

# Die zeitaufgelöste photoakustische Kalorimetrie und ihre Studienobjekte: von Carbenen bis zu Proteinen

Kevin S. Peters\*

Warum wurden Moleküle immer nur beobachtet und nie belauscht? Über ein Jahrhundert lang studierten Chemiker Reaktionen mit verschiedenen spektroskopischen Methoden, um etwas über die Struktur, das dynamische Verhalten und die Reaktivität der von ihnen untersuchten Moleküle zu erfahren. Sie haben jedoch nie zugehört, wenn ihre Moleküle reagierten. Obwohl man das

photoakustische Phänomen schon seit 1880 kennt, hat sich die Technik erst in den letzten zwanzig Jahren so weit entwickelt, daß die Schallwellen, die von reagierenden Molekülen ausgehen, zeitlich aufgelöst und die in ihnen enthaltenen Informationen entschlüsselt werden können. Diese Informationen sind wirklich reichhaltig, denn man kann aus einer photoakustischen Welle etwas über

die Dynamik und die Größe von Enthalpieänderungen sowie über die Dynamik von Änderungen des Molekülvolumens bei einer Reaktion erfahren. Diese Übersicht beschreibt die Entwicklung der zeitaufgelösten photoakustischen Kalorimetrie und ihre Anwendung auf eine Vielzahl von organischen, metallorganischen und biochemischen Reaktionen.

## 1. Einführung

Die Erkenntnis, daß Moleküle nach der Absorption von Licht Schall produzieren, geht auf Alexander Graham Bell zurück, der im Jahr 1880 Sonnenlicht, das durch einen mechanischen Unterbrecher geleitet wurde, auf eine Probe in einer Meßzelle fokussierte und die Schallwellen durch ein Rohr, dessen eines Ende mit der Meßzelle verbunden war, abhörte<sup>[1]</sup>. Dieses Phänomen wird photoakustischer Effekt genannt. Die Frequenz des Schalls, den er hörte, entsprach der Frequenz des mechanischen Unterbrechers. Heutzutage können wir den von Molekülen bei einer Reaktion erzeugten Schall mit einer Zeitauflösung von einer Nanosekunde messen.

Die Nutzung des photoakustischen Effekts zur Untersuchung der Dynamik von Enthalpie- und Volumenänderungen geht auf Arbeiten von Callis, Parson und Gouterman in den frühen siebziger Jahren zurück<sup>[2]</sup>. Bei ihrem Experiment zur Untersuchung von *Chromatium vinosum*-Chromatophoren wurde ein Kondensatormikrophon verwendet, das die durch Änderungen der Enthalpie und des Molekülvolumens bei der Reaktion verursachten Expansionen und Kontraktionen aufnahm. Die Zeitauflösung lag bei etwa 100 µs.

1985 erreichten wir eine Zeitauflösung der photoakustischen Kalorimetrie in der Größenordnung von 100 ns<sup>[3]</sup>. Dies gelang durch die Verwendung von piezoelektrischen Meßwertwandlern (Transducern) aus Bleizirconat/Bleititanat zur Detektion der

Schallwellen und einem Nanosekundenlaser zur lichtinduzierten Auslösung der Reaktionen. Wir entwickelten die photoakustische Kalorimetrie in Anlehnung an die von Patel und Tam<sup>[4]</sup> eingeführten photoakustischen Spektroskopiemethoden. Unabhängig von uns entwickelten zur gleichen Zeit auch Braslavsky et al.<sup>[5]</sup> die photoakustische Kalorimetrie. 1992 wurde die Zeitauflösung der photoakustischen Kalorimetrie von Caldwell, Melton et al.<sup>[6]</sup> in den Bereich von 1 ns ausgedehnt.

In dieser Übersicht werde ich Theorie, Prinzipien und Anwendung der zeitaufgelösten photoakustischen Kalorimetrie so besprechen, wie sie in meinem Labor und in den Laboratorien meiner früheren Mitarbeiter entwickelt wurde. Es wird dabei keine Vollständigkeit angestrebt, sondern vielmehr versucht, die Probleme aus der organischen, metallorganischen und Biochemie vorzustellen, die man mit dieser Technik bearbeiten kann. Ein ausführlicher Übersichtsartikel zur photoakustischen Kalorimetrie und zu verwandten Techniken ist 1992 erschienen<sup>[7]</sup>.

## 2. Die Theorie der photoakustischen Kalorimetrie

Der photoakustische Effekt ist theoretisch sehr gut verstanden und in einer ausführlichen Übersicht erläutert worden<sup>[8]</sup>. Wird eine chemische Reaktion in Lösung durch die Absorption von Licht ausgelöst, so übertragen die Moleküle bei der Reaktion ihre überschüssige innere Energie auf das Lösungsmittel. Dieser plötzliche Zuwachs an innerer Energie für das Lösungsmittel führt zu einer Volumenvergrößerung und damit zu einer Schallwelle, die sich durch das Medium fortpflanzt. Die Amplitude dieser Schallwelle ist der von den reagierenden Molekülen freigesetzten Energiemenge direkt proportional. Darüber hin-

[\*] Prof. K. S. Peters  
Department of Chemistry and Biochemistry  
University of Colorado  
Boulder, CO 80309-0215 (USA)  
Telefax: Int. + 303/492-5894

aus führt die Zu- oder Abnahme des Volumens der reagierenden Moleküle ebenfalls zu Schallwellen. Eine solche Volumenänderung kann als Folge der Spaltung einer kovalenten Bindung ( $\rightarrow$  Volumenzunahme) oder der Bildung von geladenen Teilchen, die eine Elektrokontraktion des umgebenden Lösungsmittels verursachen ( $\rightarrow$  Volumenabnahme), auftreten. Somit tragen sowohl eine thermische Expansion,  $\Delta V_{th}$ , als auch eine Änderung der molekularen Struktur des Systems,  $\Delta V_{con}$ , zur Entstehung der Schallwelle bei. Die vom Mikrophon aufgenommene Amplitude  $S$  der Schallwelle ergibt sich nach Gleichung (1).  $K$  ist hierin ein Parameter, der von der Empfindlichkeit der Meßanordnung abhängt.

$$S = K(\Delta V_{th} + \Delta V_{con}) \quad (1)$$

Da die Amplitude der Schallwelle somit sowohl von  $\Delta V_{th}$  als auch von  $\Delta V_{con}$  abhängt, ergibt sich das Problem, die Beiträge der beiden Komponenten zu  $S$  zu separieren. Die thermisch ausgelöste Volumenänderung ist mit der an das Lösungsmittel abgegebenen thermischen Energie  $Q$  gemäß Gleichung (2) verknüpft.  $\beta$  ist der thermische Expansionskoeffizient des Lösungsmittels,  $C_p$  die Wärmekapazität und  $\rho$  die Dichte der Lösung. In

$$\Delta V_{th} = (\beta/C_p \rho) Q \quad (2)$$

wäßrigen Lösungen hängt  $\beta/C_p \rho$  stark von der Temperatur ab und nähert sich für Wasser bei 3.9 °C dem Wert Null, d. h.  $\Delta V_{th}$  ist eine Funktion der Temperatur. Dagegen ist  $\Delta V_{con}$  in einem begrenzten Bereich temperaturunabhängig. Daher kann man in wäßrigen Medien die Beiträge von  $\Delta V_{th}$  und  $\Delta V_{con}$  aus der Temperaturabhängigkeit der Amplitude  $S$  der Schallwelle bestimmen. Leider ist  $\beta/C_p \rho$  in organischen Lösungsmitteln nahezu temperaturunabhängig, so daß hier die Temperaturabhängigkeit von  $S$  nicht zum Separieren der Beiträge von  $\Delta V_{th}$  und  $\Delta V_{con}$  herangezogen werden kann. Eine Möglichkeit ist jedoch, die Reaktion in verschiedenen organischen Solventien mit ähnlichen Lösungseigenschaften, aber unterschiedlichen thermischen Expansionskoeffizienten  $\beta$  zu untersuchen (siehe Abschnitt 4.1). Bisher wurde bei den meisten photoakustischen Untersuchungen in organischen Lösungsmitteln angenommen, daß  $\Delta V_{con}$  nur einen geringen Beitrag zur gesamten Schallwelle leistet und somit vernachlässigt werden kann.

