

3 MATERIAL UND METHODEN

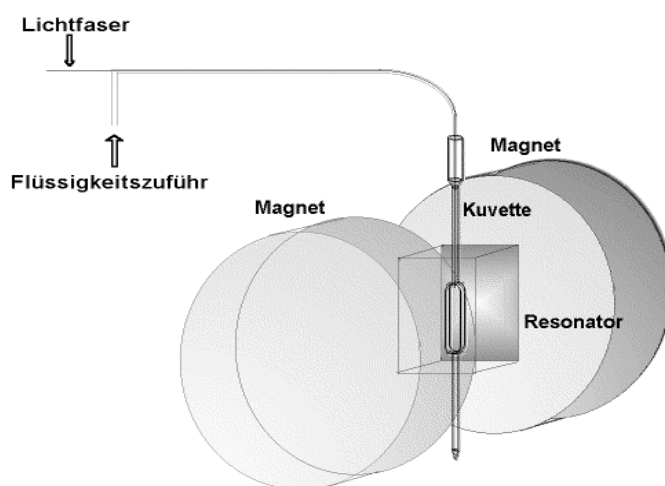
3.1 Geräte

3.1.1 Lasersysteme und Parameter

Ein KTP-gepumpter Farbstofflaser (Laserscope[®], NWL) wurde zur Anregung der Photosensibilisatoren für die ESR-Untersuchungen mit folgenden Parametern eingesetzt: Wellenlänge 633 nm, Leistung 1 W, 400 μm Faser. Die Laserleistung, die konstant 1W betrug, wurde während jeder Versuchsreihe mit einem Ulbricht-Kugel-Meßsystem des Typs Mytest[®] (Fa. Hüttinger, Umkirch) überprüft.

3.1.2 Elektronspinresonanzanlage

Das ESR-Spektrometer war ein X-Band-Gerät der Reihe Miniscope[®] von der Firma Magnettech GmbH, Berlin. Die Magnetfeldmodulation betrug 0.030 mT. Das Fieldsweep betrug 6 mT, das Sweeptime betrug 11 Sekunden. Das Gerät wurde vom PC aus gesteuert, und die Spektren wurden mit firmeneigenen Programmen ausgewertet.



Aufbau des Systems für die Bestrahlung der Versuchslösungen im ESR Spektrometer

Abb. 3

Laserfaser, Quarzküvette und Reaktionslösungszufuhr

3.2 Puffer und Lösungen

3.2.1 Photosensibilisatorlösungen

Als Photosensibilisatoren wurden die Porphyrinderivate Photosan 3[®], Protoporphyrin IX-Na, Mesoporphyrin-Na (alle Firma Seelab, Wesselburenerkoog) und Photofrin II[®] (Paesel und Lorei, Hanau) verwendet. Zusätzlich wurden Messungen mit den Farbstoffen Methyleneblau und Toluidinblau-O durchgeführt. Nach Öffnung der Behältnisse wurden die Porphyrinderivate sofort in ca. 5 mg-Portionen mittels Analysewaage in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20°C verschlossen aufbewahrt. Die Photosensibilisator-Lösungen (0,1mg/ml) wurden stets frisch mit 0.9%iger NaCl-Lösung hergestellt. Die Farbstoffstammlösung war eine 0.9%ige NaCl-Lösung mit 10⁻³ M Methyleneblau bzw. Toluidinblau O. Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt und nach 2 Wochen verworfen.

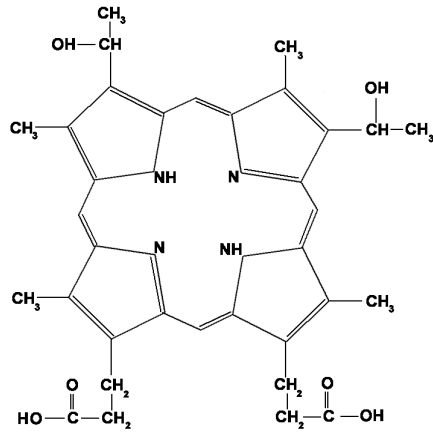
3.2.2 Reaktionslösung für die ESR-Untersuchungen

Für die Sauerstoffradikale wurde der Spin-Trap 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (*DMPO*), für Singulett-Sauerstoff (¹O₂) die Substanz 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (*TEMP*), benutzt. Zur Messung des Singulett-Sauerstoffs wurde eine TEMP-Lösung in 500 µl-Portionen aus 5 ml TEMP, 5 ml Triton-X und 490 µl 0.9 %iger NaCl-Lösung zusammengestellt. 4,95 µl dieser TEMP-Lösung wurde vor der Injektion in die Meßküvette mit 50 µl Photosensibilisatorlösung bzw. Farbstoffstammlösung zur Messung von Singulett-Sauerstoff versetzt.

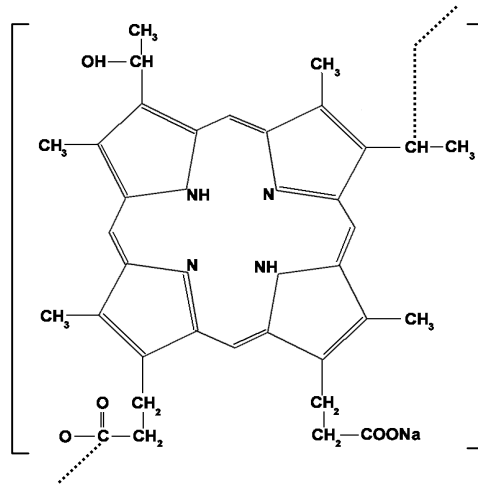
Zur Messung der Sauerstoffradikale wurden 20 µl Photosensibilisatorlösung, 20 µl DMPO und 1,96 ml PBS-Lösung bzw. 200 µl Farbstoffstammlösung, 20 µl DMPO und 1,78 ml PBS-Lösung vor der Injektion in die Küvette vermischt. Letztere Lösungen hatten einen gemessenen pH von 7,4. Die Zubereitung der Photosensibilisatorlösungen und die nachfolgenden Bestrahlungen fanden zur Vermeidung von Photobleaching-Effekten und vorzeitiger Erzeugung von Spintrap-Addukten unter Gelblicht statt⁸⁰.

Für die ¹O₂-Spezifitätsüberprüfungen wurden ungepufferte Lösungen mit Histidin und β-Karotin hergestellt. Mittels einer Stammlösung mit einer Histidinkonzentration von 1 mM wurden Reaktionslösungen mit Methyleneblau in einer Endkonzentration von 0,1 mM und unterschiedlichen Endkonzentrationen von Histidin hergestellt. Die Endkonzentrationen von Photosan 3[®], von TEMP, von Triton-X und von β-Karotin in der β-Karotin-Reaktionslösung waren jeweils 0,5 mg/ml, 10 µl/ml, 10 µl/ml und 20 mM.

