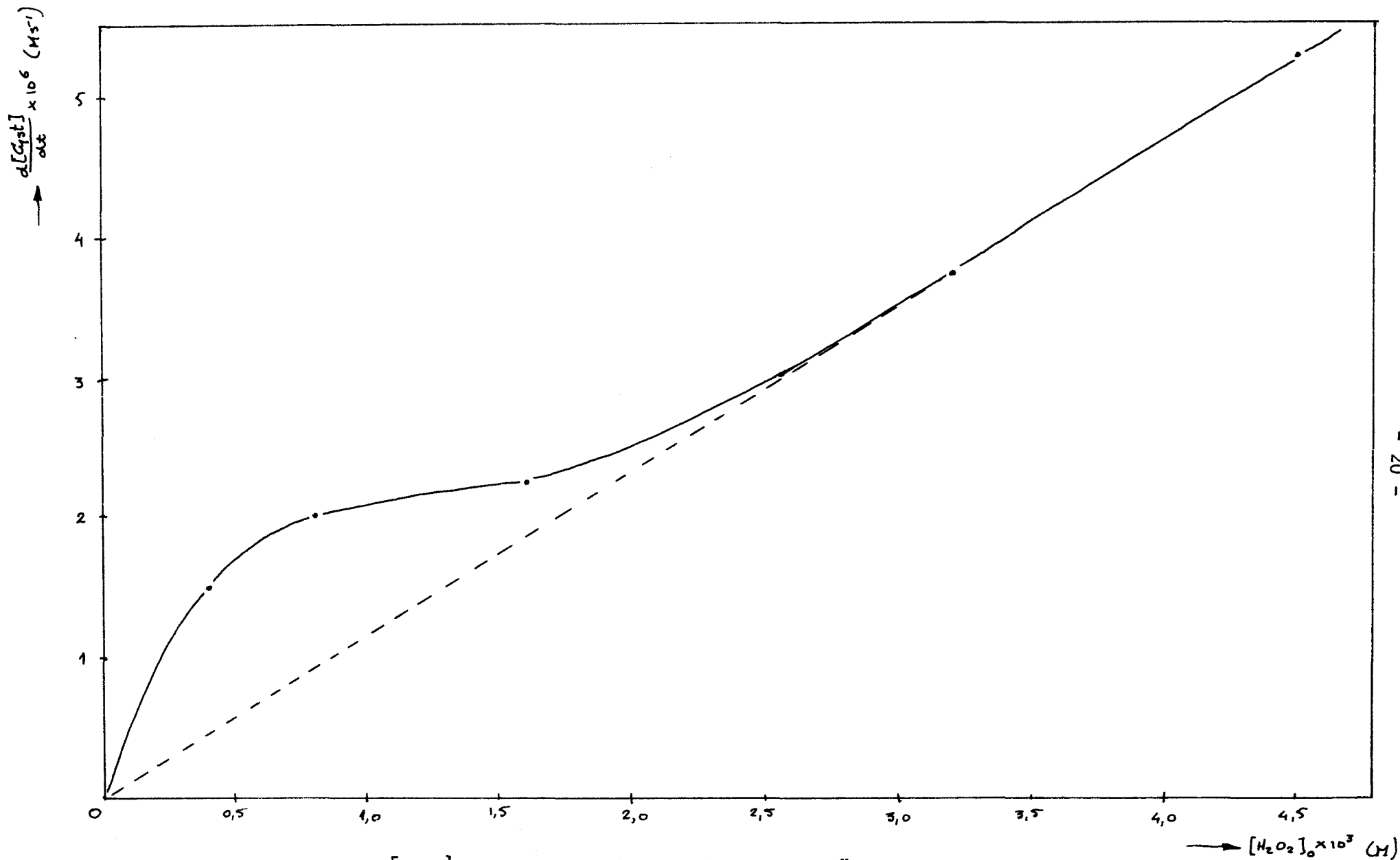


Fig.3.2.6. De invloed van $[H_2O_2]_0$ op de oxidatiesnelheid van cysteïne
 $[Cysteïne]_0 = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[Cu(++)] = 2,4 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaOH] = 0,25 \text{ M}$.

3.3. UV/VIS - spektroskopie.

Cavallini toonde aan dat tijdens de oxidatie van cysteïne, de katalytisch actieve vorm van Cu(++) bestaat uit een Cu(++)-dicysteïne-komplex.

Dit complex vertoont een absorptiepiek bij 330 nm in het UV-spektrum. (de reaktievloeistof is geel)

Onder normale condities is dit signaal stabiel; wordt echter de zuurstof aan het systeem onttrokken, dan verdwijnt het complex.

De kleur van het reaktiemengsel verandert hierbij van geel naar blank. Deze zogenaamde anaerobe verbleking wordt veroorzaakt door de reductie van Cu(++) naar Cu(+) onder invloed van cysteïne.

Het signaal verdwijnt eveneens op het einde van de reactie, als alle cysteïne is opgebruikt. Hierbij komen de koperionen kwantitatief vrij als Cu(+). (9)

Met het doel een nauwkeurig beeld te krijgen van het gedrag van het koperdicysteïne-komplex zijn enige experimenten van Cavallini overgedaan. Hierbij hebben wij onze aandacht speciaal gericht op de kwantitatieve aspecten van de vormings- en verdwijnsnelheid van het complex en op de valentietoestand van de tijdens de oxidatie aanwezige koperionen.

3.3.1. Rondpompsysteem.

In fig. 3.3.1. zijn de UV/VIS-absorptiespektra weergegeven, die met behulp van het rondpompsysteem (appendix I ; fig. 1a, fig. 1b, 1) zijn opgenomen, respectievelijk tijdens de steady state^x en na afloop van de door koper gekatalyseerde oxidatie van cysteïne.

x Steady state oxidatiereactie : $\frac{dO_2}{dt} = \text{konstant}$ (zie fig. 3.1.1.)

Tabel 3.3.1. De extinktie van de 330 nm piek in drie afzonderlijke rondpomp-oxidatie-experimenten. (10 mm kwartskuvet)
 $[\text{NaOH}] = 0,25 \text{ M}$

$[\text{Cu}(++)] \times 10^4 \text{ (M)}$	$[\text{Cysteine}]_0 \times 10^3 \text{ (M)}$	E (330nm)
1,85	14,4	1,22
1,85	14,4	1,15
1,85	14,4	1,26

In tabel 3.3.1. zijn de extinktief bij 330 nm weergegeven voor drie afzonderlijke rondpomp-oxidatie-experimenten.

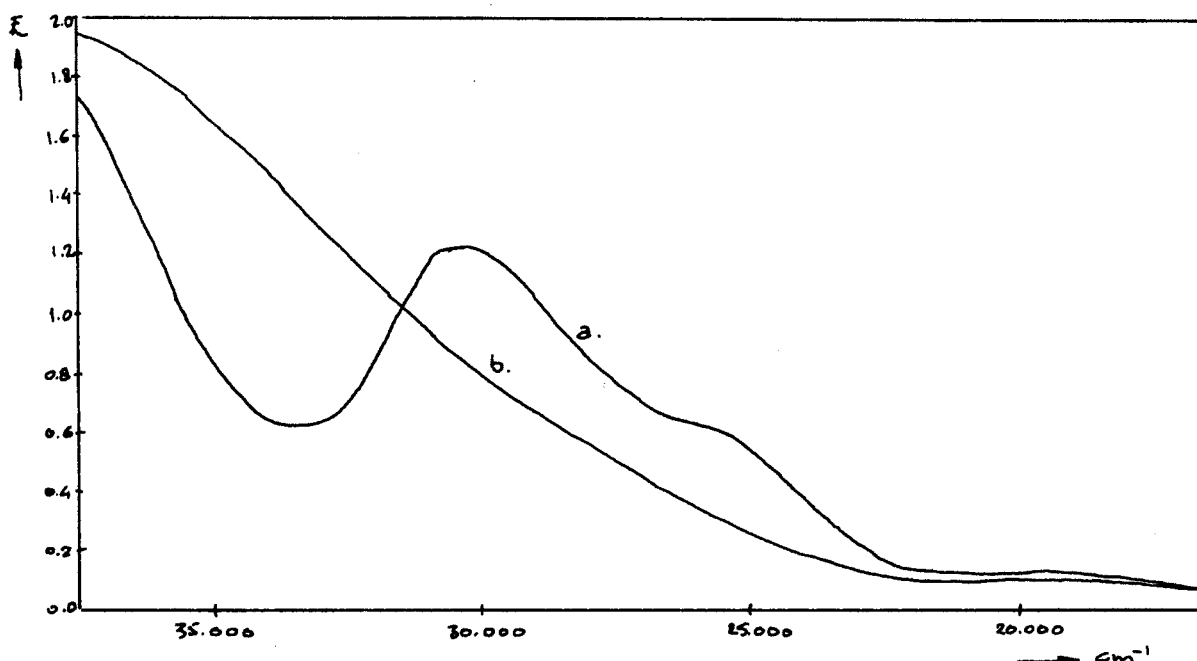


Fig. 3.3.1. UV/VIS-absorptiespektra.

a. Tijdens de steady state;

b. Na volledige oxidatie.

$[\text{Cu}(++)] = 1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Cysteine}]_0 = 14,4 \times 10^{-3} \text{ M}$;
 $[\text{NaOH}] = 0,25 \text{ M}$

Het op het einde van de oxidatie gevormde $\text{Cu}(+)$ kan spektrofotmetrisch worden aangetoond met behulp van de complexerende stof neocuproïne: het $\text{Cu}(+)$ -neocuproïnecomplex heeft een absorptiepiek bij 450 nm.

In fig. 3.3.2. is het UV/VIS-spektrum van $\text{Cu}(+)$ -neocuproïne weergegeven zoals dat ontstaat op het einde van de oxidatie, indien het reactiemengsel neocuproïne bevat.

Daar cysteïne in basisch milieu een sterker complexerend middel is voor Cu(+) dan neocuproïne, is het niet mogelijk om met behulp van neocuproïne na te gaan of er tijdens de oxidatie Cu(+) aanwezig is. (9)

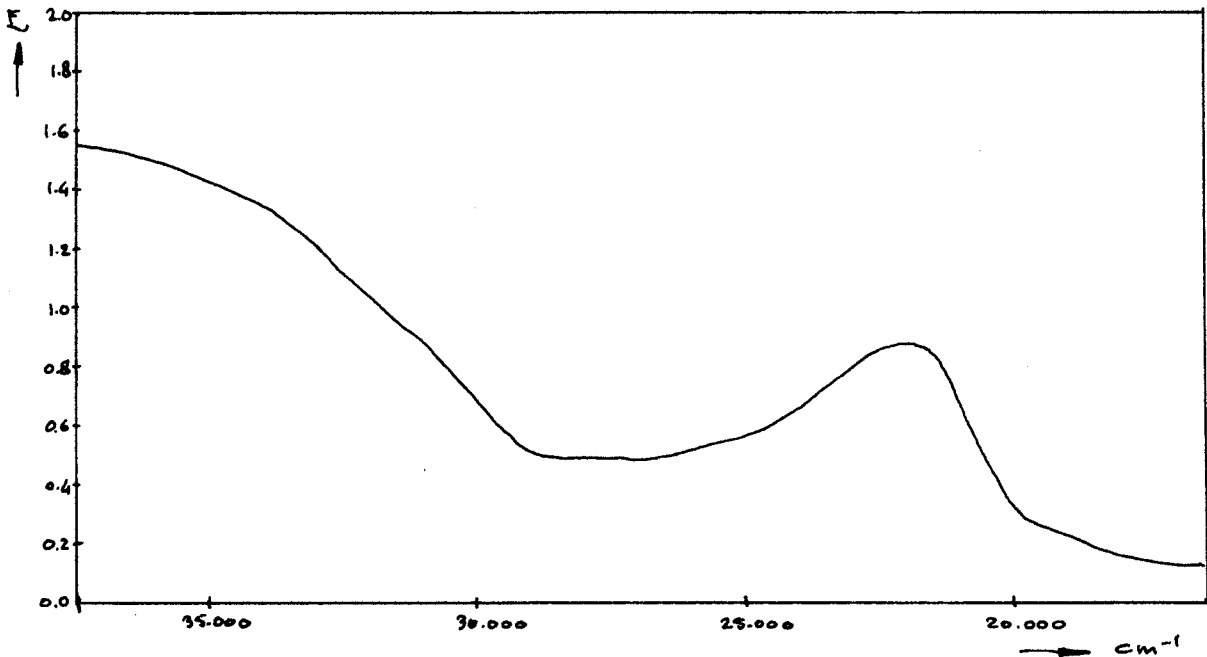


Fig. 3.3.2. Het absorptiespektrum van Cu(+)-neocuproïne na afloop van de oxidatiereactie. $[Cu^{++}]_0 = 1,85 \times 10^{-4}$; $[Cysteïne]_0 = 14,4 \times 10^{-3}$ M ; $[NaOH]_0 = 0,25$ M ; $[Neocuproïne] = 5 \times 10^{-4}$ M.

3.2.2. Kuvetproeven.

De verdwijnsnelheid van het Cu(++)-dicysteïne-sigitaal wordt spektrofotometrisch bepaald aan de hand van het verloop van de intensiteit van de 330 nm piek.

Het resultaat van zo'n fixed- λ - scan op 330 nm tijdens de oxidatie is weergegeven in fig. 3.3.3.. De reactie is uitgevoerd in een 10 mm kwartskuvet. (vergelijk paragraaf 2.3.2.)