Der apparative Parameter  $K$  kann eliminiert werden, indem man eine Eichsubstanz verwendet, die die gesamte Energie  $E_{hv}$

des Photons in Wärme umwandelt und auf der Zeitskala der instrumentellen Auflösung keine Änderung ihrer molekularen Struktur eingeht ( $\Delta V_{con} = 0$ ). Die Amplitude  $S_{cal}$  der Schallwelle dieser Eichsubstanz ist durch Gleichung (3) gegeben.  $K$  wird nun durch Division von  $S$  durch  $S_{cal}$  eliminiert [Gl. (4)].

$$S_{cal} = K(\beta/C_p \rho) E_{hv} \quad (3)$$

$$\phi = S/S_{cal} = (Q/E_{hv}) + \{\Delta V_{con}/[(\beta/C_p \rho) E_{hv}]\} \quad (4)$$

Wenn  $\Delta V_{con}$  vernachlässigt werden kann, beträgt die bei der Reaktion freigesetzte Wärme  $Q = E_{hv} \phi$ . Für wäßrige Lösungen erhält man aus der Auftragung von  $\phi$  gegen  $1/(\beta/C_p \rho)$  sowohl  $Q$  als auch  $\Delta V$ .

Die zur Detektion der Schallwellen verwendeten Transducer können nicht nur deren Amplitude, sondern auch deren zeitlichen Verlauf aufnehmen. Besteht eine Reaktion aus zwei aufeinanderfolgenden Zerfallsreaktionen [Gl. (5)], dann wird die von



den Transducern erzeugte zeitabhängige Spannung  $E(t)_{obs}$  beide Zerfallsprozesse  $H(t)$  widerspiegeln.  $E(t)_{obs}$  ist die Convolution [Gl. (6)] von  $H(t)$  mit der instrumentellen Empfindlichkeitsfunktion  $T(t)$ , die unabhängig mit Hilfe der Eichsubstanz bestimmt werden kann.

$$E(t)_{obs} = H(t) * T(t) \quad (6)$$

Für die beiden aufeinanderfolgenden Zerfallsreaktionen von Gleichung 5 ergibt sich  $H(t)$  gemäß Gleichung 7.  $\phi_i$  ist dabei wie in Gleichung (4) definiert<sup>[3]</sup>. Zur Ermittlung der Parameter  $\phi_i$  und  $k_i$  wurden zahlreiche Algorithmen entwickelt<sup>[9]</sup>.

$$H(t) = \phi_1 \exp(-tk_1) + [\phi_2 k_1 / (k_2 - k_1)] [\exp(-tk_1) - \exp(-tk_2)] \quad (7)$$

### 3. Photoakustische Kalorimeter

Es gibt zahlreiche Arten von photoakustischen Kalorimetern<sup>[3, 6, 7]</sup>. Grundlegende Bestandteile sind ein Laser zur Auslösung der Reaktion und ein Transducer zur Detektion der Schallwellen. Die Transducer bestehen entweder aus dünnen Polyvinylidendifluorid(PVF<sub>2</sub>)-Filmen oder aus piezoelektri-



*Kevin S. Peters, geboren 1949 in Ponca City, Oklahoma, USA, studierte bis 1971 an der University of Oklahoma Chemie und promovierte 1975 bei Kenneth Wiberg an der Yale University. Nach Postdoc-Aufenthalten bei Fred Richards (Yale), Meredith Applebury (Princeton) und Peter Rentzepis (Bell Laboratories) wurde er 1978 Professor an der Harvard University. Seit 1984 ist er Professor of Chemistry am Department of Chemistry and Biochemistry der University of Colorado in Boulder. 1989–1992 war er Chairman des Instituts. Er erhielt die Alfred P. Sloan Fellowship und den Henry and Camille Dreyfus Teacher-Scholar Award. Seine Forschungsinteressen sind die Dynamik und Energetik reaktiver Zwischenstufen in organischer, metallorganischer und Biochemie.*

schen Keramikbausteinen. Die dünnen PVF<sub>2</sub>-Filme werden als Breitbanddetektoren eingesetzt, die eine Echtzeitbeobachtung der Fortpflanzung der Schallwellen ermöglichen. Piezoelektrische Transducer aus Bleizirconat/Bleitanat sind per se empfindlicher. Das Transducersignal wird in der Regel durch einen Vorverstärker geleitet und dann mit einem digitalen Transientenrekorder zeitlich aufgelöst. Diese Meßanordnung reagiert sehr empfindlich auf kleine Temperaturänderungen; bei einem Laserpuls von 10 µJ Energie und mit einem Strahldurchmesser von 1 mm, der durch eine 1 cm-Küvette tritt, liegt die Temperaturänderung entlang des durch den Laserstrahl, der die Schallwelle erzeugt, definierten Zylinders in der Größenordnung von 10<sup>-6</sup> K. Die entsprechende Volumenänderung beträgt 10<sup>-10</sup> mL.

Abbildung 1 zeigt, wie sich kinetische Phänomene in Schallwellen äußern. Bestrahlung der Eichsubstanz Ferrocen in Benzol mit  $\lambda = 365$  nm führt zur Schallwelle A. Diese Kurve entspricht

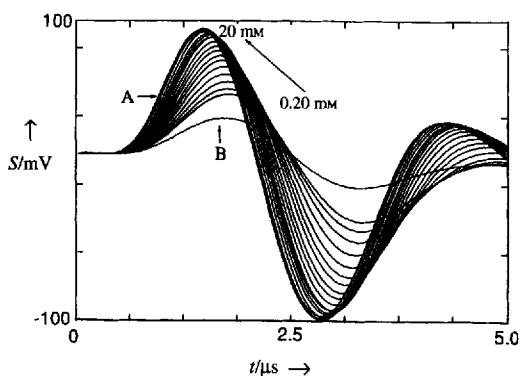


Abb. 1. Schallwellen durch die Bestrahlung von Ferrocen (Eichsubstanz, optische Dichte  $OD_{365} = 0.3$ , Kurve A) und Benzophenon ( $OD_{365} = 0.3$ , Kurve B) sowie von Benzophenon in Gegenwart von 2,3-Dimethyl-2-buten (0.2 mm–20 mm) als Quencher. Für Einzelheiten siehe Text.

der Antwort des piezoelektrischen Transducers auf einen Impuls. Kurve B entsteht durch Bestrahlung von Benzophenon in Benzol mit  $\lambda = 365$  nm. Die relative Verschiebung von Kurve B zu Kurve A spiegelt auf der Zeitskala der Transducerantwort auftretende kinetische Phänomene der Benzophenonreaktion wider. Das erste Ereignis ist die Bildung des Triplettzustands von Benzophenon aus dem angeregten Singulettzustand; dies geschieht in weniger als 20 ps und kann daher zeitlich nicht aufgelöst werden. Das zweite Ereignis ist der Zerfall des Triplettzustands; dieser läuft innerhalb von etwa von 10 µs ab. Die Schallwellen zwischen Kurve A und Kurve B entstehen, wenn der Triplettzustand von Benzophenon durch 2,3-Dimethyl-2-buten (0.2–20 mm) gequencht wird. Aus einer Analyse dieser Schallwellen erhält man für die Geschwindigkeitskonstante des Quenchens des Benzophenon-Triplettzustands durch 2,3-Dimethyl-2-buten einen Wert von  $1.30 \pm 0.02 \times 10^9$  L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Diese Schallwellen werden durch kinetische Ereignisse, die einen Zeitraum von 38 ns–3.8 µs umfassen, erzeugt.

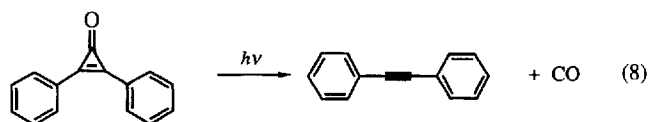
## 4. Organische Reaktionen

Die photoakustische Kalorimetrie ermöglicht es Organikern erstmals, die Reaktionsenthalpien von hochreaktiven Spezies

wie Radikalen, Diradikalen und Carbenen in der kondensierten Phase direkt zu messen. Vor ihrer Entwicklung konnten Energiegrößen für diese Teilchen nur abgeschätzt werden. Die Messungen ermöglichen nun Chemikern eine kritische Wertung theoretischer Vorhersagen über die Bildungs- und Reaktionswärmen hochreaktiver Spezies.