Hämatoporphyrin IX



Photosan 3[®] - Untereinheit (Esterbindung)



Photofrin II[®] - Untereinheit (Ätherbindung)

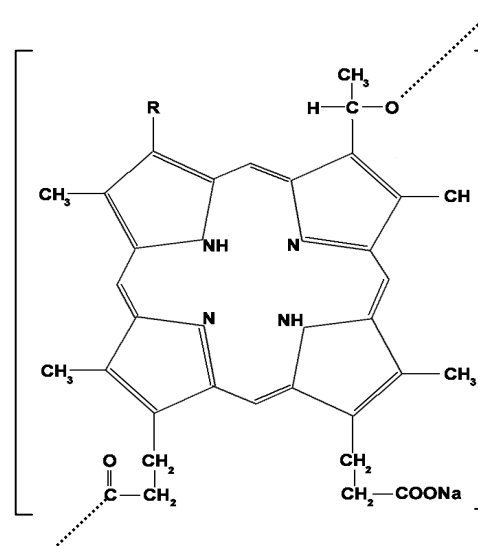
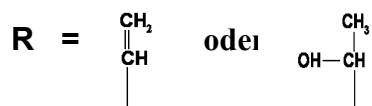


Abb. 4 Die Hämatoporphyrinderivate Photosan 3[®] und Photofrin II[®]

3.3 Methoden

3.3.1 ESR-Messung

Das Laserlicht wurde über die Glasfaser, die oberhalb der Flachzelle positioniert wurde, eingestrahlt. Die Küvette bestand aus einem Quarzglasrohr mit einer zentralen Flachzelle (Volumen $3,0 \times 0,5 \times 0,03 \text{ cm}^3$). Als Träger für die Laserfaser diente ein Kunststoffschlauch mit einem Durchmesser von $800 \mu\text{m}$. Dieser durchsichtige und farblose Schlauch war mit einem Seitenschenkel ausgestattet, der die luftfreie Einfüllung der Lösungen ermöglichte.

Sowohl Schlauch als auch Küvette waren am Spektrometer fixiert. Die mechanische Befestigung garantierte die Stabilität der Meßanordnungsgeometrie.

Für jede Meßreihe wurden 2 ml der Photosensibilisator/Spintrap-Lösung mit einer 2 ml-Spritze luftblasenfrei in die Küvette gefüllt. Danach erfolgte die nochmalige Kontrolle der optimalen Einkopplung der gefüllten Küvette im Resonator.

Nach jeder Messung wurde das System intern mit einer Ethanol/Aceton-Lösung gespült und mit Druckluft getrocknet.

Die qualitative Zuordnung der Spektren erfolgte anhand simulierter Vergleichspektren, die quantitative Auswertung anhand der integrierten Amplituden und der Linienbreiten der Signale.

3.4 Physikalischer Hintergrund

Eine wissenschaftlich korrekte Beschreibung der energetischen Zustände von Materie auf molekularer bzw. atomarer Ebene bedarf der Lösung quantenmechanischer Gleichungen, deren Ergebnisse die Eigenschaften der Energiezustände in Form von sogenannten Wellenfunktionen charakterisieren¹¹³. Damit werden mathematische Darstellungen für die physikalischen Größen der Moleküle gewonnen. Diese abstrakten Ausdrücke besitzen sowohl Wellen- als auch Teilcheneigenschaften. Dieser Dualismus, mehr oder weniger unbewußt, ist längst in der modernen Medizin etabliert. Elektromagnetische Strahlung wird beispielsweise als Licht gern anhand der Wellenlänge beschrieben. Im Falle der Röntgenstrahlung, ebenfalls elektromagnetischer Natur, ist man gewohnt, von Teilchenparameter Energie (keV bzw. kV) zu sprechen.

Geometrische Modelle, die entweder die Wellen- oder Teilchenqualitäten darstellen, sind streng genommen der klassischen und nicht der quantenmechanischen Physik zugehörig.

Dementsprechend kann kein solches Modell den Dualitäten der modernen Physik gerecht werden. Insgesamt vermögen sie es jedoch, den physikalischen Inhalt effektiv zu repräsentieren.

3.4.1 Die Physik des Lichts

Die klassische Gliederung der Natur in Wellen und Teilchen stellt eine Unterteilung in räumlichen Extremen dar, wobei Wellen räumlich ausgedehnt und Teilchen streng lokalisiert sind. Diese Kontrapunkte haben den Vorteil, dass sie grafisch leicht nachvollziehbar sind. Materie wurde in Form von Teilchen, Licht in Form von Energie mit Welleneigenschaften dargestellt. Die *Lichtintensität* an einem Raumpunkt entspricht der einfallenden Energie pro Sekunde pro Flächeneinheit, also eine *Leistungsintensität*⁸¹. Die Penetrationstiefe in Materie ist definiert als die Tiefe, bei der die Intensität auf $1/e$ des einfallenden Wertes abgefallen ist (e ist technisch gleich der Basis der natürlichen Logarithmen, mit einem Wert von circa 2,7). Bei dieser Tiefe hat also die Lichtleistung circa ein Drittel ihres ursprünglichen Wertes.

3.4.1.1 Licht als Welle

Die klassische Physik charakterisiert Licht auf der Basis der drei Parameter der Wellenbewegung

- Frequenz
- Ausbreitungsgeschwindigkeit
- Wellenlänge

konventionellerweise symbolisiert als v , c und λ , wobei gilt:

$$v = c/\lambda$$

Weil c eine konstante Größe ist, sind Wellenlänge und Frequenz als Parameter gleichwertig, da sie sich gegenseitig eindeutig bestimmen. Je höher die Frequenz ist, umso kürzer ist die Wellenlänge.

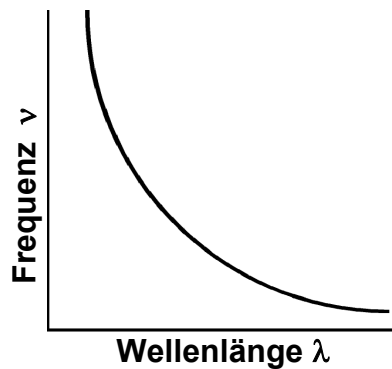


Abb. 5 Inverses Verhältnis zwischen Frequenz und Wellenlänge für Licht

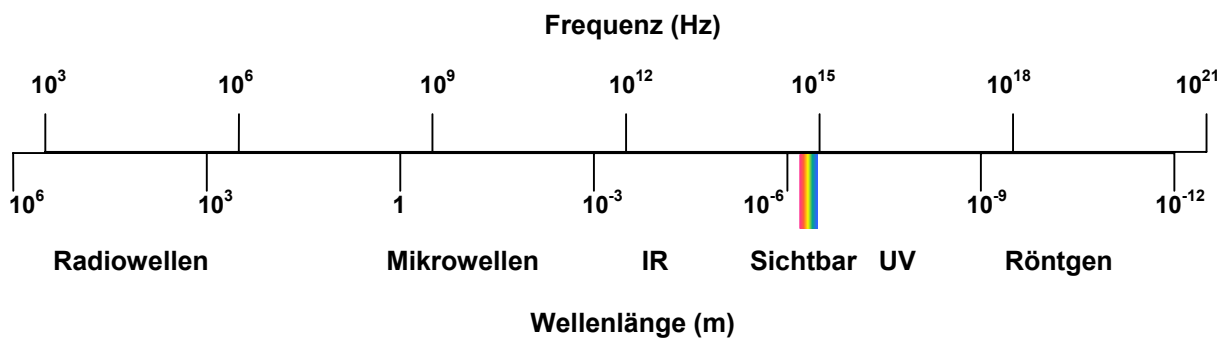


Abb. 6 Das elektromagnetische Spektrum (Frequenz als Funktion der Wellenlänge)