Op analoge wijze is ook de vormingssnelheid van de 450 nm piek van het Cu(+)-neocuproïne-spektrum behaald : Fig. 3.3.4..

We zien uit de fixed- λ -scans dat op het einde van de oxidatie het Cu(++)-dicysteïne-sigitaal in twee à drie seconden verdwijnt, en dat in ca. 20 seconden het Cu(+)-neocuproïne-spektrum verschijnt.

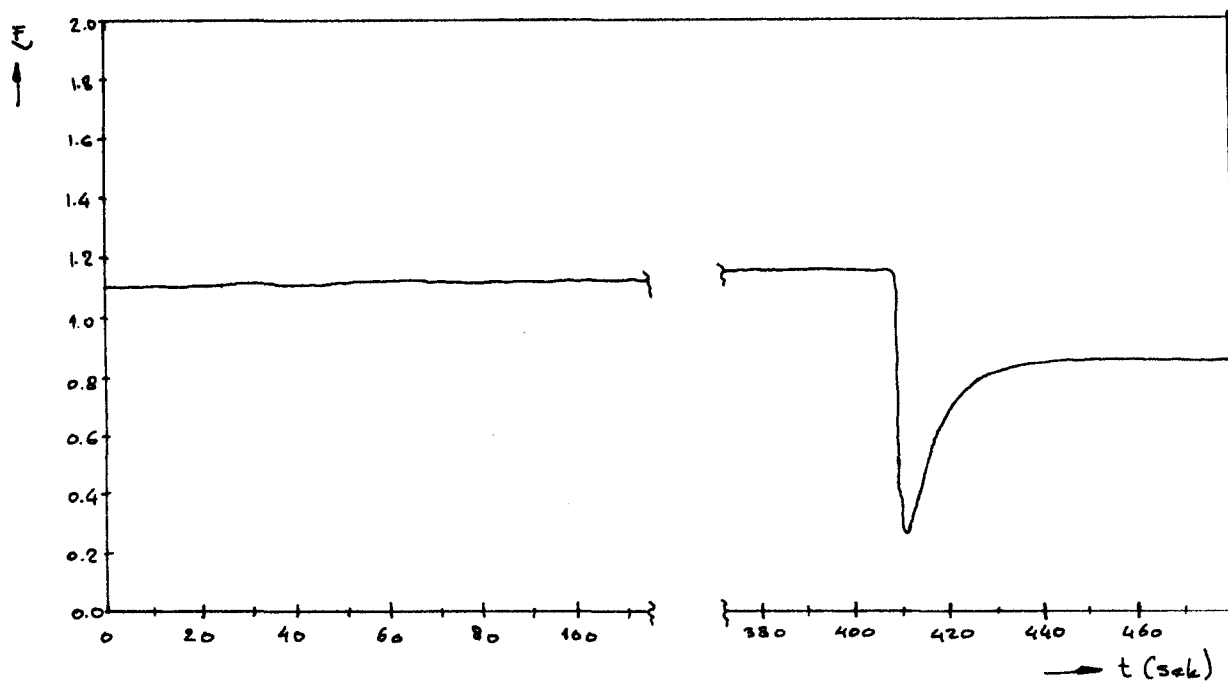


Fig. 3.3.3. Intensiteitsverloop van de absorptiepiek van Cu(++)-dicysteïne gedurende de oxidatie.
 $[Cu(++)]_0 = 1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[Cysteïne]_0 = 14,4 \times 10^{-4} \text{ M}$
 $[NaOH] = 0,25 \text{ M}$.

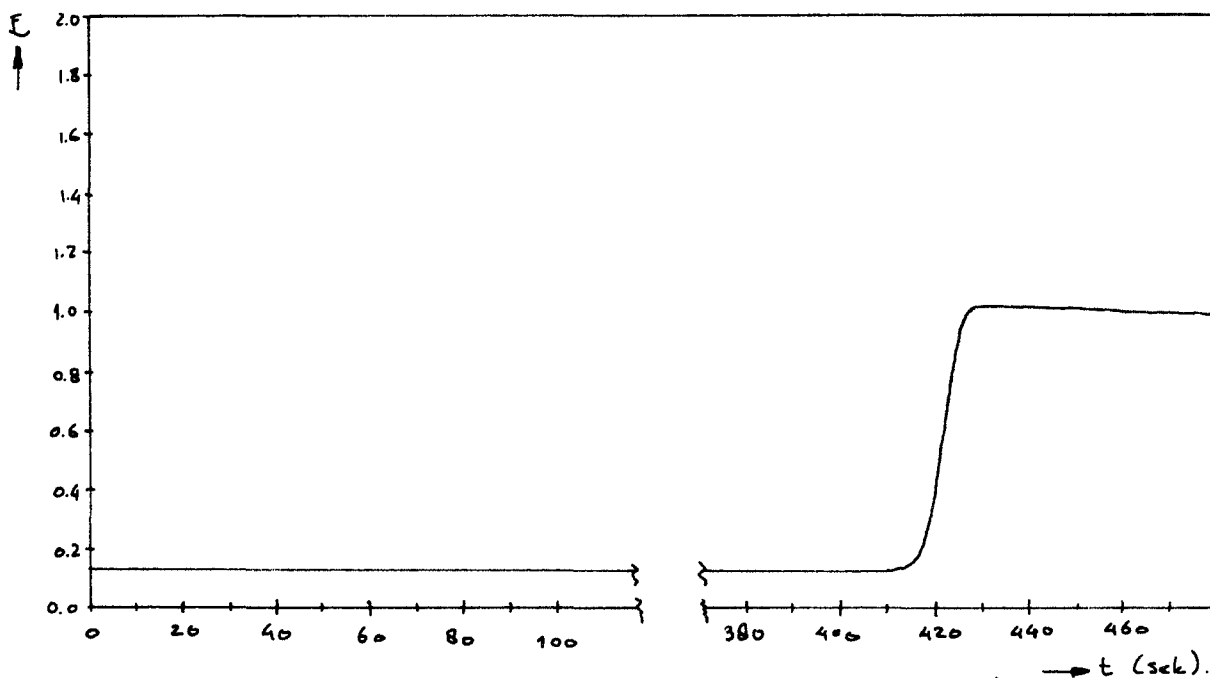


Fig. 3.3.4. Intensiteitsverloop van de absorptiepiek van Cu(+)-neocuproïne gedurende de oxidatie.
 $[Cu(++)]_0 = 1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[Cysteïne]_0 = 14,4 \times 10^{-3} \text{ M}$
 $[NaOH] = 0,25 \text{ M}$; $[Neocuproïne] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Tabel 3.3.2. De extinktie van de 330 nm piek in vier afzonderlijke kuvet-oxidatieproeven. (10 mm Kwartskuvet) $[\text{NaOH}] = 0,25 \text{ M}$

$[\text{Cu}(++)] \times 10^4 \text{ (M)}$	$[\text{Cysteïne}]_0 \times 10^3 \text{ (M)}$	E (330 nm)
1,85	14,4	1,10
1,85	14,4	1,22
1,85	14,4	1,17
1,85	14,4	1,16

In tabel 3.3.2. is de extinktie van de 330 nm piek weergegeven voor vier afzonderlijke kuvet-oxidatieproeven.

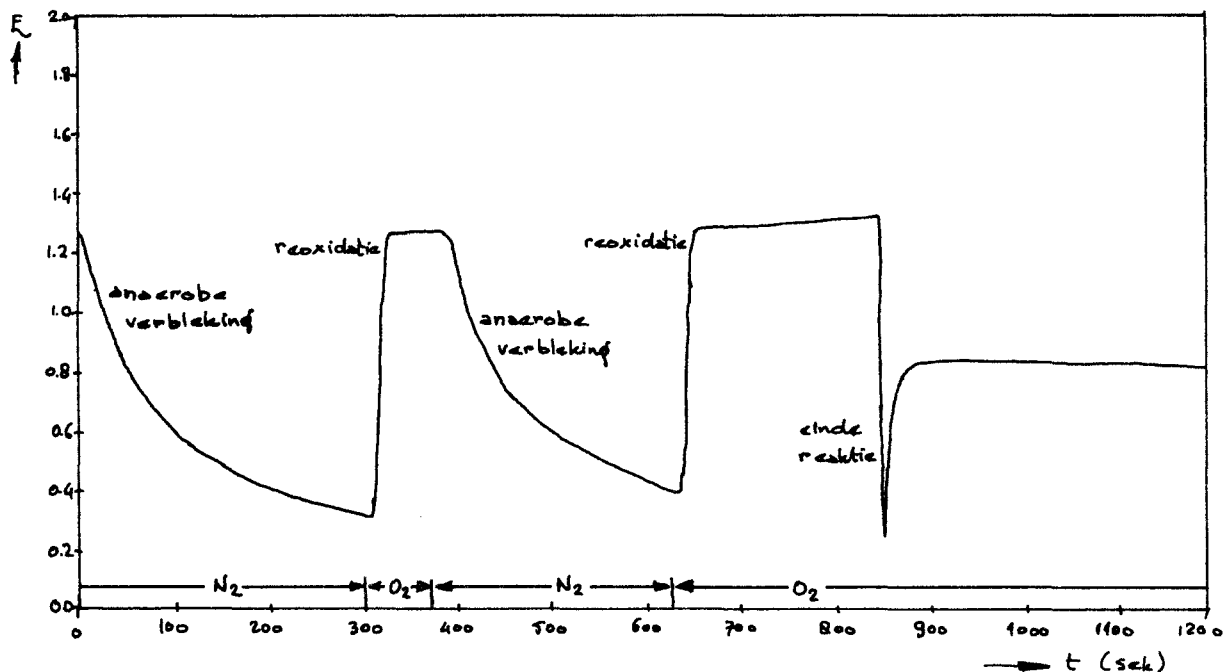


Fig. 3.3.5. Anaerobe verbleking en reoxidatie van het $\text{Cu}(++)$ -dicysteïne-komplex. $[\text{Cu}(++)]_0 = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$
 $[\text{Cysteïne}]_0 = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{NaOH}] = 0,25 \text{ M}$
 Op $t = 0$ wordt de koperoplossing toegevoegd aan de cysteïne-oplossing.

Met behulp van het intensiteitsverloop van de 330-nm-piek is ook de anaerobe verbleking bestudeerd. Het resultaat is in fig. 3.3.3. weergegeven. Bij het anaeroob toevoegen van een kopersulfaatoplossing aan een cysteïne-oplossing ontstaat momentaan het spektrum van $\text{Cu}(++)$ -dicysteïne: de 330-nm-piek bereikt een extinktie van ca. 1.3. (fig. 3.3.5.) Deze extinktie daalt direkt.

Wordt nu zuurstof door de oplossing geleid, dan komt de intensiteit direkt terug op zijn beginwaarde en behoudt die zolang zuurstof wordt doorgeleid. (mits nog niet alle cysteïne is geoxideerd)

Wordt de zuurstofstroom vervolgens weer vervangen door stikstof, dan daalt de intensiteit weer op identieke wijze als na anaeroob mengen. De scherpe daling, enige tijd nadat weer zuurstof is doorgeleid, duidt op het einde van de oxidatie : alle cysteïne is opgebruikt.

(cf. fig. 3.3.3.)

3.3.3. Rapid - mix - experimenten.

Rapid-mix-experimenten zijn uitgevoerd met het doel een indruk te krijgen van de vormingsnelheid van het Cu(++)-dicysteïne-komplex.

Het UV/VIS-spektrum, dat ontstaat bij het mengen van een kopersulfaatstroom en een cysteïne-stroom, is qua vorm identiek aan het spektrum van fig. 3.3.1..

De intensiteit van het spektrum is afhankelijk van de stroomsnelheid van de mengstroom.

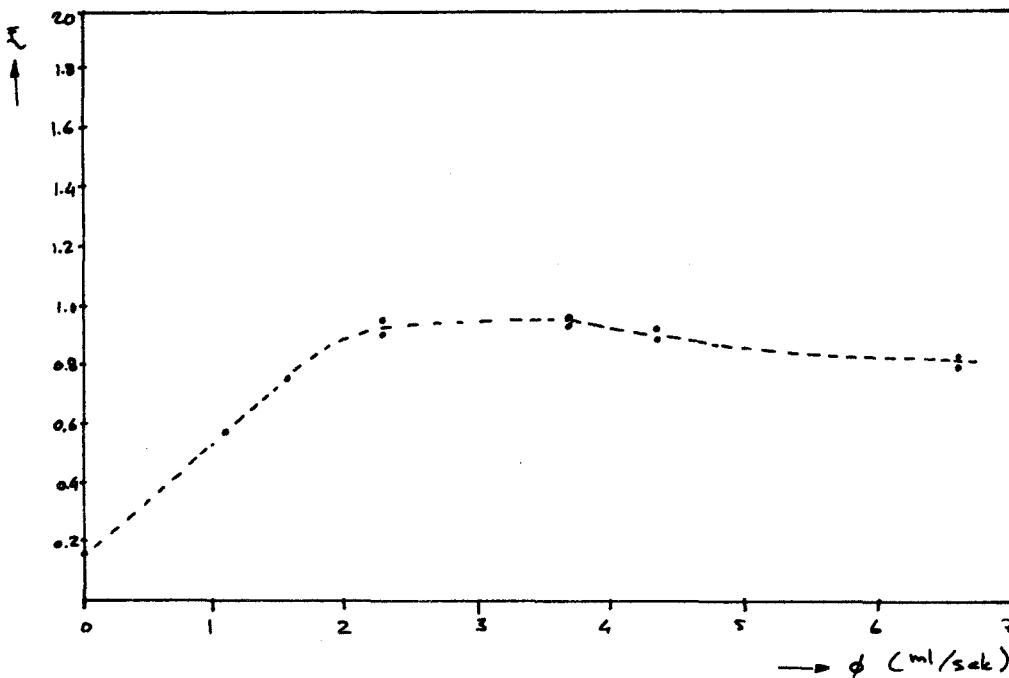


Fig. 3.3.6. Invloed van de stroomsnelheid op de intensiteit van de 330 nm piek. $[Cu(++)]_0 = 1 \times 10^{-2} M$; $[Cysteïne]_0 = 1.975 M$; $[NaOH] = 0,25 M$; Zuurstofvrije oplossingen.