### 4.1. Der Zerfall von Diphenylcyclopropenon

Eine der ersten Anwendungen der photoakustischen Kalorimetrie in der Organischen Chemie war die Abschätzung der Resonanzenergie von Diphenylcyclopropenon<sup>[10]</sup>. Sie wurde aus der Reaktionswärme seines lichtinduzierten Zerfalls in Diphenylacetylen und Kohlenmonoxid [Gl. (8)] und den mit der Gruppenadditivitätsmethode von Benson abgeschätzten Bildungswärmen der beteiligten Moleküle abgeleitet. Die Bestrahlung von Diphenylcyclopropenon in Benzol mit  $\lambda = 337$  nm liefert Diphenylacetylen und CO in einer Quantenausbeute von 1.0. Die experimentell ermittelte Reaktionswärme  $\Delta H_r$  beträgt  $-9.9 \pm 2.9$  kcal mol<sup>-1</sup>. Daraus kann man die Resonanzenergie zu  $-11$  kcal mol<sup>-1</sup> abschätzen<sup>[10]</sup>.



In der ursprünglichen Arbeit wurde angenommen, daß die durch eine Änderung der Molekülkonfiguration verursachte Volumenänderung  $\Delta V_{\text{con}}$  vernachlässigbar ist und die Schallwelle ausschließlich durch Wärmefreisetzung verursacht wird. Vor kurzem untersuchten Hung und Grabowski nun, wie groß der Beitrag von  $\Delta V_{\text{con}}$  beim Zerfall von Diphenylcyclopropenon ist<sup>[11]</sup>. Dazu wurde Reaktion (8) in einer homologen Reihe von Alkanen untersucht, für die sich der thermische Expansionskoeffizient  $\beta$  mit der Kettenlänge ändert, wobei man davon ausging, daß  $\Delta H_r$  und  $\Delta V_{\text{con}}$  in dieser Reihe von Alkanen als Solventien konstant sind. Die Untersuchung lieferte Werte von  $\Delta H_r = -6.7 \pm 1.2$  kcal mol<sup>-1</sup> und  $\Delta V_{\text{con}} = 23 \pm 4$  mL mol<sup>-1</sup>. Diese Volumenänderung liegt in der für die Spaltung von zwei Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen erwarteten Größenordnung; die mittlere Volumenänderung bei der Spaltung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung beträgt 10 mL mol<sup>-1</sup><sup>[11]</sup>.

Diese neuere Arbeit zeigt, daß man für  $\Delta H_r$  von Reaktion (8) einen um 3 kcal mol<sup>-1</sup> zu großen Wert erhält, wenn man den Beitrag von  $\Delta V_{\text{con}}$  vernachlässigt. Offensichtlich kann  $\Delta V_{\text{con}}$  bei Reaktionen, bei denen kovalente Bindungen gebildet oder gespalten werden, einen signifikanten Beitrag zur Amplitude der Schallwelle in organischen Lösungsmitteln liefern.

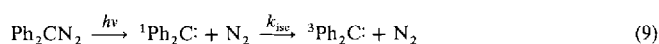
### 4.2. Die Reaktivität von Carbenen

In den letzten Jahren ist sowohl das theoretische als auch das experimentelle Interesse an der Reaktivität von Carbenen wieder erwacht<sup>[12a]</sup>. Obwohl es viele Methoden zur Untersuchung der Reaktivität von Carbenen gibt, wurden bis zur Entwicklung

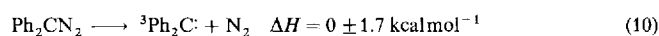
der photoakustischen Kalorimetrie nur wenige Fortschritte bei der Bestimmung der Energiegrößen dieser Reaktionen erzielt. Heute ist man in der Lage, die Enthalpieänderung bei der Bildung von Carbenen und bei deren Reaktion mit einer Vielzahl an Substraten zu messen.

#### 4.2.1. Diphenylcarben

Das dynamische Verhalten, die Struktur und die Reaktivität der Spinzustände von Diphenylcarben sind gut bekannt. Eisinger et al. haben gezeigt, daß die Photolyse von Diphenyldiazomethan innerhalb von 25 ps zum Singulett-Carben führt, das sich in etwa 100 ps durch Intersystem-Crossing in das Triplett-Carben umwandelt [Gl. (9)]<sup>[12b]</sup>. Die Kinetik des zweiten Teilschritts hängt von der Polarität des Lösungsmittels ab. Dagegen weiß man nur wenig über die Energiegrößen bei der Bildung von Diphenylcarben und bei dessen Reaktionen.

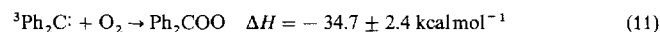


Mit Hilfe der photoakustischen Kalorimetrie bestimmten wir die Enthalpieänderung bei der Bildung von Triplett-Diphenylcarben aus Diphenyldiazomethan in Benzol [Gl. (10)]<sup>[13]</sup>. Die



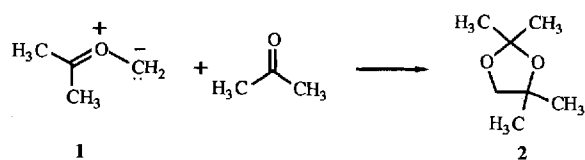
Enthalpieänderung beim Intersystem-Crossing vom Singulett zum Triplett-Diphenylcarben wurde zeitlich nicht aufgelöst, da dieser Vorgang in ca. 100 ps abläuft, die Zeitauflösung des photoakustischen Kalorimeters aber nur etwa 50 ns betrug. Bei der Auswertung der akustischen Daten zur Ermittlung der Reaktionswärme wurde der Beitrag nicht berücksichtigt, der von der bei der Dissoziation auftretenden Vergrößerung des Molekylvolumens des Systems verursacht wird. Entsprechend den Ergebnissen von Grabowski und Hung<sup>[11]</sup> kann die ermittelte Enthalpieänderung deshalb einen Fehler von bis zu 3 kcal mol<sup>-1</sup> aufweisen.

Nach der Bildung des Triplett-Diphenylcarbens entsteht in einer Folgereaktion mit molekularem Sauerstoff Benzophenonoxid, das „Criegee-Intermediat“ [Gl. (11)]<sup>[13]</sup>. In mit Sauerstoff gesättigtem Benzol läuft diese Reaktion innerhalb von 220 ± 29 ns ab.



#### 4.2.2. Alkylcarbene

Goodman et al. untersuchten in einem ausführlichen Forschungsprogramm das dynamische Verhalten und die Energiegrößen bei Reaktionen von Carbenen<sup>[14–20]</sup>. In einer ihrer ersten Arbeiten beschäftigten sie sich mit der Reaktion des Ylids **1** mit Aceton zu 2,2,4,4-Tetramethyl-1,3-dioxolan **2**; das Ylid **1**



wurde dabei durch Photolyse von Diazomethan in Aceton hergestellt<sup>[14]</sup>. Die Enthalpieänderung  $\Delta H$  beträgt bei dieser Reaktion  $-57.1 \pm 13.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Aus der Bildungswärme von Aceton und der berechneten Bildungswärme des Dioxolans **2** erhält man die Bildungswärme  $\Delta H_f(\mathbf{1})$  des Ylids **1** zu  $4.5 \pm 9.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Einer der möglichen Reaktionswege des Ylids **1** ist die Spaltung in Aceton und Singulett-Methylen<sup>[14]</sup>. Aus den Bildungswärmen von **1**, Methylen ( $102 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) und Aceton ( $-52.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) kann man für diese Dissoziation eine Enthalpieänderung von  $45 \text{ kcal mol}^{-1}$  abschätzen. Diese Endothermie spricht dagegen, daß die Spaltung von **1** in nennenswertem Ausmaß auftritt. Der Enthalpiewert für diese Zerfallsreaktion stimmt gut mit dem von Houk et al. für die Spaltung von Formaldehyd-*O*-methylid berechneten Wert von  $38 \text{ kcal mol}^{-1}$  überein<sup>[21]</sup>.

In einer späteren Untersuchung bestimmten Goodman et al. die Enthalpieänderungen bei der Photolyse der Diazirine **3a–d** zu den entsprechenden Carbenen **4a–d**, die dann in einer Einschubreaktion in die O-H-Bindung von Methanol die Ether **5a–d** bilden<sup>[15]</sup>. Die Enthalpieänderungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Aus ihnen wurden die Bildungswärmen  $\Delta H_f$  der Carbene **4a–d** ermittelt (Tabelle 1). Vergleicht man die experi-

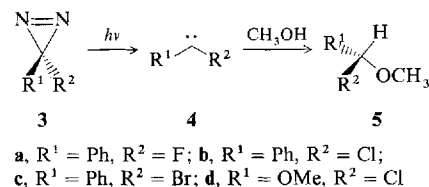


Tabelle 1. Reaktionsenthalpien der Umsetzungen **3a–d** → **4a–d** ( $\Delta H_1$ ) und **4a–d** → **5a–d** ( $\Delta H_2$ ) sowie Bildungswärmen  $\Delta H_f$  von **4a–d**.