3.4.1.2 Das Rutherford'sche Atommodell

Rutherford und seine Mitarbeiter entwickelten das erste Modell des Atoms, worin die elektrisch negativ geladenen Elektronen um einen kleinen, positiv geladenen Kern herumkreisen. Analog zur Planetenbewegung, z.B. eines Satelliten um die Erde, entspricht die Höhe einer Bahn, d.h. ihre Entfernung vom Kern, der Energie des Elektrons. Höhere Bahnen entsprechen energiereicheren Zuständen, so daß die Absorption von Energie als ein Sprung eines Elektrons aus einer tieferen in eine höhere Bahn dargestellt wird. In gleicher Weise entspricht die Ausstrahlung von Lichtenergie dem Fall eines Elektrons in eine tieferliegende Bahn. Die Absorption von einer ausreichenden Menge an Energie würde zur Ausstoßung des Elektrons aus dem Atom führen. Strahlung, die solche Energie aufbringen kann, heißt *ionisierend*, da der Verlust eines Elektrons zur Erzeugung eines positiv geladenen Ions führt.

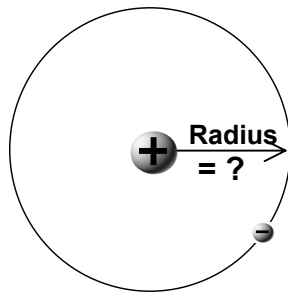


Abb. 7 **Das Rutherford'sche Wasserstoffatom**

Probleme der Rutherford'schen Atomphysik ergaben sich vor allem durch die Stabilität der Materie und durch die experimentelle Beobachtung, daß es für jedes angeregte Atom ein klar definiertes und diskontinuierliches Emissionsspektrum gibt, d.h. ein Spektrum, das aus isolierten Linien und nicht aus kontinuierlichen Banden besteht⁸².

Das Rutherford'sche Modell kann demnach nicht erklären:

- warum die Elektronen nicht aus ihren Bahnen herausfallen und mit dem Kern, an den sie elektrostatisch stark angezogen werden, zusammenstoßen
- warum die Emissions- und Absorptionsspektren der Atome aus Linien bestehen.

3.4.1.3 Licht als Teilchen

Nach Max Planck entspricht die Lichtausstrahlung von Materie, wie von einem glühend heißen Körper, der Emission von Energiepaketen, die er *Quanten* taufte⁸⁰. Die *Quantisierung* bezog er primär auf die Energiezustände des ausstrahlenden Körpers, d.h. auf die Materie. Nach seinen Vorstellungen war das Licht selbst weiterhin wellenförmig.

Entsprechend Plancks Quantenprinzip ist die betreffende Energie E proportional zu der Lichtfrequenz ν , mit Proportionalitätskonstante h , dem Planckschen *Wirkungsquant*. Dieses sei eine universelle Konstante, physikalisch ein Drehmoment. Somit sind Energie und Frequenz äquivalent.

Es gilt: $E = h\nu$ bzw. $E = hc/\lambda$

Demnach haben die Photonen mit einer höheren Energie gleichzeitig eine höhere Frequenz, d.h. eine kürzere Wellenlänge als die mit einer niedrigeren Energie. Beispielsweise hat Licht aus dem infraroten Bereich weniger Energie als das aus dem UV- bzw. Röntgenbereich.

Einstein führte Plancks Gedanken weiter durch seine Erklärung des Photoelektrischen Effekts, d.h. der Ausstoßung von Elektronen aus einem Metall durch den Einfall von Licht. Hierbei charakterisierte er das Licht selbst als Energiepakete, und lieferte somit die erste moderne Beschreibung von *Photonen*. Er erreichte eine Ergänzung des klassischen Konzepts, da die Photonen Welleneigenschaften behielten. Es kamen Teilcheneigenschaften wie die des *Impulses* hinzu. Hierbei werden der Impuls p , die Energie E und die Lichtgeschwindigkeit c verknüpft durch die Gleichung $E = pc$, d.h., $E = hc / \lambda$ ⁸¹.

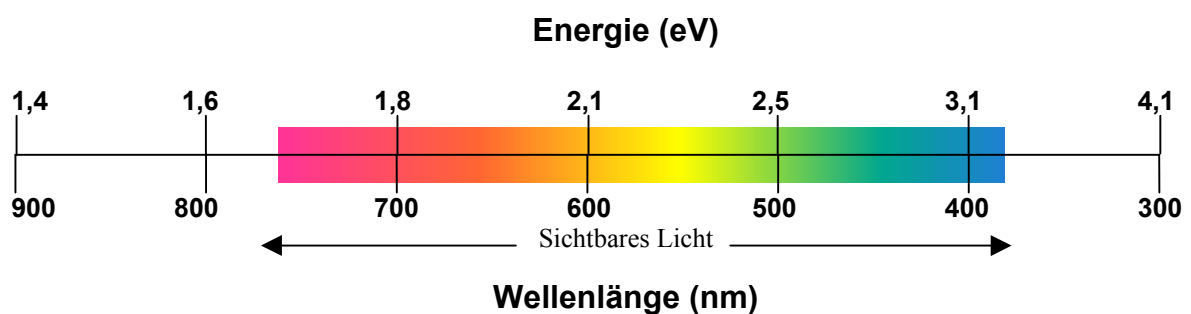


Abb. 8 Das elektromagnetische Spektrum (Energie als Funktion der Wellenlänge)

3.4.2 Die Physik der Materie

Die Quantenmechanik wird für die Erklärung der besonderen Natur von Sauerstoff sowie für die Differenzierung zwischen Photosensibilisatoren und einfachen Farbstoffen benötigt. Die Physik der PDT kommt ohne Kenntnisse der Konzepte des Drehmoments, des Spins und der quantenmechanischen Symmetrie nicht aus.

3.4.3 Quantisiertes orbitales Drehmoment und das Bohr'sche Atommodell

Energie ist nicht der einzige Parameter der Elektronenbewegung. Nach den Konzepten der klassischen Physik besitzen Teilchen in einer Umlaufbahn ein Drehmoment bzw. einen Drehimpuls. Dieses Konzept übertrug Bohr in die Quantenmechanik, wobei der Radius, das Drehmoment und die Energie nunmehr quantisiert sind. Nach Bohr ist der Drehimpuls eines Elektrons, sein sogenanntes *orbitales Drehmoment* bzw. *Bahndrehmoment*, gleich einer ganzen Zahl n mal dem Planck'schen Wirkungsquant h geteilt durch 2π :

$$L = nh / 2\pi \quad \text{mit } L = 1,2,3,\dots$$

Die zugehörigen Zahlen L heißen die *orbitalen Drehmomentquantenzahlen*.

