

ENDOR-Spektroskopie – eine fortschrittliche Methode zur Strukturuntersuchung organischer Radikale

Von Harry Kurreck*, Burkhard Kirste und Wolfgang Lubitz

Der Name „Endor“ bezeichnet seit biblischer Zeit einen kleinen Ort in der Nähe des Sees Genezareth (etwa 1000 v. Chr., 1. Sam. 28, 7 ff.). Das Akronym „ENDOR“ (Electron Nuclear DOuble Resonance) kennzeichnet die Erweiterung der Elektronenspinresonanz- zur Elektron-Kern-Doppelresonanzspektroskopie, einer Methode, die der Untersuchung komplizierterer paramagnetischer Moleküle neue Dimensionen eröffnet hat. Erst die im letzten Jahrzehnt technisch ausgereifte ENDOR-Spektroskopie sprengt die Auflösungsgrenzen der EPR-Spektroskopie und ermöglicht so beispielsweise interessante Anwendungen in biochemischen Bereichen. ENDOR-Untersuchungen haben zu neuen Einsichten in den Primärprozeß der Photosynthese, die Wirkungsweise von Vitamin E und K sowie den Mechanismus der Katalyse durch Flavoenzyme in biologischen Redoxketten geführt. ENDOR und die Erweiterung zum Dreifachresonanzexperiment TRIPLE bieten unter anderem die Möglichkeit zur genauen Bestimmung von Hyperfeinkopplungskonstanten einschließlich ihrer oft besonders interessierenden Vorzeichen. Neben Protonen sind viele andere Kerne „ENDOR-fähig“, z. B. ^2H , ^{13}C , ^{14}N . Die ENDOR-Technik ist nicht auf Monoradikale beschränkt, sondern kann auch auf Polyradikale in Spinzuständen höherer Multiplizitäten angewendet werden (Triplett-, Quartett-, Quintett-Zustand). Die Meßgrößen lassen Aussagen über Spin- und Ladungsdichteverteilungen, Radikalstrukturen und die innermolekulare Dynamik zu. Sie sind für die Prüfung der Ergebnisse quantenmechanischer Rechnungen hervorragend geeignet.

1. Einleitung – Warum Elektron-Kern-Doppel- und -Dreifachresonanz?

Die Chemie der „freien Radikale“ beginnt im Jahre 1900 mit den klassischen Versuchen von *Gomberg* zur Erzeugung und zum chemischen Nachweis des Triphenylmethyl-Radikals. Als Meilenstein auf dem Wege zur Erforschung paramagnetischer Systeme schlechthin kann das erste, von *Zavoisky* im Jahre 1945 ausgeführte Elektronenspinresonanz(EPR)-Experiment angesehen werden^[1].

Heute ist die EPR-Spektroskopie die vielseitigste Methode zur Untersuchung paramagnetischer Moleküle, deren Anwendungsbereich sich von der Festkörperphysik über das Studium von Molekülstrukturen und molekularer Dynamik bis hin zur Erforschung paramagnetischer Spezies in biologischen Systemen erstreckt.

Aufgrund dieser Vielseitigkeit sollten dem Chemiker die physikalischen Grundlagen der EPR-Spektroskopie durchaus bekannt sein, zumal die Prinzipien der Magnetischen Resonanz eine enge Verwandtschaft zwischen der EPR- und der geläufigeren NMR-Spektroskopie erkennen lassen. Ähnlich wie man in der NMR-Spektroskopie Kernspinübergänge zwischen verschiedenen Kern-Zeeman-Niveaus induziert, werden in der EPR-Spektroskopie Elektronenspinübergänge zwischen verschiedenen elektronischen Zeeman-Niveaus erzeugt. Die Observablen in einem

[*] Prof. Dr. H. Kurreck, Dr. B. Kirste, Dr. W. Lubitz [*]
Institut für Organische Chemie der Freien Universität
Takustraße 3, D-1000 Berlin 33

[*] Gegenwärtige Adresse: Department of Physics, University of California,
La Jolla, CA 92093 (USA).

EPR-Experiment sind der elektronische g -Faktor, die Linienform der Signale und – für Chemiker sicher am interessantesten – die Hyperfeinstruktur, aus der die Hyperfeinwechselwirkungsdaten entnommen werden können. Wiederum läßt sich eine Brücke zur NMR-Spektroskopie schlagen: Während dort lokale Strukturinformationen aus der Spin-Spin-Kopplung von Kernen in unterschiedlichen Molekülpositionen erhältlich sind, führen bei der EPR-Spektroskopie die skalare und die dipolare Kopplung des ungepaarten Elektrons (oder ungepaarter Elektronen) mit magnetischen Kernen zu einer Aufspaltung der einzelnen Elektron-Zeeman-Niveaus in Hyperfein-Subniveaus und damit zu zusätzlichen EPR-Übergängen. Anders als bei der NMR-Spektroskopie, in deren Spin-Spin-Wechselwirkung meistens nur die Kerne relativ kleiner Molekülteile miteinander koppeln, bewirkt jedoch die Delokalisation des ungepaarten Elektrons in einem organischen π -Radikal über ein größeres π -System dessen Kopplung mit allen magnetischen Kernen zu einem (integralen) Multispinensemble. Daraus resultiert selbst für ein vergleichsweise einfaches organisches Dublett-Radikal wie Triphenylmethyl mit drei Sätzen von drei, sechs und nochmals sechs äquivalenten Protonen ein Liniendickicht von (theoretisch zu erwartenden) $4 \cdot 7 \cdot 7 = 196$ Einzelkomponenten. Diese große spektrale Liniendichte ist zweifellos das größte Handicap der EPR-Spektroskopie, der durch das unzureichende Auflösungsvermögen insbesondere bei der Untersuchung größerer organischer Radikale enge Anwendungsgrenzen gesetzt sind.

Eine Möglichkeit, das Auflösungsvermögen einer spektroskopischen Technik zu verbessern, bieten Doppelresonanzmethoden, bei denen zwei Strahlungsfelder gleichzeitig unter Resonanz auf die Probe einwirken. In der NMR-Spektroskopie sind mehrere Versionen solcher Methoden wohl bekannt. Sofern das Doppelresonanzverfahren auf der Änderung der Population bestimmter Spinzustände beruht, ein Beispiel hierfür wäre INDOR, besteht in der Tat eine gewisse Verwandtschaft von erweiterten NMR-Techniken mit dem ENDOR-Experiment, das in diesem Fortschrittsbericht erläutert werden soll.

Erstmals wurde die Technik der „Electron Nuclear Double Resonance“ (ENDOR) im Jahre 1956 von *Feyer* an Festkörpern^[2] und später von *Hyde* und *Maki*^[3] an organischen Radikalen in Lösung angewendet. Mit dieser Methode können die Auflösungsgrenzen der EPR-Spektroskopie durch die Einführung zusätzlicher Auswahlregeln gesprengt werden. Darüber hinaus wird die Empfindlichkeit durch Nachweis der NMR-Übergänge im Mikrowellenbereich gegenüber der reinen NMR-Spektroskopie an Radikalen um mehrere Größenordnungen erhöht.

Es ist insbesondere das gegenüber der EPR-Spektroskopie drastisch verbesserte Auflösungsvermögen, das die ENDOR-Spektroskopie für Organiker und Biochemiker so attraktiv macht. Der Vergleich von EPR- und ENDOR-Spektrum des Bis(biphenylen)allyl-Radikals soll den Effekt illustrieren (Abb. 1): Während im EPR-Spektrum nur etwa 400 der theoretisch zu erwartenden $5 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 2 = 1250$ Einzellinien beobachtet werden können, zeigt das ^1H -ENDOR-Spektrum alle fünf der möglichen Linienpaare – je eines für jeden Satz äquivalenter Kerne. Die Hyperfeinkopplungskonstanten (*Hyper Fine Coupling(s)*: HFC) können problemlos und meistens ohne Spektrensimulation

eindeutig entnommen werden. Eine Simulation des EPR-Spektrums mit den aus dem ENDOR-Spektrum gewonnenen HFC-Konstanten ergibt sodann die Multiplizität. Eindeutige Zuordnungen der HFC-Konstanten zu bestimmten Molekülpositionen werden durch selektive Isotopenmarkierung erreicht.

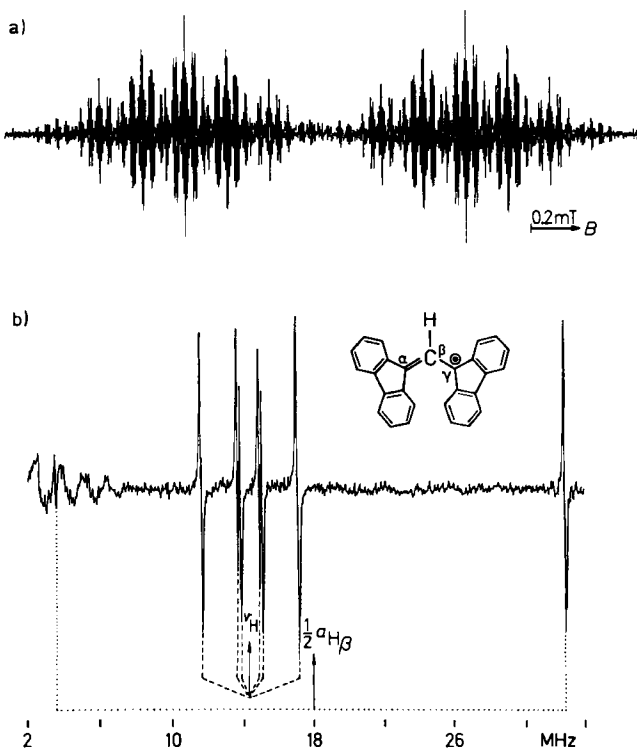


Abb. 1. a) EPR-Spektrum (in CCl_4 , 293 K) und b) ENDOR-Spektrum (in Mineralöl, 330 K) des Bis(biphenylen)allyl-Radikals. Man beachte erstens die drastische Abnahme der Linienanzahl im Doppelresonanzexperiment (Vergleich ENDOR/EPR), zweitens, daß häufig unterschiedliche Bedingungen (Temperatur, Viskosität des Lösungsmittels) für optimale EPR- und ENDOR-Spektren erforderlich sind, und drittens, wie die Lage der ENDOR-Signale – entsprechend der ENDOR-Resonanzbedingung (Gleichung (3)) – von der relativen Größe der HFC-Konstanten bezüglich der Freien Kernfrequenz (ν_H) abhängt; vgl. [27].

Die Erweiterung von ENDOR zur Elektron-Kern-Kern-Dreifachresonanzspektroskopie „TRIPLE“ (auch als „Double ENDOR“ bezeichnet^[4]) führt zu einer nochmaligen Auflösungs- und Empfindlichkeitssteigerung^[5] und ermöglicht die Bestimmung der (relativen) Vorzeichen von Kopplungskonstanten^[6].

2. Physikalische Grundlagen, Instrumentation

Anspruchsvolle Darstellungen der Theorie der Elektron-Kern-Mehrfachresonanz sind in einer Reihe von Übersichtsartikeln und Monographien zu finden^[7]. Hier soll das ENDOR-Experiment auf einfache phänomenologische Weise beschrieben werden.

2.1. ENDOR

Im ENDOR-Experiment werden mit einem Radiofrequenz(RF)-Feld Kernspinübergänge in paramagnetischen Molekülen induziert und durch eine Änderung der EPR-Signalintensität nachgewiesen. Abbildung 2 zeigt ein Ener-

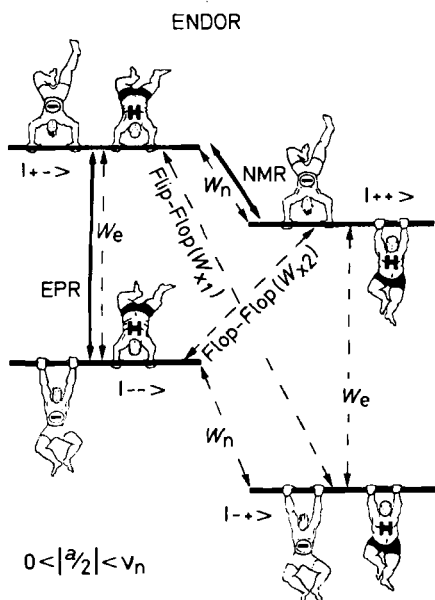
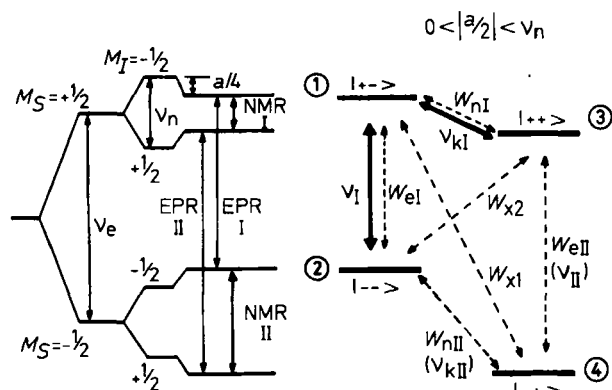


Abb. 2. Energieniveaudiagramm und „Vier-Niveau-Schema“ für die Hyperfeinwechselwirkung eines ungepaarten Elektrons ($S = 1/2$) mit einem Proton (oder einem anderen Kern mit $I = 1/2$). Ausgezogene Pfeile symbolisieren die strahlungsinduzierten EPR- bzw. NMR-Übergänge, gestrichelte Pfeile die Relaxationsübergänge. Das untere Bild soll die „Spinakrobatik“ im Doppelresonanzexperiment verdeutlichen.

gieneniveaudiagramm („Vier-Niveau-Schema“) für den einfachsten Fall eines Radikals mit einem ungepaarten Elektron ($S = 1/2$) und einem magnetischen Kern ($I = 1/2$), beispielsweise einem Proton. Die Wechselwirkung der Elektronen- und Kernspinmomente mit dem äußeren Magnetfeld führt zu einer Aufspaltung in zwei mal zwei Zustände (Zeeman-Aufspaltung), deren Lage noch durch die Hyperfeinwechselwirkung zwischen Elektron und Kern beeinflusst wird. Die vier Niveaus sind durch die Vorzeichen der Magnetischen Quantenzahlen M charakterisiert, ihre Energien in Frequenzeinheiten angegeben. Die ausgezogenen Pfeile symbolisieren die strahlungsinduzierten Elektronen- und Kernspinübergänge, die gestrichelten Pfeile die strahlungslosen Elektronenspin- (W_e), Kernspin- (W_n) und Kreuzrelaxationsprozesse (W_{x1} und W_{x2}). Bei den letztgenannten Prozessen finden gleichzeitig Elektronen- und Kernspinrelaxationsübergänge statt (vgl. Abschnitt 3). Mit den Auswahlregeln $\Delta M_S = \pm 1$, $\Delta M_I = 0$ ergeben sich die beiden erlaubten EPR-Übergänge ($1 \leftrightarrow 2$, $3 \leftrightarrow 4$) bei den Frequenzen

$$\nu_{\text{EPR}} = \nu_n \pm a/2 \quad (1)$$

und mit den Auswahlregeln $\Delta M_I = \pm 1$, $\Delta M_S = 0$ die beiden NMR-Übergänge bei den Frequenzen

$$\nu_{\text{ENDOR}} = |\nu_n \pm a/2| \quad (2)$$

Gleichung (2) läßt sich zur „ENDOR-Resonanzbedingung“ verallgemeinern:

$$\nu_{\text{ENDOR}} = |\nu_n - a \cdot M_S| \quad (3)$$

Im Falle eines Monoradikals mit $M_S = \pm 1/2$ treten im ENDOR-Spektrum für jeden Kern oder jeden Satz äquivalenter Kerne zwei Signale auf, die entweder bei der Freien Kernfrequenz ν_n im Abstand der HFC-Konstante a zentriert sind (dann gilt $|a/2| < \nu_n$) oder bei $a/2$ im Abstand $2\nu_n$ (dann gilt $|a/2| > \nu_n$).

Im ENDOR-Experiment wird zunächst bei der Frequenz eines EPR-Übergangs (ν_1) kontinuierlich mit so hoher Intensität eingestrahlt, daß die (Spin-Gitter-)Relaxation nicht mehr erfolgreich mit der induzierten Rate^[8] konkurrieren kann. Es kommt zu einem Populationsausgleich, der Übergang ist partiell „gesättigt“, das thermische Boltzmann-Gleichgewicht ist gestört.

Strahlt man nun zusätzlich bei der Frequenz eines NMR-Übergangs (ν_{k1}) ebenfalls mit hoher Intensität ein, so wird die Gesamtübergangsrate^[8] für $1 \leftrightarrow 3$ erhöht und das Niveau 1 stärker depopuliert; der Relaxationsweg schließt sich über die Prozesse $3 \leftrightarrow 4$ und $4 \leftrightarrow 2$ (W_e bzw. W_n) oder über den Prozeß $3 \leftrightarrow 2$ (W_{x2}). Die dadurch bewirkte Entsättigung des EPR-Übergangs ruft einen Intensitätsanstieg des EPR-Signals hervor, der als ENDOR-Effekt registriert wird. Obwohl der ENDOR-Effekt selbst unter günstigen Bedingungen nur wenige Prozent der EPR-Signalintensität beträgt, ist andererseits eine NMR-Empfindlichkeitssteigerung mit dem Faktor 10^5 zu verzeichnen, die aus dem Nachweis der NMR-Übergänge im Mikrowellenfrequenzbereich resultiert („Quantentransformation“).

Die Größe des ENDOR-Effekts hängt besonders von der relativen Größe der Raten W_e , W_n , W_{x1} und W_{x2} ab. Vernachlässigt man W_{x1} -Prozesse, so erhält man optimale ENDOR-Signale, wenn W_e und W_n ähnlich werden. Da diese Raten in unterschiedlicher Weise von der sogenannten Rotationskorrelationszeit τ_R (ein Maß für die rotatorische Brownsche Diffusion der Moleküle in Lösung) abhängen^[9],

$$W_e \propto 1/\tau_R; \quad W_n \propto \tau_R$$

kann man häufig durch Temperaturvariation eine Angleichung der Relaxationsraten erreichen, was sich mit Hilfe der Debye-Einstein-Gleichung verstehen läßt, die einen Zusammenhang zwischen dem effektiven Molekülvolumen (V_{eff} ergibt sich aus einem gemittelten Radius eines als kugelförmig angesehenen Moleküls), der Viskosität η des Lösungsmittels und der Temperatur herstellt:

$$\tau_R = V_{\text{eff}} \cdot \frac{\eta}{kT} \quad (4)$$

Mit abnehmender Temperatur und zunehmender Viskosität wird W_e kleiner, W_n wird größer. Das angestrebte Ver-

hältnis $W_n/W_e \approx 1$ kann daher zumeist durch Temperatur/Viskositäts-Optimierung der Lösung erreicht werden. Da W_n für Protonen gewöhnlich viel kleiner ist als W_e , erhält man optimale ENDOR-Signale in dünnflüssigen Lösungsmitteln wie Toluol, Tetrahydrofuran (THF) oder 1,2-Dimethoxyethan (DME) erst nahe am Gefrierpunkt der Lösung.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Bedingungen für die erfolgreiche Durchführung eines ENDOR-Experiments:

- (a) Ein EPR-Übergang und
- (b) ein NMR-Übergang müssen sättigend eingestrahlt werden; die erforderlichen Mikrowellen- und Radiofrequenzleistungen sind um so größer, je höher die Relaxationsraten sind^[10].
- (c) Die Relaxationsraten W_e und W_n müssen ähnliche Größe haben, oder es müssen Kreuzrelaxationsprozesse wirksam sein.
- (d) Schließlich sei betont, daß die Qualität der Probe (Konzentration, Abwesenheit von Sauerstoff) von entscheidender Bedeutung ist.

Am Beispiel des Hyperfeinniveauschemas des *p*-Benzosemichinon-Anions, oder allgemeiner eines Radikals mit einem ungepaarten Elektron und vier äquivalenten Protonen, soll nun die durch ENDOR erreichbare Spektrenvereinfachung verdeutlicht werden (vgl. Abb. 3). Während das EPR-Spektrum aus einem Linienquintett mit binomialer Intensitätsverteilung (1:4:6:4:1) besteht, enthält das ENDOR-Spektrum nur zwei Komponenten. Allgemein gilt: Beim EPR-Experiment wächst die Linienzahl mit der Anzahl der nichtäquivalenten Kerne *multiplikativ*, beim ENDOR-Experiment hingegen nur *additiv*. Jeder Satz äquivalenter magnetischer Kerne in einem Monoradikal ergibt nur *ein* ENDOR-Linienpaar – unabhängig von der Anzahl der Kerne pro Satz.

Abbildung 4 zeigt unter anderem das EPR- und das ENDOR-Spektrum des Phenalenyl-Radikals, das zwei Sätze

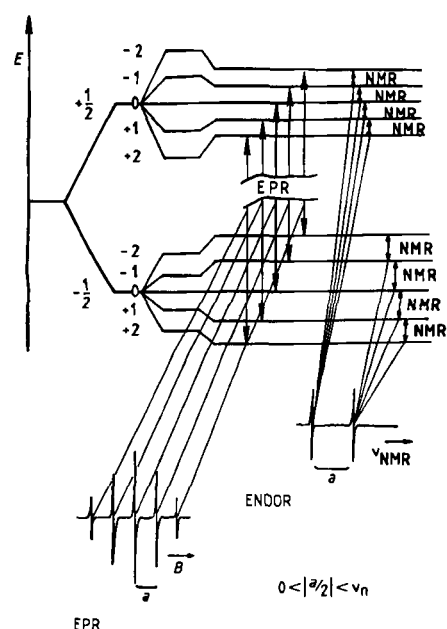


Abb. 3. Energieniveaudiagramm eines hyperfeingekoppelten Spinsystems aus einem ungepaarten Elektron ($S=1/2$) und vier äquivalenten Kernen ($I=1/2$).