In fig. 3.3.6. is de intensiteit van de 330 nm piek uitgezet tegen de stroomsnelheid van de gemengde vloeistofstroom.

We zien dat bij stroomsnelheden tussen 2 en 4 ml/sek de intensiteit maximaal en nagenoeg konstant is.

De daling van de intensiteit bij $\phi < 2$ ml/sek wordt veroorzaakt door de anaerobe verbleking: bij deze stroomsnelheden zijn de optredende dode tijden al zō lang, dat het complex gedeeltelijk is weggereageerd, vōōr het wordt gemeten.

De daling bij stroomsnelheden groter dan 4 ml/sek moet worden toegeschreven aan het nog niet volledig gevormd zijn van het complex.

Het heeft op de vorm van het spektrum geen invloed of met zuurstofvrije of met zuurstofverzadigde oplossingen wordt gewerkt.

3.3.4. Stop - flow - experimenten.

Om de anaerobe verbleking nader te onderzoeken zijn stop-flow-experimenten uitgevoerd. Deze experimenten hebben ten opzichte van kuvetproeven het voordeel dat de UV/VIS-extinktie bij anaeroob mengen, en dus op $t = 0$ veel beter vast ligt. (vergelijk fig. 3.3.7.)

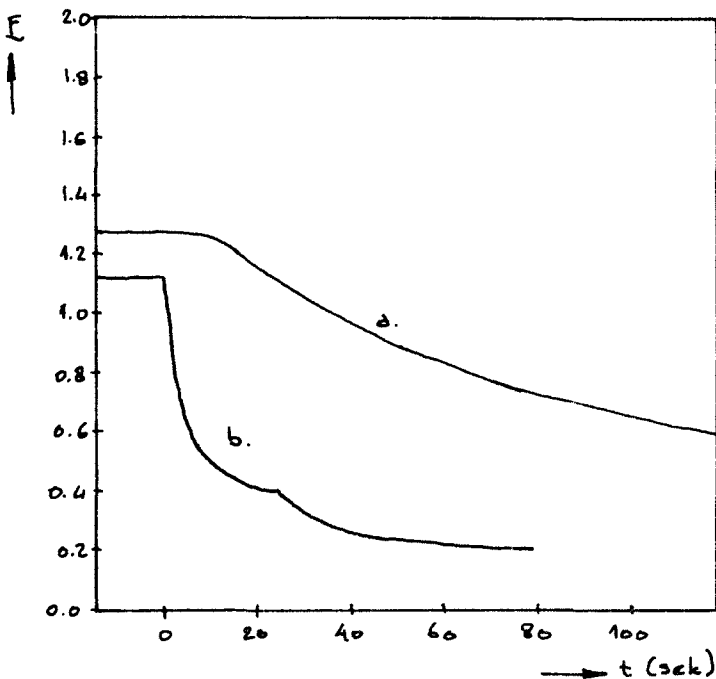


Fig. 3.3.7. Anaerobe verbleking van $\text{Cu(II)(RS}^-\text{)}_2$. "Stop flow" op $t = 0$.

$[\text{NaOH}] = 0,25 \text{ M}$;

a. $[\text{Cu(++)}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Cysteïne}] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$
(10 mm kwarts-kuvet)

b. $[\text{Cu(++)}] = 8 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{Cysteïne}] = 2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ (~~0,4 mm~~
(0,4 mm mix-cel)

De gebruikte oplossingen zijn van te voren ontzuurstoft.

In fig. 3.3.7. is voor twee stop-flow-experimenten het verloop van de intensiteit van de 330 nm piek gegeven. Het tijdstip $t = 0$ correspondeert met het stoppen van de mengstroom.^x

De snelheid van de vloeistofstromen wordt vóór stop-flow steeds zó ingesteld dat de resulterende extinktie zo hoog mogelijk is.

Dit levert stroomsnelheden die liggen tussen 2,5 en 4 ml/sek.

(cf. fig. 3.3.6.) De gebruikte oplossingen zijn van te voren ontzuurstoft.

Tabel 3.3.3. De extinktie van de 330 nm piek in afzonderlijke stop-flow-experimenten vóór "stop-flow".

Optische weglengte 10 mm. $[\text{NaOH}] = 0,25 \text{ M}$

$[\text{Cu}(++)] \times 10^4 \text{ (M)}$	$[\text{Cysteïne}]_0 \times 10^4 \text{ (M)}$	E (330 nm)
2	50	1,28
2	20	1,34
2	20	1,28
2	20	1,30
2	10	1,38
2	10	1,36
2	6	1,36
2	6	1,32

In tabel 3.3.3. is voor acht afzonderlijke stop-flow-experimenten de extinktie van de 330 nm piek vóór "stop-flow" gegeven.

De onnauwkeurigheid wordt hier voornamelijk bepaald door de onnauwkeurigheid in de stofkonsentratie ná mengen, die maximaal 10% bedraagt. (vergelijk paragraaf 2.3.3.)

In alle gevallen is een 10 mm kwarts-kuvet gebruikt als meetcel.

(appendix 1, fig 1b,1)

^x noot : De knik bij $t = 25$ sek. in kurve b, treedt alleen op bij cysteïne/(Cu(++)-verhouding van ca. 3 of kleiner.

Aan dit verschijnsel is verder geen aandacht besteed.

Uitzetten van $1/E$ tegen de tijd blijkt voor het eerste stuk van de anaerobe verblekingskurves een rechte lijn op te leveren. (appendix 4)
Dit betekent dat de verdwijningssnelheid van het complex tweede orde is in de complexkonsentratie: (appendix 3)

$$-\frac{d [\text{Cu(II)(RS}^-)_2]}{dt} = k [\text{Cu(II)(RS}^-)_2]^2 \quad (3.6)$$

In vergelijking (3.6) is k :

$$k = (t_{\frac{1}{2}} \cdot [\text{Cu(II)(RS}^-)_2]_{t=0})^{-1} \quad (3.7)$$

waarin $t_{\frac{1}{2}}$ is gedefinieerd als het tijdstip waarop geldt :

$$[\text{Cu(II)(RS}^-)_2]_{t=t_{\frac{1}{2}}} = \frac{1}{2} [\text{Cu(II)(RS}^-)_2]_{t=0} \quad (3.8)$$

De grootte van $t_{\frac{1}{2}}$ kan bepaald worden uit de grafiek van $1/E$ tegen t .
(appendix 4)

De waarde van $[\text{Cu(II)(RS}^-)_2]_{t=0}$ kan bepaald worden uit de extinktie op $t=0$ als de molaire extinktiecoëfficiënt van Cu(++) -dicysteïne bekend is.

Voor het bepalen van de molaire extinktiecoëfficiënt maken wij gebruik van het resultaat van de kwantitatieve ESR-metingen aan het Cu(++) -dicysteïnecomplex (paragraaf 3.4.1.) en van de tabellen 3.3.1., 3.3.2. en 3.3.3..

Uit de ESR-metingen blijkt dat tijdens de steady state van de oxidatie alle koperionen gekomplexeerd zijn als Cu(++) -dicysteïne. (binnen de meetnauwkeurigheid van 2%)

Tijdens de steady state van de oxidatiereactie geldt dus:

$$[\text{Cu(II)(RS}^-)_2]_{ss} = [\text{Cu(++)}]_0 \quad (3.9)$$

waarin $[\text{Cu(++)}]_0$ de totale koperionenkonsentratie is.

De in de tabellen 3.3.1. en 3.3.2. gegeven extinktiefactoren behoren dus bij een Cu(++) -dicysteïne-konsentratie van $1,85 \times 10^{-4}$ M.

De gemiddelde waarde van de extinktiefactoren uit tabel 3.3.1. en 3.3.2. bedraagt:

$$E_{\text{gem.}} = 1,2 \pm 0,1 \quad (3.10)$$

In de stop-flow-experimenten bedraagt de gemiddelde extinktie bij $[\text{Cu}(++)]_0 = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$:

$$E_{\text{gem.}} = 1,3 \pm 0,1 \quad (3.11)$$

Uit (3.10) en (3.11) volgt dezelfde molaire extinktiecoëfficiënt :

$$E_M = (0,65 \pm 0,05) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (3.12)$$

dat wil zeggen dat ook in de stop-flow-experimenten op $t = 0$ geldt:

$$[\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2]_{t=0} = [\text{Cu}(++)]_0 \quad (3.13)$$

Tabel 3.3.4. Snelheidskonstanten van de anaerobe verbleking.

De onnauwkeurigheid in k bedraagt 10%.

$[\text{Cu}(++)]_0$ $\times 10^4 \text{ (M)}$	$[\text{Cysteïne}]_0$ $\times 10^4 \text{ (M)}$	$\frac{[\text{Cysteïne}]_0}{[\text{Cu}(++)]_0}$	k $(\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$
2	50	25	68
2	20	10	63
2	10	5	104
2	6	3	435
1	100	100	62
1	10	10	65

In tabel 3.3.4. zijn van een aantal experimenten de met behulp van (3.7) berekende waarden van k weergegeven.

In de experimenten waarin $[\text{Cu}(++)]_0 = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$, is gebruik gemaakt van 10 mm kwartskuvetten; in de experimenten met $[\text{Cu}(++)]_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ zijn 20 mm kwartskuvetten gebruikt.

De gevonden waarden voor k zijn kwalitatief in overeenstemming met de resultaten van Cavllini, die ook een toenemende k vond voor $[\text{Cysteïne}] : [\text{Cu}(++)]$ kleiner of gelijk 5. (9)

Tweede orde anaerobe verbleking werd ook gesignaleerd bij $\text{Fe}(+++)$ -cysteïnekomplexen. (13)

3.4. E.S.R.-metingen.

3.4.1. Bepaling van het absolute aantal spins.

Om te achterhalen welk percentage van de aanwezige koperionen in de katalytisch actieve vorm $\text{Cu}(++)$ -dicysteïne is gekomplexeerd, zijn nauwkeurige ESR-intensiteitsmetingen uitgevoerd.

Bij de gevolgde werkwijze is het belangrijk te weten, of toevoegen van cysteïne aan de referentie-oplossing, invloed heeft op de kwaliteitfactor van de trilholte. (vergelijk paragraaf 2.4.1.)

Dit wordt op drie manieren onderzocht:

1. Tijdens de steady state van de oxidatiereactie wordt vier maal het ESR-spektrum van de reactieoplossing opgenomen. Daar de metingen na elkaar geschieden, is bij elke volgende meting minder cysteïne en meer cystine aanwezig.

2. Na afloop van de reactie wordt opnieuw de oorspronkelijke hoeveelheid cysteïne aan het systeem toegevoegd en opnieuw het spektrum opgenomen. Uit dit experiment blijkt de invloed van de voorgaande proef gevormde cystine op de intensiteit van het spektrum.

3. In een nieuwe proef wordt aan de referentie-oplossing in plaats van cysteïne een even grote hoeveelheid histidine toegevoegd.

Ook hiervan wordt de invloed spektroskopisch gemeten.

De bij bovenstaande experimenten optredende ESR-spektra zijn weergegeven in de figuren 3.4.1., 3.4.2. en 3.4.3..

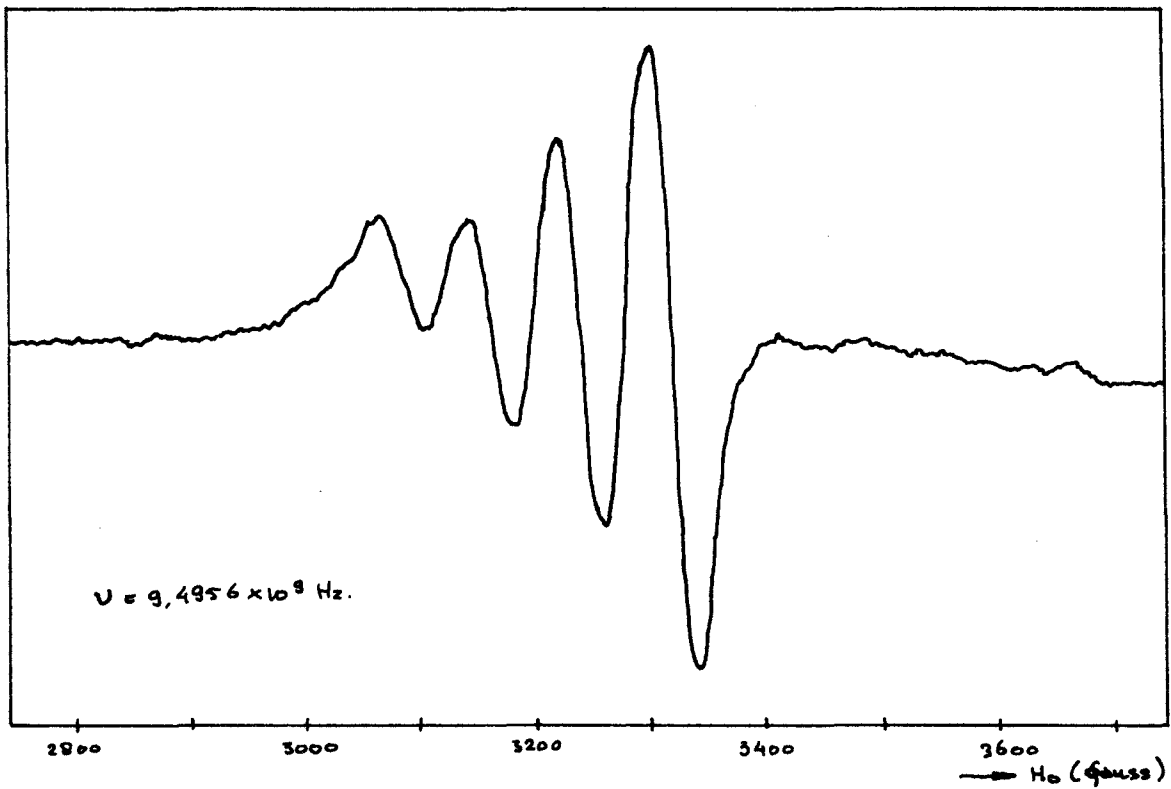


Fig. 3.4.1. Het ESR-spektrum van Cu(++)-dihistidine. [NaOH] = 0,2375 M
[Cu(++)] = 2×10^{-4} M; [histidine] = $1,9 \times 10^{-3}$ M.