3.4.4 Die Energiequantisierung der Elektronenzustände

Die Emissionslinien eines Atomspektrums entsprechen den Ausstrahlungen von Photonen mit eindeutig definierten Energien, die wiederum dem Unterschied zwischen zwei eindeutig feststehenden Energiezuständen eines atomischen Elektrons entsprechen. Bei einer Einstrahlung kann nur Licht mit einer passenden Frequenz absorbiert werden. Man spricht von einem *diskreten* im Gegensatz zu einem *kontinuierlichen* Emissions- bzw. Absorptionsspektrum. Das Linienspektrum wird hierdurch interpretierbar als eine Folge der Quantisierung der Energieniveaus des Elektrons. Die Bahnen, die die elektronischen Zustände darstellen, verlaufen mit eindeutig definierten Abständen zum Kern: sie bilden *Schalen*. Kein Elektron kann sich zwischen diesen räumlich getrennten Schalen aufhalten. Das Bohr'sche Modell ermöglichte eine Entschlüsselung der elektronischen Zustände der Atome aus ihren Linienspektren⁸⁰.

Wasserstoff gilt mit lediglich einem Elektron und einem Proton als das einfachste Atom. Entsprechend ist sein Spektrum das einfachste. Diese Eigenschaften werden aber auch bei den mehratomigen (Photosensibilisator-)molekülen beobachtet. Wegen der Anzahl an möglichen Bewegungen innerhalb des Moleküls, d.h. Drehungen und Vibrationen der Atome untereinander, sind die Spektren wesentlich komplizierter. Statt einzelner Linien existieren Gruppen eng aneinander liegender Linien. Die Emissions- bzw. Absorptionslinien eines Atoms gehen in die *Emissions-* bzw. *Absorptionsbanden* eines Moleküls über.

3.4.5 Materie als Wellen

Nach de Broglie werden die Elektronen selbst nicht als Teilchen sondern als Wellen um den Kern dargestellt⁸⁰. In der späteren Quantenmechanik, die statistisch orientiert ist, werden die Bahnen durch Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für die Elektronen ersetzt, die man sich als „Elektronenwolken“ vorstellen kann.



Abb. 9 **Modifiziertes Bohr'sches Atom** **Quantenmechanisches Wasserstoffatom**
 mit stehenden Wellen **mit Wahrscheinlichkeitsdichte**

Im Bohr'schen Modell liegt eine Bahn in einer Ebene, so daß das Bahndrehmoment eines Einzelelektrons eine Ausrichtung hat. Es gibt jedoch auch Zustände (*s-Orbitale*, s.u.) deren Wahrscheinlichkeitsdichten keine bevorzugte Ausrichtung haben, d.h. mit einer kompletten Rotationssymmetrie um den Kern. Diese werden mit keinem Bahndrehmoment assoziiert.

3.4.6 Elektronenorbitale

Zu jedem Energieniveau sind prinzipiell mehrere Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen und Ausrichtungen bzw. Drehimpulse und Orientierungen möglich. Klassisch ausgedrückt gibt es mehrere Bahnen zu jeder Schale, mit unterschiedlichen Bahnkrümmungen und in unterschiedlichen Ebenen. Diese einzelnen nunmehr vollständig charakterisierten Bahnen werden auch *Orbitale* genannt. Die Gesamtheit der möglichen räumlichen Elektronenzustände kommt der Menge der Orbitale gleich. Die Schalen werden durchgehend mit ganzzahligen *Hauptquantenzahlen* versehen. Die tiefste hat die Hauptquantenzahl 1. Jedes Orbital darf nur bis zu zwei Elektronen enthalten (*Pauli'sches Prinzip*⁸⁰, s.u.).

3.4.7 Die Wechselwirkung zwischen Licht und Materie

3.4.7.1 Spin und Spinorbitale

Quantenmechanisch haben Elektronen nicht nur einen Bahndrehimpuls, sondern darüber hinaus eine „interne“ Drehmomentskomponente, ihren sogenannten *Spin*. Dies wurde durch Stern und Gerlach erstmals experimentell nachgewiesen⁸³. Sie zeigten, daß die Linien des Spektrums eines Atoms mit einem einzelnen ungepaarten Elektron, wie Wasserstoff oder Natrium, durch den Einfluß eines externen Magnetfeldes in Linienpaare gespalten werden.

Die Spaltung hängt linear von der Magnetfeldstärke ab. Dies führt zur Schlußfolgerung, daß

- der Energiezustand eines Elektrons von der Magnetfeldstärke abhängig ist
- ein Elektron zwei solcher möglichen Energiezustände hat.

In einem Magnetfeld verhält sich ein Elektron demgemäß analog einem einfachen klassischen Dipolmagnet, konventionell dargestellt als ein Pfeil.



Abb. 10 Pfeildarstellung eines Dipols

Nach quantenmechanischen Regeln muß ein Elementardipol parallel bzw. antiparallel zu einem äußeren Magnetfeld orientiert sein. Somit entstehen zwei Zustände. Die parallele Ausrichtung hat eine niedrigere Energie. Sie wird somit bevorzugt besetzt, und entspricht dem Grundzustand eines solchen Systems.

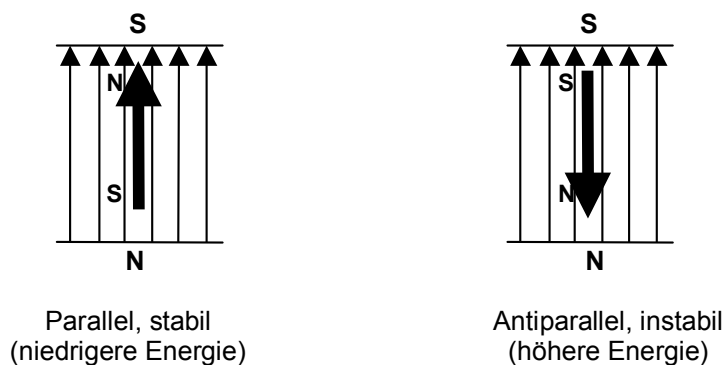


Abb. 11 Die zwei möglichen Energiezustände eines (klassischen) magnetischen Dipols

3.4.7.2 Spin- und bahnmagnetische Momente

Bewegte Ladungen rufen ein magnetisches Feld hervor. Der klassische Fall der Elektromagnetspule verdeutlicht dieses Phänomen: der Elektronenstrom durchläuft das Vielfache einer Umkreisung um die Spulenachse. Alle Elektronenbahnen verlaufen parallel zueinander, das Feld wird so verstärkt und makroskopisch wahrnehmbar. Ströme in zwei Kreisen mit entgegengesetzten Umlaufrichtungen verursachen ein Gesamtfeld gleich null.