Verbindung	$\Delta H_1$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H_2$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H_f$ ( <b>4</b> ) [kcal mol <sup>-1</sup> ]
<b>3a</b>	$-7.9 \pm 2.1$	-49.4	27.3
<b>3b</b>	$-11.1 \pm 1.6$	-50.9	67.1
<b>3c</b>	$-11.4 \pm 2.0$	-50.6	79.8
<b>3d</b>	$-39.9 \pm 2.9$	-31.2	-21.6

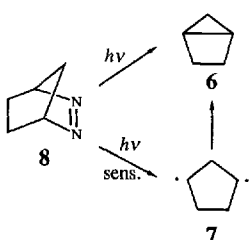
mentell bestimmten Bildungswärmen mit denen aus MNDO-Rechnungen, so erweisen sich die experimentellen Werte durchweg um 10–20 kcal mol<sup>-1</sup> niedriger als die berechneten<sup>[15]</sup>. Als Erklärung für diese Diskrepanz wurde vorgeschlagen, daß  $\Delta V_{\text{con}}$  hier einen signifikanten Beitrag zur Amplitude der Schallwellen liefert oder daß die Solvatationsenergie der Carbene hoch ist. Natürlich könnten auch die MNDO-Rechnungen fehlerhaft sein. Offensichtlich existiert hier ein fruchtbares Gebiet für weitere Arbeiten.

Goodman et al. nutzten die photoakustische Kalorimetrie auch zur Untersuchung von intramolekularen 1,2-Wasserstoffverschiebungen an Halogenmethylcarbenen, die zu Vinylhalogeniden führen; die Carbene wurden dabei photochemisch aus den entsprechenden Diazirinen hergestellt<sup>[17, 19]</sup>. Bei Chlormethylcarben beträgt die Reaktionsenthalpie der 1,2-Wasserstoffverschiebung  $-59.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ; bei Brommethylcarben nimmt dieser Wert auf  $-48.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  ab. Diese Angaben stimmen

gut mit den Ergebnissen von AM1-Rechnungen zu diesen Reaktionen überein.

#### 4.3. Die Reaktivität von 1,3-Diradikalen

Diradikale gelten oft als Intermediate bei thermischen Umlagerungen von Cycloalkanen; daher sollte man ihre Bildungswärmen kennen<sup>[22]</sup>. Es gibt jedoch wenige direkt erhaltene thermodynamische Daten für Diradikale. So beträgt die Bildungswärme des Übergangszustands bei der thermischen Isomerisierung von Bicyclopentan **6**  $76 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Der für die Bildungswärme des 1,3-Diradikals **7** abgeschätzte Wert liegt bei  $67 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Daraus ergäbe sich als Aktivierungsenergie für den Ringschluß von **7** nach **6**  $9 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Experimentell fand man hierfür jedoch nur  $2.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ , so daß die für **7** berechnete Bildungswärme zweifelhaft erscheint<sup>[23]</sup>.



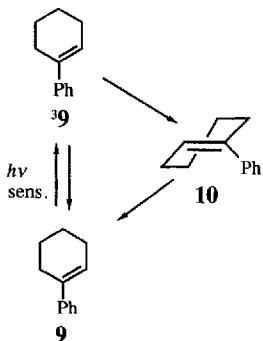
Herman und Goodman bestimmten die Bildungswärme von **7** durch zeitaufgelöste photoakustische Kalorimetrie<sup>[24]</sup>. Bestrahlung des Diazens **8** führt in weniger als 10 ns zu Bicyclopentan **6**; die Reaktionswärme  $\Delta H_{86}$  beträgt dabei  $-20.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Bei Triplett-Sensibilisierung erhält man aus **8** den langlebigen Triplettzustand

von **7** mit einer Reaktionswärme  $\Delta H_{87}$  von  $14.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Die Bildungswärme  $\Delta H_f(7)$  erhält man dann gemäß  $\Delta H_f(7) = \Delta H_f(6) - \Delta H_{86} + \Delta H_{87}$ . Mit  $\Delta H_f(6) = 37.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  beträgt  $\Delta H_f(7)$   $71.5 \pm 2.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Dieser höhere Wert für die Bildungswärme von **7** ist mit der experimentell ermittelten Aktivierungsenergie für den Ringschluß von **7** und der Bildungswärme des Übergangszustands der Isomerisierung von **6** in Einklang.

Diese Untersuchungen zeigten weiterhin, daß die Lebensdauer des Triplettzustands von **7** 316 ns beträgt und somit deutlich kürzer ist, als aus Sauerstoff-Abfangexperimenten abgeleitet wurde (720 ns)<sup>[24]</sup>. Dies war die erste Messung der Lebensdauer eines nichtkonjugierten Diradikals in Lösung.

#### 4.4. Ringspannung von trans-1-Phenylcyclohexen

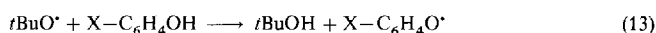
Trotz zahlreicher Versuche, die Spannungsenergien organischer Verbindungen zu quantifizieren, weiß man nur wenig über die Größe der Torsionsspannung an Doppelbindungen in cyclischen Systemen<sup>[25]</sup>. trans-1-Phenylcyclohexen **10** ist ein solches Molekül. Durch Triplett-Sensibilisierung mit Benzophenon entsteht aus cis-1-Phenylcyclohexen **9** dessen Triplettzustand **39** mit einer Lebensdauer von 65 ns. **39** reagiert dann in einer Quantenausbeute von 0.36 zu trans-1-Phenylcyclohexen **10**, und das wiederum lagert sich innerhalb von 9  $\mu\text{s}$  in **9** um.



Durch photoakustische Kalorimetrie bestimmten wir die Spannungsenergie von **10** – definiert als Differenz der Enthalpien von **10** und **9** – zu  $44.7 \pm 5.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ <sup>[25]</sup>. Die Energie des Triplettzustands **39** beträgt  $56.0 \pm 3.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Dies war die erste direkt ermittelte Energie des relaxierten Triplettzustands eines Alkens. In den Folgejahren wurden einige Arbeiten veröffentlicht, bei denen die photoakustische Kalorimetrie zur Untersuchung der Energie des relaxierten Triplettzustands von Alkenen und Dienen eingesetzt wurde<sup>[26–29]</sup>.

#### 4.5. Die Enthalpie von O-H-Bindungen

Eine weitere Anwendung der zeitaufgelösten photoakustischen Kalorimetrie ist die Untersuchung von Substituenteneinflüssen auf die Enthalpie der O-H-Bindung in Phenolen<sup>[13, 30]</sup>. Diese Bindungsenthalpie kann aus der Reaktionswärme der Abstraktion des OH-Wasserstoffatoms durch das *tert*-Butoxy-Radikal und der bekannten Enthalpie der O-H-Bindung von *tert*-Butylalkohol abgeleitet werden. Die Gleichungen (12) und (13) fassen die Reaktionen zusammen.



Die O-H-Bindungsenthalpie und die Kinetik der Wasserstoffabstraktion wurden an mehreren substituierten Phenolen bestimmt (Tabelle 2)<sup>[13]</sup>. Der für Phenol erhaltene Wert von 84.4

Tabelle 2. Bindungsdissoziationsenergien (BDE) für die Wasserstoffabstraktion aus substituierten Phenolen (0.06 M in Benzol) durch das *tert*-Butoxy-Radikal und zugehörige Halbwertszeiten  $\tau$ .

Phenol	BDE [ $\text{kcal mol}^{-1}$ ]	$\tau$ [ns]
4-Cyanphenol	$88.2 \pm 1.1$	227
Phenol	$84.4 \pm 1.1$	175
4- <i>tert</i> -Butylphenol	$83.2 \pm 0.8$	213
4-Phenylphenol	$83.0 \pm 1.1$	151
4-Methoxyphenol	$77.9 \pm 0.9$	128

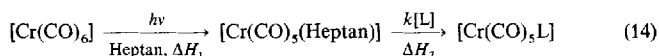
$\pm 1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$  stimmt gut mit dem aus Gasphasenmessungen stammenden von  $86.5 \pm 2.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  überein<sup>[13]</sup>. Man findet außerdem eine Korrelation zwischen der Kinetik der Wasserstoffabstraktion und den Bindungsdissoziationsenergien.