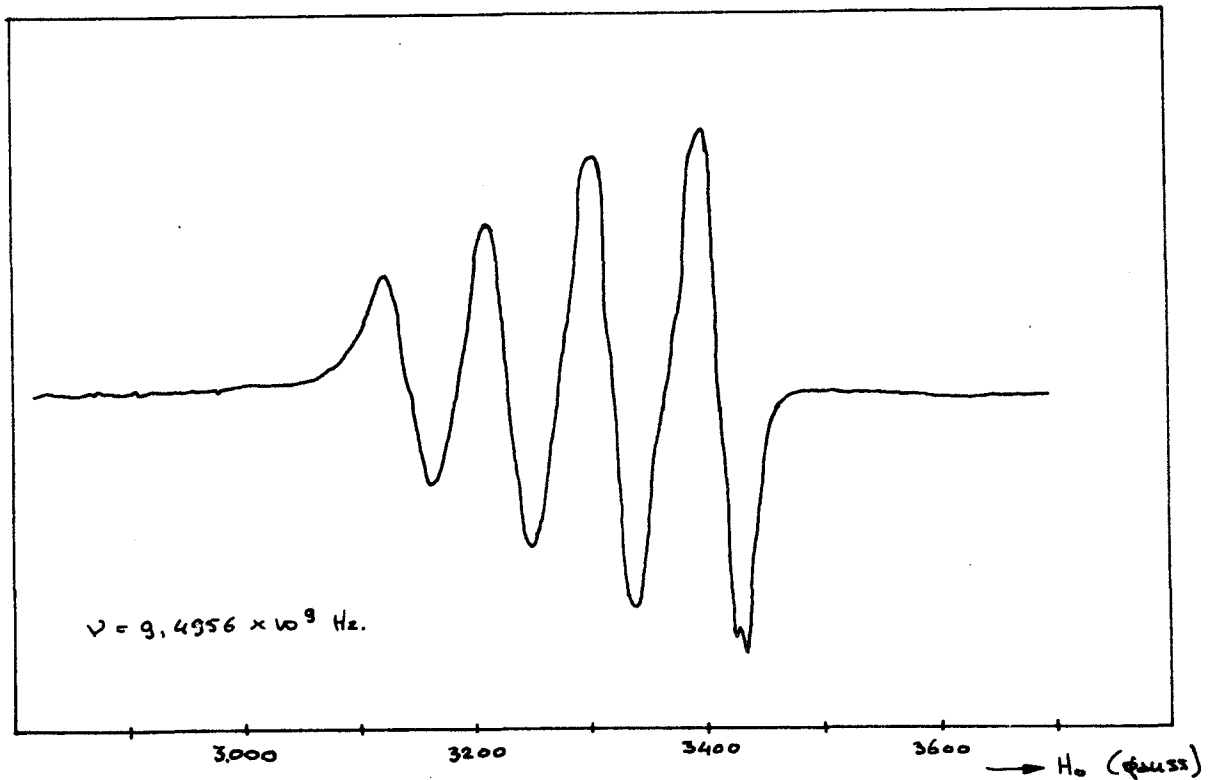


Fig. 3.4.2. Het ESR-spektrum van Cu(++)-dicysteïne. Het signaal is over-
gemoduleerd om het makkelijk te kunnen integreren. Hierdoor
is de hyperfijnsplitsing verdwenen. [Cu(++)] = 2×10^{-4} M;
[histidine] = $1,9 \times 10^{-3}$ M; [NaOH] = 0,2375 M;
[Cysteïne] = $8,25 \times 10^{-2}$ M.

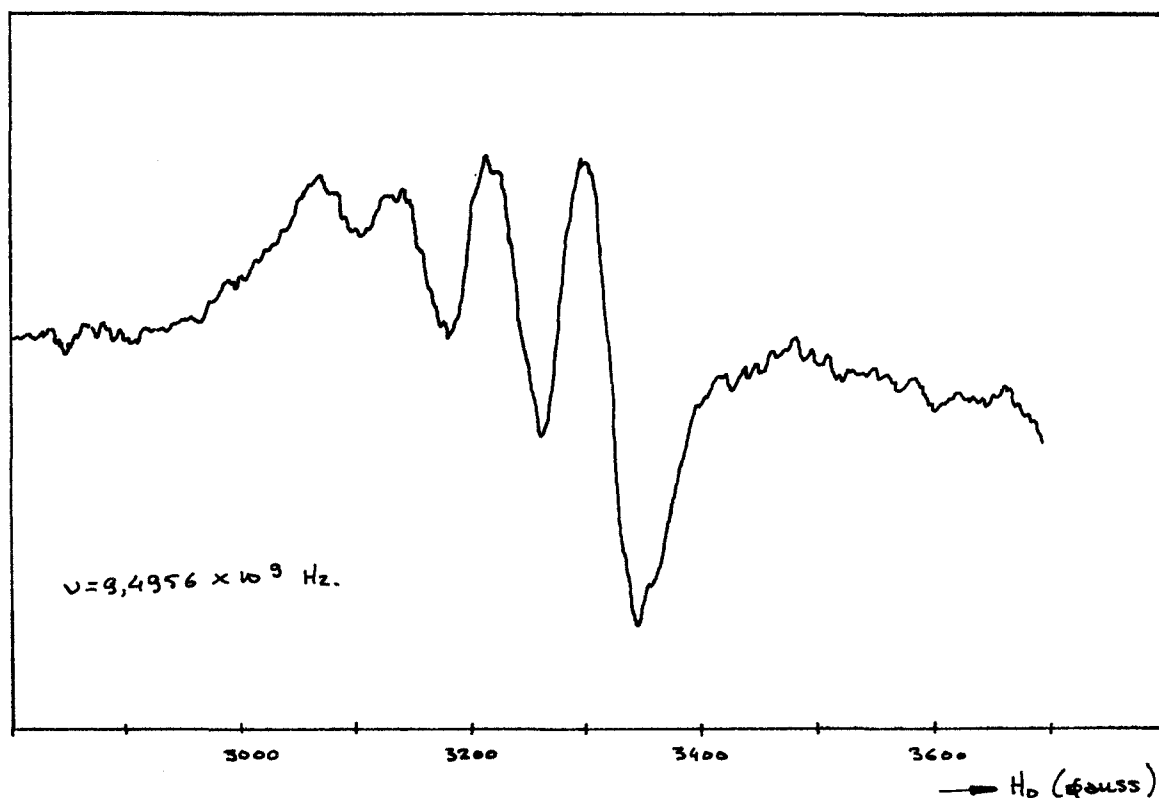


Fig.3.4.3. Het spektrum van de reactieoplossing na volledige oxidatie. Overige kondities idem fig. 3.4.2.

Tabel 3.4.1. Resultaten van de ESR-intensiteitsmetingen.

Exp. nr.	sub.	Omstandigheden	Int.
1	a	$[\text{Cu}(++)] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}; [\text{histidine}] = 1,9 \times 10^{-3} \text{ M}$ $[\text{NaOH}] = 0,2375 \text{ M}$	100
	b	idem 1 + $[\text{Cysteïne}]_0 = 8,25 \times 10^{-2} \text{ M}$; Vier maal na elkaar ESR-spektrum opgenomen, alle vier identiek	100
	c	45 min. na afloop van oxidatie b	82
	d	opnieuw cysteïne toegevoegd. $[\text{Cysteïne}]_0 = 8,25 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{Cystine}]_0 = 4,125 \times 10^{-2} \text{ M}$	101
	e	5 min. na afloop van oxidatie d	88
2	a	$[\text{Cu}(++)] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}; [\text{Histidine}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ $[\text{NaOH}] = 0,2375 \text{ M}; [\text{Cu}(++)], [\text{NaOH}]$ idem 6,	100
	b	$[\text{histidine}] = 8,27 \times 10^{-2} \text{ M}$ $[\text{Cu}(++)], [\text{NaOH}]$ idem 6	99

In tabel 3.4.1. zijn de resultaten van de ijk-metingen uitgezet. De intensiteit van de referentie-oplossing werd steeds 100 gesteld.

De waargenomen ESR-signalen worden veroorzaakt door het ongepaarde elektron van Cu(++). (d^9 systeem)

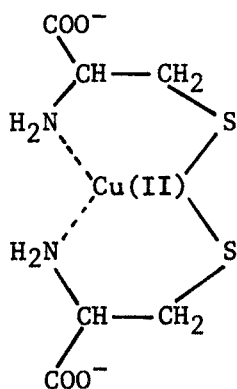
De opsplitsing in vier lijnen ontstaat door wisselwerking van de koperkern ($I = 3/2$) met het ongepaarde elektron.

De optredende lijnverbreding bij toenemend veld voor elk van de lijnen is een relaxatie-verschijnsel dat verklaard kan worden door de zogenaamde "slow tumbling" van het complex. (19)

Bij het cysteïnecomplex vertonen de hoge-veld-lijnen nog 'n extra opsplitsing in 5 lijnen tengevolge van de wisselwerking van twee equivalente ^{14}N -kernen.

Deze extra hyperfijnstructuur is in fig. 3.4.2. en fig. 3.4.3. niet goed waar te nemen doordat het signaal is overgemoduleerd. Dit overmoduleren wordt gedaan om het spektrum makkelijk te kunnen integreren. (vergelijk paragraaf 2.4.1.)

De structuur van Cu(++)-dicysteïne is vlak-vierkant en kan als volgt worden weergegeven (1):



- Cu(++)-dicysteïne -

Zoals blijkt uit de proeven 1b en 1d (tabel 3.4.1.), heeft het toevoegen van cysteïne aan de referentieoplossing geen invloed op de kwaliteitsfactor van de trilholte. Ook histidine, dat een overeenkomstige structuur heeft als cysteïne, heeft geen significante invloed op de ESR-intensiteit. (tabel 3.4.1.; 2a,b)

Hierdoor mogen de spektra van referentie en sample direkt met elkaar vergeleken worden. (de overige omstandigheden waren al identiek door de gevolgde werkwijze, vergelijk paragraaf 2.4.1.)

De onnauwkeurigheid in de intensiteitsmetingen wordt alleen nog bepaald door de dubbele integratie. De geschatte maximale onnauwkeurigheid in de dubbele integraal bedraagt 2%.

Uit tabel 3.4.1. nr.1a, b blijkt dus dat tijdens de steady state van de oxidatie alle koperionen aanwezig zijn als Cu(++) en gekomplexeerd zijn met cysteïne.

Na afloop van de reactie daalt het percentage Cu(++) kennelijk tot 80 à 90% van de totale hoeveelheid koperionen.

3.4.2. Invloed van zuurstof op het ESR - spektrum van $\text{Cu(II)(RS}^-\text{)}_2$.

In paragraaf 3.3. zagen wij dat met behulp van UV/VIS-spektroskopie geen onderscheid gemaakt kan worden tussen het $\text{Cu(II)(RS}^-\text{)}_2$ -komplex in een oplossing mét zuurstof (tijdens de oxidatie) en het complex in een oplossing zónder zuurstof (tijdens rapid-mix).

Daar het toch vrij aannemelijk is, dat zuurstof tijdens de oxidatie aanlegt op het complex om er elektronen op te nemen, is nagegaan of dit in het ESR-spektrum van het complex tot uiting komt.

Daartoe zijn twee rapid-mix-experimenten uitgevoerd: Eén met zuurstofvrije en één met zuurstofverzadigde koper- en cysteïne-oplossingen.

Het ESR-spektrum blijkt in beide gevallen exakt hetzelfde te zijn.

Het is weergegeven in fig. 3.4.4..

Fig. 3.4.5. geeft van het spektrum van fig. 3.4.4. de hoge-veld-piek weer, opgenomen met een kleiner scan-range, zodat zeer nauwkeurig vergelijken van het spektrum met en zonder zuurstof mogelijk is.