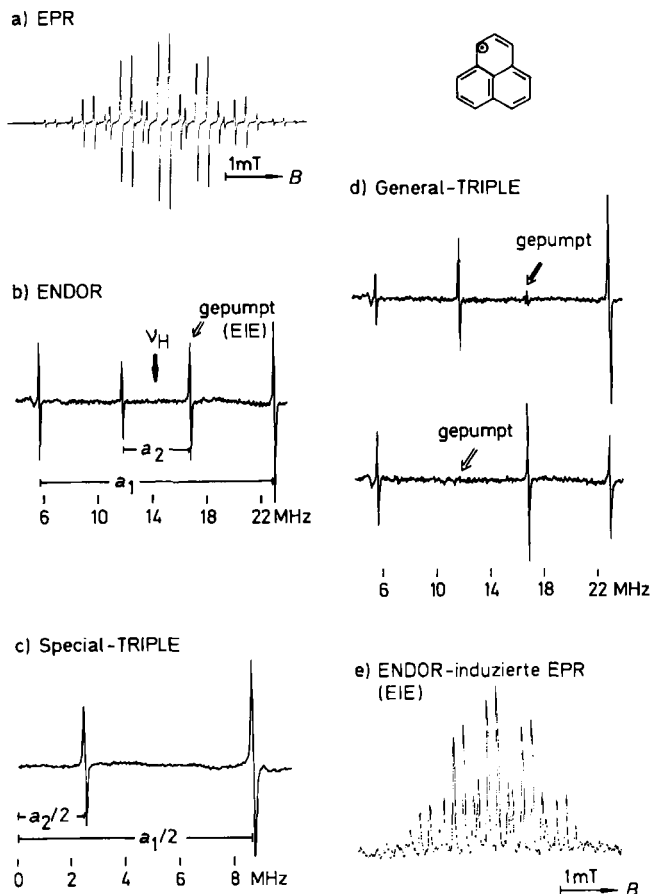


Abb. 4. Spektren des Phenalenyl-Radikals (in Mineralöl, 300 K), die durch Anwendung der Resonanztechniken EPR, ENDOR, Special-TRIPLE, General-TRIPLE und ENDOR-induzierte EPR (EIE) erhalten werden: ENDOR erhöht gegenüber EPR die Auflösung, Special-TRIPLE-Resonanz erweitert den Aufnahmebereich (Temperatur, Lösungsmittel), General-TRIPLE-Resonanz ergibt die Vorzeichen der HFC-Konstanten, ENDOR-induzierte EPR ermöglicht die selektive Registrierung verschiedener Radikalspezies in einer Probe.

mit drei und sechs äquivalenten Protonen aufweist. Dementsprechend besteht sein EPR-Spektrum aus $4 \cdot 7 = 28$, das ENDOR-Spektrum aus nur 4 Signalen. Ein komplizierteres und naturgemäß den Auflösungsgewinn von ENDOR eindrucksvoller demonstrierendes Beispiel ist bereits in Abbildung 1 vorgestellt worden.

Die Anzahl der zu jedem Satz gehörenden äquivalenten Kerne, d.h. die Multiplizität, spiegelt sich in der Intensitätsverteilung eines aufgelösten EPR-Spektrums wider; diese Information geht aber in einem ENDOR-Spektrum verloren, denn die ENDOR-Signalintensität wird wesentlich von den individuellen Relaxationseigenschaften der einzelnen Kerne an den jeweiligen Molekülpositionen bestimmt. Eine systematische Abnahme der ENDOR-Signalintensität findet man für kleine Hyperfeinkopplungen^[11]. Dadurch wird die Zuordnung der einzelnen ENDOR-Signale zu bestimmten Molekülpositionen erschwert. Darüber hinaus ist die hochfrequente Komponente eines ENDOR-Linienpaares bei gleicher RF-Leistung häufig intensiver als die tieffrequente. Dieser „hyperfine-enhancement“-Effekt^[12] ist um so ausgeprägter, je größer der Frequenzunterschied zwischen beiden Komponenten ist. Beispielsweise ist in Abbildung 1 das hochfrequente ENDOR-Signal (bei ≈ 33 MHz) wesentlich intensiver als das zugehörige tieffrequente, und außerdem erscheint dieses Signal

des einzelnen zentralen Protons mit gleicher Intensität wie die zu Sätzen von jeweils vier äquivalenten Protonen gehörenden ENDOR-Linien der Fluorenyliden-Flügel. Eine Bestimmung der zu jeder HFC-Konstante gehörenden Anzahl äquivalenter Kerne gelingt durch Simulation eines hinreichend aufgelösten EPR-Spektrums mit den aus dem ENDOR-Spektrum erhaltenen Kopplungskonstanten. Die eindeutige Zuordnung zu bestimmten Molekülpositionen wird durch gezielte Isotopenmarkierung erreicht, wobei der präparative Aufwand allerdings meistens erheblich ist. Abbildung 5 zeigt diesen Weg der eindeutigen Zuordnung von ENDOR-Signalen am Beispiel einiger *m*-Terphenyl-Radikalanionen^[13]. Die Pfeile in den beiden unteren Spektren weisen auf die im ¹H-ENDOR-Spektrum durch Deuterierung verschwundenen Resonanzlinien hin.

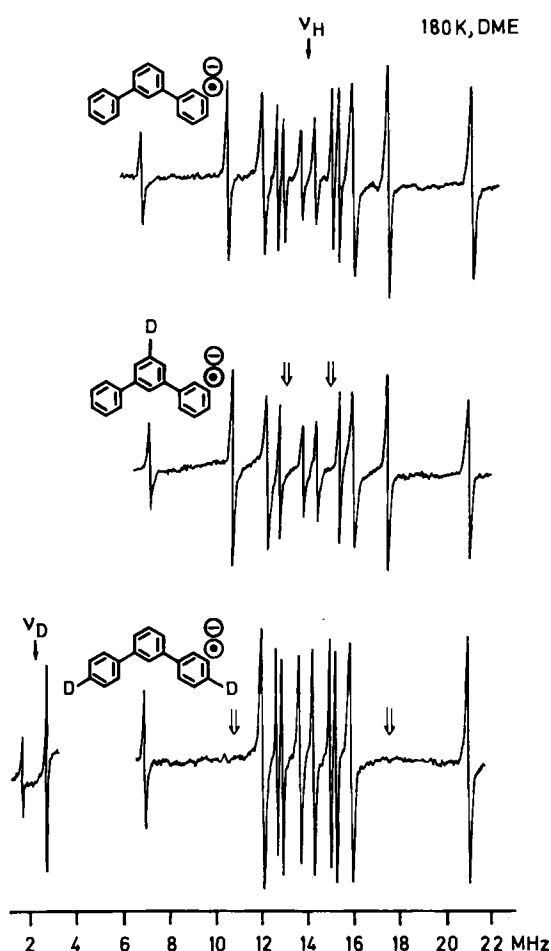


Abb. 5. ¹H- und ²H-ENDOR-Spektren von *m*-Terphenyl-Radikalanionen. In den Spektren der selektiv 5'- oder 4,4''-deuterierten Derivate verschwindet jeweils das zugehörige (hier durch die Pfeile gekennzeichnete) Linienpaar, was die eindeutige Zuordnung der entsprechenden HFC-Konstanten zu diesen Molekülpositionen ermöglicht [13].

2.2. Special-TRIPLE-Resonanz

In Abschnitt 2.1 wurde anhand von Abbildung 2 dargelegt, daß der ENDOR-Effekt mit dem „Kurzschluß“ von Kernspinübergängen gedeutet werden kann. Es ist einleuchtend, daß dieser Effekt wesentlich verstärkt werden sollte, könnte man *beide* Relaxationswiderstände W_{n1} und W_{n2} mittels einer weiteren NMR-Frequenz simultan kurzschließen^[5a]. Die Verwirklichung von solchen TRIPLE-Resonanzexperimenten an organischen Radikalen in Lösung

ist der in der Entwicklung der ENDOR-Spektroskopie führenden Arbeitsgruppe von Möbius mit Biehl, Dinse und Plato in den Jahren 1974 (Special-TRIPLE)^[5b] und 1975 (General-TRIPLE)^[6] gelungen.

Im Special-TRIPLE-Experiment wirken auf die Probe zusätzlich zur „sättigenden“ Mikrowellenstrahlung zwei RF-Felder ein. Durch Erzeugung von Seitenbändern um die Freie Kernfrequenz fährt man mit dem einen RF-Feld zu höheren, mit dem anderen zu tieferen Frequenzen und „trifft“ so immer *gleichzeitig beide* NMR-Übergänge eines Satzes äquivalenter Kerne. In Abbildung 4c ist dargestellt, daß jede Hyperfeinkopplung nur zu *einem* Special-TRIPLE-Signal führt, das jeweils im Frequenzabstand $|a/2|$ vom Ursprung der NMR-Frequenzachse ($\nu_{\text{NMR}} = 0$) erscheint.

Die Vorteile der Special-TRIPLE-Version im Vergleich zu ENDOR sind:

- (a) Erhöhung der Empfindlichkeit (des Signal/Rausch-Verhältnisses).
- (b) Verbesserte Auflösung, wie sich experimentell und auch theoretisch zeigen läßt^[5,7c].
- (c) Die Signalintensitäten spiegeln unter günstigen experimentellen Bedingungen (induzierte Rate der Kernspins $\gg W_c \gg W_n$) – etwa wie in der NMR-Spektroskopie diamagnetischer Verbindungen – das Verhältnis der Anzahl äquivalenter Kerne pro Satz wider, weil die Entsättigung des EPR-Übergangs nicht wie im ENDOR-Experiment entscheidend von der Kernspinrelaxationsrate W_n bestimmt wird.
- (d) Diese Tatsache (c) führt auch zu einer wesentlich geringeren Temperaturabhängigkeit der Special-TRIPLE-Signalintensität, weshalb beispielsweise biologische Systeme unter (physiologischen) Bedingungen untersucht werden können, unter denen kein meßbarer ENDOR-Effekt mehr auftritt.

Das Special-TRIPLE-Experiment läßt sich in der gleichen Weise auch auf solche hyperfeingekoppelten Kerne anwenden, für die $|a/2| > \nu_n$ gilt (siehe Abschnitt 2.1), da „negative“ Frequenzen gespiegelt werden. Aus mehreren Gründen (Frequenzverschiebungen durch Effekte zweiter Ordnung, hohe Relaxationsraten W_n) ergibt sich in diesen Fällen allerdings meistens kein Vorteil gegenüber dem ENDOR-Experiment.

2.3. General-TRIPLE-Resonanz

Bedingt durch die neben der reinen π -Konjugation wirkenden verschiedenen Spindichte-Transfermechanismen (wie π - π - und π - σ -Spinpolarisation oder Hyperkonjugation), können sowohl positive als auch negative Spindichten am Kernort und damit durch Hyperfeinkopplung auch HFC-Konstanten mit *positivem* bzw. *negativem* Vorzeichen auftreten. Es ist daher von größtem Interesse, neben den Beträgen auch die Vorzeichen von Kopplungskonstanten bestimmen zu können. Die General-TRIPLE-Technik eröffnete einen einfachen Weg zur eindeutigen Bestimmung der relativen Vorzeichen von HFC-Konstanten. Andere Methoden zur Vorzeichenbestimmung sind hingegen nur begrenzt anwendbar, wie z. B. Breitlinien-NMR-Spektroskopie (NMR-Messung der Fermi-Kontakt-Verschiebung)

organischer Radikale^[14] oder EPR-Spektroskopie in flüssigen Kristallen (Richtung der Hyperfeinverschiebung beim Übergang von der isotropen in die nematische Phase)^[15].

Im Gegensatz zum Special-TRIPLE- werden beim General-TRIPLE-Experiment die NMR-Übergänge *verschiedener* Sätze äquivalenter Kerne derselben Kernsorte oder auch verschiedener Kernsorten *gleichzeitig* gesättigt. Praktisch wird zunächst auf eine EPR-Komponente sättigend eingestrahlt, und es wird mit der einen (unmodulierten) NMR-Frequenz ein NMR-Übergang „gepumpt“. Mit dem zweiten (modulierten) RF-Feld wird nun der gesamte NMR-Resonanzbereich der Probe überstrichen. Die zusätzliche Pumpfrequenz bewirkt gegenüber dem ENDOR-Spektrum charakteristische Intensitätsänderungen der Signale, aus denen auf die relativen Vorzeichen der HFC-Konstanten geschlossen werden kann (vgl. Abb. 4d). Wird z. B. die hochfrequente ENDOR-Komponente der kleinen Kopplung des Phenalenyl-Radikals (in Abb. 4d (oben) durch den Pfeil gekennzeichnet) „gepumpt“, so nimmt die Intensität des zugehörigen *tieffrequenten* Signals zu, weil dies einem Special-TRIPLE-Experiment entspricht. Hingegen wird dabei die *hochfrequente* Komponente der großen Kopplung verstärkt, und die auf der anderen Seite – bezogen auf die Freie Protonenfrequenz ν_H – befindliche tieffrequente Komponente wird intensitätsschwächer. Aus diesem Erscheinungsbild ergibt sich, daß die beiden HFC-Konstanten *unterschiedliche Vorzeichen* haben. Wird das korrespondierende Experiment unter Positionierung der Pumpfrequenz auf der tieffrequenten ENDOR-Linie der kleinen Kopplung durchgeführt, so kehren sich die Intensitätsverhältnisse um (Abb. 4d (unten)). Diese Analyse von General-TRIPLE-Spektren gilt jedoch nur, wenn die Vorzeichen der gyromagnetischen Verhältnisse der betrachteten Kerne gleich sind.

Für heteronucleare General-TRIPLE-Experimente, z. B. mit ^1H und ^{29}Si ^[16] oder ^1H und ^{15}N ^[17], müssen diese Intensitätsregeln gegebenenfalls umgekehrt werden. Da es sich um eine Methode zur Bestimmung *relativer* Vorzeichen handelt, ist für die Deutung des Effektes zumindest ein Acht-Niveau-Schema mit zwei verschiedenen Kernen ($I=1/2$; $a_1 \neq a_2$) erforderlich. Abbildung 6 zeigt derartige Schemata für gleiche (linkes Diagramm) und ungleiche Vorzeichen (rechtes Diagramm) der beiden HFC-Konstanten. In beiden Fällen soll ν_2 die Pumpfrequenz und sollen ν_1 und ν_1^+ die Beobachtungsfrequenzen symbolisieren. Ein Intensitätsanstieg ist immer dann zu erwarten, wenn Pumpfrequenz und Beobachtungsfrequenz *verschiedenen* M_S -Zuständen angehören.

Wie aus einer genaueren Betrachtung von Abbildung 6 hervorgeht, kann nur in dieser Situation eine „Relaxationsschleife“ gebildet werden, die ausschließlich aus W_e -Prozessen und aus kurzgeschlossenen W_n -Prozessen besteht, so daß kein „Flaschenhals“ W_n mehr auftritt. Strahlt man jedoch Pump- und Beobachtungsfrequenz in denselben M_S -Zustand ein, so läßt sich die Relaxationsschleife nur unter Einbeziehung von W_n -Prozessen schließen; die Signalintensität ist dann sogar kleiner als bei einem ENDOR-Experiment („Nebenschluß“). Große TRIPLE-Effekte werden für den Fall $W_e \gg W_n$, also *außerhalb* des optimalen ENDOR-Bereiches ($W_e \approx W_n$) erhalten. Im Falle gleicher (in Abb. 6 links positiver) Vorzeichen beider HFC-Konstanten befinden sich *beide* tieffrequenten Komponenten

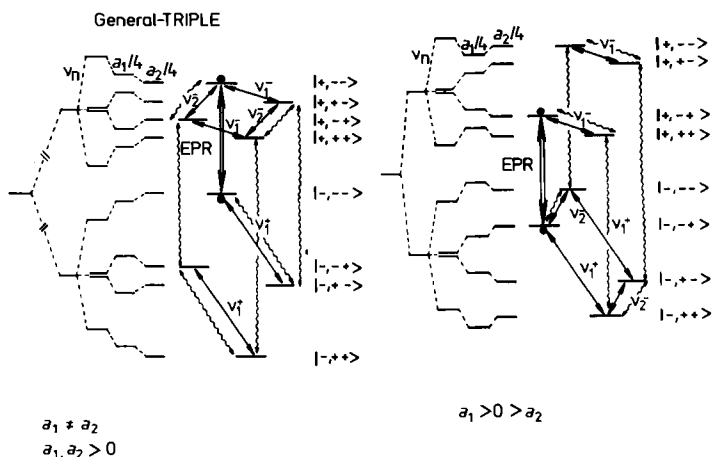


Abb. 6. Energieniveaudiagramme für die Hyperfeinwechselwirkung eines ungepaarten Elektrons ($S=1/2$) mit zwei nicht äquivalenten Protonen (oder zwei anderen Kernen mit $I=1/2$) zur Deutung des General-TRIPLE-Effektes. Die HFC-Konstanten haben im linken Diagramm gleiche (positive), im rechten entgegengesetzte Vorzeichen. ν_2 bezeichnet die NMR-Pumpfrequenz, ν_1 und ν_1^+ die NMR-Beobachtungsfrequenzen. Links: Zwischen den beiden Hyperfein-Niveaus des gepumpten EPR-Überganges $|-, --> \leftrightarrow |+, -->$ kann *nur* für den Fall, daß ν_1^+ eingestrahlt wird, eine geschlossene Relaxationsschleife gebildet werden, die ausschließlich aus W_e - und kurzgeschlossenen W_n -Prozessen besteht. Rechts: Für den Fall $a_1 > 0 > a_2$ gibt es eine solche – wiederum durch die Schlangenlinien symbolisierte – Relaxationsschleife nur dann, wenn ν_1 eingestrahlt wird.

ten ν_2 und ν_1 im selben M_S -Zustand. Das rechte Diagramm der Abbildung 6 beschreibt z. B. das in Abbildung 4d dargestellte TRIPLE-Experiment für das Phenalenyl-Radikal: Die HFC-Konstanten haben ungleiche Vorzeichen, somit gehören die beiden tieffrequenten NMR-Übergänge *verschiedenen* M_S -Zuständen an. In diesem Fall wird das ENDOR-Signal dann verstärkt, wenn Pump- und Beobachtungsfrequenz auf derselben Seite (von ν_H) liegen.

Neben der Vorzeichenbestimmung läßt sich mit General-TRIPLE-Resonanz zuweilen auch ein Auflösungsgewinn erzielen, wenn zwei HFC-Konstanten dem Betrage nach ähnlich sind, sich aber im Vorzeichen unterscheiden. Durch die Pumpfrequenz wird das Signal der einen Kernsorte verstärkt, das der anderen wird geschwächt, was zu einer geringfügigen Verschiebung der Resonanz des überlagerten Signals führt. Durch sinngemäßes Umsetzen der Pumpfrequenz wird eine Verschiebung in die entgegengesetzte Richtung erreicht^[13]. Zusammenfallende ENDOR-Signale mit HFC-Konstanten ungleichen Vorzeichens bei gleicher Anzahl von Kernen sind daran zu erkennen, daß diese Linien bei wechselnder Positionierung der Pumpfrequenz auf den TRIPLE-Effekt nicht „reagieren“, also keine Intensitätsänderung erfahren.

2.4. ENDOR-induzierte Elektronenspinresonanz (EIE)

Bei Untersuchungen zur Radikalchemie treten nicht selten mehrere radikalische Spezies in einer Probe auf. Das EPR-Spektrum einer solchen Mischung besteht – zumal im Falle ähnlicher g -Faktoren – zumeist aus einer nur schwer analysierbaren Überlagerung der Einzelspektren. Die individuellen EPR-Spektren lassen sich jedoch durch Anwendung der Variante „ENDOR-induzierte EPR“ (EIE) separat registrieren, wenn im ENDOR-Spektrum getrennte Signale der verschiedenen Radikale erscheinen^[18a]. In Abbil-

Abbildung 4 ist das EIE-Experiment für das Phenalenyl-Radikal erläutert: Während man die unmodulierte NMR-Frequenz auf die Spitze einer ENDOR-Linie positioniert (Abb. 4b), fährt man mit dem externen Magnetfeld über den EPR-Absorptionsbereich und erhält sodann das ENDOR-induzierte EPR-Spektrum des Phenalenyl-Radikals, das apparativ bedingt wie ein Absorptionsspektrum aussieht (Abb. 4e). Wie mit der EIE-Technik in der Praxis die Einzelspezies einer Mischung verschiedener Radikale selektiv erfasst werden können, sei an einem Beispiel verdeutlicht: Vor kurzem hatten wir die Frage zu klären^[18b], ob ein in Abbildung 7 (oben) wiedergegebenes ENDOR-Spektrum von einem partiell deuterierten Phenalenyl-Radikal mit H-Atomen in 1- und 2-Stellung herrührt, oder ob die Lösung eine Mischung von Radikalen mit jeweils nur noch einem H-Atom in 1- oder 2-Stellung enthält (die Intensitäten der ENDOR-Signale sollen unbeachtet bleiben). Das EIE-Experiment gibt die eindeutige Antwort: Je nach Positionierung der NMR-Pumpfrequenz (A) oder (B) bekommt man unterschiedliche EIE-Spektren (A bzw. B)! Daher enthält die Lösung eine Mischung von Phenalenyl-Radikalen, in denen immer acht der neun möglichen Positionen deuteriert sind und sich das restliche H-Atom entweder in 1- oder in 2-Stellung befindet.

Ergänzend sei erwähnt, daß sich die Signalintensität durch die Variante „TRIPLE-induzierte EPR“ erheblich steigern läßt^[19]. Grundsätzlich ist ein solches Selektionsexperiment auch mit General-TRIPLE-Resonanz möglich. Wenn ein ENDOR-Spektrum Signale mehrerer radikalischer Spezies aufweist, so „reagieren“ natürlich nur diejenigen ENDOR-Komponenten auf die zusätzliche Pumpfrequenz, die zum selben Termschema wie die gepumpte Komponente, also zum selben Radikal gehören.