#### 5. Metallorganische Reaktionen

Die Kenntnis von Metall-Ligand- und Metall-Metall-Bindungsenthalpien ist für das Verständnis der Reaktivität und Selektivität in der metallorganischen Chemie von großer Bedeutung. Bis heute gibt es jedoch nur wenige thermochemische Untersuchungen über Bindungsenergien metallorganischer Verbindungen in Lösung. Das Aufkommen der photoakustischen Kalorimetrie hat diese Situation geändert; inzwischen ist eine Reihe von Metall-Ligand-, Metall-Wasserstoff- und Metall-Metall-Bindungsenthalpien bekannt.

## 5.1. Die Enthalpie von Metall-Ligand-Bindungen

Die erste metallorganische Verbindung, die mit der photoakustischen Kalorimetrie untersucht wurde, war  $[\text{Cr}(\text{CO})_6]$ <sup>[31, 32]</sup>. Bestrahlt man  $[\text{Cr}(\text{CO})_6]$  in Heptan mit  $\lambda = 337 \text{ nm}$ , so wird ein CO-Ligand abgespalten, und es folgt innerhalb von Picosekunden die Komplexbildung durch das Lösungsmittel. In Gegenwart eines Liganden L wird das koordinierte Solvensmolekül anschließend verdrängt [Gl. (14)].



Die Werte für  $\Delta H_1$ ,  $\Delta H_2$  und  $k$  sind für eine Reihe von Liganden in Tabelle 3 zusammengestellt. Die bei Gasphasenmessungen ermittelte Enthalpie für die Abspaltung eines CO-Liganden aus  $[\text{Cr}(\text{CO})_6]$  beträgt  $36.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ <sup>[33]</sup>, die Enthalpie  $\Delta H_1$

Tabelle 3. Reaktionsenthalpien für die Substitution von CO in  $[\text{Cr}(\text{CO})_6]$  durch Heptan ( $\Delta H_1$ ) und für die Substitution von Heptan in  $[\text{Cr}(\text{CO})_5(\text{Heptan})]$  durch L ( $\Delta H_2$ ) sowie die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten  $k$ .

L	$\Delta H_1$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H_2$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$k$ [10 <sup>-7</sup> L mol <sup>-1</sup> ]
THF	27.2 ± 1.2	-12.4 ± 1.2	11.8
2,5-Dimethyltetrahydrofuran	27.1	-10.8	5.3
Ethanol	26.5	-13.8	3.6
Aceton	27.3	-13.5	15.9
Acetonitril	26.8	-18.2	27.1
<i>n</i> -Bu <sub>3</sub>	27.3	-12.2	1.2
<i>n</i> -Bu <sub>3</sub>	26.3	-21.6	—
1-Hexen	27.2	-12.2	3.0
2,3-Dimethyl-2-buten	27.2	-9.6	2.6

für die Substitution von CO durch Heptan ist  $27 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Die Differenz dieser beiden Werte ( $9.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) ist die Enthalpie für die Koordination von Heptan an  $[\text{Cr}(\text{CO})_5]$ . Wie erwartet sind *n*-Bu<sub>3</sub> und Acetonitril die Liganden mit der größten Bindungsenergie. Die Bindungsenergien der anderen Liganden sind sehr ähnlich; bemerkenswerte Ausnahmen sind 2,5-Dimethyltetrahydrofuran, dessen Bindungsenergie  $1.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  geringer ist als die von THF, und 2,3-Dimethyl-2-buten, dessen Bindungsenergie  $2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  unter der von 1-Hexen liegt. Diese Unterschiede werden auf Unterschiede in den sterischen Wechselwirkungen zurückgeführt.

Die Kinetik der Verdrängung von Heptan aus  $[\text{Cr}(\text{CO})_5(\text{Heptan})]$  korreliert nicht mit den Reaktionsenthalpien. In erster Linie scheint die Substitutionsgeschwindigkeit durch die sterischen Anforderungen des eintretenden Liganden bestimmt zu werden. Es gibt jedoch einige bemerkenswerte Ausnahmen, z.B. ist die Geschwindigkeitskonstante für Ethanol kleiner als aufgrund sterischer Überlegungen erwartet. Möglicherweise ist diese Anomalie auf Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen.

Bei einer ähnlichen Untersuchung fanden Klassen und Yang für die Enthalpieänderung beim Austausch von Heptan in  $[\text{Cr}(\text{CO})_5(\text{Heptan})]$  durch *cis*-Cycloocten einen Wert für  $\Delta H_2$  von  $-14.2 \pm 0.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  und beim Austausch durch *trans*-Cycloocten einen von  $-19.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ <sup>[34]</sup>. Die größere Bindungsenthalpie für *trans*-Cycloocten ( $\Delta\Delta H_2 = -5 \text{ kcal mol}^{-1}$ )

wird darauf zurückgeführt, daß sich bei der Bindung an das Metallzentrum die Hybridisierung der olefinischen Kohlenstoffatome ändert und dadurch die Spannung in *trans*-Cycloocten abnimmt.

Yang et al. untersuchten auch die Metall-Ligand-Bindungsdissoziationsenergien von  $[\text{CpMn}(\text{CO})_2\text{L}]$ -Komplexen [Gl. (15), Tabelle 4]<sup>[35–37]</sup>.

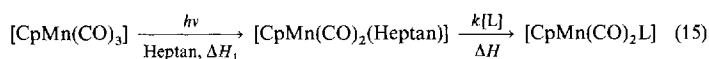


Tabelle 4. Reaktionsenthalpien für die Substitution von CO in  $[\text{CpMn}(\text{CO})_3]$  durch Heptan ( $\Delta H_1$ ) und für die Substitution von Heptan in  $[\text{CpMn}(\text{CO})_2(\text{Heptan})]$  durch L ( $\Delta H_2$ ) sowie die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten  $k$ .

L	$\Delta H_1$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H_2$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$k$ [10 <sup>-6</sup> L mol <sup>-1</sup> ]
THF	46.2 ± 1.2	-16.1 ± 1.4	4.4 ± 0.1
Aceton	47.8 ± 1.7	-17.4 ± 1.0	3.6 ± 0.4
<i>cis</i> -Cycloocten	47.6 ± 1.4	-24.5 ± 2.3	2.3 ± 0.4
Bu <sub>2</sub> S	45.3 ± 1.4	-28.7 ± 2.2	8.2 ± 0.5
Et <sub>3</sub> SiH	46.7 ± 2.2	-20.1 ± 2.1	2.5 ± 0.5

Vergleicht man die Metall-CO-Bindungsenthalpie in  $[\text{Cr}(\text{CO})_6]$  und in  $[\text{CpMn}(\text{CO})_3]$ , so findet man für die Mn-CO-Bindung einen um  $20 \text{ kcal mol}^{-1}$  größeren Wert als für die Cr-CO-Bindung. Die Bindungsenthalpie von Heptan in  $[\text{CpMn}(\text{CO})_2(\text{Heptan})]$  läßt sich nicht berechnen, da die Mn-CO-Bindungsenthalpie in der Gasphase nicht bekannt ist.

## 5.2. Die Enthalpie von Metall-Metall-Bindungen

Zur Ermittlung der Metall-Metall-Bindungsenthalpie von  $[\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}]$  wurden mehrere Methoden eingesetzt<sup>[38]</sup>. Die erhaltenen Werte schwanken stark:  $16, 22.5$  und  $34 \pm 13 \text{ kcal mol}^{-1}$  thermochemisch,  $19–28 \text{ kcal mol}^{-1}$  mit der Elektronenstoß-Massenspektrometrie,  $36.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  aus Kinetikmessungen in Lösung und  $41 \pm 9 \text{ kcal mol}^{-1}$  mit der ICR-Photoelektronenspektroskopie (ICR = Ionen-Cyclotron-Resonanz). Diese Streuung verdeutlicht, wie schwierig es ist, für Metall-Metall-Bindungsenthalpien verlässliche thermochemische Daten zu erhalten.