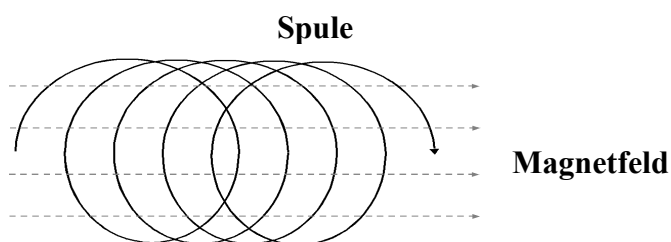


Abb. 12 Elektromagnetspule: Magnetfeld-Erzeugung durch bewegte Elektronen

Das assoziierte magnetische Dipolfeld eines Elektrons ist der Grund für die klassische Betrachtungsweise, die den Spin als eine Drehung beschreibt. Das Feld ist jedoch unabhängig sowohl von äußeren Einflüssen als auch von der Lage des Elektrons. Wegen dieser Unabhängigkeit wird der Spin als ein *intrinsischer* Parameter betrachtet. Der Spin wird generell dargestellt als entspräche er einer Drehung des Elektrons um die eigene Achse, ein der Quantenmechanik fremdes Konzept. Eine Erklärung wurde von Dirac hergeleitet durch eine Vereinigung zwischen der Speziellen Relativitätstheorie von Einstein und der Quantenmechanik⁸³. Der vollständige Ausdruck für den Zustand eines einzelnen Atom- bzw. Molekülelektrons ist ein Produkt aus seinem intrinsischen Spinzustand und dem Orbital als seinem extrinsischen Zustand. Der Produktzustand wird als ein *Spinorbital* bezeichnet.

3.4.7.3 Das Pauli'sche Prinzip

Der Elektronenspin ist eine physikalische Größe mit einem einheitlichen absoluten Betrag von $\frac{1}{2} h$ und einer Ausrichtung. Nach der Quantentheorie kann ein einzelner Spin entweder parallel oder antiparallel zu einer vorgegebenen Raumrichtung liegen, sein Wert also entweder $+\frac{1}{2} h$ (für parallel) oder $-\frac{1}{2} h$ (für antiparallel) betragen. Entsprechend gibt man einem Elektron eine Quantenzahl für seinen Spin, und zwar entweder $+\frac{1}{2}$ oder $-\frac{1}{2}$.

Das phänomenologische Pauli'sche Prinzip gilt für alle Teilchen mit Spinquantenzahl $\frac{1}{2}$, $1\frac{1}{2}$, $2\frac{1}{2}$ usw., die sogenannten *Fermionen*, wozu Elektronen und auch Protonen zählen. Es gibt auch Teilchen mit ganzzahligem Spin, die *Bosonen*, wie Photonen, die einen Spin von 1 haben. Die Produkte der Spinorbitale eines Elektronenkollektivs können nicht beliebig gebildet werden. Das Pauli'sche Prinzip besagt, daß zwei Elektronen sich nicht im gleichen Gesamtzustand befinden können. Wenn sie das gleiche Orbital teilen, müssen sie sich durch ihre Spins unterscheiden.

Dies bedeutet, daß

- zwei Elektronen im gleichen Orbital antiparallele Spins haben müssen
- nicht mehr als zwei Elektronen im gleichen Orbital vorhanden sein können.

Ein Orbital mit zwei Elektronen wird als *geschlossen* bezeichnet, eins mit weniger als zwei als *offen*.

3.4.7.4 Das Aufbauprinzip der Elemente

Das Bohr'sche Konzept ist prinzipiell auf eine Beschreibung der möglichen Energieniveaus beschränkt. Es überwindet die Probleme des Rutherford'schen Modells, kann aber nicht erklären, warum sich nicht alle Elektronen des Grundzustands eines Atoms im tiefsten Orbital befinden. Die Elektronenpaarung geschlossener Orbitale löst dieses Problem, und begründet das *Aufbauprinzip* der Elemente. Ausgehend von einem Element wird das nächste durch den Zusatz eines Protons sowie eines Neutrons zum Kern generiert. So wird Helium durch die Hinzufügung eines Protons (sowie zwei Neutronen) zum einfachen Protonenkern von Wasserstoff generiert. Lithium wird analog aus Helium gebildet, usw. Für jedes Proton muß auch ein Elektron hinzukommen, um die elektrische Neutralität zu gewährleisten.

Während die zwei Elektronen des Heliumatoms auf dem gleichen Energieniveau sind, haben spektroskopische Methoden nachgewiesen, daß das „dritte“ Elektron bei Lithium in einem energetisch höheren Orbital liegen muß. Dies widerspiegelt das Pauli'sche Prinzip der Elektronenpaarung. Nach Bildung eines Paares aus energetisch äquivalenten Elektronen zwingt die gegenseitige elektrostatische Abstoßung das dritte Elektron in ein höheres Niveau. Wie im Kapitel über das Rutherford'sche Atom erläutert, sind die energetisch höher liegenden Orbitale weiter entfernt vom Kern.

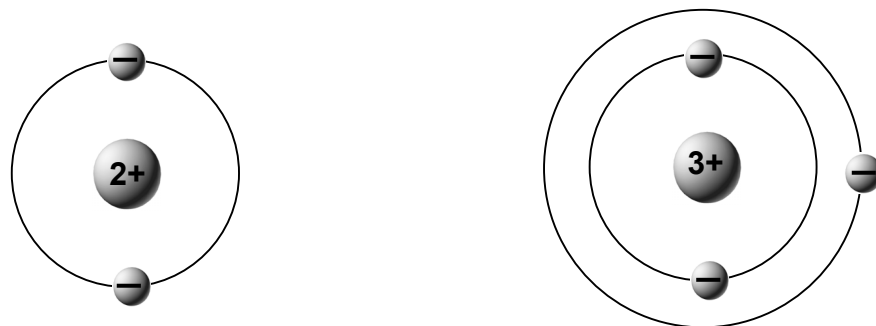


Abb. 13

Die Elemente Helium und Lithium

Die einfachsten atomaren Orbitale sind die sphärisch symmetrischen *s-Orbitale*. Diese bilden die Basis der einfachsten interatomaren Bindungen (siehe Kapitel 3.5). Nur die Minderheit der Orbitale nehmen jedoch eine kugelsymmetrische Form an. Darüber hinaus gibt es die nächstkomplizierten *p-Orbitale*. Diese sind nicht sphärisch symmetrisch, sondern nur axial symmetrisch, und stellen die Grundverbindung der lichtaktiven molekularen Strukturen dar. Es gibt sogenannte p_x , p_y und p_z -Orbitale, entsprechend der jeweiligen Symmetrieachse. Die erste Energieschale hat ein Elektronenorbital (das 1-s-Orbital), und kann 2 Elektronen akkommodieren. Die zweite Schale hat vier Elektronenorbitale (die 2-s, 2- p_x , 2- p_y und 2- p_z Orbitale), und kann insgesamt 8 Elektronen akkommodieren⁸⁴ ($2 n^2 = 2 \times 2^2 = 8$). Konventionell wird ein Spin häufig graphisch durch einen Pfeil dargestellt. Ein paralleler Spin mit $\frac{1}{2}h$ wird gegebenenfalls durch \uparrow und ein antiparalleler mit $-\frac{1}{2}h$ durch \downarrow repräsentiert.