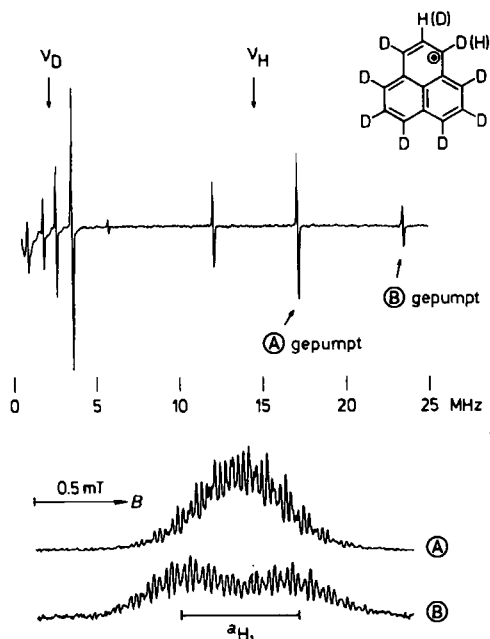


Abb. 7. ENDOR (oben) und ENDOR-induzierte EPR-Spektren (unten) von Phenalenyl-Radikalen mit gleichem Deuterierungsgrad, aber unterschiedlicher Isotopenverteilung: Das durch Positionierung der NMR-Pumpfrequenz auf die hochfrequente ENDOR-Komponente der kleinen Kopplung erhaltene EIE-Spektrum A stammt vom Radikal mit einem Wasserstoffatom in 2-Stellung; analog bestätigt das EIE-Experiment B die Anwesenheit des isomeren Radikals mit einem Wasserstoffatom in 1-Stellung. Aus den relativen Intensitäten der ENDOR-Signale geht weiterhin hervor, daß die Konzentration der $[2\text{-}^1\text{H}]$ -Spezies größer ist als die der $[1\text{-}^1\text{H}]$ -Spezies (vgl. [18b]).

2.5. Instrumentation und Probenbereitung

Abbildung 8 zeigt das Blockschaltbild des in unserem Laboratorium verwendeten Spektrometers, mit dem EPR-, ENDOR-, ENDOR-induzierte EPR- sowie Special- und General-TRIPLE-Resonanz-Spektren gemessen werden können. Die Komponenten des kommerziellen EPR-Spek-

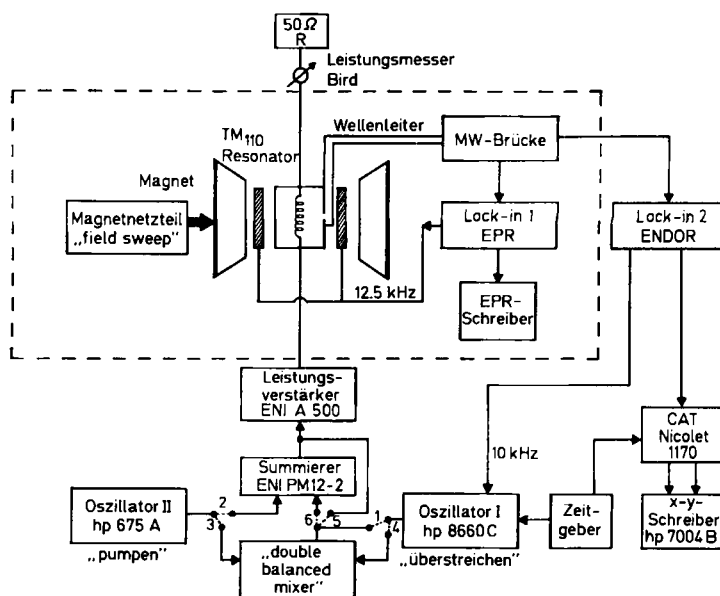


Abb. 8. Blockschaltbild eines ENDOR/TRIPLE-Spektrometers. Die gestrichelte Linie umgrenzt das EPR-Spektrometer. Für besonders anspruchsvolle EPR-Messungen (Empfindlichkeit, Auflösung) ist allerdings der ENDOR-gegen einen EPR-Resonator auszutauschen. Die verschiedenen Betriebsarten erfordern die folgenden, mit 1–6 bezeichneten Verbindungen: ENDOR: 1, 5 geschlossen; 2, 3, 4, 6 offen. General-TRIPLE: 1, 2, 6 geschlossen; 3, 4, 5 offen. Special-TRIPLE: 3, 4, 5 geschlossen; 1, 2, 6 offen. – Zur Erzeugung der MW- und RF-Felder dient ein Bruker-ENDOR-Resonator (ER 200 ENB) vom TM₁₁₀-Typ mit innenliegender NMR-Spule unterschiedlicher Windungszahl, die an einem doppelwandigen Dewar-Temperaturrohr aus Quarz befestigt ist. Für die Aufnahme der EPR-Spektren im Feldsweep-Verfahren (Stabilisierung durch „Hall-Sonde“) wird eine 12.5 kHz-Feldmodulation verwendet. Die EPR-Signale werden nach phasempfindlicher Gleichrichtung und Verstärkung (Lock-in 1) auf dem Schreiber der Bruker-Konsole dargestellt. Für die Aufnahme von ENDOR-Spektren wird das Spektrometer mit einem „field frequency lock“ (Bruker ER 033) auf das EPR-Absorptionsmaximum der gewünschten Linie justiert, und die Feldmodulation wird ausgeschaltet. Der Frequenzgenerator I (hp 8660 C) erzeugt die mit 10 kHz frequenzmodulierte NMR-Frequenz. Sie wird verstärkt (ENI A 500), durch die NMR-Spule im Resonator geführt und nach Leistungsmessung (Bird Wattmeter 43) in einem 50-Ω-Abschlußwiderstand (Bird 8201) vernichtet. Die durch NMR-Übergänge in der Probe bewirkte Änderung der EPR-Absorption wird phasempfindlich gleichgerichtet, verstärkt (Lock-in 2, Ithaco 393) und in einem Spektrenakkumulator (Nicolet 1170) gespeichert. Die Kanalfortschaltung des CAT ist über einen Zeitgeber mit der Änderung der Oszillatorfrequenz (I) synchronisiert. Die ENDOR-Signale, die in Form der ersten Ableitung einer Absorptionskurve erscheinen, können dann auf einem x-y-Schreiber (hp 7004 B) über der NMR-Frequenz dargestellt werden. – Bei General-TRIPLE-Experimenten wird zusätzlich die NMR-Frequenz einer ENDOR-Linie unmoduliert eingestrahlt (vgl. Abschnitt 2.3). Diese Frequenz wird im Oszillator II (hp 675 A) erzeugt und mit einem Summierer (ENI PM 12-2) zur ersten modulierten „überstreichenden“ NMR-Frequenz addiert. – Im Special-TRIPLE-Experiment erzeugt der „double balanced mixer“ (Industrial Electronics SRA-3H) zwei frequenzmodulierte Seitenbänder bei ν_{11} (vom Oszillator II) $\pm \nu_1$ (vom Oszillator I). Entspricht die Trägerfrequenz ν_{11} der Larmor-Frequenz einer Kernsorte im Radikal, so werden für alle HFC-Konstanten dieser Kernsorte stets der hochfrequente und der tieffrequente ENDOR-Übergang gleichzeitig eingestrahlt; das Verfahren läßt sich sogar im Fall $|a/2| > \nu_n$ anwenden, lediglich der Bereich $\nu_1 \approx \nu_{11} (|a/2| = \nu_n)$ ist zu vermeiden (vgl. Abschnitt 2.2). – Zur Temperierung der Probe dient meistens ein Stickstoffstrom (z. B. Temperiereinrichtung Bruker VT-1000), auch die Verwendung eines Helium-Kryostaten ist möglich [21]. Geschlitzte Resonatoren gestatten die Bestrahlung der Probe in situ [7f, 22a, b]. Neuerdings gibt es auch rechnergestützte ENDOR-Spektrometer, bei denen der Computer die Gerätesteuerung (unter anderem Feldpositionierung, Frequenzsweep, RF-Leistungsregelung), die digitale Akkumulation sowie eine anschließende numerische Verarbeitung und Speicherung der Spektren ermöglicht [7f, 22c].

trometers (Bruker ER 220 D) sind im Bild gekennzeichnet. Der Aufbau des breitbandigen NMR-Kanals ist in seinen Grundzügen bereits beschrieben worden^[7c, f, 20].

Zur Probenbereitung mit den vielfältigen Möglichkeiten der chemischen, elektrolytischen und photolytischen Radikalerzeugung empfehlen sich im wesentlichen die einschlägigen Methoden der EPR-Spektroskopie^[23]. Die Anzahl der „ENDOR-günstigen“ Lösungsmittel ist allerdings nicht sehr groß; besonders bewährt haben sich solche Solventien, die beim Abkühlen in einen Glaszustand übergehen (Toluol, Ethanol, 2-Methyltetrahydrofuran), weil die so erreichbare hohe Viskosität häufig die Bedingung $W_e \approx W_n$ einzustellen erlaubt.

3. Weitere ENDOR-fähige Kerne („Nichtprotonen-ENDOR“)^[25]

ENDOR-Spektroskopie in Lösung wurde bis zum Jahre 1970 ausschließlich auf die Protonen der Radikale angewendet, die für diese Technik besonders geeignet sind: Das magnetische Moment des Wasserstoffkerns ist relativ groß, so daß die Resonanzfrequenz ν_H des freien Protons (die „Freie Protonenfrequenz“) in einem experimentell gut zugänglichen Bereich liegt (13–15 MHz im Feldbereich eines X-Band-EPR-Spektrometers); der über die C–H- σ -Bindung wirksame π - σ -Spinpolarisationsmechanismus führt zu reiner s-Spindichte in der Nähe der Protonen und somit zu einer vergleichsweise kleinen Hyperfeinanisotropie; relativ kleine RF-Leistungen genügen daher zur Sättigung der NMR-Übergänge. Es war jedoch auch für die angewandte ENDOR-Spektroskopie von größtem Interesse, diese Methode auf andere Kerne wie ^2H , ^{13}C , $^{14,15}\text{N}$, ^{19}F zu erweitern. Beispielsweise erwartet man für die Hyperfeinkopplung eines ^{13}C -Kerns im π -System eine wesentlich größere Empfindlichkeit gegenüber Änderungen der Struktur als für die peripheren Protonen. Alle nicht mit Protonen verknüpften Kerne des π -Skeletts sind für die ^1H -ENDOR-Spektroskopie „blind“.

Die „Nichtprotonen“-ENDOR-Spektroskopie ist allerdings im Vergleich zur ^1H -ENDOR-Spektroskopie mit größeren experimentellen Schwierigkeiten verbunden. So wird zunächst bei magnetischen Kernen mit geringer natürlicher Häufigkeit wie ^2H , ^{13}C und ^{15}N eine Isotopenmarkierung erforderlich sein^[26]. Aus apparativer Sicht sind das meistens kleinere magnetische Moment und die niedrige „Freie Kernfrequenz“ der „Nichtprotonen“ problematisch (solange $|a/2| < \nu_n$ gilt). Hohe π -Spinpopulationen an magnetischen Kernen, z. B. an im Ringskelett befindlichen ^{13}C -Atomen, führen zu einer großen Hyperfeinanisotropie und im Falle von Heteroatomen (Stickstoff, Sauerstoff, Halogene) oft zu einer großen g -Faktoranisotropie. Diese Größen beeinflussen aber in starkem Maße die Kernspin- bzw. Elektronenspin-Relaxationsraten^[7d]. Andererseits nehmen die experimentellen Schwierigkeiten der ENDOR-Technik besonders bei gleichzeitig erforderlicher großer Mikrowellen- (> 100 mW) und Radiofrequenz-Leistung (> 200 W) erheblich zu. Wesentliche apparative Verbesserungen ermöglichen jedoch heute die ENDOR-Spektroskopie einer ganzen Reihe von „Nichtprotonen“ (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1. Eigenschaften der magnetischen Kerne, von denen bisher ENDOR-Signale in Lösung erhalten werden konnten, vgl. Text (^2H - und ^{15}N -ENDOR-Spektroskopie war nur an isotopenangereicherten Radikalen möglich).

Kern	Kernspin I	Freie Kernfrequenz [MHz] ($B_0 = 328.8 \text{ mT}$)	Magnetisches Moment μ_I (in μ_n)	Natürliche Häufigkeit [%]
^1H	1/2	14.00	2.7927	99.99
^2H	1	2.15	0.8574	0.015
^7Li	3/2	5.44	3.2560	92.58
^{10}B	3	1.50	1.8007	19.78
^{11}B	3/2	4.49	2.6880	80.22
^{13}C	1/2	3.52	0.7022	1.11
^{14}N	1	1.01	0.4035	99.63
^{15}N	1/2	1.42	-0.2830	0.37
^{19}F	1/2	13.17	2.6273	100
^{23}Na	3/2	3.70	2.2161	100
^{27}Al	5/2	3.65	3.6385	100
^{29}Si	1/2	2.78	-0.5548	4.70
^{31}P	1/2	5.67	1.1305	100
^{39}K	3/2	0.65	0.3910	93.10
^{85}Rb	5/2	1.35	1.3482	72.15
^{87}Rb	3/2	4.58	2.7414	27.85
^{117}Sn	1/2	4.58	-0.9132	7.61
^{119}Sn	1/2	4.99	-0.9949	8.58
^{133}Cs	7/2	1.84	2.5642	100
^{203}Tl	1/2	8.00	1.5960	29.50
^{205}Tl	1/2	8.08	1.6116	70.50

Die Multikern-EPR- und -ENDOR-Spektren eines mit Ausnahme des Protons am β -C-Atom perdeuterierten und zu 90% in der β -Position ^{13}C -markierten Bis(biphenylyl)allyl-Radikals zeigt Abbildung 9. Aus dem Vergleich der EPR-Spektren in den Abbildungen 9 und 1 geht die drastische Abnahme der spektralen Auflösung hervor, die erstens durch das um 1/6 gegenüber dem Proton kleinere gyromagnetische Verhältnis des Deuteriums, zweitens durch die größere Spinquantenzahl des Deuteriums ($I_D = 1$, $I_H = 1/2$) und drittens durch die infolge der ^{13}C -Hyperfeinanisotropie vergrößerte Linienbreite verursacht wird. Das für drei Kernarten optimierte ENDOR-Spektrum ist dagegen vollständig aufgelöst. Um die Freie Deuteriumfrequenz ν_D als Zentrum erscheinen die ^2H -ENDOR-Linien ($|a/2| < \nu_D$), während die ^1H - und die ^{13}C -ENDOR-Signale um die Frequenz, die jeweils der halben HFC-Konstante entspricht, als Zentrum im Abstand der doppelten Freien Kernfrequenz ν_H bzw. ν_C auftreten ($|a/2| > \nu_n$).

Kohlenstoff (^{13}C)

Zunächst sollen Charakteristika des für die Organische Chemie besonders interessanten ^{13}C -Isotops diskutiert werden. Der ^{13}C -Kern in der β -Position des Bis(biphenylyl)allyl-Radikals verhält sich im Hinblick auf den optimalen ENDOR-Effekt typisch, d. h. im Vergleich zum ^1H -ENDOR-Spektrum der unmarkierten Verbindung wird eine etwas höhere MW- und RF-Leistung benötigt (Abb. 9). Die α - und γ -Positionen dieser Spezies weisen eine erheblich größere Spinpopulation als die β -Position auf. Erwartungsgemäß werden für das ^{13}C -ENDOR-Spektrum wegen der größeren Hyperfeinanisotropie an diesen Positionen deutlich höhere Leistungen und Temperaturen erforderlich. Abbildung 9 (unten links) zeigt die Mikrowellenleistungsabhängigkeit der ENDOR-Signalamplituden der hochfrequenten Protonenlinien für zwei unterschied-

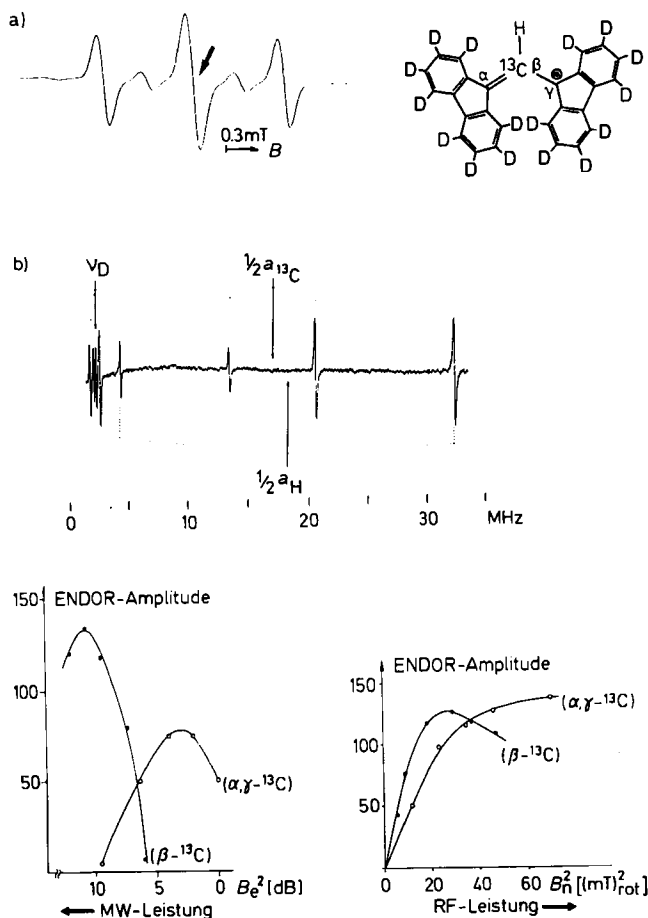


Abb. 9. a) Multikern-EPR- und b) ^{13}C -ENDOR-Spektrum (in Mineralöl, 360 K) des selektiv deuterierten und ^{13}C -markierten Bis(biphenylen)allyl-Radikals. Der Pfeil im EPR-Spektrum bezeichnet die Feldpositionierung für das ENDOR-Experiment. Man beachte, daß die experimentellen Bedingungen bei der Aufnahme des ENDOR-Spektrums nicht verändert wurden. Unten links ist die Abhängigkeit der ENDOR-Signalamplitude für die hochfrequente ^1H -ENDOR-Linie der in β - und der in α,γ -Position ^{13}C -markierten Verbindung von der Mikrowellenleistung dargestellt. Unten rechts ist die ENDOR-Signalamplitude der hochfrequenten ^{13}C -ENDOR-Linie dieser Radikale als Funktion der Radiofrequenzleistung wiedergegeben. In beiden Fällen erfordert die α,γ - ^{13}C -markierte Verbindung wegen der größeren Hyperfeinanisotropie die größeren Leistungen zum Erreichen eines optimalen ENDOR-Effektes (vgl. [27]).

lich markierte Moleküle sowie auch (unten rechts) die Intensitäten der hochfrequenten ^{13}C -ENDOR-Signale als Funktion der Radiofrequenzleistung^[27].

Ein weiteres instruktives Beispiel bietet die ^{13}C -ENDOR-Untersuchung von ^{13}C -markierten Galvinoxylen („Coppers Radikal“)^[28]. Das unsubstituierte, selektiv deuterierte und ^{13}C -markierte Galvinoxyl-Radikal zeigt wiederum das typische ENDOR-Verhalten – für ^{13}C -ENDOR werden im Vergleich zu ^1H - und ^2H -ENDOR höhere Temperaturen sowie höhere MW- und RF-Leistungen verlangt – hingegen erhält man für das *tert*-Butyl-substituierte und ^{13}C -markierte Galvinoxyl-Radikal ein zunächst völlig unerwartetes Ergebnis (vgl. Abb. 10): Die optimalen ^{13}C -ENDOR-Intensitäten werden bei vergleichsweise tiefen Temperaturen und mit niedrigeren Leistungen erreicht; darüber hinaus läßt sich das tieffrequente ^{13}C -ENDOR-Signal auch am *unmarkierten* Molekül, also bei natürlicher Häufigkeit (1.1%) nachweisen. Dieses Signal ist im ENDOR-Spektrum von Abbildung 10 (Mitte rechts) zusätzlich abgebildet (die wegen des „hyperfine-enhancement“-Ef-

fekts^[12] sicherlich noch intensivere hochfrequente Komponente fällt unter den Aufnahmebedingungen zufällig mit einer ^1H -ENDOR-Linie zusammen). Das grundsätzlich verschiedene ^{13}C -Relaxationsverhalten der beiden Radikale bedeutet, daß sich das *tert*-Butyl-Galvinoxyl im Gegensatz zu vielen anderen Verbindungen dieses Typs nicht mehr wie ein „echtes“ Galvinoxyl mit einem über die beiden äquivalenten Arylringe vollständig delokalisierten π -System verhält. Bedingt durch eine *unterschiedliche* Verdrillung der Ringe ist es vielmehr als ein äquilibrierendes substituiertes Phenoxy-Radikal zu beschreiben.