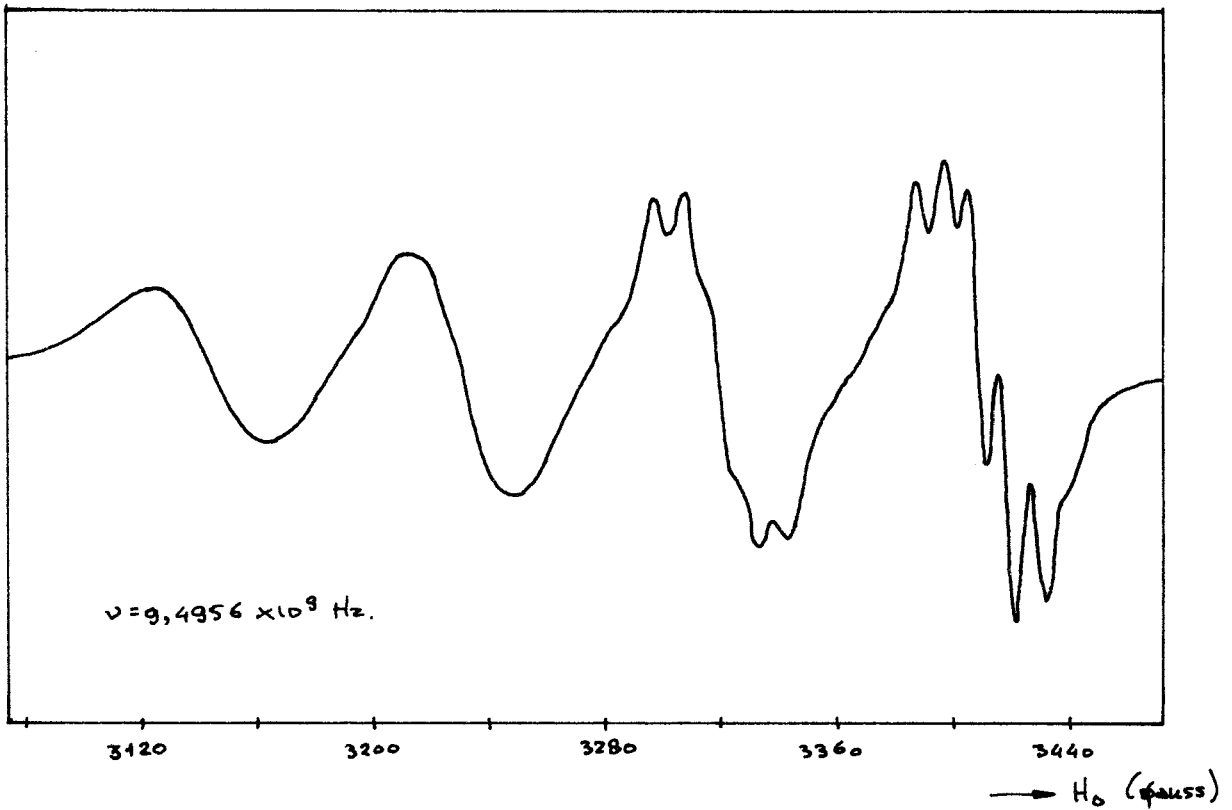


Fig. 3.4.4. Het ESR-spektrum van $\text{Cu(II)(RS}^-\text{)}_2$ in een rapid-mix-experiment. Hetzelfde spektrum ontstaat bij mengen van oplossingen met of zonder zuurstof. $[\text{Cu(++)}] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{Cysteïne}] = 5 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{NaOH}] = 0,25 \text{ M}$

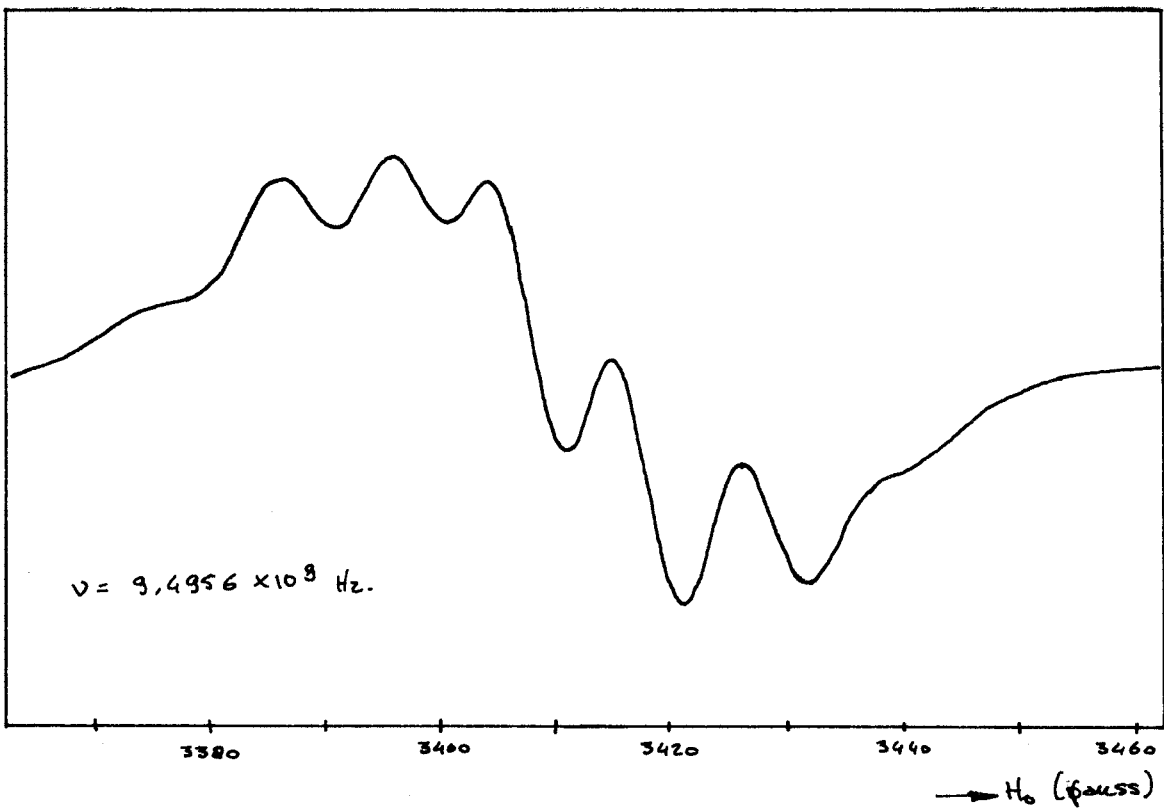


Fig. 3.4.5. Het ESR-spektrum van $\text{Cu(II)(RS}^-\text{)}_2$. Alleen de hoge-veld-piek is weergegeven. (vergelijk fig.3.4.4.)

3.4.3. ESR - stop - flow - experimenten.

De anaerobe verbleking van het koper-cysteïne-komplex wordt ook met behulp van ESR-stop-flow-experimenten onderzocht.

De waarde voor de verdwijnsnelheidsconstante, die uit deze metingen volgt, dient in overeenstemming te zijn met de k die door middel van UV-stop-flow-metingen werd gevonden. Zodoende vormt de k die met behulp van UV- of ESR-stop-flow-experimenten wordt gevonden een bevestiging voor het feit dat het UV-spektrum en het ESR-spektrum (respektievelijk fig. 3.3.1. en fig. 3.4.4.) bij hetzelfde complex horen.

Het voordeel van de ESR-stop-flow-metingen is bovendien dat de nullijn van de afvalkurves veel scherper vast ligt: de reactieproducten van de anaerobe verbleking vertonen wel absorptie bij 330 nm, doch vertonen geen ESR-absorptie. (Dit betekent in de praktijk dat de nullijn in de UV-experimenten oploopt in de tijd)

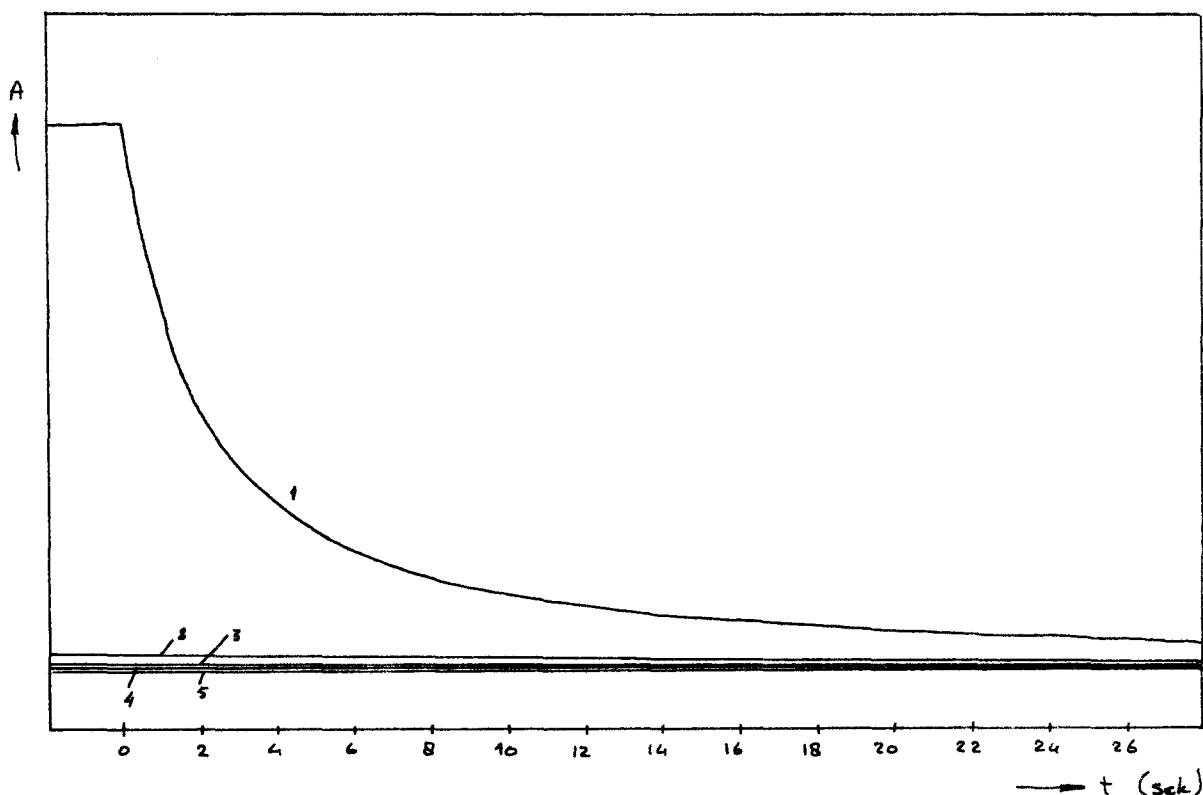


Fig. 3.4.6. Anaerobe verbleking van Cu(++)-dicysteïne, gevolgd aan de hand van het ESR-sigitaal.

$[Cu(++)]_0 = 10^{-2}$ M; $[Cysteïne]_0 = 5 \times 10^{-2}$ M

$[NaOH] = 0,25$ M. 1,2,3,4 en 5 direkt na elkaar opgenomen.

Bij de ESR-stop-flow-experimenten wordt uitgegaan van het overgemoduleerde signaal. (fig. 3.4.2.) Van dit signaal wordt het verloop van de piek bij $H_0 = 3395$ gauss gevolgd. In fig. 3.4.6. is zo'n ESR-afvalkurve weergegeven. In appendix 4.7. is de hieruit bepaalde $1/A$ -kurve uitgezet. Voor de verdwijnsnelheidskonstante vinden we $k = 67 \pm 3 \text{ Ms}^{-1}$. De onnauwkeurigheid wordt bepaald door de nauwkeurigheid waarmee de richtingscoëfficiënt van $1/A$ kan worden bepaald. De onnauwkeurigheid in de concentraties kan hier worden geëlimineerd door de amplitude van het gemeten signaal te vergelijken met de amplitude van het geijkte ESR-spektrum van het complex. (paragraaf 3.4.1.)

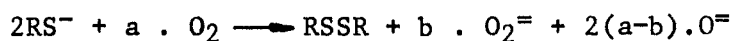
4. *Diskussie en konklusies*

Voor het konstrueren van een reaktiemechanisme hebben we de beschikking over de volgende experimentele gegevens:

a. De katalytisch aktieve vorm van de koperionen bestaat uit het koper-cysteïne-komplex $\text{Cu(II)(RS}^-\text{)}_2$ (1;9). Tijdens de steady state van de oxidatie vertegenwoordigt dit kompleks alle aanwezige koperionen (eigen werk).

b. Er treden géén thylradikalen op. (1)

c. De overall reaktievergelijking luidt (eigen werk) :



d. De orde van de zuurstofopnamesnelheid in de koperionenkonsentrasie is hoger dan één. (1; 11; bevestigd in eigen werk)

e. Zolang cysteïne aanwezig is in het katalytisch systeem, is H_2O_2 stabiel. Aanwezige H_2O_2 kan dan alleen wegreageren door te fungeren als oxidator voor cysteïne. (9; bevestigd in eigen werk)

f. In het katalytisch systeem geldt bij lage cysteïnekonsentrasies bij benadering (eigen werk) :

$$\frac{d\text{H}_2\text{O}_2}{dt} \sim [\text{Cu}(++)]^2$$

g. Voor de door $\text{Cu}(++)$ gekatalyseerde oxidatie van cysteïne onder invloed van H_2O_2 geldt (eigen werk) :

$$-\frac{d\text{RS}^-}{dt} \sim [\text{H}_2\text{O}_2] \quad \text{en} \quad -\frac{d\text{RS}^-}{dt} \sim [\text{Cu}(++)]$$

h. Aanwezigheid van zuurstof in het oplosmiddel beïnvloedt noch het UV/VIS-spektrum, noch het ESR-spektrum van het $\text{Cu(II)(RS}^-\text{)}_2$ -komplex. (1, bevestigd in eigen werk)

i. Het $\text{Cu}(++)$ -dicysteïnekomplex reageert weg in zuurstofvrije omgeving, waarbij $\text{Cu}(++)$ wordt gereduceerd tot $\text{Cu}(+)$.