Bei einer Studie zur Kinetik der photochemischen Dissoziation von  $[\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}]$  im Picosekundenbereich fanden wir, daß es zwei Reaktionswege gibt: Spaltung der Metall-Metall-Bindung zu zwei  $[\text{Mn}(\text{CO})_5]$ -Teilchen und Abspaltung eines CO-Liganden unter Bildung von  $[\text{Mn}_2(\text{CO})_9]$  und CO. Beide Reaktionen erfolgen innerhalb von 25 ps nach der Anregung<sup>[38]</sup>. Die Spaltung der Metall-Metall-Bindung dominiert dabei, denn die Quantenausbeute beträgt für die CO-Abspaltung nur 0.1. Mit dem früher bestimmten Wert von  $36 \text{ kcal mol}^{-1}$  für die Mn-CO-Bindungsenthalpie<sup>[38]</sup> erhält man für die Mn-Mn-Bindung in  $[\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}]$  einen Wert von  $38.0 \pm 5.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

## 5.3. Die Enthalpie von Metall-Wasserstoff-Bindungen

Reaktionen, an denen Metall-Wasserstoff-Bindungen beteiligt sind, spielen in der metallorganischen Chemie eine zentrale

Rolle, und trotzdem ist nur wenig über deren Bindungsenthalpien bekannt. Im allgemeinen nutzt man zur Bestimmung dieser thermochemischen Größe die Wasserstoffabstraktion aus einem Metallhydrid durch das *tert*-Butoxy-Radikal [Gl. (16), siehe auch Abschnitt 4.5].



Wir ermittelten auf diese Art die Metall-Wasserstoff-Bindungsenthalpie in  $[(\eta^5-C_5Me_5)(PMe_3)IrH_2]^{[39]}$  und erhielten  $72.9 \pm 4.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Dieser Wert stimmt ausgezeichnet mit dem aus Kinetikmessungen erhaltenen von  $74 \text{ kcal mol}^{-1}$  überein. Das Verfahren sollte zur Bestimmung von Metall-Wasserstoff-Bindungsenthalpien allgemein anwendbar sein.

## 6. Reaktionen von Proteinen

Das Verständnis des Zusammenspiels von molekularer Beweglichkeit und Funktion eines Proteins ist für die Entwicklung von funktionellen Enzymmodellen von zentraler Bedeutung. Röntgenographisch ermittelte Proteinstrukturen sind eine reichhaltige Quelle, um ein Verständnis von Proteinfunktionen zu entwickeln. Das Bild bleibt jedoch unvollständig, wenn man die Zwischenstufen, die bei der Wirkung von Proteinen eine Rolle spielen, nicht genau kennt. Man möchte gerne verstehen, wie die Dynamik und die Energetik der Substratbindung und der katalytischen Wirkung durch die Struktur eines Proteins bestimmt werden. Inzwischen gibt es eine Reihe von Methoden, die Informationen über die Zwischenstufen von Proteinreaktionen liefern. Dazu gehören zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie, Raman-, EPR-, NMR- und IR-Spektroskopie. Es mangelt jedoch vor allem an Wissen über die Dynamik der Enthalpieänderungen und der entsprechenden, die Proteinfunktion bestimmenden Bewegungen auf molekularer Ebene für sehr kurze Zeitspannen. Die photoakustische Kalorimetrie liefert nun erste Einblicke in diesen Aspekt der Proteinfunktion.

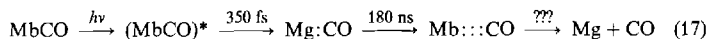
Die photoakustische Kalorimetrie diene beispielsweise zur Untersuchung der Dynamik der Photodissoziation von Kohlenmonoxid aus Carboxymyoglobin<sup>[40–42]</sup> und aus Carboxyhämoglobin<sup>[43]</sup>, zur Untersuchung der Energetik der beim Ausbleichen des Sehproteins Rhodopsin auftretenden Zwischenstufen<sup>[44]</sup>, der Dynamik der Protonenpumpe bei Bacteriorhodopsin<sup>[45]</sup> sowie zur Untersuchung des Elektronentransfers in Reaktionszentren und der Photochemie und -physik der pflanzlichen Photopigmente Phytochrom und Chlorophyll<sup>[46, 47]</sup>.

### 6.1. Myoglobin

Eines der am besten untersuchten Proteine ist Pottwal-Myoglobin, ein Eiweißmolekül, das zur Speicherung von Sauerstoff dient. Obwohl man den Mechanismus der Myoglobinfunktion in zahlreichen experimentellen und theoretischen Arbeiten untersucht hat, blieben zwei grundlegende Fragen bestehen. Die erste ist die nach dem Weg, auf dem ein Ligand von der Häm-Tasche zum Lösungsmittel diffundiert und umgekehrt. Die zweite ist, wie die Proteinstruktur die Bindungsenergie dieses Liganden

beeinflusst. Röntgenstrukturuntersuchungen belegen, daß es keine Kanäle gibt, die die Häm-Tasche direkt mit dem Lösungsmittel verbinden und durch die der Ligand diffundieren könnte. Daher muß das Protein deutliche Strukturänderungen eingehen, um die Diffusion eines Liganden zu ermöglichen. Über die Dynamik und die Energetik dieser Vorgänge weiß man nichts. Mit der photoakustischen Kalorimetrie gelangen uns nun erste Einblicke in die Natur solcher Prozesse.

Die Photophysik von Carboxymyoglobin MbCO ist gut verstanden [Gl. (17)]<sup>[48]</sup>. Nach Absorption eines Lichtquants zer-



fällt sein angeregter Zustand durch Spaltung der Fe-CO-Bindung innerhalb von 350 fs zum Molekülpaar Mb:CO, bei dem sich der Ligand noch in der Häm-Tasche befindet. Innerhalb von 180 ns diffundiert CO dann bei Raumtemperatur aus der Häm-Tasche in die Proteinmatrix (Mb:::CO) und dann in das Lösungsmittel (Mb + CO). Die Dynamik des zuletzt genannten Vorgangs ist unbekannt.

Abbildung 2 zeigt zeitaufgelöste photoakustische Spektren von MbCO und der Eichsubstanz Desoxymyoglobin Mb nach Bestrahlung. Mb wandelt die gesamte Energie des Photons in

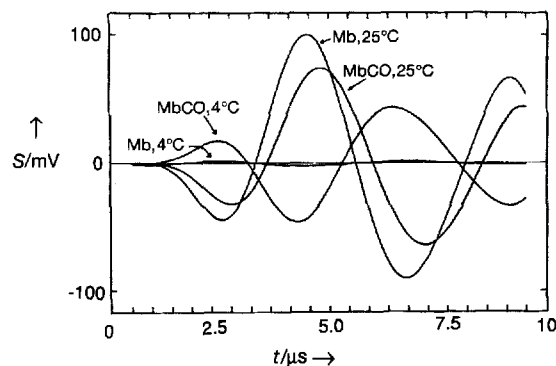
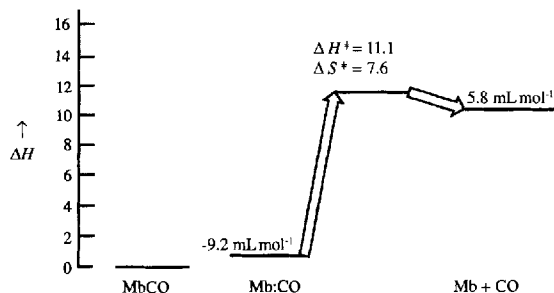


Abb. 2. Temperaturabhängigkeit des photoakustischen Signals von Carboxymyoglobin MbCO ( $1.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) und Desoxymyoglobin Mb ( $1.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) in  $0.1 \text{ M}$  Tris/HCl, pH 8.0.  $T = 25$  und  $4^\circ\text{C}$ , Bestrahlung mit  $\lambda = 510 \text{ nm}$ .