Diese Interpretation wird durch die Untersuchung des an der Carbonylgruppe ^{13}C -markierten 4-Benzoyl-2,6-di-*tert*-butylphenoxy-Radikals bestätigt, bei der ebenfalls ein solches ungewöhnliches ^{13}C -ENDOR-Verhalten gefunden wurde^[29]. An diesem Radikal wurden erstmals ^{13}C -ENDOR-Signale bei natürlicher Isotopenhäufigkeit beobachtet. HMO-McLachlan- und INDO-Rechnungen ergaben für das Carbonyl-C-Atom eine sehr niedrige p_z -Spinpopulation. Daher ist die ^{13}C -Hyperfeinanisotropie in diesem System extrem klein, was auch experimentell durch EN-

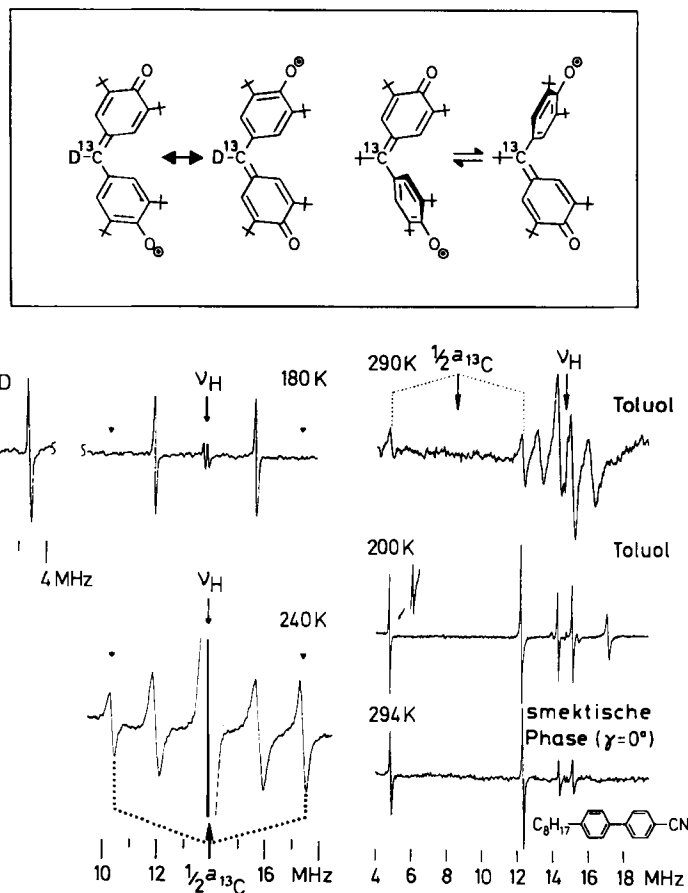


Abb. 10. ^1H -, ^2H - und ^{13}C -ENDOR-Spektren von Galvinoxyl. Die Formelbilder oben veranschaulichen, daß aus dem Galvinoxyl-Radikal mit äquivalenten Arylringen und vollständig delocalisiertem π -System durch Einführung eines sperrigen Substituenten am zentralen C-Atom ein äquilibrierendes Phenoxy-Radikal mit unterschiedlich verdrillten Arylringen wird. Vor dieser Substitution beobachtet man für das Galvinoxyl typisches ^{13}C -ENDOR-Verhalten (unten links), hingegen werden für das *tert*-Butyl-Derivat ^{13}C -ENDOR-Signale auch bei tieferen Temperaturen (200 K) oder in Lösungsmitteln mit hoher Viskosität (smektische Phase eines flüssigen Kristalls) erhalten. Man beachte besonders, daß das *tert*-Butyl-Galvinoxyl auch ^{13}C -ENDOR-Signale des *unmarkierten* Radikals, also bei natürlicher Isotopenhäufigkeit zeigt: Siehe die Linie bei 5 MHz im ENDOR-Spektrum bei 200 K (Mitte rechts), vgl. [28].

DOR-Untersuchungen in flüssigen Kristallen (vgl. Abschnitt 4) bestätigt werden konnte. Die ^{13}C -Hyperfeinkopplung resultiert fast ausschließlich aus einer π - σ -Spinpolarisation, und die Relaxationseigenschaften des ^{13}C -Kerns entsprechen in voller Übereinstimmung mit dem Experiment denen der Protonen^[30].

Unser Nachweis einer Kernresonanz an ^{13}C in natürlicher Häufigkeit mit der ENDOR-Spektroskopie gibt einen Eindruck von der durch Quantentransformation gegenüber der NMR-Spektroskopie erzielbaren Empfindlichkeitssteigerung. Kürzlich fanden wir auch, daß durch ^{13}C -ENDOR-Experimente an unmarkierten Radikalen ganze Sätze von ^{13}C -HFC-Konstanten bestimmt werden können, wenn diese Radikale möglichst weitgehend deuteriert sind^[31].

Bei der ENDOR-Untersuchung ^{13}C -markierter Radikale mit großer p_z -Spinpopulation und damit großer Hyperfeinanisotropie treten häufig ausgeprägte Intensitätsunterschiede in den ^{13}C -ENDOR-Linienpaaren auf, wobei es von der Positionierung des externen Magnetfeldes im EPR-Spektren abhängt, ob die hoch- oder die tieffrequente ENDOR-Komponente intensiver ist. Dieser Effekt ist nicht allein mit dem in Abschnitt 2.1 erwähnten „hyperfine-enhancement“ zu erklären, er ist vielmehr auf „Kreuzrelaxationsprozesse“ zurückzuführen. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, können Elektronenspin und Kernspin auch simultan umklappen. Man bezeichnet den Übergang $|+ - \rangle \leftrightarrow |- + \rangle$ (Flip-Flop) mit W_{x1} , den Prozeß $|+ + \rangle \leftrightarrow |- - \rangle$ (Flop-Flop) mit W_{x2} . Es ist leicht einzusehen, daß die für optimale ENDOR-Signale notwendige Bedingung $W_e \approx W_n$ bei wirksamen W_x -Prozessen ($W_x > W_n$) nicht mehr gilt, da bereits mit der Sättigung eines NMR-Überganges eine geschlossene „Relaxationschleife“ entsteht. Kreuzrelaxationsprozesse sind vor allem bei höheren Temperaturen und großer Hyperfeinanisotropie ($W_{x2} > W_{x1}$) oder bei zeitlich modulierten isotropen Hyperfeinkopplungen ($W_{x1} > W_{x2}$) von Bedeutung^[18b,32]. In Abbildung 11 sind die Verhältnisse unter Verwendung entsprechender Termschemata für das am zentralen C-Atom zu 90% ^{13}C -markierte, perdeuterierte Triphenylmethyl-Radikal veranschaulicht^[33]. Sättigt man z. B. die Tieffeld-EPR-Komponente, so ist im ^{13}C -ENDOR-Spektrum das hochfrequente Signal intensiver (Fall A), während die Positionierung des externen Feldes auf der Hochfeld-EPR-Komponente zu dem ENDOR-Spektrum mit dem intensiveren tieffrequenten Signal führt (Fall B). In diesem System dominiert also ein W_{x2} -Prozeß, der durch die große ^{13}C -Hyperfeinanisotropie hervorgerufen wird.

Kreuzrelaxationsprozesse von Kernen mit großer Hyperfeinanisotropie, wie sie zum Beispiel in ^{13}C -angereicherten Molekülen auftreten, lassen sich interessanterweise auch an solchen Kernen (z. B. Protonen) in diesen Molekülen nachweisen, die wegen ihrer geringen Anisotropie normalerweise keine Kreuzrelaxationseffekte zeigen. Diese Übertragung erklärt sich aus der Tatsache, daß das ungepaarte Elektron in organischen Radikalen mit allen magnetischen Kernen zu einem Multispinensemble koppelt. Es sei noch erwähnt, daß durch derartige Untersuchungen – ähnlich wie beim General-TRIPLE-Effekt – relative Vorzeichen von HFC-Konstanten bestimmt werden können. Zur näheren Erläuterung sei jedoch auf die Originalliteratur verwiesen^[18b,34].

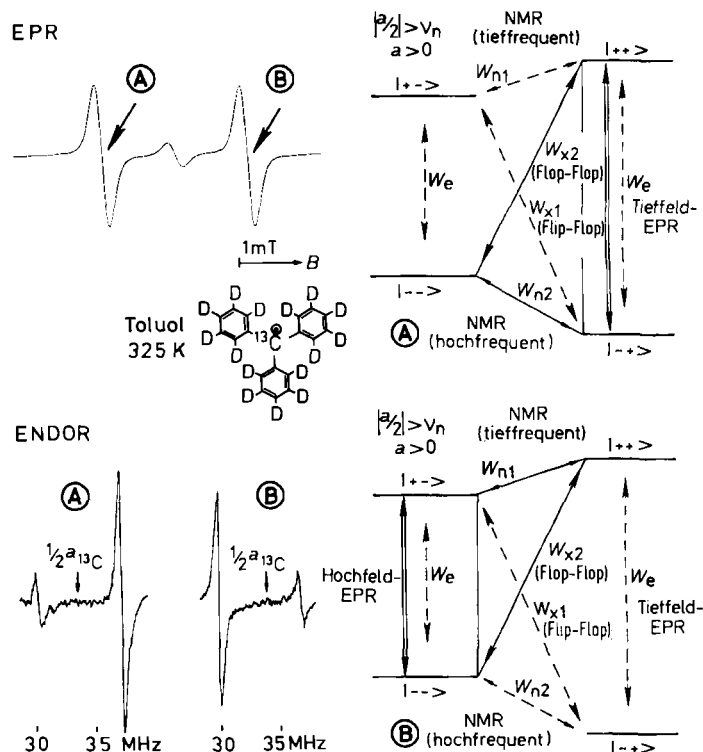


Abb. 11. EPR- und ^{13}C -ENDOR-Spektren des ^{13}C -markierten und perdeuterierten Triphenylmethyl-Radikals. Die große ^{13}C -Hyperfeinanisotropie verursacht einen dominierenden W_{x2} -Prozeß, so daß bei der Tieffeld-Positionierung A im EPR-Spektrum eine geschlossene Relaxationschleife ohne Einbeziehung von W_{n1} erhalten wird, während bei der Hochfeld-Positionierung B der NMR-Übergang W_{n2} vermieden wird. Man verdeutliche sich anhand der beiden „Vier-Niveau-Schemata“, daß im Experiment B die tieffrequente, im Fall A die hochfrequente ENDOR-Komponente intensiver ist (vgl. [33]). Dieses Verhalten ist vom Vorzeichen der ^{13}C -HFC-Konstante unabhängig.

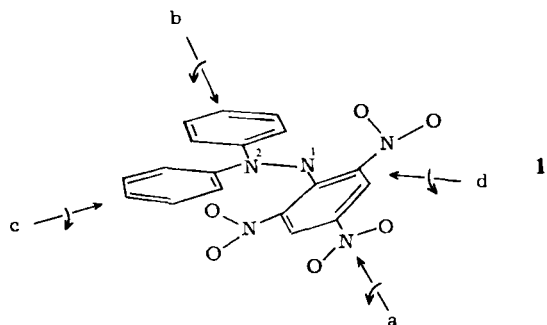
Deuterium (^2H)

In Multikern-ENDOR-Spektren können Deuteronen (Tabelle 1) trotz des kleinen magnetischen Momentes häufig mit ähnlicher Intensität wie die Protonen nachgewiesen werden (vgl. die Abbildungen 5 und 9)^[19]. Wegen der deutlich kleineren Hyperfeinanisotropie findet man den optimalen ^2H -ENDOR-Effekt im Vergleich zum ^1H -ENDOR-Effekt bei tieferer Temperatur. ^2H -ENDOR-Linien sind meistens schmäler als die ^1H -ENDOR-Signale, was sich günstig auf die Auflösung z. B. von Quadrupolaufspaltungen ($I_D = 1$) in flüssigen Kristallen auswirkt (vgl. Abschnitt 4).

Stickstoff ($^{14,15}\text{N}$)

Seit dem ersten, im Jahre 1970 von Leniart et al.^[35] publizierten, erfolgreichen ^{14}N -ENDOR-Experiment hat die ^{14}N -ENDOR-Spektroskopie insbesondere bei der Anwendung auf biologische Systeme zunehmendes Interesse erlangt (vgl. auch Abschnitt 7). Für einen ^{14}N -Kern im π -System ist das „ENDOR-Verhalten“ gut vergleichbar mit dem des ^{13}C -Isotops in ähnlicher Umgebung; die für ^{14}N mit $I_N = 1$ zusätzlich auftretende Quadrupolrelaxation kann im allgemeinen vernachlässigt werden^[7d], da die anisotrope Hyperfeinwechselwirkung den Hauptbeitrag zur Relaxation liefert (eventuelle Quadrupoleffekte lassen sich durch Vergleich mit ^{15}N -markierten Spezies erkennen, denn dieses Isotop hat kein Quadrupolmoment ($I_N = 1/2$)).

Zwei exemplarische Untersuchungen sollen hier erwähnt werden. Durch eine NMR-, EPR-, ENDOR- und TRIPLE-Studie des „Goldschmidt-Radikals“ (*N,N*-Diphenyl-*N'*-picrylhydrazyl) ließen sich vier verschiedene dynamische Prozesse im Bereich der NMR- und ENDOR-Zeitskalen unterscheiden (in der Formel 1 mit a–d bezeichnet). Die Bestimmung der kinetischen Daten gelang mit ^1H -ENDOR- und ^2H -NMR-Spektroskopie, nachdem unter anderem ^{15}N -ENDOR- und -TRIPLE-Experimente an selektiv markiertem 1 die vollständige Ermittlung der HFC-Konstanten und ihrer Vorzeichen ermöglicht hatte^[17].



Die andere ^{14}N -ENDOR-Studie am Pyrazin-Radikal-anion ist besonders bemerkenswert, weil hierbei erstmals gezeigt werden konnte, daß flüssiges Ammoniak für die

Erzeugung von stabilen Radikalanionen und für die EPR/ENDOR-Spektroskopie hervorragend geeignet ist (sehr gutes Signal/Rausch-Verhältnis, ausgeprägte TRIPLE- und Kreuzrelaxationseffekte, die die Bestimmung der relativen Vorzeichen von ^{14}N - und ^1H -HFC-Konstanten ermöglichen)^[34].

Alkalimetall-Ionen (M^\oplus)

Bekanntlich hat das „Gegenion“ bei Reaktionen organischer Ionen einen wichtigen Einfluß auf Ausbeute und Stereochemie der Produkte. Deshalb ist die Kenntnis der Art und Struktur von Ionenpaaren auch für die präparative Chemie von erheblichem Interesse. Für die Untersuchung radikalischer Ionenpaare hat sich die ENDOR-Spektroskopie insbesondere deshalb als wertvoll erwiesen, weil sie nicht nur „organische“ anionische Reste, sondern auch das Gegenion direkter Beobachtung zugänglich machte. Lubitz et al.^[36a] konnten ^7Li -, ^{23}Na -, $^{85,87}\text{Rb}$ - und ^{133}Cs -ENDOR-Signale an Metallketylen von Fluorenol nachweisen (vgl. Abb. 12). Am Beispiel des Na-Ketyls ist ferner zu erkennen, wie gut der heteronucleare TRIPLE-Resonanzeffekt wirkt^[36b]; es wird auf einer Protonenlinie gepumpt, und es reagieren auch die ^{23}Na -ENDOR-Signale! Interessanterweise ändert sich das Vorzeichen der HFC-Konstante von Natrium beim Abkühlen der Meßlösung von etwa 230 K auf 170 K. Offenbar ist die Struktur

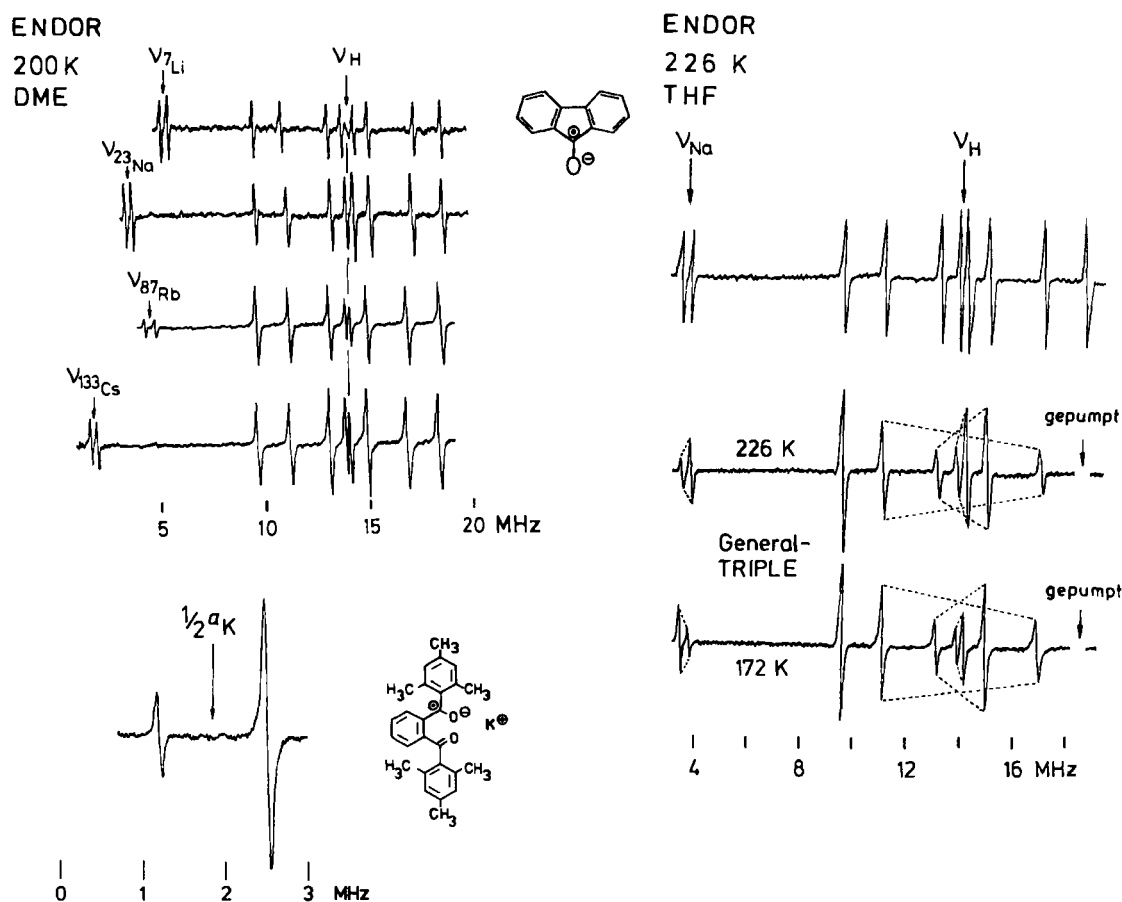


Abb. 12. Alkalimetall- und ^1H -ENDOR-Spektren von Fluorenol-Metallketylen; für das ^{39}K -ENDOR-Experiment wurde 1,2-Dimesitylbenzol-kalium verwendet. An den General-TRIPLE-Spektren des Fluorenol-Natriumketyls (unten rechts) ist deutlich die beim Abkühlen von 226 auf 172 K auftretende Vorzeichenumkehr der HFC-Konstante des ^{23}Na -Kations zu erkennen (vgl. [36a, b]).

des Ionenpaares auch in ausgeprägter Weise von der Art des Lösungsmittels und der Temperatur abhängig. Bei den untersuchten Kontakt-Ionenpaaren konnten die Spindichtverschiebungen im Fluorenon-Ketyl und am Metall selbst mit Eigenschaften der Gegenionen korreliert werden, und INDO-Rechnungen führten zu Aussagen über die Geometrie der Ionenpaare^[36a].

Der ^{39}K -ENDOR-Effekt kann aufgrund des sehr kleinen magnetischen Momentes von ^{39}K (siehe Tabelle 1) nur an Chelatkomplexen mit großer Spindichte am Kalium nachgewiesen werden. Abbildung 12 zeigt das ^{39}K -ENDOR-Linienpaar von 1,2-Dimesitylbenzol-kalium^[36a]. An einem ähnlichen Komplex konnte auch erstmals der ^{85}Rb -ENDOR-Effekt beobachtet werden^[36c].

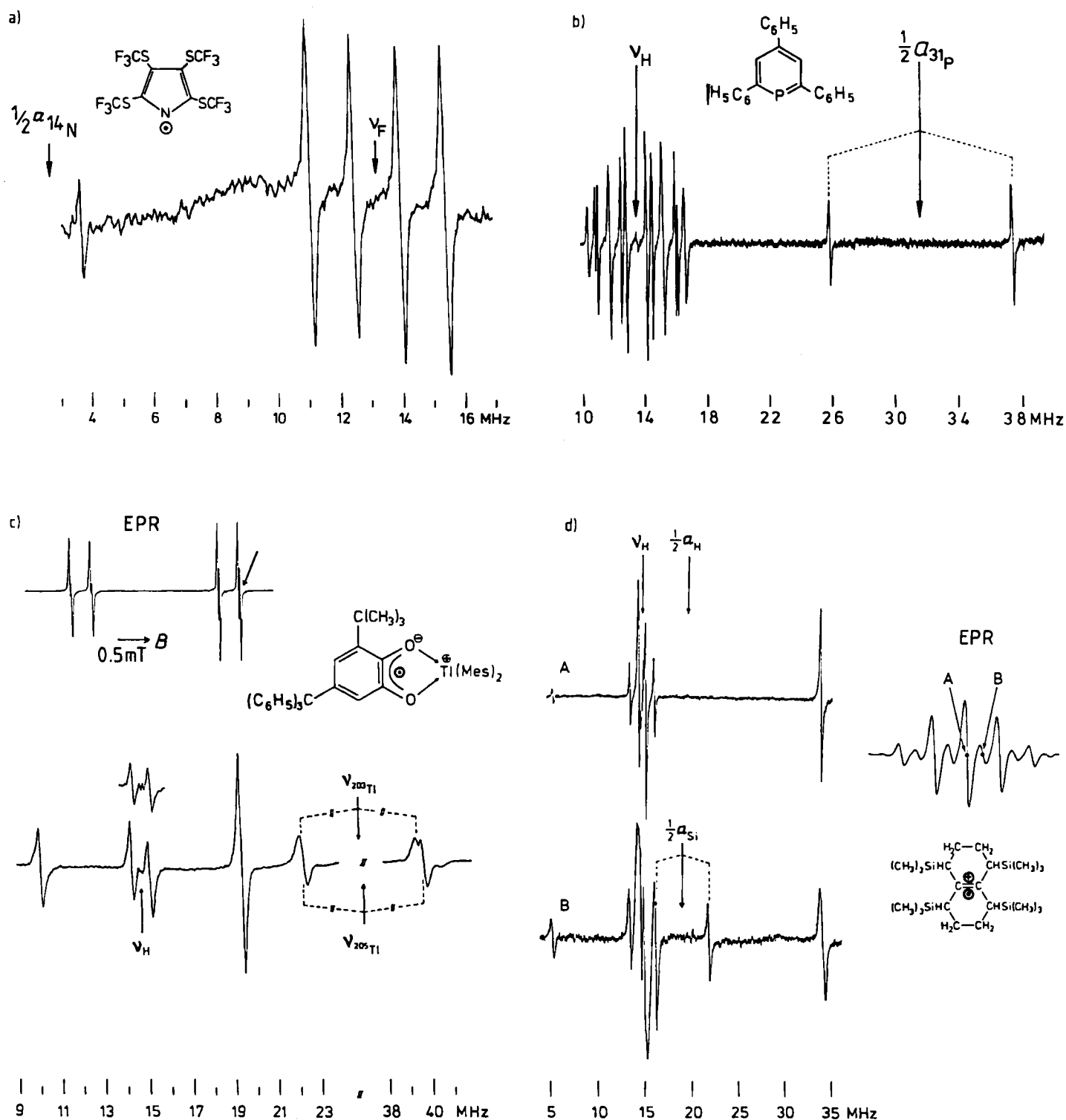


Abb. 13. ENDOR-Spektren mit Signalen verschiedener „Nichtprotonen“-Kerne (siehe Text). a) ^{19}F (in Mineralöl, 330 K); b) ^{31}P (in Toluol mit 2,4,6-Triphenylphenoxy, 225 K); c) $^{203,205}\text{Tl}$ (in Tetrahydrofuran, 260 K); d) ^{29}Si (in Dichlormethan, 235 K).