Bij niet te kleine cysteïne/ $\text{Cu}(++)$ -verhouding is deze reaktie tweede orde in de komplekskonsentrasie met een verdwijnsnelheidskonstante $k = 67 \pm 3 \text{ Ms}^{-1}$; (9; eigen werk)

j. Bij hoge cysteïnebeginkonsentrasies vindt de H_2O_2 -opbouw voornamelijk plaats op het einde van de reaktie. (eigen werk)

Omdat de nauwkeurigheid van de Cu(++)-bepaling met behulp van ESR niet groter is dan tot op 2% , is de aanwezigheid van 2% Cu(+) niet uitgesloten.

Daarom zullen wij nagaan of het mogelijk is dat Cu fungeert als elektronen-transporteur, waarbij de valentietoestand van de koperionen afwisselend één- en tweewaardig positief is. Een dergelijk mechanisme is geponereerd door Kuijpers (1). Schematisch verloopt de oxidatie dan als volgt: (fig. 4.1.)

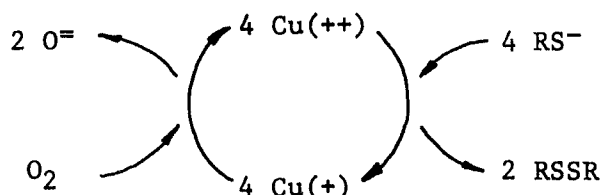


Fig. 4.1. Schematische weergave van het oxidatieverloop in een Cu(+) - Cu(++)-cyclus.

Cysteïne wordt hier geoxideerd door Cu(++) terwijl de zuurstof zorgt voor de reoxidatie van Cu(+).

In dit reaktieschema geldt:

$$-\frac{dCu(++)}{dt} = -4 \frac{dO_2}{dt} \quad (4.1)$$

In ons geval zijn de experimentele waarde van zowel het linker- als het rechterlid bekend voor verschillende koperionenconcentraties.

Nemen we bijvoorbeeld $Cu(++) = 1 \times 10^{-4} M$, dan is:

$$-\frac{dCu(++)}{dt} = 65 \times 10^{-8} Ms^{-1} \quad (4.2)$$

(vergelijk tabel 3.3.4.) en is

$$-\frac{dO_2}{dt} = 11 \times 10^{-6} Ms^{-1} \quad (4.3)$$

(vergelijk tabel 3.1.2.)

We zien dus dat de stap $Cu(++) \rightarrow Cu(+)$ 60 à 70 keer zo snel zou moeten zijn om te kunnen voldoen aan (4.1). Hieruit konkluderen we dat de oxidatie via de Cu(+) - Cu(++)-cyclus geen noemenswaardige rol speelt in het reaktieverloop.

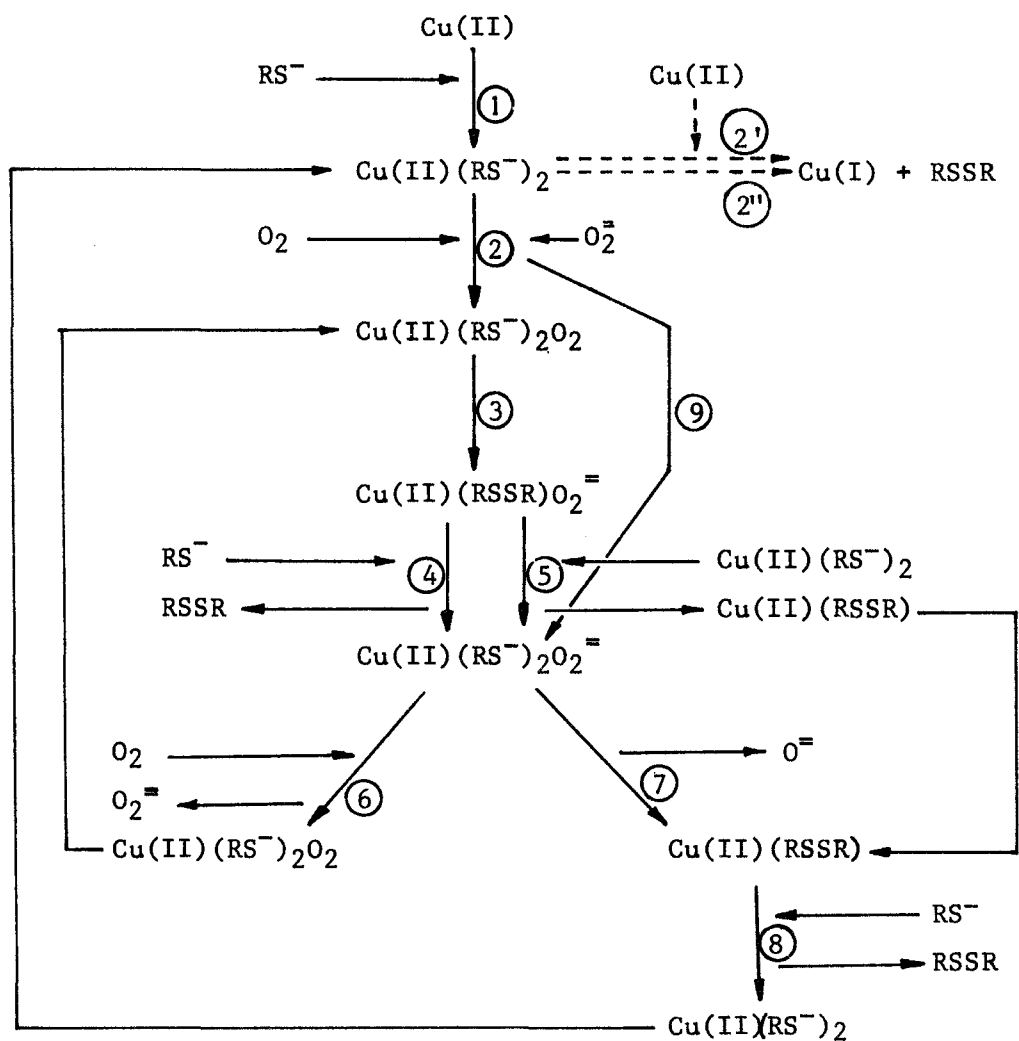


Fig. 4.2. Schematische voorstelling van de door Cu(++) gekatalyseerde oxidatie van cysteine onder invloed van moleculaire zuurstof. Alle reacties zijn in principe evenwichtsreacties die zowel heen als terug kunnen verlopen.

Een reactiemechanisme, dat in overeenstemming is met alle aan het begin van deze paragraaf genoemde experimentele gegevens, is schematisch weer- gegeven in fig. 4.2..

Hieronder zijn de reactievergelijkingen afzonderlijk uitgeschreven en becommentarieerd aan de hand van de experimentele gegevens.

Reaktieverloop :

1. $\text{Cu}^{++} + 2\text{RS}^- \rightleftharpoons \text{Cu(II)(RS}^-)_2$
2. $\text{Cu(II)(RS}^-)_2 \rightleftharpoons \text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2$
3. $\text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Cu(II)(RSSR)O}_2$
4. $\text{Cu(II)(RSSR)O}_2 + 2\text{RS}^- \rightleftharpoons \text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2 + \text{RSSR}$
5. $\text{Cu(II)(RSSR)O}_2 + \text{Cu(II)(RS}^-)_2 \rightleftharpoons \text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2 + \text{Cu(II)(RSSR)}$
6. $\text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
7. $\text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Cu(II)(RSSR)} + 2\text{O}^-$
8. $\text{Cu(II)(RSSR)} + 2\text{RS}^- \rightleftharpoons \text{Cu(II)(RS}^-)_2 + \text{RSSR}$

Ad.a Behalve $\text{Cu(II)(RS}^-)_2$ treden in ons reactieschema ook nog de deeltjes $\text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2$, $\text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2$, Cu(II)(RSSR) en Cu(II)(RSSR)O_2 op. Gezien punt *h* van de experimentele gegevens hebben deze deeltjes òf dezelfde UV en ESR-spektra als $\text{Cu(II)(RS}^-)_2$ òf hun concentratie is te laag om detecteerbaar te zijn.

Ad.c De konversie van 130% wordt geheel verklaard door de H_2O_2 -vorming. Kuijpers verklaarde de konversie van 130% met behulp van de hydrolyse van RSSR. (1)

Gezien onze resultaten kan deze hydrolyse pas starten na volledige oxidatie van de cysteïne.

Ad.d Om de orde van de zuurstofopnamesnelheid in de koperionenconcentratie volledig te kunnen verklaren dienen de snelheidskonstanten van alle reacties bekend te zijn.

Een eerste orde benadering krijgen we door te veronderstellen dat alle $\text{Cu}(++)$ -complexen een vaste fraktie vertegenwoordigen van de totale hoeveelheid aanwezige koperionen.

Dan geldt: Zuurstofopname geschiedt in de reacties 2 en 6.

Reaktie 2 is eerste orde in $[\text{Cu(II)(RS}^-)_2]$ en dus (vanwege de aanname) in $[\text{Cu(++)}]$.

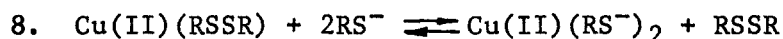
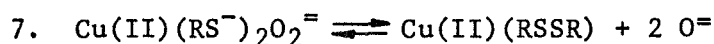
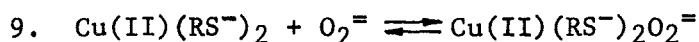
Reaktie 6 is eerste orde in $[\text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2^=]$, wat wordt gevormd via reaktie 4 en 5.

Hiervan is reaktie 4 eerste orde in $[\text{Cu(II)(RSSR)O}_2^=]$ en dus in $[\text{Cu(++)}]$, terwijl reaktie 5 eerste orde is in $[\text{Cu(II)(RSSR)O}_2^=]$ en eerste orde in $[\text{Cu(II)(RS}^-)_2]$, dus tweede orde in $[\text{Cu(++)}]$. Dientengevolge zal $[\text{Cu(II)(RS}^-)_2\text{O}_2^=]$ in meer dan eerste orde afhangen van $[\text{Cu(++)}]$ en zal dus ook de zuurstofopnamesnelheid in reaktie 6 meer dan eerste orde in $[\text{Cu(++)}]$ zijn. Hierdoor zal ook de totale zuurstofopnamesnelheid (reaktie 2 en 6 samen) een orde in de koperionenconcentratie, hoger dan één hebben.

Ad.e De oxidatie van cysteïne onder invloed van H_2O_2 is weergegeven in reaktie 7.

Ad.f Bij lage cysteïneconcentratie zal reaktie 5 overheersend zijn ten opzichte reaktie 4. Om de orde twee van de waterstofperoxide-opbouw in de koperionenconcentratie te verklaren, dient in in dit geval reaktie 5 de snelheidsbepalende stap te zijn in de vorming van H_2O_2 .

Ad.g Bij de oxidatie van cysteïne onder invloed van H_2O_2 hebben we waarschijnlijk te maken met de reakties:

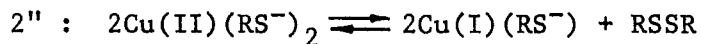
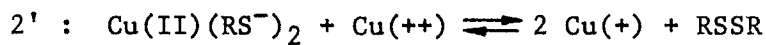


waarbij reaktie 9 snelheidsbepalend is. Dit verklaart de orde in $[\text{Cu(++)}]$ en in $[\text{H}_2\text{O}_2]$ van de cysteïneverdwijnsnelheid. De orde in $[\text{H}_2\text{O}_2]$ en $[\text{Cu(++)}]$ van de cysteïne-verdwijnsnelheid is afgeleid uit de beginhelling van de cysteïne-vervalkurves. (fig. 3.2.3.)

De versnelling die optreedt in de cysteïne-verdwijnsnelheid wordt door de reakties 9, 10 en 11 niet verklaard. In het algemeen heeft men bij een snelheidsverloop als in fig. 3.2.3. te maken met autokatalyse: een van de reaktieproducten katalyseert de reaktie.

Het is niet duidelijk welk deeltje hiervoor in ons geval aansprakelijk zou kunnen zijn.

Ad.i Het kwalitatieve beeld van de anaerobe verbleking kan verklaard worden met behulp van reactie 1 en reactie 2' en 2'':



Bij hoge $[\text{RS}^-]$ zal $[\text{Cu(++)}]$ praktisch nul zijn wegens reactie 1 en wordt de anaerobe verbleking bepaald door 2''. Zij is dan tweede orde in de complexenkonsentratie.