Wärme um, ohne dabei seine Konformation zu ändern. Bei  $25^\circ\text{C}$  ist die MbCO-Schallwelle stark gegenüber der Mb-Schallwelle verschoben; dies zeigt, daß hier dynamische Prozesse im Nanosekundenbereich ablaufen. Um zu ermitteln, ob es sich dabei um Konformationsänderungen handelt, wurde die Temperatur der wäßrigen Lösung auf  $4^\circ\text{C}$  erniedrigt; dabei nähert sich der thermische Expansionskoeffizient des Systems dem Wert Null. Bei dieser Temperatur führen ausschließlich Änderungen der Proteinstruktur,  $\Delta V_{\text{con}}$ , zu Schallwellen. Tatsächlich verschwindet die Amplitude der Mb-Schallwelle bei  $4^\circ\text{C}$  fast völlig, da diese Eichsubstanz im Nanosekundenbereich eine Änderung ihrer Struktur eingeht. Für MbCO tritt jedoch auch bei  $4^\circ\text{C}$  eine ausgeprägte Schallwelle auf, und zwar mit einer negativen Anfangsamplitude; diese Schallwelle ist ausschließlich auf Strukturänderungen im Protein-Solvens-System zurückzuführen. Die Analyse der Temperaturabhängigkeit der Schallwellen ergab, daß es mindestens zwei Zerfallsprozesse gibt, und für beide wurden die Enthalpie- und Volumenände-

rungen ermittelt<sup>[40]</sup>. Aus der Temperaturabhängigkeit der Kinetik des zweiten Zerfalls wurden auch die thermodynamischen Aktivierungsparameter abgeleitet.

Die Ergebnisse lassen sich gemäß Schema 1 zusammenfassen: Nach Lichtabsorption zerfällt MbCO in weniger als 10 ns zum Molekülpaar Mb:CO. Die damit verknüpfte Enthalpieände-



Schema 1. Energiediagramm für die Freisetzung von CO aus Carboxymyoglobin MbCO,  $\Delta H$  in  $\text{kcal mol}^{-1}$ ,  $\Delta S$  in  $\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ .

rung beträgt  $0.6 \pm 2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  und die Volumenänderung  $-9.2 \pm 0.5 \text{ mL mol}^{-1}$ . Bei  $22^\circ\text{C}$  findet innerhalb von 700 ns ein zweiter Zerfallsprozess mit einer Enthalpieänderung von  $10.7 \pm 1.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  und einer Volumenänderung von  $15.0 \pm 0.4 \text{ mL mol}^{-1}$  statt. Dieser zweite Schritt besitzt eine Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  von  $11.1 \pm 0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  und eine Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  von  $7.6 \pm 1.9 \text{ cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ .

Am überraschendsten ist, daß die Enthalpieänderung bei der Bildung des Molekülpaars  $0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  und die entsprechende Volumenänderung  $-9.2 \text{ mL mol}^{-1}$  beträgt. Da die Bildung des Molekülpaars die Spaltung der Fe-CO-Bindung erfordert, erwarteten wir, daß die Enthalpieänderung die Fe-CO-Bindungsenthalpie, ungefähr  $20 \text{ kcal mol}^{-1}$ , widerspiegeln und die Volumenänderung positiv sein würde. Kürzlich wurde jedoch basierend auf Röntgenstrukturuntersuchungen, die Vermutung geäußert, daß auf dem Weg, auf dem der Ligand aus dem Protein herausdiffundiert, eine Salzbrücke zwischen Arginin-45 und der Propionatseitenkette aufgebrochen werden muß<sup>[48]</sup>. Durch das Aufbrechen der Salzbrücke und die sich anschließende Solvation der beiden Ladungszentren wird zum einen Wärme in die Lösung abgegeben und zum anderen eine Elektrokontraktion des Wassers um die Ladungszentren ausgelöst, die zur beobachteten Volumenabnahme führt.

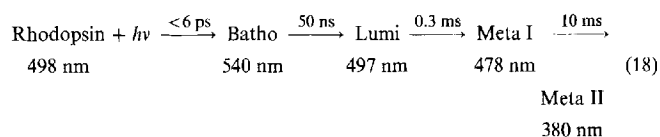
Um die Rolle der Arginin-45-Salzbrücke aufzuklären, wurde bei Pottwal-Myoglobin diese Aminosäure durch Asparagin, das keine Salzbrücke bildet, ersetzt und das photoakustische Spektrum aufgenommen<sup>[41]</sup>. Ohne die Salzbrücke ändert sich der Wert der Volumenänderung bei der Bildung des Molekülpaars von  $-9.2$  auf  $-4.7 \text{ mL mol}^{-1}$ , und die Enthalpieänderung steigt auf  $8.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Offensichtlich ist das Aufbrechen der Arginin-45-Salzbrücke an der Diffusion des Liganden aus dem Protein beteiligt.

Diese Arbeiten sowie analoge Untersuchungen an Pferde-Carboxymyoglobin<sup>[42]</sup> und an menschlichem Carboxyhämoglobin<sup>[43]</sup> lieferten erste detaillierte Informationen über die im Nanosekundenbereich ablaufende Dynamik von Enthalpie- und Volumenänderungen bei der Diffusion des CO-Liganden in Häm-Proteinen.

## 6.2. Rhodopsin

Das Sehprotein Rhodopsin (39 kD) ist Bestandteil der Scheibchen-Membranen des äußeren Segments der Stäbchenzellen der Retina. Wegen der heterogenen Umgebung ist die Untersuchung der Dynamik der bei der Bleichung von Rhodopsin auftretenden Enthalpie- und Volumenänderungen eine besondere Herausforderung<sup>[44]</sup>.

Nach der Absorption von Licht durchläuft Rhodopsin eine Reihe spektroskopisch unterscheidbarer Zwischenstufen, die für seine Funktion, die Weiterleitung visueller Reize auszulösen, wichtige Änderungen der Proteinstruktur widerspiegeln [Gl. (18)]. Das Intermediat Metarhodopsin II aktiviert das G-Protein Transducin, das die Enzymkaskade für die Weiterleitung visueller Reize startet.



Die Zeitauflösung unseres photoakustischen Kalorimeters (100 ns) ermöglichte die Bestimmung der Enthalpie- und Volumenänderungen, die mit der Bildung von Lumirhodopsin – dies geschieht bei Raumtemperatur in 50 ns – einhergehen<sup>[44]</sup>, nicht jedoch die getrennte Messung des Schritts von Batho- zu Lumirhodopsin. Auch der in 300  $\mu\text{s}$  ablaufende Zerfall von Lumi- zu Metarhodopsin I liegt außerhalb der Zeitauflösung des Experiments.

Der schwierigste Aspekt einer photoakustischen Untersuchung von Rhodopsin ist es, eine Eichsubstanz zu finden. Wegen der Heterogenität der Lösung muß man zeigen, daß die Proteinlösung und die Eichsubstanz den gleichen  $\beta/C_p q$ -Wert haben. Mit photochemisch inertem gebleichtem Rhodopsin ohne den 11-*cis*-Retinal-Chromophor konnten wir belegen, daß die Eichsubstanz Bromkresolpurpur in einer zweiprozentigen Lösung des Detergens Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid den gleichen  $\beta/C_p q$ -Wert hat wie gebleichtes Rhodopsin in der gleichen Detergenlösung. Daher untersuchten wir das photoakustische Spektrum von Rinder-Rhodopsin in zweiprozentiger Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid-Lösung<sup>[43]</sup>.

Die gesamte Enthalpie- und Volumenänderung bei der Bildung von Lumirhodopsin beträgt  $3.9 \pm 5.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  bzw.  $29.1 \pm 0.8 \text{ mL mol}^{-1}$ . Bei einer früheren kalorimetrischen Untersuchung bei tiefer Temperatur ( $-75^\circ\text{C}$ ) erhielt man für die Enthalpieänderung bei der Bildung von Lumirhodopsin einen Wert von  $26.3 \pm 4.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ <sup>[44]</sup>. Eine mögliche Erklärung für die Differenz der beiden Enthalpiewerte könnte eine Störung der Energetik von Lumirhodopsin durch die Tieftemperaturmatrix sein. Nach der Photoaktivierung durchläuft Rhodopsin eine Reihe von Konformationsänderungen, die sich in Änderungen des Absorptionsspektrums des Chromophors zeigen. Vermutlich spiegelt die bei der photoakustischen Kalorimetrie gemessene Volumenänderung von  $29.1 \text{ mL mol}^{-1}$  einige dieser Konformationsänderungen wider. In einem Glycerin-Wasser-Glas bei tiefer Temperatur ist photoaktiviertes Rhodopsin möglicherweise nicht zu strukturellen Änderungen in der Lage; dies würde zu erhöhter Spannung im Protein und damit zu einer Enthalpiezunahme im System führen. Es ist offensichtlich wichtig, die Dynamik von



Enthalpie- und Volumenänderungen bei Proteinen unter ange-nähert physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Die photoakustische Kalorimetrie hat bereits viele neue Ein-blicke in organische und metallorganische Reaktionen sowie in die Dynamik von Proteinen ermöglicht. Trotzdem ist es sicherlich nötig, die Zeitauflösung in den Pikosekundenbereich auszudeh-nen. Mit Transducern aus dünnen Polyvinylidendifluorid-Fil-men, Picosekundenlasern und Gigahertz-Transientenrekordern sollte eine Zeitauflösung von 100 ps schon in allernächster Zu-kunft möglich sein. Die Ausdehnung der Zeitauflösung in den 10ps-Bereich ist schwieriger und verlangt eine andere Technik. Die von Zimmt et al.<sup>[49, 50]</sup> entwickelten Methoden der opti-schen Pikosekunden-Kalorimetrie sind der vielversprechendste Ansatz für diese Zeitdomäne.