Fluor (^{19}F), Phosphor (^{31}P), Silicium (^{29}Si), Zinn ($^{117,119}\text{Sn}$), Bor ($^{10,11}\text{B}$), Aluminium (^{27}Al), Thallium ($^{203,205}\text{Tl}$)

Abbildung 13 stellt einen kleinen „Spektrenatlas“ mit weiteren, bisher nicht behandelten Nichtprotonen-ENDOR-Signalen dar. Der ^{19}F -ENDOR-Effekt wurde erstmals von Allendoerfer und Maki^[37] erwähnt und später von Lubitz et al.^[38] im Detail diskutiert. In Zusammenarbeit mit Haas et al.^[39] konnten wir das in Abbildung 13 (oben links) angegebene CF_3S -substituierte Pyrrolyl-Radikal durch ^{14}N - und ^{19}F -ENDOR-Spektroskopie identifizieren. Über ^{31}P -ENDOR-Experimente berichteten erstmals Stegmann et al.^[40]. Mit Dimroth et al.^[74,41] gelang es, ^{31}P -ENDOR-Signale an einem aus 2,4,6-Triphenylphosphabenzol durch Einwirkung von 2,4,6-Triphenylphenoxyl erzeugten Radikal zu messen (Abb. 13, oben rechts); diese Signale lassen sich eindeutig identifizieren (der Abstand der Linien beträgt $2\nu_{\text{P-P}}$), jedoch ist die Natur des Radikals noch unbekannt. Bei Versuchen mit Stegmann et al.^[24,42] konnten erstmals ^{203}Tl - und ^{205}Tl -ENDOR-Signale (Abb. 13, unten links) vom Komplex eines *o*-Semichinons mit Diorganothallium(III) erhalten werden. In Zusammenarbeit mit Bock et al.^[16] wurden erstmals ^{29}Si -ENDOR-Signale an siliciumorganischen Radikalen mit natürlicher Isotopenverteilung nachgewiesen (Abb. 13, unten rechts). Mit West konnten wir an Radikalanionen von vier- und fünfgliedrigen Cyclosilanen mit natürlicher Isotopenverteilung neben ^{29}Si - auch ^{13}C -ENDOR-Signale messen^[43]. Die Ergebnisse ermöglichten Aussagen über die Bindungsverhältnisse in diesen Systemen.

Die Fortentwicklung der ENDOR-Spektroskopie dokumentiert sich auch in ihrer ständigen Erweiterung auf neue magnetische Kerne. So berichteten Stegmann et al.^[44] kürzlich über erfolgreiche ^{117}Sn - und ^{119}Sn -ENDOR-Experimente an *o*-Benzosemichinonen mit Triphenylzinn(IV) als Gegenion. Kaim und Lubitz konnten erstmals ^{10}B - und ^{11}B -^[45a] sowie ^{27}Al -ENDOR-Signale^[45b] an Diazaaren-Radikalanionen mit den entsprechenden Trialkylelement-Spezies als Koordinationspartner beobachten.

In einer 1981 publizierten theoretischen Untersuchung zur ENDOR-Empfindlichkeit von magnetischen Kernen^[74] wurden Voraussagen über die Chancen getroffen, ENDOR-Signale von weiteren, sehr interessanten Kernen wie ^{17}O , ^{33}S und $^{35,37}\text{Cl}$ zu erhalten, die meistens große Quadrupolkopplungen aufweisen. So wurde abgeschätzt, daß die auch für biologische Studien relevante ^{17}O - und ^{33}S -ENDOR-Spektroskopie in Lösung wohl nur an wenigen Molekülen mit besonders geeigneter Struktur möglich sein dürfte.

4. ENDOR-Spektroskopie in flüssigkristallinen Lösungen

Die bisher beschriebenen ENDOR-Experimente in isotroper flüssiger Lösung ergeben – neben den Freien Kernfrequenzen – als einzige Meßgrößen die isotropen HFC-Konstanten. Um detailliertere Informationen über Spindichteverteilung und geometrische Parameter erhalten zu können, ist oft die Kenntnis der anisotropen Hyperfeinwechselwirkungen erforderlich. Durch Spektroskopie in ungeordneten Feststoffen wie Pulvern oder Gläsern werden anisotrope Meßgrößen zwar im Prinzip zugänglich,

doch ist der Informationsgehalt infolge des drastischen Auflösungsverlustes stark eingeschränkt^[46]. Dagegen sind durch Einkristalluntersuchungen, bei denen paramagnetische „Gastmoleküle“ in hinreichender Verdünnung in diamagnetische „Wirtkristalle“ eingebaut sind, zumeist alle isotropen und anisotropen Daten zugänglich. Doch abgesehen vom hohen Zeitaufwand für Züchtung und spektroskopische Untersuchung von Einkristallen sind diamagnetisch verdünnte Einkristalle nur von wenigen paramagnetischen Systemen herstellbar. Mit Flüssigkristallen als Lösungsmittel lassen sich die Vorteile der Spektroskopie in Lösung (hohe Auflösung) und an Einkristallen (anisotrope Wechselwirkungen werden nicht ausgemittelt) miteinander verbinden. Flüssige Kristalle eignen sich als anisotrope Lösungsmittel, weil sich die in ihnen vorliegende Fernordnung auch auf gelöste Moleküle überträgt^[47]. Breite Anwendung in der NMR-^[48] und auch in der EPR-Spektroskopie^[15] haben nematische Phasen gefunden, die sich bereits durch ein Magnetfeld von etwa 0.2 T makroskopisch ausrichten lassen^[49]. Smektische A-Phasen lassen sich durch ein Magnetfeld nicht direkt, aber in einigen Fällen indirekt durch langsames Abkühlen einer vorgeschalteten nematischen Phase ausrichten. Das „Einfrieren“ der Vorzugsrichtung ermöglicht dann die Untersuchung von Winkelabhängigkeiten^[50].

Abbildung 14 zeigt schematisch die nematische Phase und die smektische A-Phase des Flüssigkristalls 4-Cyan-4'-octylbiphenyl (8CB). Die hervorragende Eignung von smektischen A-Phasen für ^1H - und ^2H -ENDOR-Untersuchungen konnte erstmals am Beispiel von Coppingers Radikal demonstriert werden^[51].

Die teilweise Ausrichtung gelöster Radikale in flüssigkristallinen Phasen, die sich durch eine Ordnungsmatrix beschreiben läßt^[49], hat zur Folge, daß die gemessenen Hyperfeinkopplungskonstanten eine Verschiebung Δa durch einen anisotropen Beitrag erfahren^[15]. Für den einfachsten Fall, daß axiale Symmetrie um eine Achse *z* vorliegt, gilt

$$\Delta a = \bar{a}_{\text{nem}} - a_{\text{iso}} = O_{zz} A'_{zz} \quad (5)$$

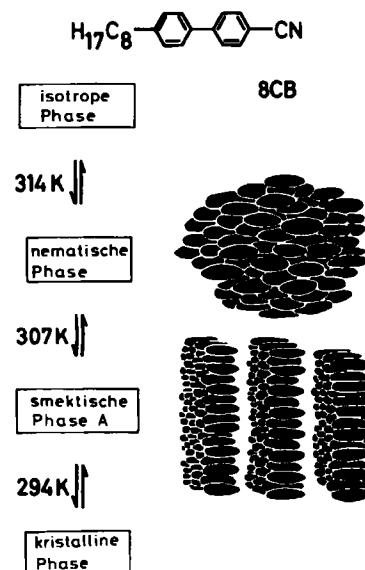


Abb. 14. Schematische Darstellung verschiedener flüssig-kristalliner Phasen von 4-Cyan-4'-octyl-biphenyl (8CB).

wobei O_{zz} den Ordnungsparameter symbolisiert, der Werte zwischen -0.5 und 1 annehmen kann ($O_{zz}=1$ entspräche vollkommener Ausrichtung), und A'_{zz} die axiale Komponente der dipolaren Hyperfeinwechselwirkung. Je nach den zusätzlich verfügbaren Kenntnissen gestatten die Meßwerte Rückschlüsse auf den Ordnungsgrad, die Vorzugsorientierung oder die anisotrope Hyperfeinwechselwirkung. Messungen in Flüssigkristallen können auch dazu dienen, zufällige Äquivalenzen von HFC-Konstanten aufzuheben, wie die ENDOR-Spektren des 2-Methylphenalenyl-Radikals zeigen (Abb. 15). In isotroper Phase (oberes Spektrum) haben die Methylprotonen- und die kleine Ringprotonen-HFC-Konstante zufällig fast den gleichen Wert. Beim Übergang zur smektischen A-Phase (unteres Spektrum) ergibt sich hingegen eine deutliche Aufspaltung, da die anisotropen Verschiebungen in entgegengesetzter Richtung wirken. Die im Bereich der großen Ringprotonen-HFC-Konstante beobachtbare Aufspaltung läßt sich auf eine durch den Methylsubstituenten bewirkte zusätzliche Ausrichtung der Moleküle zurückführen^[52].

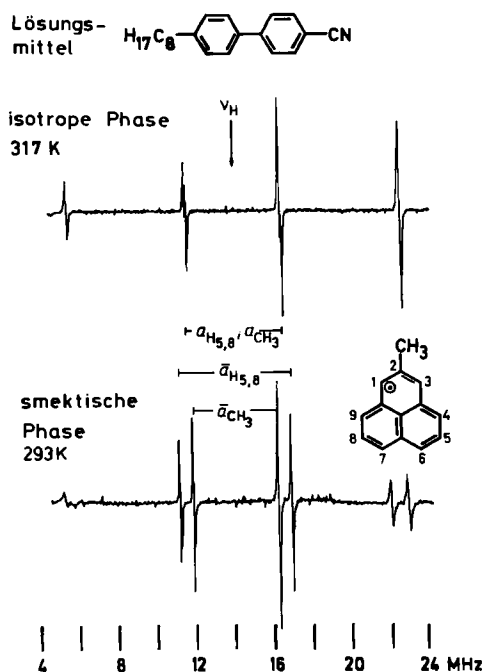


Abb. 15. ENDOR-Spektren des 2-Methylphenalenyl-Radikals im flüssigen Kristall 8CB. Während die isotropen HFC-Konstanten der Methylprotonen und der Protonen in 5,8-Position (zufällig) nahezu äquivalent sind, tritt beim Übergang von der isotropen in die smektische Phase eine deutliche Aufspaltung der Resonanzlinien auf (vgl. [52]).

In flüssigkristallinen Lösungen erlangt die Quadrupolwechselwirkung von Kernen mit einem Kernspin $I \geq 1$ (^2H , ^{14}N) Bedeutung. Ähnlich wie bei der NMR-, jedoch im Unterschied zur EPR-Spektroskopie, führt diese Wechselwirkung in orientierten Proben (oder in festen Lösungen) zu Aufspaltungen der ENDOR-Linien. Erstmals konnten Dinse, Möbius et al.^[53] derartige Quadrupolaufspaltungen für ^{14}N -ENDOR-Linien an Nitroxid-Radikalen in „Licristal – Nematische Phase IV“ nachweisen. Gemäß der vereinfachten Beziehung

$$\delta_Q \approx \frac{1}{2} O_{zz} e^2 q_{xx} Q/h \quad (6)$$

($I=1$, Vernachlässigung des Asymmetrieparameters) hängt die Quadrupolaufspaltung δ_Q vom Ordnungsgrad, von der Orientierung der Bindungsachsen und von der Quadrupolkopplungskonstante $e^2 q_{xx} Q/h$ ab^[19]. Abbildung 16 zeigt ENDOR-Spektren des unmarkierten und des in den *para*-Stellungen deuterierten Benzilsemidion-Radikalanions im Flüssigkristall 8CB^[54]. Im ^2H -ENDOR-Spektrum (Mitte rechts, $\delta_Q = 160$ kHz) sind die in der smektischen Phase auftretenden Quadrupolaufspaltungen deutlich zu erkennen. Aus der Größe dieser Aufspaltungen ist zu schließen, daß die C–D-Bindungsachsen annähernd parallel zur Vorzugsrichtung des Flüssigkristalls liegen, was nur bei einem *trans*-konfigurierten Molekül möglich ist. Weiterhin illustriert Abbildung 16 die starke Abhängigkeit der beobachteten Hyperfein- und Quadrupolaufspaltungen vom Winkel γ zwischen der Vorzugsrichtung der smektischen Phase und dem Magnetfeld. Zwei Messungen in einer smektischen A-Phase bei nicht gedrehter ($\bar{a}(0^\circ) = a + \Delta a$) und bei um 90° gedrehter Probe ($\bar{a}(90^\circ) = a - \frac{1}{2} \Delta a$) gestatten die Ermittlung der isotropen HFC-Konstante und der anisotropen Verschiebung Δa unter den gleichen experimentellen Bedingungen. Die Verwendung nematischer Phasen erfordert hingegen eine Vergleichsmessung zur Bestimmung der isotropen HFC-Konstante, entweder bei höherer Temperatur im gleichen Lösungsmittel oder aber in einem anderen Lösungsmittel, was naturgemäß zu Fehlern führen kann^[50].

Quadrupolaufspaltungen von ^2H -ENDOR-Linien wurden erstmals am deuterierten Phenalenyl-Radikal beobachtet^[19], und Untersuchungen an substituierten Phenalenyl-Radikalen ermöglichten eine Bestimmung der Quadrupolkopplungskonstanten ($e^2 q_{CD} Q/h = 174 \pm 10$ kHz, Asymmetrieparameter $\eta = 0.08 \pm 0.04$)^[52]. Nach den bisher be-

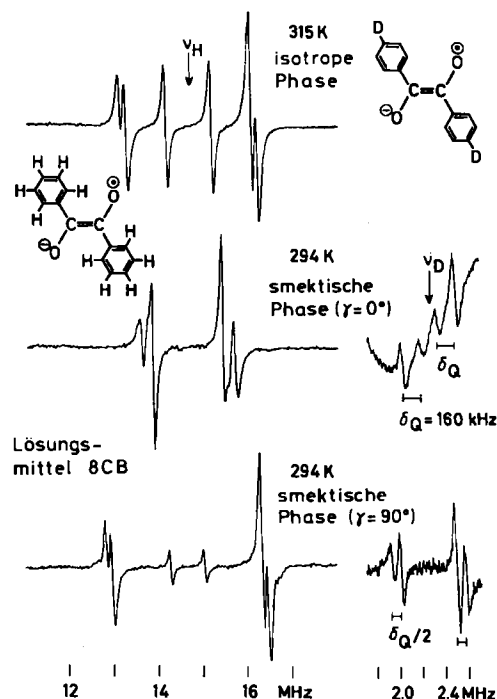


Abb. 16. ENDOR-Spektren des Benzilsemidion-Radikalanions im flüssigen Kristall 8CB. In der smektischen Phase findet beim Drehen des Probenröhrchens im Magnetfeld *keine* Reorientierung der Moleküle statt – also kann die Winkelabhängigkeit der Resonanzfrequenzen, ähnlich wie in Einkristallen, untersucht werden. Die selektiv deuterierte Verbindung zeigt eine ausgeprägte Quadrupolaufspaltung (vgl. [54]).

kannten ^2H -ENDOR-Untersuchungen an Radikalen sowie ^2H -NMR-Messungen an diamagnetischen Molekülen^[55] weisen ^2H -Quadrupolkopplungskonstanten von C–D-Bindungen eine nur geringe Variationsbreite auf. Die beobachteten Quadrupolaufspaltungen lassen daher Aussagen über Radikalstrukturen zu, wie bereits am Beispiel des Benzilsemidions erläutert wurde. Als weiteres Beispiel sei erwähnt, daß auf diese Weise eine Abschätzung der Verdrehungswinkel im Triphenylmethyl-Radikal möglich war (ca. 30°)^[56].

„Nichtprotonen“-ENDOR-Untersuchungen (vgl. Abschnitt 3) in flüssigen Kristallen sind wegen der hohen Viskosität von nematischen und erst recht von smektischen Phasen stark eingeschränkt. Hohe ^{13}C -ENDOR-Signalintensitäten konnten jedoch in solchen Fällen erhalten werden, in denen die ^{13}C -Hyperfeinanisotropie außergewöhnlich klein ist, wie bei den bereits erwähnten Galvinoxyl- und Phenoxyl^[28] (vgl. Abb. 10). Die hohe Viskosität von Flüssigkristallen läßt sich andererseits zuweilen zunutze machen, um dynamische Prozesse „einzufrieren“. So konnte im Falle von Coppingers Radikal eine Aufspaltung der Ringprotonen-Signale beobachtet werden, die in Lösungsmitteln mit geringer Viskosität wegen der raschen Rotation der Phenylgruppen zusammenfallen^[51]. Ein weiteres Problem wirft die geringe Löslichkeit von Radikationen in flüssigen Kristallen auf. Kürzlich wurde jedoch nachgewiesen^[54], daß in einigen Fällen eine hinreichende Radikalkonzentration erreichbar ist, wenn das Alkalimetall-Gegenion durch Kronenether komplexiert wird, oder wenn lipophile quaternäre Ammonium-Gegenionen verwendet werden (vgl. auch Abb. 16).

5. ENDOR-Spektroskopie an organischen Radikalen mit mehreren ungepaarten Elektronen

Enthält ein Molekül mehr als ein ungepaartes Elektron, so treten magnetische Besonderheiten auf, die durch die *skalare Austauschwechselwirkung* und die *dipolare Elektronenwechselwirkung* verursacht werden. Am Beispiel von Molekülen mit zwei ungepaarten Elektronen sei verdeutlicht, daß die Stärke der Wechselwirkungen eine sinnvolle Klassifizierung in „Doppel-Dublett-Radikale“, „Diradikale“ und „eigentliche Triplet-Systeme“ erlaubt. Ein Diradikal liegt dann vor, wenn in isotroper flüssiger Lösung ein EPR-Signal beobachtet werden kann, dessen Habitus sich von dem eines entsprechenden Monoradikals unterscheidet^[57]. Somit werden Diradikale einerseits von Doppel-Dublett-Radikalen und andererseits von den eigentlichen Triplet-Molekülen abgegrenzt, bei denen die starke dipolare Kopplung einen so großen Beitrag zur Elektronenspinrelaxation liefert, daß in flüssiger Lösung kein EPR-Spektrum nachweisbar ist^[58]. Ist die Austauschwechselwirkung groß gegenüber der Hyperfeinwechselwirkung ($|J| \gg |a|$), so muß die strenge Kopplung der ungepaarten Elektronen zu den Spinzuständen $S=1$, $S=3/2$, $S=2$, ... berücksichtigt werden. Aus dem einfachen „Vier-Niveau-Schema“ eines Dublett-Radikals werden die in Abbildung 17 dargestellten komplizierteren Energieniveaudiagramme. Die Anzahl der EPR-Hyperfeinkomponenten erhöht sich, da die ungepaarten Elektronen formal über das gesamte Molekül delokalisiert sind und jeweils mit allen magnetischen Kernen koppeln. Bei gleichbleibender Gesamtauf-

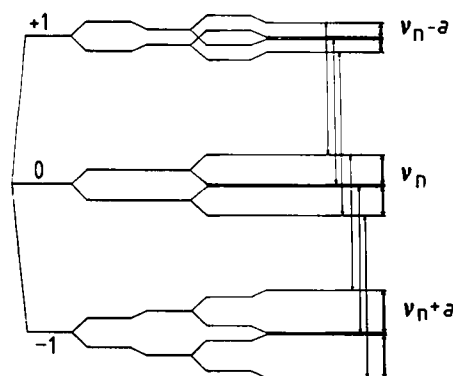
spaltung nimmt die spektrale Liniendichte zu, und die Auflösung wird im Vergleich zum entsprechenden Monoradikal schlechter (siehe Abbildung 19). Hier ist der mit der ENDOR-Spektroskopie erreichbare Auflösungsgewinn besonders vorteilhaft. Die erste erfolgreiche ^1H -ENDOR-Untersuchung an Diradikalen (z. B. *p*-Phenylbisgalvinoxyl) in Lösung wurde im Jahre 1975 publiziert^[60]. Nach der ENDOR-Resonanzbedingung (Gl. (3)) erwartet man für ein Diradikal mit $S=1$ ($|J| \gg |a|$) und $M_S = \pm 1, 0$ drei ENDOR-Linien pro Satz äquivalenter Kerne^[61]. Es wurde gefunden, daß die ENDOR-Linien eines derartigen Diradikals, das aus gleichartigen Monoradikalhälften zusammengesetzt ist, bei den *gleichen* Positionen auftreten wie diejenigen des Monoradikals. Allerdings zeigen die ENDOR-Signale infolge der durch die dipolare Elektronenwechselwirkung verursachten Relaxationsprozesse eine deutliche Linienverbreiterung und ein anderes Temperatur- und Sättigungsverhalten. Die erwartete Linie bei der Freien Protonenfrequenz, die aus NMR-Übergängen in der Komponente $M_S=0$ resultieren sollte, ließ sich jedoch nicht beobachten. Ein Triplet-Zustand ist also mit ENDOR-Spektroskopie in Lösung nicht ohne weiteres eindeutig nachzuweisen. Dieser Nachweis gelang aber durch ^{13}C -Markierung^[62]. Abbildung 18 zeigt die EPR- und ENDOR-Spektren der ersten (Dublett-) und zweiten (Triplet-)-Dehydrierungsstufe von isotonenmarkiertem *p*-Phenylbisgalvinoxyl. Wie erwartet (vgl. Abschnitt 3), erscheinen für die erste Dehydrierungsstufe bei der tieferen Temperatur (210 K) nur die ^1H - und ^2H -ENDOR-Signale; das ^{13}C -ENDOR-Linienpaar ist erst bei höherer Temperatur (250 K) und höherer RF-Leistung nachweisbar. Die ausgeprägten Aufspaltungen der den *m*-Protonen zuzuordnenden Signale lassen sich mit einer sterisch bedingten Inäquivalenz dieser Protonen erklären. Die Untersuchung der zweiten Dehydrierungsstufe zeigt *eindeutig*, daß ein Diradikal im Triplet-Zustand ($S=1$) mit $|J| \gg |a|$ vorliegt: (a) Das EPR-Spektrum besteht aus einem 1:2:1-Triplett von Nonetts, somit koppelt jedes der beiden ungepaarten Elektronen mit allen (acht) *m*-Protonen und mit beiden ^{13}C -Kernen. (b) Im Zentrum des EPR-Spektrums können nur Mono- und Diradikale ohne ^{13}C -Markierung oder Diradikale mit zwei ^{13}C -Kernen absorbieren. Positioniert man aber das externe Magnetfeld in der Spektralmitte und erhält man dann ^{13}C -ENDOR-Signale, so muß eine zweifach ^{13}C -markierte Spezies, also ein Diradikal vorliegen.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß ENDOR-Untersuchungen auch an unsymmetrischen Diradikalen möglich sind^[63]. Sind beispielsweise ein Nitroxid- und ein Galvinoxyl-Fragment miteinander verknüpft, so ist von unterschiedlichen *g*-Faktoren und HFC-Konstanten der Radikalfragmente auszugehen. Die Interpretation der EPR- und ENDOR-Spektren solcher „gemischter“ Diradikale ist insbesondere im intermediären Fall $|J| \approx |a|$ schwierig. Eine detaillierte Analyse gestattet die Vorzeichenbestimmung des Austauschintegrals J ^[63].