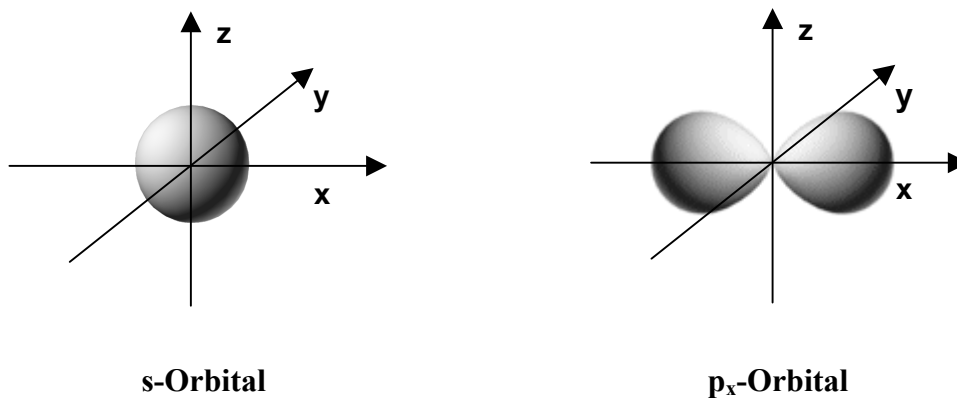


Abb. 14 s- und p_x -atomare Orbitale

Atomares Orbital	H Wasserstoff	He Helium	Li Lithium	Be Beryllium	B Bor	C Kohlenstoff	N Stickstoff	O Sauerstoff	F Fluor	Ne Neon
1 s	↓	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑
2 s			↓	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑
2 p_x					↓	↓	↓	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑
2 p_y						↓	↓	↓	↓ ↑	↓ ↑
2 p_z							↓	↓	↓	↓ ↑

Tabelle 2 Orbitale für die "ersten" zehn Elemente (Elektronenspin = \downarrow oder \uparrow)

Die höherliegenden Schalen haben eine größere Anzahl an möglichen Orbitalen mit größerer geometrischer Komplexität als die niedrigeren. Nach der Quantenmechanik besitzt die n-te Schale n^2 Orbitale, und kann $2 n^2$ Elektronen aufnehmen. Für das Verständnis der Photophysik bzw. -chemie der PDT sind sie von geringer Bedeutung

3.4.7.5 Lichtenergie, chemische Reaktivität und Valenzelektronen

Die Anregung eines Elektrons bedeutet die Absorption von Energie, die das Elektron in ein höheres, nicht geschlossenes Orbital anhebt. Änderungen der Konfigurationen der tieferliegenden Elektronen verlangen Energien, die viel höher liegen als die, die Wärme oder Licht liefern können. Sie entsprechen eher den Energien aus dem Bereich der Röntgenstrahlung.

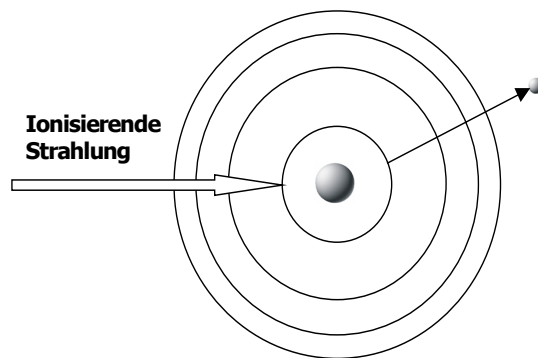


Abb. 15 Ionisierende Strahlung führt zur Emission von tiefliegenden Elektronen

Elektronen in den höheren Orbitalen werden durch die in den niedrigeren vor der Anziehungskraft des Kerns abgeschirmt, und sind somit weniger fest an das Atom gebunden.

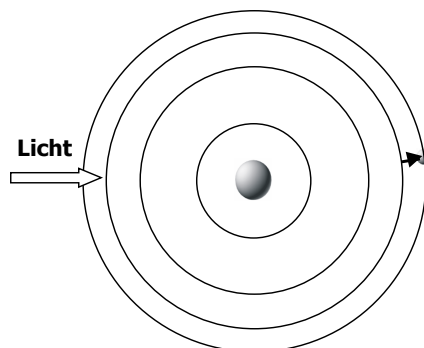


Abb. 16 Lichtabsorption führt zu Transitionen der höheren Elektronen

Folglich sind typischerweise die energetisch höchstliegenden Elektronen sowohl für die chemische Reaktivität eines Atoms als auch für seine Wechselwirkungen mit Licht bestimmend. Diese energetische Übereinstimmung erklärt die Auslösung chemischer Reaktionen durch Lichteinwirkung.

Die Elektronen, die am höchsten liegen, und entsprechend am wichtigsten für die Photophysik eines Atoms sind, werden als *Valenzelektronen* bezeichnet.

3.4.7.6 Spektroskopische Aufspaltung in einem Magnetfeld (i)

Die Aufteilung eines Produktzustands in Bahn- und Spinanteile entspricht einer Aufteilung in elektrostatische und magnetische Komponenten. Dies erlaubt die Analyse eines Mehrelektronensystems in einem Magnetfeld, was Aufschluß über die Aktivierung von Sauerstoff gibt.

Die Orbitale stehen prinzipiell mit der elektrostatischen Energie in Zusammenhang, d.h. mit der Anziehungs- bzw. Abstoßungsenergie zwischen den elektrisch geladenen Elektronen und dem Kern, und sind ausschlaggebend für die (Haupt-)linien des Spektrums. Die Klassifizierung von Zuständen als Singulett, Dublett- oder Triplettzustände entstand aus dem Bereich der optischen Spektroskopie, wo die Entwicklung hochauflösender Spektrometer den Nachweis feiner Aufspaltungen der Spektrallinien brachte. Die gelben Spektrallinien für Natrium beispielsweise bilden ein enges Paar, ein sogenanntes Dublett. Diese Aufspaltung weist auf die zwei Spinzustände eines Elektrons hin. Der Kern des Natriums besitzt ein Magnetdipolfeld, und das Valenzelektron befindet sich in einem niedrigeren Energiezustand, wenn sein eigenes Dipolfeld parallel ist zu dem des Kerns.