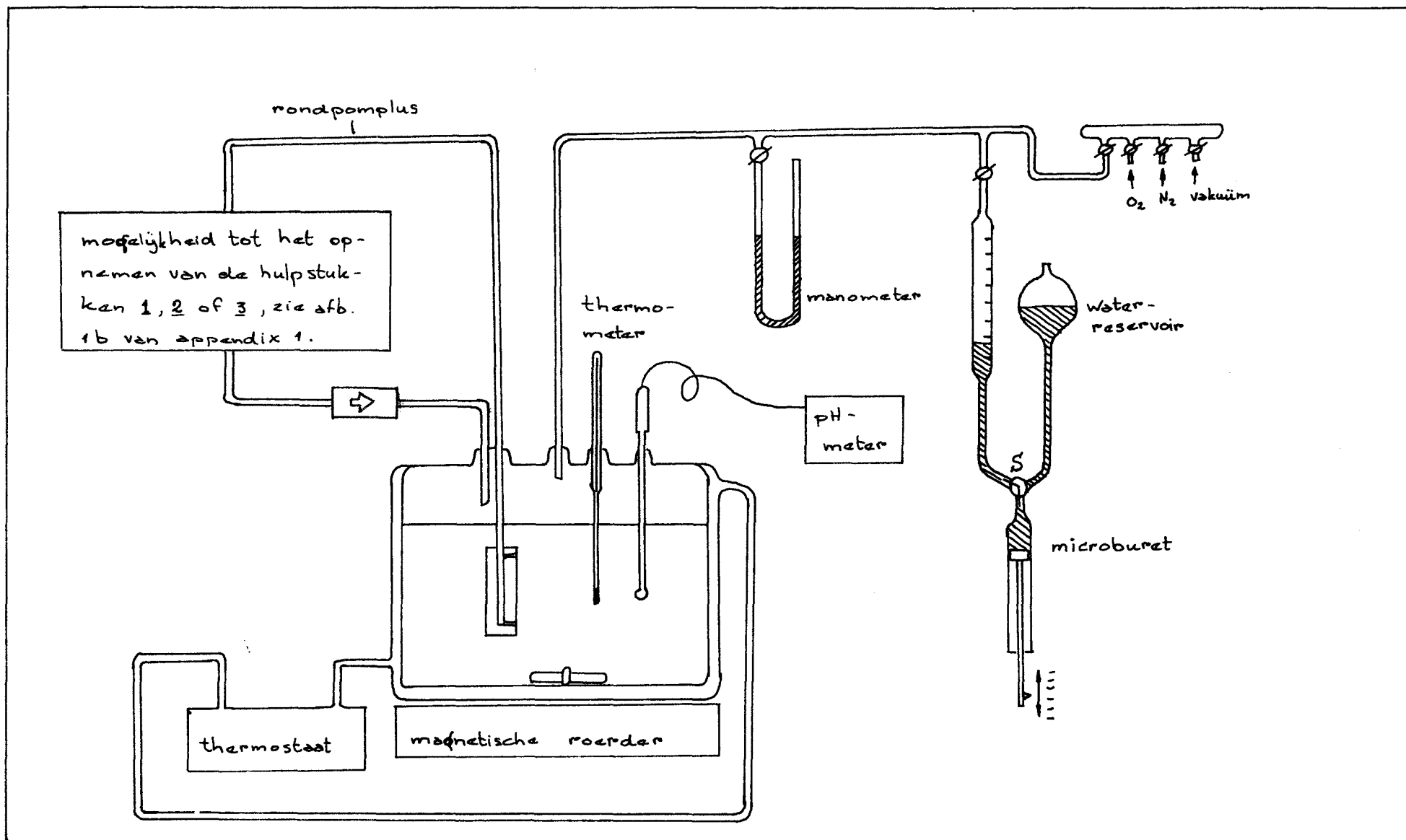
Bij lage $[\text{RS}^-]$ is $[\text{Cu(++)}]$ zo groot dat reactie 2' in belangrijke mate de anaerobe verbleking gaat bepalen.

De reaktiesnelheidskonstante van 2' is kennelijk groter dan die van 2''.

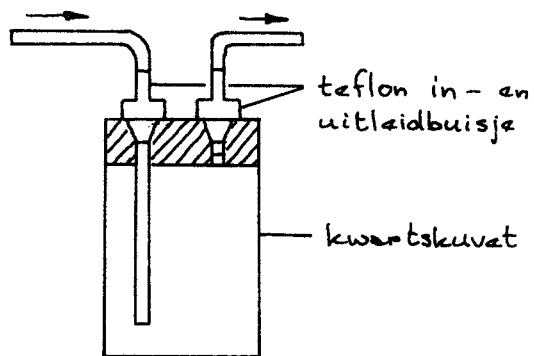
Ad.j Bij hoge $[\text{RS}^-]$ wordt reactie 8 snel en daardoor de konsentratie $[\text{Cu(II)(RSSR)}]$ laag. Lage $[\text{Cu(II)(RSSR)}]$ versnelt reactie 7, waardoor deze overheersend wordt ten opzichte van reactie 6.

Literatuurlijst

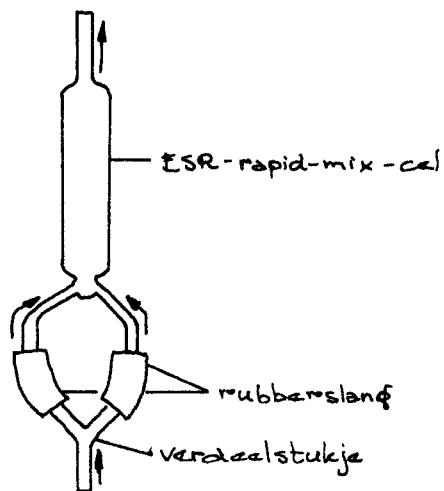
1. F. Kuypers, proefschrift, THE (1974)
2. J. Zwart, afstudeerverslag, THE (1973)
3. T. Welzen, afstudeerverslag, THE (1973)
4. J. Timmers, afstudeerverslag, HTS (1971)
5. A. Schoonbeek, afstudeerverslag, HTS (1973)
6. A. Edelbroek, afstudeerverslag, THE (1973)
7. M. Eykelhardt en C. Geurts, afstudeerverslag, THE (1973)
8. D. Cavallini, Arch. Biochem. Biophys. 124, 18 (1968)
9. D. Cavallini, Arch. Biochem. Biophys. 130, 354 (1969)
10. C. de Marco, Arch. Biochem. Biophys. 144, 496 (1971)
11. C. Rummens, laboratoriumverslag, THE, groep TA (1975)
12. C.J. Swann & D.L. Trimm, J. Appl. Chem. 18, 340 (1968)
13. Kolthoff & Stricks, J. Amer. Chem. Soc. 73, 1728 (1951)
14. Egerton & Everett, Anal. Chim. Acta 10, 422 (1954)
15. T.J. Wallace, A. Schriesheim, H. Hurwitz and H.B. Glaser,
Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop. 3, 237 (1964)
16. Discuss. Faraday Soc. 46, 144-149 ; 184-189 (1968)
17. H.M. Swartz, J.R. Bolton & D.C. Borg, Biological Appl. of ESR,
Hfst. 3, Wiley-Interscience 1972
18. G. Casteleijn, J.J. ten Bosch and J. Schmidt, J. Appl. Phys.
39, 4375 (1968)
19. H. Mc. Connell, J. Chem. Phys. 25, 709 (1956)



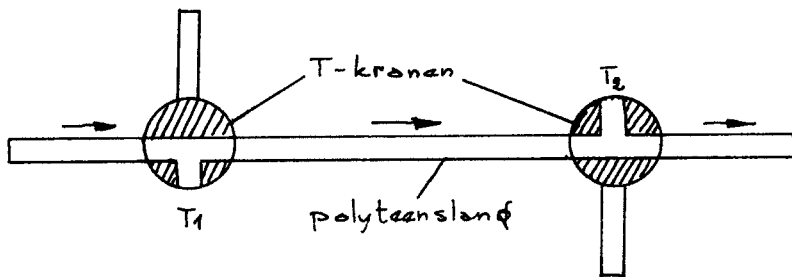
Appendix 1. fig. 1a Warburg-apparatuur. Geschikt voor kinetische metingen en simultane UV/VIS- of ESR-bepaling of monstername. (zie ook fig. 1b)



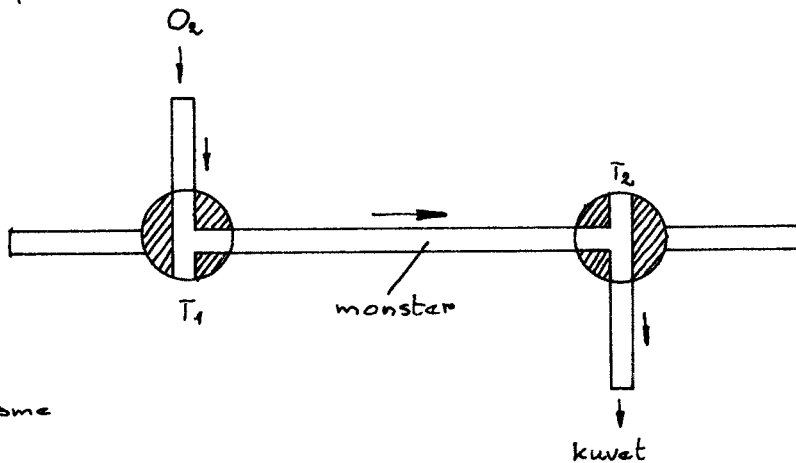
1. Hulpstuk voor het opnemen van UV/VIS-spektra tijdens de oxidatie.



2. Hulpstuk voor het opnemen van ESR-spektra tijdens de oxidatie. (doorstroomcel)



a. rondpompen



b. monsternamen

3. Hulpstuk voor monsternamen tijdens de oxidatie.

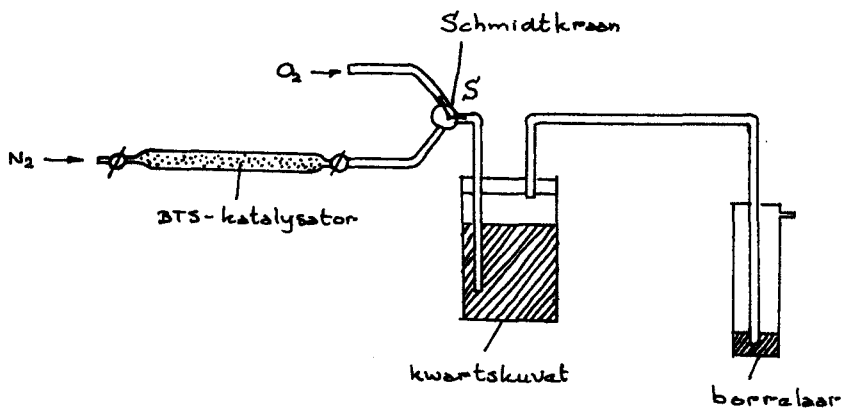


Fig. 2. Opstelling voor kuvet-proeven.

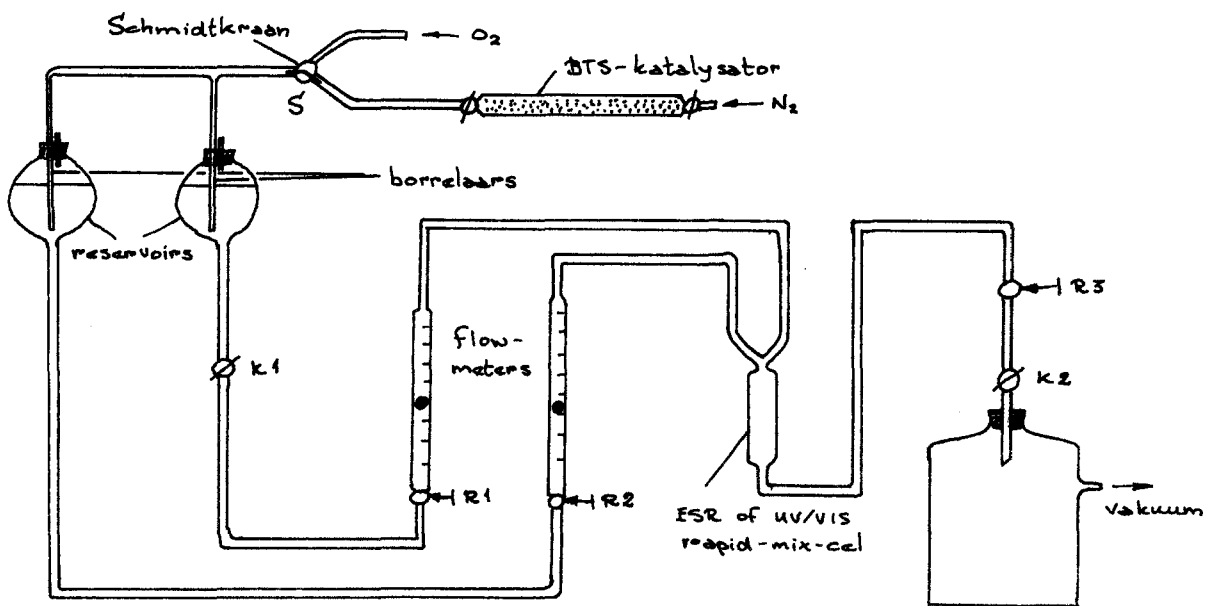
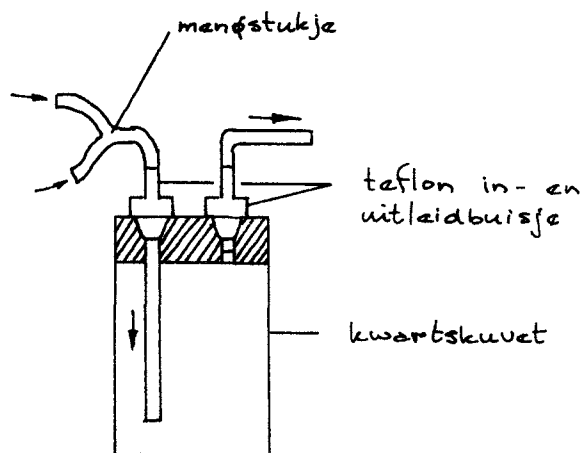
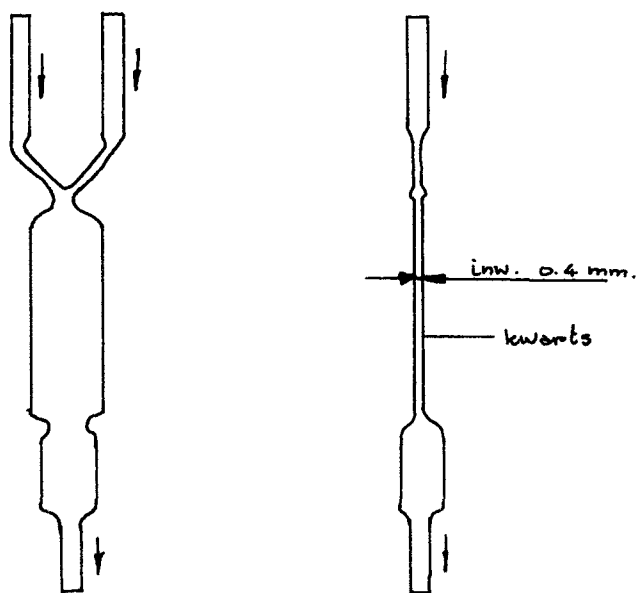


Fig. 3a. Opstelling voor rapid-mix-experimenten.