Die durch die dipolare Elektronenwechselwirkung verursachten Relaxationsprozesse führen nicht nur zu einer Linienverbreiterung, sondern infolge der Vergrößerung der Elektronenspin-Relaxationsrate W_e auch zu einer Verringerung des ENDOR-Effektes (vgl. Abschnitt 2.1). ENDOR-Untersuchungen in flüssiger Lösung gelingen daher nur an Diradikalen mit verhältnismäßig kleiner dipolarer

Triplet, $S=1$

$$\nu_{\text{ENDOR}} = \left| \nu_n \pm a^{\dagger} \right|, \nu_n$$

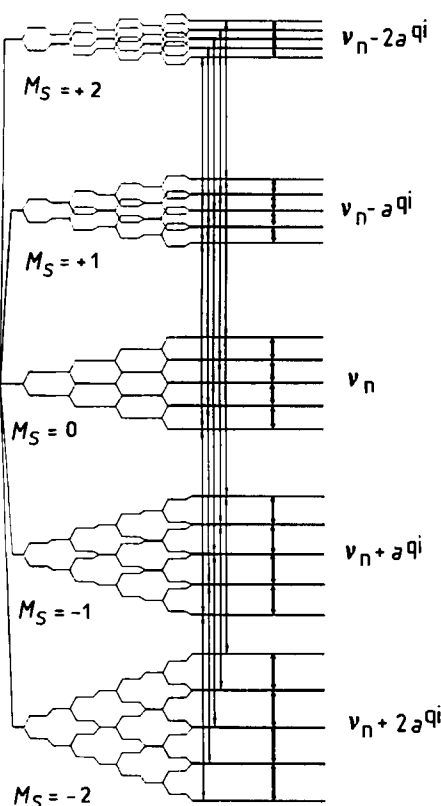


$$0 < S \cdot a < \nu_n$$

Quintett, $S=2$

$$\nu_{\text{ENDOR}} = \left| \nu_n \pm 2a^{qi} \right| ;$$

$$\left| \nu_n \pm a^{qi} \right| ; \nu_n$$



Quartett, $S=3/2$

$$\nu_{\text{ENDOR}} = \left| \nu_n \pm 3/2 a^{qu} \right|,$$

$$\left| \nu_n \pm 1/2 a^{qu} \right|$$

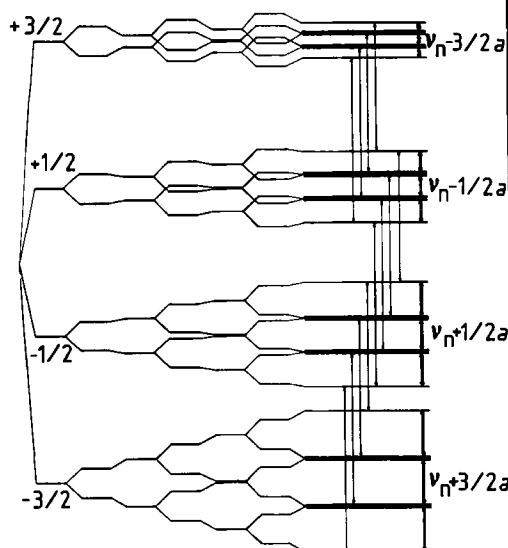


Abb. 17. Energieniveaudiagramme für organische Mehrspinsysteme im Triplet-, Quartett- und Quintett-Zustand zur Deutung der in Abb. 18 und 19 wiedergegebenen ENDOR-Spektren. Man beachte im Diagramm des Diradikals die gleiche Pfeillänge (energetische Entartung) für die EPR-Übergänge $| -1 \rangle \leftrightarrow | 0 \rangle$ und $| 0 \rangle \leftrightarrow | +1 \rangle$, siehe Text.

Kopplung (Nullfeldaufspaltungsparameter $D \leq 100$ MHz). Als Alternative bieten sich jedoch Messungen in glasartiger Matrix an. Die dipolare Elektronenwechselwirkung wird hierbei nicht mehr durch die Brownsche Molekülbewegung ausgemittelt, sondern verursacht eine Aufspaltung der EPR-Übergänge $| -1, M_I \rangle \leftrightarrow | 0, M_I \rangle$ und $| 0, M_I \rangle \leftrightarrow | +1, M_I \rangle$ ^[64], die in isotroper flüssiger Lösung entartet sind. Diese Entartung verhindert übrigens, daß ENDOR-Linien bei den Freien Kernfrequenzen in isotroper flüssiger Lösung nachgewiesen werden können, da beide Übergänge in gleichem Maße gepumpt werden und die thermische Kernspinpolarisation im Zustand $M_S = 0$ ungestört bleibt (vgl. auch Abb. 17). In glasartiger Matrix

läßt sich diese dritte ENDOR-Komponente hingegen nachweisen: Man findet im allgemeinen ein intensives schmales Signal bei der Freien Protonenfrequenz, und eine ENDOR-Linie bei der Freien ^{13}C -Frequenz konnte sogar an unmarkierten Radikalen beobachtet werden^[65]. Darüber hinaus läßt sich für jeden Satz äquivalenter Kerne eine weitere, hyperfeinverschobene ENDOR-Linie nachweisen, deren Lage von der Wahl der gepumpten EPR-Komponente abhängt. Daraus ist die Größe der betreffenden Hyperfeinkomponente sowie ihr Vorzeichen relativ zu dem des Nullfeldaufspaltungsparameters ableitbar^[66]. Vor kurzem gelang es sogar, *photoangeregte* Triplet-Zustände (z. B. von Naphthalin) auf diese Weise zu untersuchen^[21].

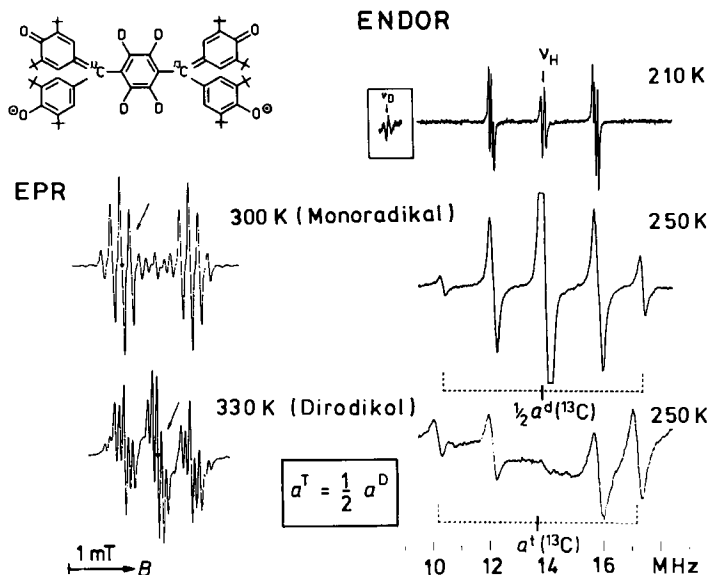


Abb. 18. EPR- und ENDOR-Spektren der ersten (Monoradikal, oben und Mitte) und zweiten Dehydrierungsstufe (Diradikal, unten) eines isotopenmarkierten Galvinoxyls (vgl. [62]). Die Pfeile bezeichnen die jeweiligen Feldpositionierungen im ENDOR-Experiment. Das Auftreten der ^{13}C -ENDOR-Signale im Spektrum rechts unten beweist das Vorliegen eines Triplett-Zustandes (vgl. Text).

Am Beispiel eines dreifach ^{13}C -markierten Trisgalvinoxyls soll gezeigt werden, daß ^1H - und ^{13}C -ENDOR-Spektroskopie auch an Triradikalen erfolgreich anzuwenden ist^[67]. Nach der ENDOR-Resonanzbedingung erwartet man für ein Quartett-Molekül mit $S=3/2$ vier ENDOR-Signale pro Satz äquivalenter Kerne, die aus NMR-Übergängen in den Niveaus $M_S = \pm 1/2$ und $\pm 3/2$ resultieren (vgl. Abb. 17). In Übereinstimmung mit theoretischen Überlegungen^[65] weisen die zu den Niveaus $M_S = \pm 1/2$ oder

$M_S = \pm 3/2$ gehörenden ENDOR-Signale unterschiedliches Relaxations- und Sättigungsverhalten auf. Nach den bisher bekannten Ergebnissen ist der erfolgreiche Nachweis von ENDOR-Signalen an einem Quartett-Molekül in flüssiger Lösung an dessen dreizählige Symmetrie gebunden. Sind die Beziehungen der einzelnen Spinträger zueinander unterschiedlich (Austauschwechselwirkung, Dipolkopplung), so liegen keine reinen Quartett-, sondern Mischzustände vor, wodurch die Relaxationseigenschaften offenbar entscheidend beeinflusst werden.

Von einem Molekül mit vier Galvinoxylkomponenten können je nach Dehydrierungsstufe Dublett- und, unter bestimmten geometrischen Voraussetzungen, Triplett-, Quartett- und Quintett-Zustände erwartet werden. Ein Tetraradikal mit *tetraedrischer Symmetrie* sollte zwei ausschlaggebende Vorteile bieten: Die Austauschwechselwirkung ist zwischen sämtlichen Paaren von Spinträgern gleich, so daß der Bildung eines thermisch populierte Quintett-Zustandes nichts im Wege steht, und die Nullfeldaufspaltung ist gleich Null^[68]. Diese Voraussagen wurden durch die ENDOR-Untersuchung eines stufenweise oxidierten tetraedrischen Tetragalvinoxyls vollauf bestätigt, wie Abbildung 19 demonstriert.

Man erkennt die in den EPR-Spektren vom Dublett zum Quintett-Zustand abnehmende Auflösung (Abb. 19, links), während die ENDOR-Spektren (Abb. 19, rechts) alle nach der ENDOR-Resonanzbedingung (Gl. (3) mit $S=1/2$ bis 2) erwarteten Signale zeigen (abgesehen von Linien bei der Freien Protonenfrequenz), siehe dazu auch Abbildung 17. Naturgemäß lassen sich nur die Proben der ersten und der vierten Dehydrierungsstufe in reiner Form einstellen; die diradikalische Stufe enthält noch Mono- und Triradikal, die triradikalische Stufe noch Di- und Tetraradikal. Die Fähigkeit der ENDOR-Spektroskopie zur

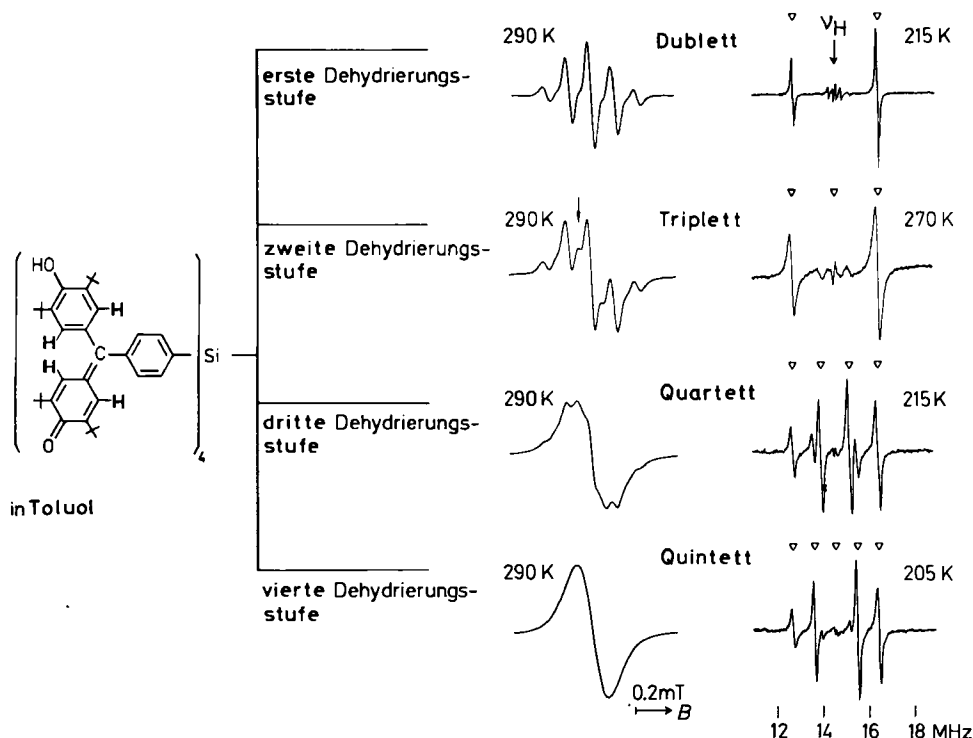


Abb. 19. EPR- und ENDOR-Spektren der vier Dehydrierungsstufen eines Tetragalvinoxyls. Man beachte die mit zunehmender Multiplizität abnehmende Auflösung der EPR-Signale, während die (durch die Dreiecke markierten) erwarteten ENDOR-Signale vollständig aufgelöst sind (vgl. [68]).

Selektion einer Spezies aus einer Mischung verschiedener paramagnetischer Moleküle ist auch hier am Beispiel des Diradikals erkennbar (Abb. 19).

6. Intramolekulare dynamische Prozesse

Die Aussagekraft der ENDOR-Spektroskopie ist nicht auf statische Moleküleigenschaften beschränkt, sondern sie vermag ähnlich wie die NMR- oder die EPR-Spektroskopie auch Einblicke in die molekulare Dynamik zu vermitteln^[7a, 69]. Dynamische Vorgänge wie gehinderte Rotation von Molekülfragmenten, Ringinversion, pyramidale atomare Inversion, intramolekularer Elektronentransfer, Ionenpaarumwandlung oder Torsionsschwingungen können die Linienbreiten und -positionen von Resonanzsignalen beeinflussen, soweit die Lebensdauern der Einzelzustände im Bereich des „Zeitfensters“ der Methode liegen. Die Zeitskala der ENDOR-Spektroskopie entspricht mit 10^{-9} – 10^{-4} s derjenigen der EPR-Spektroskopie, während die NMR-Spektroskopie an diamagnetischen Molekülen eine „langsamere“ Methode ist (10^{-5} – 10^{-1} s). Abbildung 20 zeigt als typisches Beispiel die Temperaturabhängigkeit des hochfrequenten ENDOR-Signals der *ortho*-Protonen des 4,4'-Dimethyl-*m*-terphenyl-Radikalanions^[13]. Bei hoher Temperatur sind diese Protonen infolge rascher Rotation der Tolygruppen spektroskopisch äquivalent. Mit abnehmender Temperatur wird das Signal breiter und spaltet sich unterhalb der Koaleszenztemperatur (157 K) in zwei getrennte Signale, die bei weiterer Temperaturerniedrigung schmaler werden. Die Rotation der Tolygruppen ist nunmehr langsamer bezüglich der ENDOR-Zeitskala, so daß die Inäquivalenz der *ortho*-Protonen in diesen Gruppen (Verdrillungswinkel ca. 50°) in Erscheinung tritt.

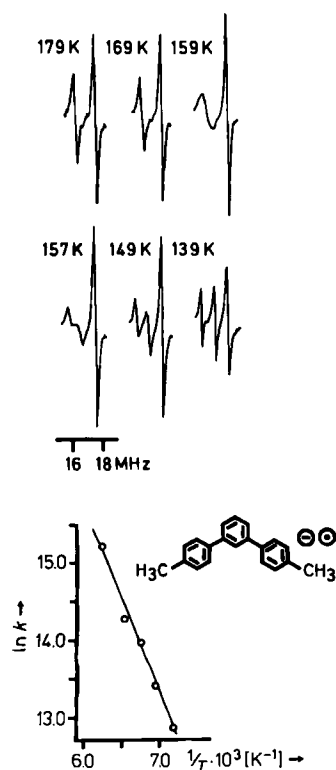


Abb. 20. ENDOR-Teilspektren des 4,4'-Dimethyl-*m*-terphenyl-Radikalanions bei verschiedenen Temperaturen (Koaleszenztemperatur 157 K) in 2-Methyltetrahydrofuran. Aus dem Arrhenius-Diagramm (unten) können die Aktivierungsenergie und der Frequenzfaktor entnommen werden (vgl. [13]).

Die intramolekularen dynamischen Prozesse lassen sich meistens als Sprungprozesse zwischen zwei bis vier Einzelzuständen beschreiben. Dabei wird vorausgesetzt, daß die Sprungzeit klein gegen die mittlere Lebensdauer eines Einzelzustandes ist. Bei der Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten durch Linienformanalysen verfährt man weitgehend analog zu den von der dynamischen NMR-Spektroskopie her bekannten Methoden^[70]. Zur Auswertung können die Linienbreiten oder -abstände herangezogen werden^[71]. Die vom dynamischen Effekt herrührende Verbreiterung ergibt sich (näherungsweise) durch Vergleich mit einem Referenzsignal derselben Probe, das von diesem Effekt nicht berührt wird. Über die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten lassen sich mit der Arrhenius-Gleichung die Aktivierungsenergie E_a des dynamischen Prozesses ($\ln k = -E_a/RT + \ln A_0$; siehe Abb. 20) und nach der Eyringschen Theorie die Aktivierungsenthalpie und -entropie bestimmen (siehe dazu^[72]). Im folgenden seien einige Anwendungsbeispiele erwähnt.

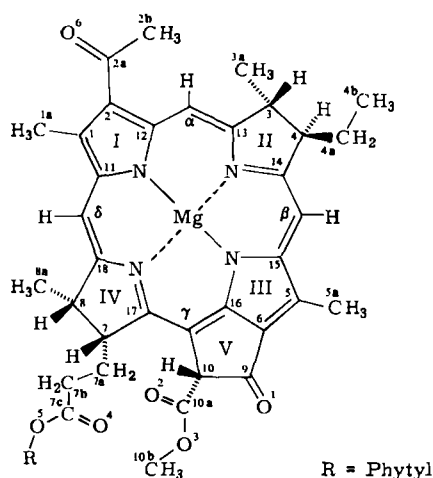
Die ENDOR-Spektroskopie diente zur Untersuchung der behinderten Rotation von Alkylseitenketten in den Radikalanionen von Vitamin K₁ und Ubisemichinon^[73] sowie von Phenylgruppen in Silol^[72a] und in Terphenyl-Radikalanionen^[13, 74] und im *N,N*-Diphenyl-*N'*-picrylhydrazyl (siehe Abschnitt 3)^[17]. Im Falle von Phenyl-naphthalin-Radikalanionen konnten zwei dynamische Prozesse unterschieden werden, nämlich behinderte Rotation und Ionenpaarbildung^[75]. Gegenstand ausführlicher Untersuchungen war die behinderte Rotation der Aroxylgruppen in Galvinoxyl^[28, 72b, 76], deren Mechanismus durch systematische Variation der Substituenten am zentralen Kohlenstoffatom und durch ¹³C-Markierung (vgl. Abschnitt 3) weitgehend geklärt worden ist. Die innere Dynamik in Tetraaryl- und in Bis(biphenylyl)allyl-Radikalen wurde ebenfalls untersucht^[27, 77]. Ein an Triphenylmethyl-Derivaten beobachteter dynamischer Prozeß wurde als Sprung zwischen links- und rechtsgängigen Propellerformen gedeutet^[78]. Die ENDOR-Signalintensitäten wurden zur Untersuchung des intramolekularen Kationenaustausches in 2,5-Di-*tert*-butyl-*p*-benzosemichinon-Ionenpaaren benutzt^[79]. Eine Reihe von Arbeiten befaßte sich mit der Messung der Temperaturabhängigkeit von β -Protonen-HFC-Konstanten, woraus auf die Höhe der Potentialbarrieren der behinderten Rotation geschlossen wurde^[80]. Wie aus dieser kurzen Übersicht hervorgeht, ermöglicht die ENDOR-Spektroskopie allein oder in Kombination mit der EPR-Spektroskopie die Aufklärung der Mechanismen verschiedenartiger intramolekularer dynamischer Prozesse sowie die Bestimmung der kinetischen Daten und Aktivierungsparameter oder der Potentialbarrieren.

7. ENDOR-Spektroskopie an biologischen Systemen

Einem in vielen spektroskopischen Disziplinen erkennbaren „Zuge der Zeit“ folgend, wird auch die ENDOR-Spektroskopie in zunehmendem Maße zur Lösung biologisch relevanter Fragen angewendet. Allerdings wurden ENDOR-Untersuchungen bisher fast ausschließlich bei tiefen Temperaturen (2–100 K) in pulverartigen Festkörpern durchgeführt; geeignete Einkristalle von biologischem Material sind nur in seltenen Fällen zugänglich^[81].