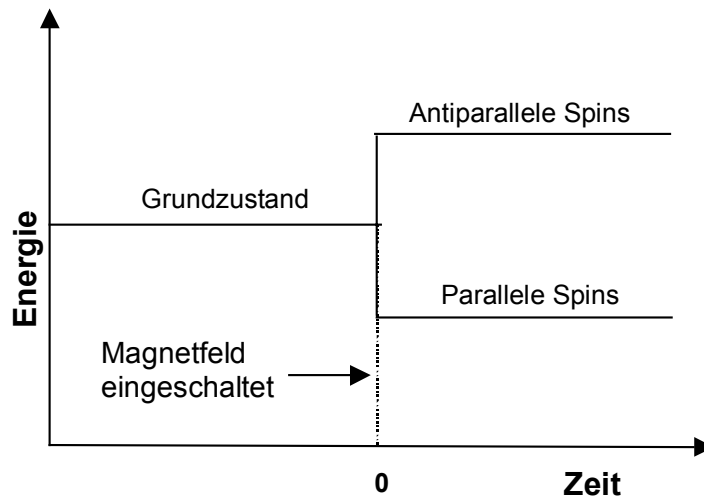


Abb. 17 Aufspaltung einer Spektrallinie durch ein magnetisches Feld

3.4.8 Mehrelektronenzustände: die Ununterscheidbarkeit der Elektronen

In Kollektiven von Elektronen, wie sie in einem Atom oder Molekül vorhanden sind, können den einzelnen Elektronenteilchen im Rahmen der Quantenmechanik keine individuellen Elektronenzustände zugeschrieben werden⁸³. Dies steht in Zusammenhang mit der quantenmechanischen Ablösung des klassischen Standpunkts einer punktmechanischen Teilchendarstellung der Materie durch eine wellenmechanische Darstellung. Geeignet ist eine Charakterisierung durch *Aufenthaltswahrscheinlichkeiten*.

Solche Elektronen können nicht räumlich gegeneinander abgegrenzt werden. Sie sind ununterscheidbar, d.h. es gibt keinen physikalisch gültigen mathematischen Ausdruck für den Zustand eines solitären Elektrons, sondern nur einen für das Kollektiv. Durch die Bildung des Produktes der einzelnen Spinorbitale gewinnt man einen validen Ausdruck für den räumlichen Zustand des Kollektivs als ganzes, und für einen kollektiven Spinzustand.

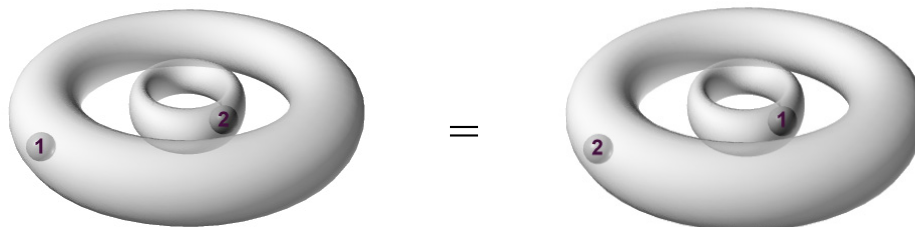


Abb. 18 Ununterscheidbarkeit der Elektronenzustände (schematisch)

3.4.9 Symmetrie und Antisymmetrie in der Quantenmechanik

Die physikalische Interpretation der Wellenfunktion - als Parameter des Teilchenzustands - gründet auf der *Wahrscheinlichkeitsdichte*. Zur Veranschaulichung kann man an die "Area

under the Curve" (*AUC*) für ein Arzneimittel denken. Diese ist ein Maß für die Stoffmenge, die im Blut erscheint. Sie entspricht der zeitlichen Integration der *Konzentration* der Substanz im Blut. In der Quantenmechanik ist die Wahrscheinlichkeitsdichte äquivalent einer Konzentration.

Die mathematischen Ausdrücke für eine Gruppe von Elektronen gehen von denen der Einzelteilchen aus. Das Resultat muß der physikalischen Ununterscheidbarkeit der individuellen Elektronen gerecht werden. Diesem wird durch die Forderung genügt, daß ein Austausch der "individuellen Elektronen" eines Paares, d.h. ihrer mathematischen Kennwerte, zu dem gleichen physikalischen Zustand führen muß. Hierbei beschreiben die *Symmetrie* und *Antisymmetrie* eines einem (*Elektronen-*)*paar* entsprechenden Zustandes das Vorzeichen der Funktion, wenn man die Kennwerte (Spins und Positionen) der individuellen Elektronen im Paar tauscht. Wenn das Vorzeichen unverändert bleibt, ist der Zustand symmetrisch bezüglich dieser Parameter. Wechselt es, ist der Zustand antisymmetrisch. Wie oben erläutert, muß die *gesamte* Wellenfunktion für ein System von Elektronen antisymmetrisch in bezug auf einen Austausch zweier Elektronen sein. Zwei Elektronen in dem gleichen räumlichen Zustand haben definitionsgemäß die gleiche räumliche (orbitale) Wellenfunktion. Sie müssen sich somit durch ihre Spins unterscheiden.

Eine vollkommen antisymmetrische Funktion kann als das Produkt einer antisymmetrischen Spinfunktion mit einer symmetrischen räumlichen Funktion oder umgekehrt beschrieben werden. Beispielsweise wird ein symmetrischer Spinzustand mit einem antisymmetrischen räumlichen Zustand verknüpft, damit die Antisymmetrie der ganzen Wellenfunktion garantiert wird. Die vollständigen Zustandsfunktionen für das Elektronenpaar genügen nunmehr dem Pauli'schen Prinzip^{84,85}.

3.4.10 Spin als eine binäre Größe

Angelehnt an die Konzepte der Informationstechnologie, kann ein Spin als ein *Bit* (Binary Digit) charakterisiert werden. Dies ist nicht nur frei von den geometrischen Assoziierungen der klassischen Physik, sondern spiegelt die tatsächlich binäre Natur des Elektronenspins bezogen auf eine äußere Feldrichtung wider. Anstelle der üblichen Schilderung mit Spinanteilen von $+\frac{1}{2}h$ und/oder $-\frac{1}{2}h$, können die Spinzustände durch **0** und **1** abstrakt dargestellt werden. Es existieren vier mögliche Paarkombinationen: **00**, **01**, **10** und **11**.

3.4.11 Elektronenpaare: Triplet- und Singulettzustände als

Spinzustandsprodukte

Die Bedingung der Ununterscheidbarkeit muß hier interpretiert werden als die Unmöglichkeit, zwischen zwei Elektronen mittels der Ordnung der individuellen Bits (Spins) zu unterscheiden. Die symmetrischen Paare **00** und **11** erfüllen diese Forderung automatisch. Im Falle von **01** und **10** muß man zuerst Kombinationen aus den Paaren bilden:

- **(01 - 10)**
- **(10 - 01)**, physikalisch gleichbedeutend mit **(01 - 10)**
- **(01 + 10)**, welches identisch ist mit **(10 + 01)**

Diese werden dann in symmetrische und antisymmetrische Gruppen unterteilt. Man muß berücksichtigen, daß die Wellenfunktionen Ψ und $-\Psi$, hier insbesondere **(01-10)** und **(10-01)**, der gleichen Physik entsprechen.

Das Ergebnis ist ein *Triplet* der symmetrischen Drehungszustände

- **00**
- **11**
- **(01 + 10)**

und das antisymmetrische *Singulett*

- **(01 - 10)**.

3.4.12 Symmetrie und Parallelität

Parallelität ist ein klassisches und kein wirklich quantenmechanisches Konzept. Klassisch werden die zwei Einzelspins jeder Kombination des Triplettet als *parallel* (*zueinander*) bezeichnet, da ein Austausch der individuellen Spins das Spinprodukt nicht verändert. Im Fall des Singulettet werden die Einzelspins wegen der Antisymmetrie als *antiparallel* bezeichnet.