Ein Gebiet der organischen und metallorganischen Chemie, auf dem es bisher nur wenige photoakustische Untersuchungen gibt, sind Reaktionen, bei denen Ladungen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln gebildet oder vernichtet werden. Die Bildung eines Ladungszentrums wird von einer Elektrokontraktion des Lösungsmittels in der Umgebung des Ions begleitet; dies führt zu einem signifikanten Beitrag von  $\Delta V_{\text{con}}$  zur gesamten Schall-welle. Daher wird es äußerst schwierig, die thermischen Effekte und die molekularen Konformationsänderungen getrennt zu be-trachten. Die Methode von Grabowski et al.<sup>[11]</sup> eignet sich wohl für Alkane, aber bei polareren Lösungsmitteln, bei denen spezi-fische Solvatationsvorgänge eine zunehmende Bedeutung für die Gesamtstabilität der geladenen Teilchen haben, bewirkt eine Änderung der Zusammensetzung des Lösungsmittels, um einen anderen Wert für  $\beta/C_p Q$  zu erhalten, zweifellos eine Störung der Gesamtenthalpie der Reaktion. Das bedeutet: Solange es kein neues Verfahren gibt, um die thermischen Beiträge zur gesamten Schallwelle von den durch Konfigurationsänderungen beding-ten zu trennen, bleibt der photoakustischen Kalorimetrie ein sehr wichtiger Reaktionstyp, nämlich die Bildung und die Ver-nichtung von Ladung, verschlossen.

*Die National Science Foundation, die Petroleum Research Foundation und die National Institutes of Health haben meine Arbeit unterstützt. Es ist mir auch eine große Freude, die Arbeit meiner früheren Kollegen zu würdigen, die viel zum Fortschritt der photoakustischen Kalorimetrie beigetragen haben: Lewis Rothberg, Mark Bernstein, John Simon, Joe Grabowski, Jeanne Rudzki, Josh Goodman, Gil Yang, Judy Westrick, Kathleen Marr, Gary Snyder und Chris Norris. Außerdem danke ich den Professoren Veronica Vaida, Richard Caldwell und Stephen Sligar für die Zusammenarbeit.*

Eingegangen am 8. März 1993 [A 930]

- [1] A. G. Bell, *Philos. Mag.* **1881**, 11, 510.
- [2] J. B. Callis, W. W. Parson, M. Gouterman, *Biochem. Biophys. Acta* **1972**, 267, 348.
- [3] J. E. Rudzki, J. L. Goodman, K. S. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7849.
- [4] C. K. N. Patel, A. C. Tam, *Rev. Mod. Phys.* **1981**, 53, 517.
- [5] K. Heihoff, S. E. Braslavsky, *Chem. Phys. Lett.* **1986**, 131, 183.
- [6] L. G. Arnaut, R. A. Caldwell, J. E. Elbert, L. A. Melton, *Rev. Sci. Instrum.* **1992**, 63, 5381.
- [7] S. E. Braslavsky, G. E. Heibel, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1381.
- [8] A. C. Tam, *Rev. Mod. Phys.* **1986**, 58, 381.
- [9] J. Rudzki Small, L. J. Libertini, E. W. Small, *Biophys. Chem.* **1992**, 42, 29.
- [10] J. J. Grabowski, J. D. Simon, K. S. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4615.
- [11] R. R. Hung, J. J. Grabowski, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 351.
- [12] a) M. S. Platz in *Kinetics and Spectroscopy of Carbenes and Biradicals* (Hrsg.: M. S. Platz), Plenum, New York, **1990**, S. 143; b) K. B. Eissenthal, N. J. Turro, M. Aikawa, J. A. Butcher, C. DuPuy, G. Hefferon, W. Hetherington, G. M. Korenowski, M. J. McAuliffe, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6563.
- [13] K. S. Peters in *Kinetics and Spectroscopy of Carbenes and Biradicals* (Hrsg.: M. S. Platz), Plenum, New York, **1990**, S. 37–49.
- [14] J. A. LaVilla, J. L. Goodman, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 2623.
- [15] J. A. LaVilla, J. L. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 712.
- [16] M. S. Herman, J. L. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 1849.
- [17] J. A. LaVilla, J. L. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6877.
- [18] J. A. LaVilla, J. L. Goodman, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 6287.
- [19] J. A. LaVilla, J. L. Goodman, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 5109.
- [20] X. M. Du, H. Fan, J. L. Goodman, M. A. Kesselmayr, K. Krogh-Jespersen, J. A. LaVilla, R. A. Moss, S. Shen, R. S. Sheridan, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1920.
- [21] K. N. Houk, N. G. Rondau, C. Santiago, C. J. Gallo, R. W. Gandour, G. W. Griffen, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 1504.
- [22] W. von E. Doering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 5279.
- [23] S. L. Buchwalter, G. L. Closs, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 101, 4688.
- [24] M. S. Herman, J. L. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2681.
- [25] J. L. Goodman, K. S. Peters, H. Misawa, R. A. Caldwell, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6803; zur Ringspannung in einem Brückenkopf-Imin siehe G. S. Wayne, G. J. Snyder, D. W. Rogers, *ibid.* **1993**, 115, 9860.
- [26] J. A. LaVilla, J. L. Goodman, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, 141, 149.
- [27] D. I. Schuster, G. E. Heibel, R. A. Caldwell, W. Tang, *Photochem. Photobiol.* **1990**, 52, 645.
- [28] T. Ni, R. A. Caldwell, L. A. Melton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 457.
- [29] C. M. Brennan, R. A. Caldwell, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 53, 165.
- [30] P. Mulder, O. W. Saastad, D. Griller, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4090.
- [31] G. K. Yang, K. S. Peters, V. Vaida, *Chem. Phys. Lett.* **1986**, 125, 566.
- [32] G. K. Yang, V. Vaida, K. S. Peters, *Polyhedron* **1988**, 7, 1619.
- [33] K. E. Lewis, D. M. Golden, G. P. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3905.
- [34] J. K. Klassen, G. K. Yang, *Organometallics* **1990**, 9, 874.
- [35] J. K. Klassen, M. Selke, A. A. Sorensen, G. K. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1267.
- [36] A. A. Sorensen, G. K. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7061.
- [37] D. M. Hester, J. Sun, A. W. Harper, G. K. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5234.
- [38] G. L. Goodman, K. S. Peters, V. Vaida, *Organometallics* **1986**, 5, 815.
- [39] S. P. Nolan, C. D. Hoff, P. O. Stoutland, L. J. Newman, J. M. Buchanan, R. G. Bergman, G. K. Yang, K. S. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3143.
- [40] J. A. Westrick, J. L. Goodman, K. S. Peters, *Biochemistry* **1987**, 26, 8313.
- [41] J. A. Westrick, K. S. Peters, J. D. Ropp, S. G. Sligar, *Biochemistry* **1990**, 29, 6741.
- [42] J. A. Westrick, K. S. Peters, *Biophys. Chem.* **1990**, 37, 73.
- [43] K. S. Peters, T. Watson, T. Logan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4276.
- [44] K. Marr, K. S. Peters, *Biochemistry* **1991**, 30, 1254.
- [45] D. R. Ort, W. W. Parson, *Biophys. J.* **1979**, 25, 355.
- [46] H. Arta, W. W. Parson, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 638, 201.
- [47] K. Jabben, K. Heihoff, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Photochem. Photobiol.* **1986**, 43, 127.
- [48] K. S. Peters, T. Watson, K. Marr, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, 20, 243.
- [49] M. B. Zimmt, *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* **1991**, 1599, 115.
- [50] J. Morais, J. Ma, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 3885.