Es hat sich jedoch gezeigt, daß mit der ENDOR-Spektroskopie selbst an polykristallinen Proben interessante Strukturinformationen gewonnen werden können. Dies gilt vor allem für Protonen in frei rotierenden Methylgruppen; gelegentlich konnten auch ENDOR-Signale von anderen Protonensorten und sogar von „Nichtproton“-Kernen erhalten werden^[82]. Bisher wurden vor allem paramagnetische Abkömmlinge von photosynthetischen Pigmenten^[83], Flavoproteinen^[84], Cobalaminen^[85], Häm- und Myoglobinen sowie anderen Metallproteinen^[81b, 82, 86] untersucht.

Zweifellos wären ENDOR-Experimente an biologischem Material am reizvollsten unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei Raumtemperatur in wäßrigem Medium. Die ENDOR-Theorie^[7d] lehrt jedoch, daß Untersuchungen an Übergangsmetall-Komplexen wie Eisen-, Cobalt- oder Kupfer-enthaltenden Proteinen und Coenzymen wegen der sehr ungünstigen Relaxationseigenschaften dieser Systeme in Lösung *nicht möglich* sind. Auch das ENDOR-Studium metallfreier Proteine wird dann problematisch, wenn große effektive Molekylvolumina vorliegen – weil die Rotation in Lösung nicht mehr schnell genug ist, um die *g*- und Hyperfeinanisotropien auszumitteln. Beispielsweise läßt sich für Molekulargewichte von etwa 100 000 eine Rotationskorrelationszeit von 30 ns abschätzen^[87]. Damit werden nur noch dipolare Hyperfeinkomponenten ausgemittelt, die kleiner als 5 MHz sind. Für Kerne mit größerer Anisotropie erhält man daher auch in Lösung breite und schwer nachweisbare Signale vom Typ der Pulver-ENDOR-Spektren.



Chlorophylle und Bacteriochlorophylle spielen als Photopigmente in allen photosynthetisierenden Organismen eine wichtige Rolle. Grundlage der Photosynthese ist bekanntlich eine lichtinduzierte Ladungstrennung, bei der Radikalkationen der primären Donoren und Radikalanionen von Acceptoren gebildet werden. Hier bot sich die ENDOR-Spektroskopie zur Identifizierung und strukturellen Charakterisierung dieser in den „Reaktionszentren“^[88] auftretenden paramagnetischen Spezies an. Da am Primärschritt (Bacterio-)Chlorophylle und möglicherweise Phäophytine beteiligt sind, erschien eine vorhergehende Untersuchung der Pigmente notwendig. Als Beispiel ist in Abbildung 21 (unten) das ¹H-ENDOR-Spektrum des Radikalkations von Bacteriochlorophyll a wiedergegeben, aus dem elf ¹H-HFC-Konstanten entnommen werden können.

Das entsprechende ¹⁴N-ENDOR-Spektrum lieferte alle vier ¹⁴N-HFC-Konstanten. Kürzlich ist es gelungen, durch ENDOR/TRIPLE-Resonanz bei 25 °C in wäßriger Lösung das in situ lichtinduziert erzeugte Radikalkation des primären Donors P⁸⁷⁰ in den „Reaktionszentren“ einiger photosynthetisierender Bakterien zu beobachten^[89, 90]. In Abbildung 21 (oben) ist ein derartiges ENDOR-Spektrum von P⁸⁷⁰ (*Rp. sphaeroides* R-26) wiedergegeben. Aus diesem „echten“ Lösungsspektrum lassen sich sieben isotrope ¹H-HFC-Konstanten entnehmen, die durch Vergleich mit den Daten selektiv deuterierter „Reaktionszentren“ aus biosynthetisch markierten Bakterien bestimmten Positionen im Bacteriochlorophyll a zugeordnet werden konnten. Diese Untersuchung ist ein Beitrag zu der umstrittenen Frage nach der Bildung eines „Supramoleküls“^[90] („special pair“-Hypothese^[83]).

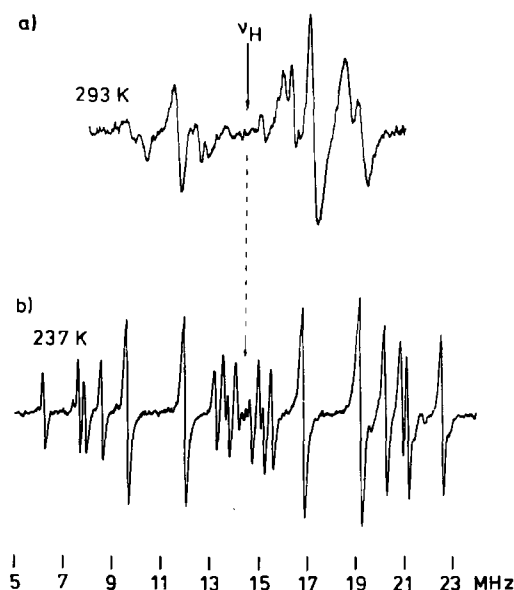


Abb. 21. a) ¹H-ENDOR-in-Lösung-Spektrum von im ENDOR-Resonator in situ bestrahlten „Reaktionszentren“ aus dem Bakterium *Rp. sphaeroides* R-26; beobachtet wird das radikalische Kation P⁸⁷⁰ (TRIS-Puffer, pH 7.5, Lauryldimethylaminoxid). – b) ¹H-ENDOR-Spektrum des Radikalkations des aus *Rp. sphaeroides* R-26 isolierten Bacteriochlorophylls a; Erzeugung des Radikalkations Bchl a^{•+} in CH₂Cl₂/CH₃OH durch Iod-Oxidation (vgl. [89, 90]).

Das et al.^[73] berichteten über ENDOR-in-Lösung-Untersuchungen an paramagnetischen Formen einiger biologisch bedeutender Chinone wie Ubichinon und die Vitamine K₃, K₁, E. An elektrolytisch erzeugtem Ubisemichinon-10 ließen sich vier ¹H-HFC-Konstanten ermitteln^[91]. Da das Ubichinon in vielen biologischen Prozessen als Elektronenüberträger wirkt, bieten sich Vergleiche mit in-situ-ENDOR-Spektren des Radikals in biologischem Material an. Das von Okamura et al.^[92] an eisenfreien „Reaktionszentren“ des Bakteriums *Rp. sphaeroides* R-26 erhaltene Festkörper-ENDOR-Spektrum des Ubisemichinons konnte bisher allerdings noch nicht vollständig analysiert werden. In Zusammenarbeit mit Sutcliffe et al.^[93] haben wir durch ENDOR-Spektroskopie an den Radikalkationen von Modellverbindungen der Vitamin-E-Reihe Spindichteverteilungen bestimmt und auch interessante dynamische Effekte beobachtet.

Ganz im Sinne des einleitenden Satzes zu diesem Abschnitt beschäftigt sich die Arbeitsgruppe der Autoren seit

etwa zwei Jahren mit ENDOR-Untersuchungen an Flavinen und Flavoenzymen. Diese Enzyme haben als Redoxkatalysatoren in biologischen Elektronenflußprozessen unter anderem die Funktion von Mediatoren zwischen Ein- und Zweielektronentransferschritten (genauer: zwei konsekutiven Eielektronentransferschritten), z. B. zwischen dem NAD/NADH- und dem Ubichinon-System^[94]. Die Eielektronenschritte führen naturgemäß zu Flavin-Radikalen, für deren Studium die EPR- und ENDOR-Spektroskopie benutzt werden kann.

Kürzlich wurden erstmals an einigen Modellverbindungen, nämlich den Radikalkationen von Isoalloxazin-Derivaten, hochaufgelöste ENDOR/TRIPLE-Spektren in Lösung erhalten. Die vollständigen Sätze der ^1H - und ^{14}N -HFC-Konstanten konnten einschließlich der Vorzeichen ermittelt werden, ihre Zuordnung gelang durch gezielte Deuterierung^[95]. Abbildung 22 zeigt die ^1H -, ^2H - und ^{14}N -ENDOR-Spektren der Radikalkationen einiger Lumiflavine. Obwohl das Lumiflavin in der Flavin-Biochemie als geeignetes Modellsystem angesehen wird, ist es noch immer eine Herausforderung, die spektroskopischen Techniken auch auf echtes natives biologisches Material anzuwenden.

Seit Ende der sechziger Jahre wurde vor allem von Hyde und Ehrenberg^[84] über interessante ENDOR-Untersuchungen an Flavoenzymen in fester Matrix berichtet, die zum Teil eindeutige Aussagen über die Natur der Bindung zwischen prosthetischen Gruppen und Apoproteinen ermöglichen haben. Wir führten kürzlich ENDOR-Experimente in fester Matrix unter wesentlich verbesserten apparativen Voraussetzungen durch^[96]. Untersucht wurde das Warburgsche „alte gelbe Ferment“ (in der angelsächsischen Literatur als „old yellow enzyme“ bezeichnet), eine aus Bier-

hefe isolierbare NADPH-Dehydrogenase^[96]. In Zusammenarbeit mit Kroneck et al.^[96] konnten eine Methanol-Oxidase aus *Candida boidinii* und eine Enzym-Pseudosubstrat-Wechselwirkung studiert werden. Mit Müller^[96] wurden schließlich einige Flavodoxine untersucht (aus *Azotobacter vinelandii* und *Megasphaera elsdenii*). In Abbildung 23 sind als Beispiel die EPR-, ENDOR- und Special-TRIPLE-Spektren der NADPH-Dehydrogenase wiedergegeben, deren radikalischer Zustand durch Bestrahlen in Gegenwart von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Elektronendonator erzeugt wurde. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen^[84a] konnte die radikalische Spezies durch Vergleich mit der authentischen Modellverbindung als das Radikalanion des „Flavinmononucleotids“ (FMN) identifiziert werden. Untersuchungen über die Linienbreite sowie die Abhängigkeit des Habitus der Festkörper-ENDOR-Spektren der Flavoenzyme von der Positionierung des externen Magnetfeldes führten zu Informationen über die Struktur des Isoalloxazin-Ringsystems und über die innermolekulare Beweglichkeit der prosthetischen Gruppe in der „Tasche“ des Apoproteins. ENDOR-Untersuchungen in flüssiger wäßriger Lösung sind allerdings bisher an den Flavoenzym-Radikalen nicht gelungen.

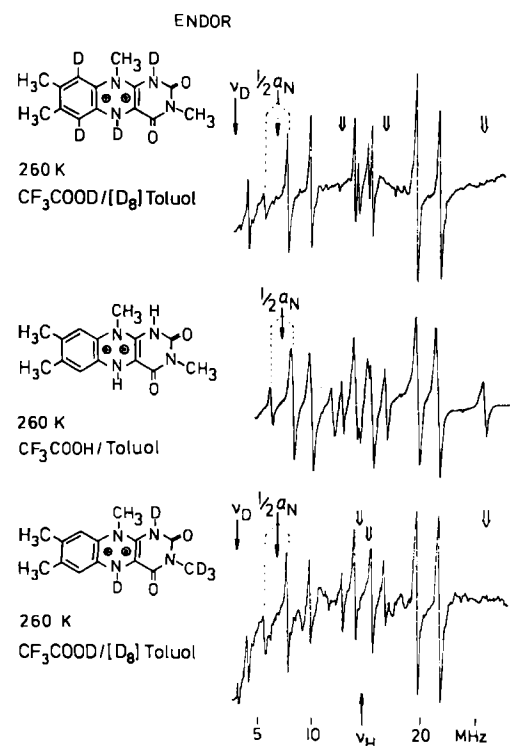


Abb. 22. ENDOR-Spektren von Lumiflavin-Radikalkationen. Neben ^1H - und ^{14}N -Signalen erscheinen in den Spektren der selektiv deuterierten Spezies auch ^2H -ENDOR-Signale. Die Pfeile kennzeichnen die Resonanzpositionen der durch die Deuterierung verschwundenen ^1H -ENDOR-Linien (vgl. [95]).

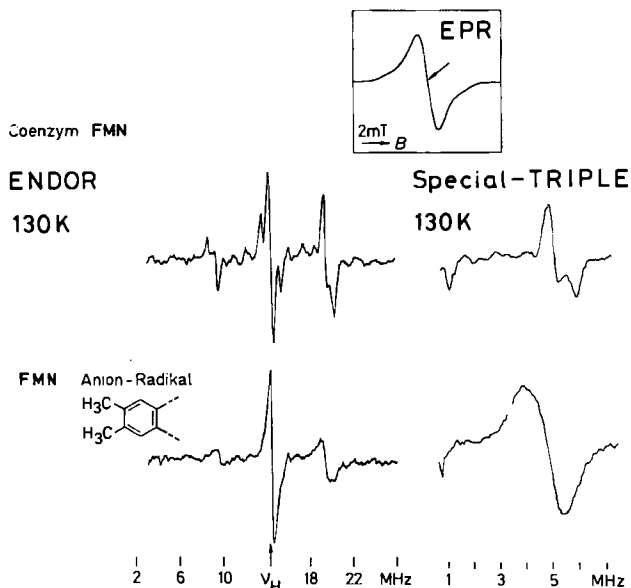


Abb. 23. ENDOR- und Special-TRIPLE-Spektren des durch Bestrahlung in Gegenwart eines Elektronendonors erzeugten Radikals im „alten gelben Ferment“, der NADPH-Dehydrogenase (aus Bierhefe, 20 mM TRIS-Puffer, pH 9.0, 10 mM EDTA, 80 min Bestrahlung). Der Vergleich mit den Spektren des FMN-Radikalanions (unten) ermöglicht die Bestimmung des Protonierungsgrades der prosthetischen Gruppe (vgl. [96]).

8. Anwendungsgrenzen und Ausblick

Dieser Fortschrittsbericht macht deutlich, daß die Doppelresonanzmethode ENDOR mit ihren Erweiterungen zu TRIPLE häufig der konventionellen EPR-Spektroskopie weit überlegen ist. Hervorzuheben sind insbesondere das große Auflösungsvermögen, die elegante Möglichkeit zur Bestimmung relativer Vorzeichen von Kopplungskonstanten, die Fähigkeit, verschiedene Kernsorten zu identifizieren und ihre Eigenschaften individuell zu studieren, die Möglichkeit zur Selektion unterschiedlicher Spezies in flüssiger Lösung oder unterschiedlich orientierter Mole-

küle in fester Matrix und schließlich die Fähigkeit, in organischen Polyradikalen den Spinzustand, d. h. die Multiplizität, zu ermitteln. Es ist allerdings festzuhalten, daß der ENDOR-Technik bisher Anwendungsgrenzen gesetzt sind: Organische Radikale mit großen g -Faktoranisotropien und/oder Kernen mit großen Hyperfeinanisotropien oder Quadrupolkopplungen sowie Polyradikale mit großer dipolarer Elektronenwechselwirkung ergeben in Lösung wegen ihrer ungünstigen Relaxationseigenschaften nur schwer nachweisbare ENDOR-Effekte.

Wenn die Liste der Literaturzitate dieses Beitrags auch keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, so ist doch klar zu erkennen, daß es bisher weniger als ein Dutzend Arbeitsgruppen gibt, die sich intensiv mit ENDOR-in-Lösung beschäftigen. Auch die kommerzielle Entwicklung rechnergesteuerter Geräte hat bisher nichts daran geändert, daß die ENDOR-Spektroskopie keineswegs zu den Routinemethoden gezählt werden kann. Erfolgreiches Arbeiten setzt noch immer langjährige Erfahrungen voraus, was insbesondere dann gilt, wenn kompliziertere als „Standard“-Proben (Phenalenyl, Galvinoxyl) untersucht werden sollen, die eine sorgfältige Optimierung der Probenbereitung und der Spektrometereinstellung erfordern. Dennoch wird die ENDOR-Technik zunehmende Verbreitung finden und ein unentbehrliches Hilfsmittel zur Beantwortung schwieriger strukturanalytischer Fragen in der Chemie paramagnetischer Moleküle werden.

Zur apparativen Weiterentwicklung der konventionellen („continuous wave“) ENDOR-Spektroskopie erscheint nach unseren Erfahrungen insbesondere eine Verbesserung des ENDOR-Resonators mit der NMR-Spule, des Herzstücks des Spektrometers, wünschenswert. Während gepulste NMR-Spektrometer eine weite Verbreitung gefunden haben, sind gepulste EPR-Spektrometer erst in jüngster Zeit kommerziell erhältlich^[97]. Es sei erwähnt, daß Spin-Echo-ENDOR-Experimente an Einkristallen bereits erfolgreich durchgeführt worden sind^[98]. Bei dieser Doppelresonanztechnik wird zu einer bestimmten Zeit der Elektronen-Spin-Echo-Pulssequenz ein RF-Impuls eingestrahlt, so daß sich das ENDOR-Spektrum als Diagramm der Echointensität über der Radiofrequenz ergibt^[99]. Die Spin-Echo-Technik könnte den Anwendungsbereich der ENDOR-Methode wesentlich erweitern, da deren Abhängigkeit von einer kritischen Balance der RF- und Mikrowellenleistungen und der verschiedenen Relaxationsraten überwunden wird^[98]. Spin-Echo-ENDOR-Experimente sollten auch in Lösung durchführbar sein, allerdings bereiten die kurzen Relaxationszeiten und die deshalb erforderlichen hohen Leistungen experimentelle Schwierigkeiten. Schließlich sei angemerkt, daß die Verwendung von Durchflußsystemen auch ENDOR-Untersuchungen an kurzlebigen Radikalen ermöglichen sollte. In diesem Zusammenhang könnte sich eine Empfindlichkeitssteigerung durch Spinpolarisation („CIDEP-enhanced ENDOR“) bei der photolytischen Radikalerzeugung in situ als hilfreich erweisen^[22b, 100]. Die neuen Techniken erfordern aber noch umfangreiche Entwicklungsarbeiten und bedeuten eine Erhöhung des apparativen Aufwandes. Mehr noch als für die konventionelle ENDOR-Spektroskopie gilt für diese hochinteressanten Varianten, daß sie auf absehbare Zeit keinesfalls als Routinemethoden Eingang in die chemischen Laboratorien finden werden.

H. K. dankt den Freunden und Kollegen aus der Physik, die in ihm die – allerdings keinesfalls immer ungetrübte (!) – Liebe zur ENDOR-Spektroskopie geweckt und durch ständige Hilfsbereitschaft am Leben erhalten haben. Zu nennen sind insbesondere die Herren Dr. R. Biehl, Dr. K. P. Dinse, Professor Dr. K. Möbius, Dr. M. Plato sowie Dr. F. Lendzian und Dr. C. Winscom. Gedankt sei auch den in den eigenen Literaturziten genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe und Frau E. Brinkhaus und Frau J. Krüger für die engagierte Mitarbeit. B. K. dankt dem Verband der Chemischen Industrie für ein Liebig-Stipendium. H. K. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für Unterstützung. W. L. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Unterstützung (SFB 161 „Hyperfeinwechselwirkungen“) und der Max Kade Foundation für ein Forschungsstipendium.

Eingegangen am 3. Mai,
in veränderter Fassung am 8. Dezember 1983 [A 486]

- [1] E. Zavoisky, *J. Phys. (Moscow)* 9 (1945) 245. Wie für Kernresonanz werden leider auch für Elektronenspinresonanz verschiedene Akronyme (EPR: Electron Paramagnetic Resonance, ESR: Electron Spin Resonance) synonym verwendet. Wir geben hier der Bezeichnung EPR den Vorzug, die – im Gegensatz zu ESR – neben dem Spin- auch den Bahnmagnetismus erfaßt.
- [2] G. Feher, *Phys. Rev.* 103 (1956) 834.
- [3] J. S. Hyde, A. H. Maki, *J. Chem. Phys.* 40 (1964) 3117.
- [4] R. J. Cook, D. H. Whiffen, *Proc. Phys. Soc. London* 84 (1964) 845.
- [5] a) J. H. Freed, *J. Chem. Phys.* 50 (1969) 2271; b) K. P. Dinse, R. Biehl, K. Möbius, *ibid.* 61 (1974) 4335.
- [6] R. Biehl, M. Plato, K. Möbius, *J. Chem. Phys.* 63 (1975) 3515.
- [7] a) A. Carrington, A. D. McLachlan: *Introduction to Magnetic Resonance*, Harper and Row, New York 1969; b) L. Kevan, L. D. Kispert: *Electron Spin Double Resonance Spectroscopy*, Wiley, New York 1976; c) K. Möbius, R. Biehl sowie J. H. Freed, N. M. Atherton in M. M. Dorio, J. H. Freed: *Multiple Electron Resonance Spectroscopy*, Plenum, New York 1979; d) M. Plato, W. Lubitz, K. Möbius, *J. Phys. Chem.* 85 (1981) 1202; e) K. Möbius, W. Fröhling, F. Lendzian, W. Lubitz, M. Plato, C. J. Winscom, *ibid.* 86 (1982) 4491; f) K. Möbius, M. Plato, W. Lubitz, *Phys. Rep.* 87 (1982) 171; g) A. Schweiger, *Struct. Bonding (Berlin)* 51 (1982).
- [8] Der Begriff „Rate“ (induzierte Rate, Relaxationsrate) definiert hier die Anzahl der pro Zeiteinheit übergehenden Spins, ähnlich wie die „radioaktive Zerfallrate“ (Zerfallskonstante) die Anzahl von Kernzerfällen pro Zeiteinheit angibt.
- [9] Die Relaxationsraten W_e und W_n werden in der Regel durch die Spinrotationswechselwirkung bzw. die Modulation der dipolaren Hyperfeinwechselwirkung bestimmt: $W_e^{SR} = B/\tau_R$ und $W_n^{END} = A \cdot \tau_R$; die Konstante $B \propto \sum_i (g_{ii} - g_e)^2$ hängt von der g -Faktor-Anisotropie ab, während $A \propto \tau_R A'^2$ die Größe der Hyperfeinanisotropie enthält.
- [10] Die Sättigungsbedingungen sind $\sigma_e = \gamma_e^2 T_{1e} T_{2e} B_e^2 \geq 1$ und $\sigma_n = \gamma_n^2 T_{1n} T_{2n} B_n^2 \geq 1$, wobei σ_e, σ_n die Sättigungsparameter, γ_e, γ_n die gyromagnetischen Verhältnisse, T_{1e}, T_{1n} die longitudinalen sowie T_{2e}, T_{2n} die transversalen Relaxationszeiten und B_e, B_n die (effektiven) Feldstärken bedeuten; die Indices e und n bezeichnen das Elektron bzw. den Kern. Vgl. J. H. Freed in L. T. Muus, P. W. Atkins: *Electron Spin Relaxation in Liquids*, Plenum, New York 1972.
- [11] R. D. Allendoerfer, A. H. Maki, *J. Magn. Reson.* 3 (1970) 396.
- [12] S. Geschwind in A. J. Freeman, R. B. Frankel: *Hyperfine Interactions*, Academic Press, New York 1967, S. 225.
- [13] P. Melzer, H. Kurreck, W. Kieslich, *Chem. Ber.* 115 (1982) 3597.
- [14] H. M. McConnell, D. B. Chesnut, *J. Chem. Phys.* 28 (1958) 107; K. H. Hauser, H. Brunner, J. C. Jochims, *Mol. Phys.* 10 (1966) 253; R. W. Kreilick, *Adv. Magn. Reson.* 6 (1973) 141; R. Biehl, K. P. Dinse, K. Möbius, M. Plato, H. Kurreck, U. Mennenga, *Tetrahedron* 29 (1973) 363.
- [15] H. R. Falle, G. R. Luckhurst, *J. Magn. Reson.* 3 (1970) 161.
- [16] H. Bock, B. Hierholzer, H. Kurreck, W. Lubitz, *Angew. Chem.* 95 (1983) 817; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 787; *Angew. Chem. Suppl.* 1983, 1088.
- [17] R. Biehl, K. Möbius, S. E. O'Connor, R. I. Walter, H. Zimmermann, *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 3449.
- [18] a) J. S. Hyde, *J. Chem. Phys.* 43 (1965) 1806; b) C. Hass, B. Kirste, H. Kurreck, G. Schlömp, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7375.
- [19] R. Biehl, W. Lubitz, K. Möbius, M. Plato, *J. Chem. Phys.* 66 (1977) 2074.