1. Kwartskuvet voor rapid-mix-experimenten.



2. 0,4 mm rapid-mix-cel.

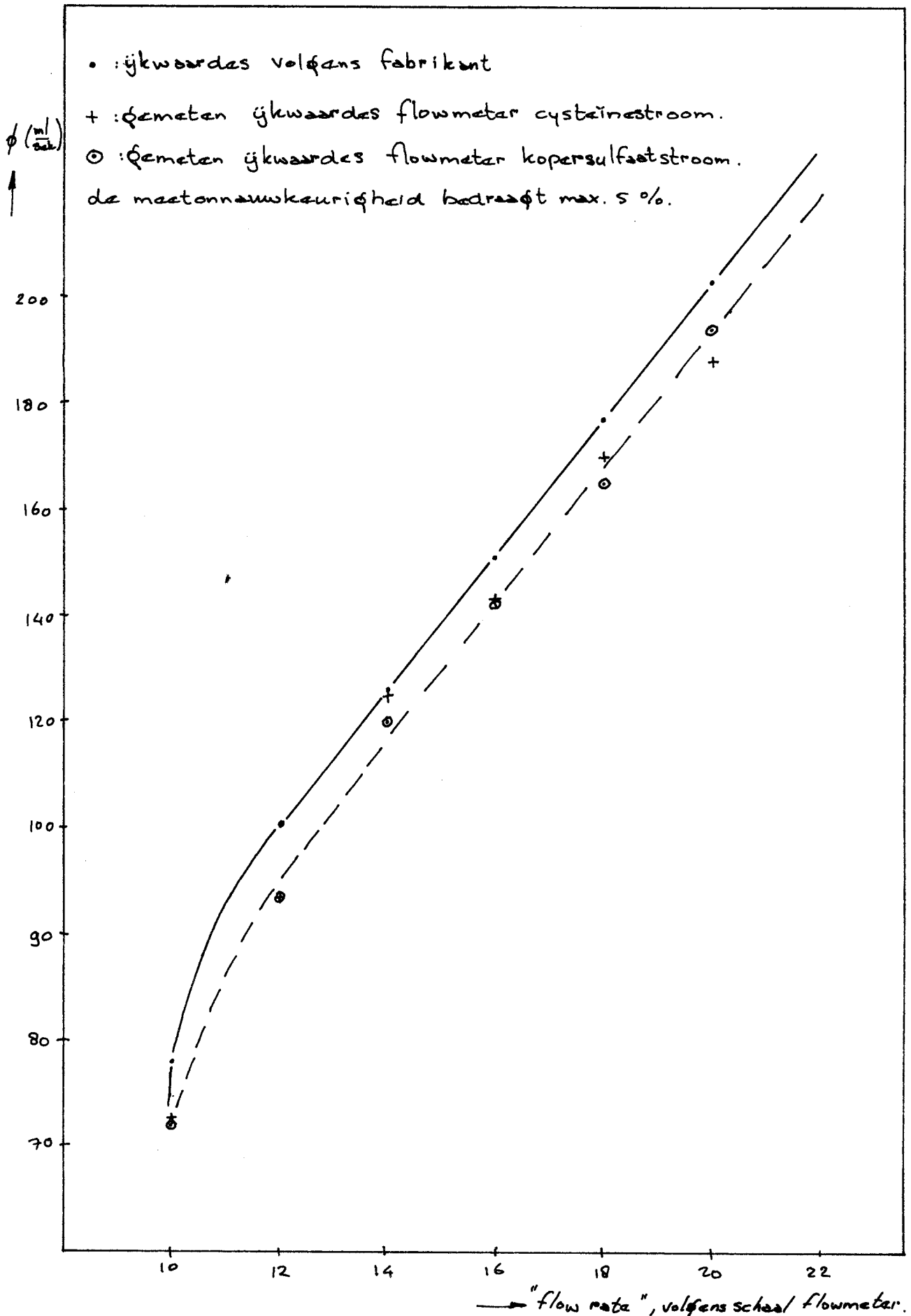


Fig. 4. Ijkkurven van de flowmeters uit de rapid-mix-opstelling.

Appendix 2

Korrektiemethode bij onjuiste keuze van de nullijn bij de integratie van ESR-spektra.

Een eenvoudig ESR-sigitaal is getekend in fig 1

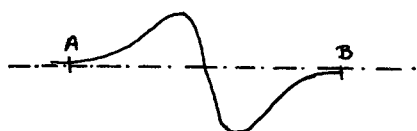


Fig. 1 ESR-spektrum

De integraal van dit spektrum is weergegeven in fig. 2

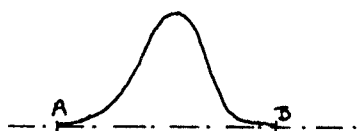


Fig.2a Absorptiecurve, behorend bij het ESR-spektrum van fig. 1

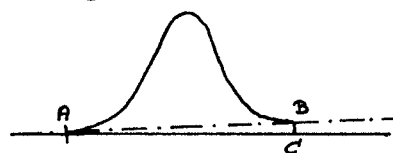


Fig.2b Absorptiecurve bij onjuiste keuze van de ~~null~~ nullijn.

Fig. 2a geeft de integraal van het spektrum bij juiste keuze van de nullijn, fig. 2b bij onjuiste keuze van de nullijn. We zien dat in het laatste geval de enkelvoudige integraal bij B niet nul is doch $|BC|$. De dubbele integraal, die het oppervlak onder de absorptiecurve aangeeft, levert in dit geval dus een te grote waarde. De afwijking bestaat uit het oppervlak van driehoek ABC (fig. 2b). Dit oppervlak wordt ter correctie afgetrokken van de waarde van de dubbele integraal van het ESR-spektrum, dus:

$$\iint' = \iint - \frac{1}{2} \times |AB| \times |BC|$$

Appendix 3

Tweede orde verdwijnsnelheid

Indien uitzetten van $1/E$ tegen t een rechte lijn oplevert, dat wil zeggen:

$$1/E = k_1 \cdot t + k_2 \quad (1)$$

of

$$E = \frac{1}{k_1 \cdot t + k_2} \quad \text{en} \quad k_2 = (1/E)_{t=0} = 1/(E)_0 \quad (2)$$

dan geldt:

$$\frac{dE}{dt} = -k_1 \cdot \frac{1}{(k_1 \cdot t + k_2)^2} = k_1 \cdot (E)^2 \quad (3)$$

Voor E geldt in ons geval (We beschouwen de anaerobe verbleking van het $\text{Cu}(++)$ -dicysteïne-komplex) :

$$E = [\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2] \cdot EM \quad (4)$$

waarin EM de molaire ekstinktiekoëfficiënt van het complex is.

Als $t_{\frac{1}{2}}$ gedefinieerd wordt als het tijdstip waarop geldt:

$$(E)_t = t_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} (E)_t = 0 \quad (5)$$

dan geldt voor k_1 :

$$k_1 = \frac{1}{t} \left\{ \frac{1}{(E)_t} - \frac{1}{(E)_0} \right\} = \frac{1}{t_{\frac{1}{2}}} \cdot \frac{1}{E_0} = \frac{1}{t_{\frac{1}{2}}} \cdot \frac{1}{[\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2]_0 \cdot EM} \quad (6)$$

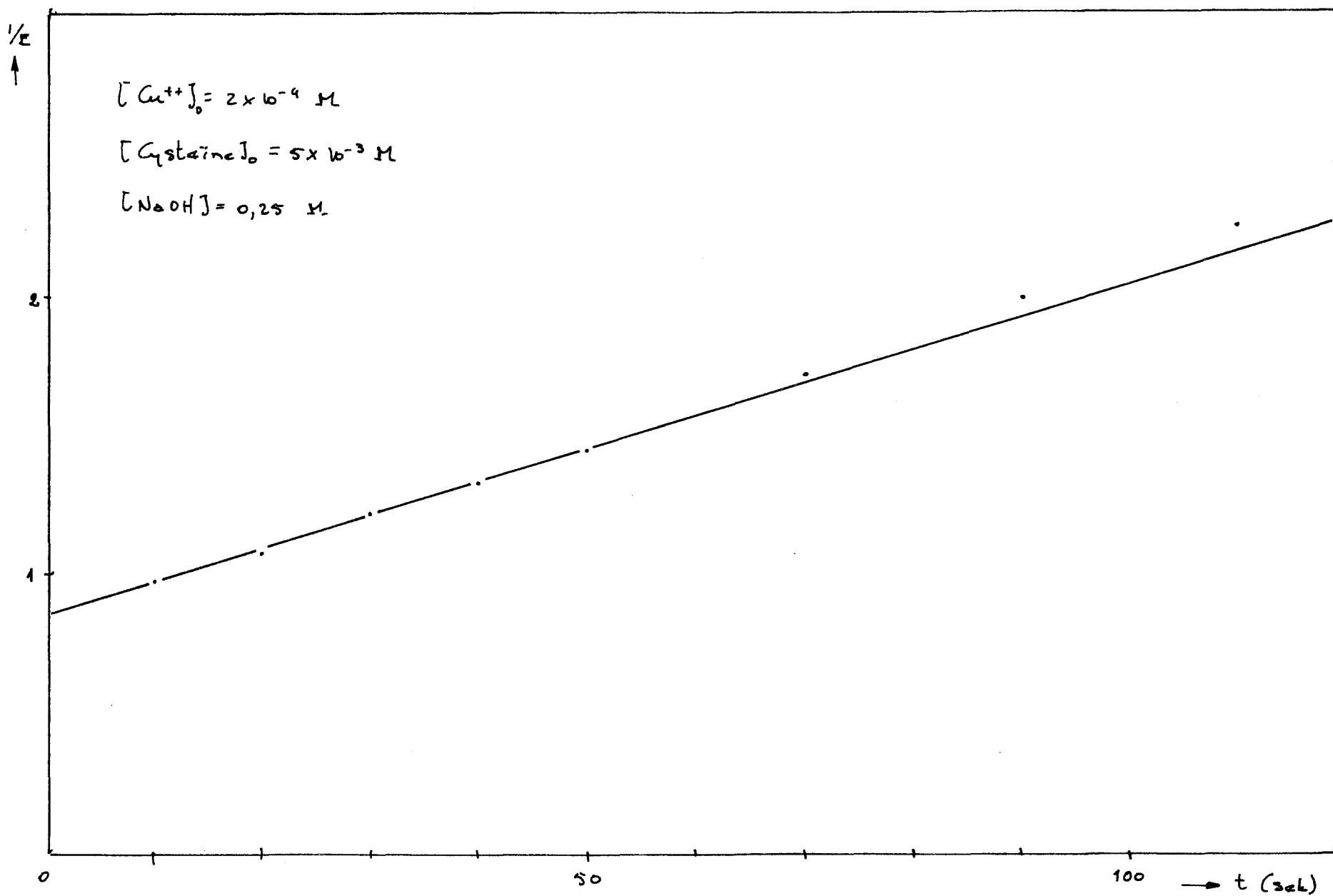
Invullen van (4) en (6) in (3) levert:

$$- EM \cdot \frac{d[\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2]}{dt} = \frac{1}{t_{\frac{1}{2}} \cdot [\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2]_0 \cdot EM} \times EM^2 \cdot [\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2]^2 \quad (7)$$

of

$$- \frac{d[\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2]}{dt} = \frac{1}{t_{\frac{1}{2}} \cdot [\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2]_0} \times [\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2]^2 \quad (8)$$

de $(t_{\frac{1}{2}} \cdot [\text{Cu(II)}(\text{RS}^-)_2]_0)^{-1}$ is de snelheidsconstante k van de verblekingsreactie. Vergelijking (1) betekent dus dat de verdwijnsnelheid tweede orde is in de complexconcentratie.



* "t=0" korrespondeert niet in alle appendices 4. met "stop flow".

$$[Cu^{++}]_0 = 2 \times 10^{-4} M$$

$$[Cysteine]_0 = 2 \times 10^{-3} M$$

$$[NaOH] = 0,25 M.$$