- [20] H. J. Fey, H. Kurreck, W. Lubitz, *Tetrahedron* 35 (1979) 905.
- [21] B. Kirste, H. van Willigen, *Chem. Phys. Lett.* 92 (1982) 339.
- [22] a) F. Lenzian, Dissertation, Freie Universität Berlin 1982; b) W. Möhl, Dissertation, Freie Universität Berlin 1983; c) B. Kirste, H. van Willigen, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 2743.
- [23] Die Lösungsmittel müssen sorgfältig gereinigt, getrocknet (z. B. über flüssiger Na/K-Legierung) und frei von Sauerstoff sein. Die Probenbereitung gelingt am besten am Rezipienten eines Hochvakuum-Pumpstandes; Restsauerstoff läßt sich durch mehrmalige Wiederholung des Zyklus „Einfrieren/Abpumpen/Auftauen“ entfernen. Gute ENDOR-Spektren können nur erhalten werden, wenn die Radikalkonzentration genügend klein ist ($\approx 10^{-4}$ mol/L), um den „Heisenberg-Austausch“ zu vermeiden, wobei es aufgrund des Signal/Rausch-Verhältnisses natürlich eine untere Grenzkonzentration gibt. Um den „chemischen Austausch“ auszuschließen, sollte das diamagnetische Ausgangsmaterial möglichst vollständig in den radikalischen Zustand umgewandelt werden. Zur Einstellung einer optimalen Radikalkonzentration haben sich Probengefäße mit Seitenarmen bewährt [24], die es ermöglichen, das Lösungsmittel zum Verdünnen oder Konzentrieren der Lösung im Hochvakuum zu destillieren. Schließlich sei noch erwähnt, daß Lösungsmittel mit hoher Dielektrizitätskonstante zwar für das Studium von Radikationen besonders geeignet sind (Löslichkeit, Stabilisierung), jedoch im ENDOR-Resonator häufig stark dämpfend wirken. Man muß daher kleine Probenvolumina in Kauf nehmen. So können Radikale in konzentrierter Schwefelsäure nur in Kapillaren untersucht werden.
- [24] W. Lubitz, Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin 1982.
- [25] Der sprachlich unschöne und dem englischen „non proton ENDOR“ entlehnte Begriff läßt sich nicht – wie es zuweilen geschieht – durch „Heterokern-ENDOR“ ersetzen, da der Chemiker Isotope wie ^2H oder ^{13}C nicht als „Heteroatome“ bezeichnet.
- [26] In der ENDOR-Spektroskopie kann die Fourier-Transform(FT)-Technik, wie sie heute in der NMR-Spektroskopie üblich ist, nicht angewendet werden (breitbandige RF-Einstrahlung in der Größenordnung kW).
- [27] B. Kirste, H. Kurreck, W. Lubitz, H. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 817.
- [28] B. Kirste, W. Harrer, H. Kurreck, K. Schubert, H. Bauer, W. Gierke, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6280.
- [29] W. Lubitz, W. Broser, B. Kirste, H. Kurreck, K. Schubert, *Z. Naturforsch. A* 33 (1978) 1072.
- [30] Mit der im Vergleich zur EPR-Spektroskopie „schnellen“ UV-Spektroskopie läßt sich dieser Unterschied zwischen Resonanz- und Tautomerie ebenfalls nachweisen: Während viele unterschiedlich substituierte Galvinoxyle sehr ähnliche UV-Spektren zeigen, ähnelt das von *tert*-Butylgalvinoxyl in Bandenform und -intensität eher dem UV-Spektrum von 2,4,6-Tri-*tert*-butylphenoxyl.
- [31] B. Kirste, M. Sordo, H. Kurreck, noch unveröffentlicht.
- [32] N. M. Atherton, B. Day, *Chem. Phys. Lett.* 15 (1972) 428; *Mol. Phys.* 27 (1974) 145.
- [33] H. J. Fey, W. Lubitz, H. Zimmermann, M. Plato, K. Möbius, R. Biehl, *Z. Naturforsch. A* 33 (1978) 514.
- [34] W. Lubitz, T. Nyström, *J. Magn. Reson.* 41 (1980) 17.
- [35] D. S. Leniart, J. C. Vedrine, J. S. Hyde, *Chem. Phys. Lett.* 6 (1970) 637.
- [36] a) W. Lubitz, M. Plato, K. Möbius, R. Biehl, *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 3402; b) W. Lubitz, R. Biel, K. Möbius, *J. Magn. Reson.* 27 (1977) 411; c) H. van Willigen, M. Plato, R. Biehl, K. P. Dinse, K. Möbius, *Mol. Phys.* 26 (1973) 793; E. van der Drift, A. J. Dammers, J. Smidt, M. Plato, K. Möbius, *J. Magn. Reson.* 40 (1980) 551; N. M. Atherton, B. Day, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 69 (1973) 1801.
- [37] R. D. Allendoerfer, A. H. Maki, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 1088.
- [38] W. Lubitz, K. P. Dinse, K. Möbius, R. Biehl, *Chem. Phys.* 8 (1975) 371.
- [39] M. R. C. Gerstenberger, A. Haas, B. Kirste, C. Krüger, H. Kurreck, *Chem. Ber.* 115 (1982) 2540.
- [40] H. B. Stegmann, K. Scheffler, G. Bauer, R. Grimm, S. Hieke, D. Stürner, *Phosphorus* 4 (1974) 165; H. B. Stegmann, H. Müller, K. B. Ulmschneider, K. Scheffler, *Chem. Ber.* 112 (1979) 2444.
- [41] W. Lubitz, K. Dimroth, unveröffentlicht; W. Lubitz, Dissertation, Freie Universität Berlin 1977.
- [42] W. Lubitz, H. B. Stegmann, unveröffentlicht.
- [43] B. Kirste, H. Kurreck, R. West, unveröffentlicht.
- [44] H. B. Stegmann, K. Scheffler, U. Weber, P. Schuler, *J. Magn. Reson.* 54 (1983) 521.
- [45] a) W. Kaim, W. Lubitz, *Angew. Chem.* 95 (1983) 915; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 892; *Angew. Chem. Suppl.* 1983, 1209; b) W. Lubitz, W. Kaim, unveröffentlicht.
- [46] J. S. Hyde, G. H. Rist, L. E. G. Eriksson, *J. Phys. Chem.* 72 (1968) 4269.
- [47] G. W. Gray, P. A. Winsor: *Liquid Crystals and Plastic Crystals*, Vol. 1–2, Ellis Horwood, Chichester 1974; H. Kelker, R. Hatz: *Handbook of Liquid Crystals*, Verlag Chemie, Weinheim 1980.
- [48] J. W. Emsley, J. C. Lyndon: *NMR Spectroscopy using Liquid Crystal Solvents*, Pergamon, Oxford 1975.
- [49] A. Saupe, *Angew. Chem.* 80 (1968) 99; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 7 (1968) 97.
- [50] B. Kirste, H. Kurreck, *Appl. Spectrosc.* 34 (1980) 305.
- [51] B. Kirste, *Chem. Phys. Lett.* 64 (1979) 63.
- [52] B. Kirste, H. Kurreck, H. J. Fey, C. Hass, G. Schlömp, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 7457.
- [53] K. P. Dinse, K. Möbius, M. Plato, R. Biehl, H. Haustein, *Chem. Phys. Lett.* 14 (1972) 196.
- [54] B. Kirste, H. Kurreck, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 6180.
- [55] J. C. Rowell, W. D. Phillips, L. R. Melby, M. Panar, *J. Chem. Phys.* 43 (1965) 3442; F. S. Millet, B. P. Dailey, *ibid.* 56 (1972) 3249; H. H. Mantsch, H. Saito, I. C. P. Smith: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Vol. 11, Pergamon, Oxford 1977, S. 211.
- [56] B. Kirste, unveröffentlicht.
- [57] N. M. Atherton: *Electron Spin Resonance*, Ellis Horwood, Chichester 1973, S. 182.
- [58] Die hier gewählte, auf der Meßtechnik beruhende Definition stimmt nicht in allen Fällen mit der von Quantenchemikern bevorzugten Definition überein, nach der ein Diradikal ein System mit zwei einsamen Elektronen in (nahezu) entarteten Molekülorbitalen ist [59].
- [59] L. Salem, C. Rowland, *Angew. Chem.* 84 (1972) 86; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 11 (1972) 92.
- [60] H. van Willigen, M. Plato, K. Möbius, K. P. Dinse, H. Kurreck, J. Reusch, *Mol. Phys.* 30 (1975) 1359.
- [61] H. D. Brauer, H. Stieger, J. S. Hyde, L. D. Kispert, G. R. Luckhurst, *Mol. Phys.* 17 (1969) 457.
- [62] B. Kirste, H. Kurreck, K. Schubert, *Tetrahedron Lett.* 1978, 777.
- [63] B. Kirste, A. Krüger, H. Kurreck, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3850.
- [64] E. Wasserman, L. C. Snyder, W. A. Yager, *J. Chem. Phys.* 41 (1964) 1763.
- [65] B. Kirste, H. van Willigen, H. Kurreck, K. Möbius, M. Plato, R. Biehl, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 7505.
- [66] H. van Willigen, C. F. Mulks, *J. Chem. Phys.* 75 (1981) 2135; H. van Willigen, B. Kirste, H. Kurreck, M. Plato, *Tetrahedron* 38 (1982) 759.
- [67] K. Schubert, B. Kirste, H. Kurreck, *Angew. Chem.* 95 (1983) 149; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 150; *Angew. Chem. Suppl.* 1983, 128.
- [68] B. Kirste, W. Harrer, H. Kurreck, *Angew. Chem.* 93 (1981) 912; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 873.
- [69] C. S. Johnson, *Adv. Magn. Reson.* 1 (1965) 33; P. D. Sullivan, J. R. Bolton, *ibid.* 4 (1970) 39.
- [70] H. S. Gutowsky, C. H. Holm, *J. Chem. Phys.* 25 (1956) 1228; G. Binsch, *Top. Stereochem.* 3 (1968) 97.
- [71] Für die Linienbreite $\delta\omega$ gilt im Bereich des langsamen Austausches $\delta\omega = \delta\omega_0 + 2/\tau$ und im Bereich des schnellen Austausches $\delta\omega = \delta\omega_0 + (\Delta\omega_0)^2 \tau/4$, wobei $\delta\omega_0$ die ungestörte Linienbreite (Referenzlinie), τ die Lebensdauer der Einzelzustände und $\Delta\omega_0 = \pi|a_1 - a_2|$ bedeutet. Der Linienabstand im Bereich des langsamen Austausches ist durch $\Delta\omega = (\Delta\omega_0^2 - 8/\tau^2)^{1/2}$ gegeben, und am Koaleszenzpunkt gilt $\tau\Delta\omega_0 = 2/\sqrt{2}$. Es sei darauf hingewiesen, daß die Linienbreiten auf verschwindende RF-Leistung extrapoliert werden müssen.
- [72] a) C. von Borczyskowski, K. Möbius, M. Plato, *J. Magn. Reson.* 17 (1975) 202; b) B. Kirste, H. Kurreck, W. Harrer, J. Reusch, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 1775.
- [73] M. R. Das, H. D. Connor, D. S. Leniart, J. H. Freed, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 2258.
- [74] M. Plato, R. Biehl, K. Möbius, K. P. Dinse, *Z. Naturforsch. A* 31 (1976) 169.
- [75] C. von Borczyskowski, K. Möbius, *Chem. Phys.* 12 (1976) 281.
- [76] K. Mukai, T. Kamata, T. Tamaki, K. Ishizu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 49 (1976) 3376; K. Hinrichs, B. Kirste, H. Kurreck, J. Reusch, *Tetrahedron* 33 (1977) 151; B. Kirste, H. Kurreck, W. Lubitz, K. Schubert, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 2292.
- [77] K. Watanabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48 (1975) 1732.
- [78] J. S. Hyde, R. Breslow, C. De Boer, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 4763; L. D. Kispert, J. S. Hyde, C. De Boer, D. La Follette, R. Breslow, *J. Phys. Chem.* 72 (1968) 4276.
- [79] N. M. Atherton, P. A. Kennedy, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 74 (1978) 67; M. Okazaki, K. Kuwata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 51 (1978) 385.
- [80] R. F. Adams, N. M. Atherton, *Mol. Phys.* 17 (1969) 673; R. D. Allendoerfer, D. J. Eustace, *J. Phys. Chem.* 75 (1971) 2765; F. Nemoto, F. Shimoda, K. Ishizu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48 (1975) 2627; F. Nemoto, K. Ishizu, *J. Phys. Chem.* 79 (1975) 1730; F. Nemoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 49 (1976) 1194; F. Shimoda, T. Hanafusa, F. Nemoto, K. Mukai, K. Ishizu, *ibid.* 52 (1979) 3743; F. Shimoda, *ibid.* 53 (1980) 1853.
- [81] a) C. A. Hutchison Jr., D. J. Singel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6883; b) C. P. Scholes, A. Lapidot, R. Mascarenhas, T. Inubushi, R. A. Isaacson, G. Feher, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2724.
- [82] G. Feher, R. A. Isaacson, C. P. Scholes, R. Nagel, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 222 (1973) 86; C. F. Mulks, C. P. Scholes, L. C. Dickinson, A. Lapidot, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 1645.
- [83] A. J. Hoff, *Phys. Rep.* 54 (1979) 75; J. Fajer, M. S. Davis in D. Dolphin: *The Porphyrins*, Vol. IV, Academic Press, New York 1979, S. 197; J. R. Norris, H. Scheer, J. J. Katz, *ibid.*, S. 159; G. Feher, A. J. Hoff, R. A. Isaacson, L. C. Ackerson, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 244 (1975) 239.

- [84] a) A. Ehrenberg, L. E. G. Eriksson, J. S. Hyde, *Biochim. Biophys. Acta* 167 (1968) 482; b) L. E. G. Eriksson, J. S. Hyde, A. Ehrenberg, *ibid.* 192 (1969) 211; c) J. Salach, W. H. Walker, T. P. Singer, A. Ehrenberg, P. Hemmerich, S. Ghisla, U. Hartmann, *Eur. J. Biochem.* 26 (1972) 267; d) L. E. G. Eriksson, A. Ehrenberg, *Biochim. Biophys. Acta* 293 (1973) 57.
- [85] E. Jörin, F. Graf, A. Schweiger, H. H. Günthard, *Chem. Phys. Lett.* 42 (1976) 375; K. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 6105.
- [86] J. E. Roberts, T. G. Brown, B. M. Hoffmann, J. Peisach, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 825.
- [87] N. D. Chasteen, J. Francavilla, *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 867.
- [88] Govindjee: *Photosynthesis. Energy Conversion by Plants and Bacteria*, Vol. 1, Academic Press, New York 1982.
- [89] F. Lendzian, W. Lubitz, H. Scheer, C. Bubenzer, K. Möbius, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4635.
- [90] W. Lubitz, F. Lendzian, H. Scheer, M. Plato, K. Möbius in A. H. Zewail: *Photochemistry and Photobiology*, Proc. Int. Conf., Vol. II, Harwood Academic Publ., Chur 1983; W. Lubitz, F. Lendzian, H. Scheer, J. Gottstein, M. Plato, K. Möbius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, im Druck; P. J. O'Malley, G. T. Babcock, *ibid.*, im Druck.
- [91] W. Lubitz, unveröffentlicht.
- [92] M. Okamura, R. Debus, R. Isaacson, G. Feher, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 39 (1980) 1802.
- [93] J. M. Smith, L. H. Sutcliffe, W. Lubitz, S. Wiesner, H. Kurreck, unveröffentlicht.
- [94] P. Hemmerich, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 33 (1976) 451; P. Hemmerich, V. Massey, H. Michel, C. Schug, *Struct. Bonding (Berlin)* 48 (1982) 94.
- [95] M. Bock, W. Lubitz, H. Kurreck, H. Fenner, R. Grauert, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5567.
- [96] H. Kurreck, M. Bock, N. Bretz, M. Elsner, H. Kraus, W. Lubitz, F. Müller, J. Geissler, P. M. H. Kroneck, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [97] *Bruker-Report 1* (1983) 31, Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Karlsruhe.
- [98] W. B. Mims, *Proc. Roy. Soc. A* 283 (1965) 452.
- [99] A. E. Stillman, R. N. Schwartz, *Mol. Phys.* 35 (1978) 301; A. E. Stillman, R. N. Schwartz in L. Kevan, R. N. Schwartz: *Time Domain Electron Spin Resonance*, Wiley, New York 1979, S. 173; W. B. Mims, J. Peisach in L. J. Berliner, J. Reuben: *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 3, Plenum, New York 1981, S. 250.
- [100] R. Z. Sagdeev, W. Möhl, K. Möbius, *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 3183.

Biochemische Aspekte der cholinergen Reizung

Von Alfred Maelicke*

In memoriam David Nachmansohn (1899–1983)

Lebende Organismen können sich nur entwickeln und erhalten, solange eine wirksame Kommunikation zwischen ihren Einzelkomponenten – den Zellen – besteht. Diese interzelluläre Kommunikation ist hauptsächlich chemischer Natur: Sie benutzt als Botenstoffe Neurotransmitter und Hormone und als Signalempfänger Rezeptoren. Die Konzentrationen aller beteiligten Komponenten sind gewöhnlich gering. Ausnahmen gibt es bei einigen synaptischen Kommunikationssystemen wie der Nerven-Muskel-Synapse oder ihrer speziellen Form, der Nerven-Elektrozyt-Synapse in den elektrischen Organen von Zitteraal (*Electrophorus*) und Zitterrochen (*Torpedo*). Diese Systeme sind der biochemischen Analyse gut zugänglich, so daß sie sich zur Aufklärung der molekularen Grundlagen derartiger biologischer Kommunikationsprozesse eignen. Auf diese Weise ist gefunden worden, daß der nicotinische Acetylcholinrezeptor der Muskelzelle nicht nur das von der zugehörigen Nervenzelle ausgesendete Signal empfängt, sondern dieses auch selbst in eine elektrische Aktivität der Muskelzelle umsetzt. Fluoreszenzkinetische Untersuchungen der Wechselwirkung des Acetylcholinrezeptors mit seinen Liganden haben zu einem neuen Modell des molekularen Mechanismus der cholinergen Reizung geführt, das auch von physiologischen und immunologischen Befunden gestützt wird.

1. Einleitung^[1]

Das zentrale Ereignis im Verlauf der chemischen Reizung erregbarer Zellen ist die Umsetzung des chemischen Signals in die primäre Reizantwort der Zelle. Im Falle der cholinergen Reizung peripherer Muskelzellen ist hierfür ein einziges Makromolekül, der nicotinische Acetylcholinrezeptor der Muskelendplatte, verantwortlich (Abb. 1): Durch das Binden des von der zugeordneten Nervenendigung abgegebenen Neurotransmitters Acetylcholin empfängt der Rezeptor den Reiz. Die erste Reaktion darauf – die primäre Reizantwort – ist das kurzzeitige Öffnen und Schließen des Ionenkanals im Rezeptor. Diese Verknüpfung

der für Reizempfang und Reizverarbeitung zuständigen Strukturen innerhalb eines Proteins scheint typisch für viele ligandenaktivierte Ionenkanalproteine erregbarer Zellen zu sein. Somit ist der Acetylcholinrezeptor – der biochemisch am besten charakterisierte Neurorezeptor – auch ein Modellsystem für andere an der schnellen Reizübertragung im Nervensystem beteiligte, ligandenaktivierte Ionenkanäle.

Obwohl die in der Nerv-Muskel-Synapse ablaufenden Reaktionen und die daran beteiligten Komponenten gut bekannt sind (Abb. 1), ist der molekulare Mechanismus der cholinergen Reizung noch nicht geklärt. Insbesondere wird noch nicht verstanden, durch welche Struktureigenschaften des Rezeptors es zur Unterscheidung zwischen Agonisten (kanalaktivierende Liganden wie Acetylcholin) und Antagonisten (Liganden ohne kanalaktivierende Wirkung) kommt und wie das Binden des Transmitters (und

[*] Prof. Dr. A. Maelicke
Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie
Rheinlanddamm 201, D-4600 Dortmund 1