3.4.13 Spektroskopische Aufspaltung in einem Magnetfeld (ii)

Im Falle des Einzelelektrons führen die zwei möglichen Orientierungen für den Spin zur spektroskopischen Erscheinung des Dubletts. Das Produkt des Spinzustandes mit dem Orbital ergibt das entsprechende Spinorbital. Die drei Paarkombinationen des Triplets werden zusammengefaßt als ein Gesamtspin der Größe $1h$, mit drei *Spinkomponenten* von $1h$ für den (zum Magnetfeld) *parallelen* Zustand, entsprechend dem **11**-Zustand, von $0h$, entsprechend dem gemischten (**01** + **10**)-Zustand, der als *senkrecht* zum Magnetfeld beschrieben wird, sowie von $-1h$, entsprechend dem *antiparallelen* **00**-Zustand. Diese werden jeweils durch $\uparrow\uparrow$, $\downarrow\uparrow + \uparrow\downarrow$ und $\downarrow\downarrow$ graphisch dargestellt, in Übereinstimmung mit der beschriebenen Konvention für Einzelelektronen. Die antisymmetrische (**01-10**) Kombination, graphisch $\downarrow\uparrow - \uparrow\downarrow$, wird einem Zustand mit Gesamtspin gleich $0h$ zugeschrieben. Der Einfluß eines Magnetfeldes auf die Energieniveaus der Singulett- und Triplettzustände führt zu einer Aufspaltung des Triplets, die von der Stärke des Magnetfeldes abhängt.

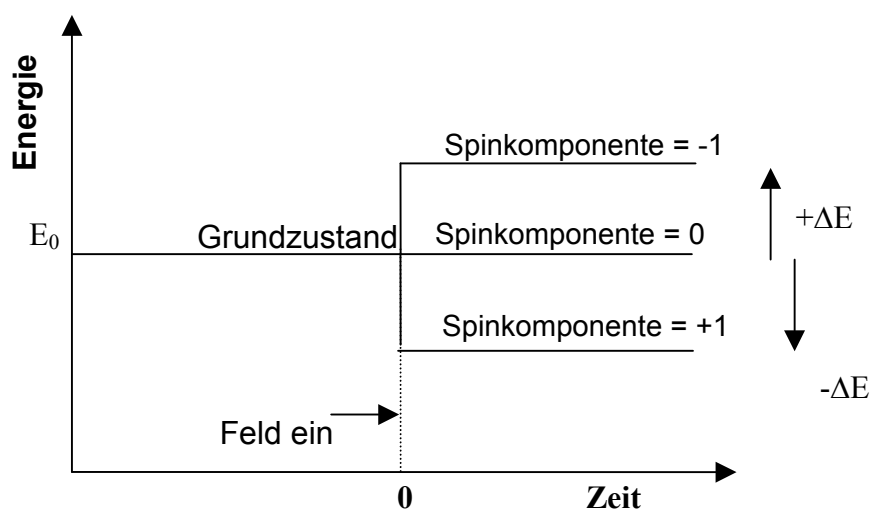


Abb. 19 Energiespaltung eines Triplettzustands in einem äußeren Magnetfeld

Genau wie bei dem einfachen Fall des Wasserstoffatoms können die Energiestufen der zusammengesetzten Zustände spektroskopisch erfaßt werden durch die Emission oder Absorption von Licht. In Abwesenheit eines Magnetfeldes hat ein Triplettzustand ein Spektrum mit nur einer Linie, der Energie E_0 entsprechend, d.h. es entsteht keine Aufspaltung der Spektrallinien. Die Einschaltung eines Feldes führt zu einer Aufspaltung jeder gewöhnlichen Linie in drei, mit Stufen bei E_0 , $E_0 - \Delta E$ und $E_0 + \Delta E$.

Die Spaltung ΔE ist proportional zur Stärke des Magnetfeldes. Ein Singulettzustand hat immer ein Spektrum nur mit Einzellinien.

3.5 Moleküle und Radikale

Das Basisgerüst eines Moleküls besteht aus den Kernen der beteiligten Atome. Die Kerne sind alle positiv geladen, so daß eine abstoßende Wechselwirkung zwischen ihnen besteht. Der Zusammenhalt des Moleküls wird durch den überbrückenden Einfluß der negativ geladenen Elektronen ermöglicht, die sich teilweise zwischen den Kernen, teilweise in Bahnen um das Gerüst herum aufhalten. Molekulare Bindungen können auf der Grundlage von atomaren Orbitalen verstanden werden. Nur die zwei einfachsten Typen werden hier geschildert, um die Moleküle zu verstehen, die in der PDT von Interesse sind.

3.5.1 Chemische Bindungen

Nach der quantenmechanischen Theorie von Heitler und London entstehen die einfachsten *kovalenten Bindungen* zwischen Atomen durch die Paarung von jeweils einem Elektron aus den äußersten Schalen der beteiligten Atome. Der Begriff der *Kovalenz* drückt die Gemeinsamkeit des Beitrags der Valenzelektronen aus⁸⁶.

Die Spins dieser gepaarten Elektronen sind maßgeblich für die Struktur der Bindung, sie müssen "antiparallel" sein. Die Bindung ähnelt in dieser Hinsicht einem geschlossenen Orbital. Sie kommt unter der Freisetzung von Energie zustande. Eine Bindung wird durch einen Strich — dargestellt, oder durch zwei Punkte •• für die zwei Bindungselektronen. Eine *Doppelbindung* entspricht zwei Elektronenpaaren. Bei der Absorption ausreichender Energie können die kovalenten Bindungen wieder gelöst werden.

Die einfachsten molekularen Orbitale⁸⁷ sind die σ -*Orbitale*, so genannt in Anlehnung an die einfachsten atomaren *s-Orbitale*. In den σ -Orbitalen halten sich die Elektronen zwischen den Kernen auf. Sie bilden i.A. die Basis für den Zusammenhalt eines Moleküls. Ihre Entstehung aus s-Orbitalen ist einfach vorstellbar. Sie können aber auch auf der Basis von p_x -Orbitalen entstehen, wenn die betroffenen Kerne auf der x-Achse liegen.

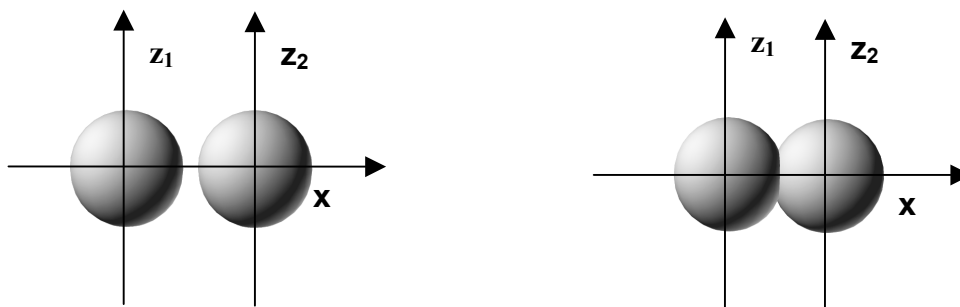
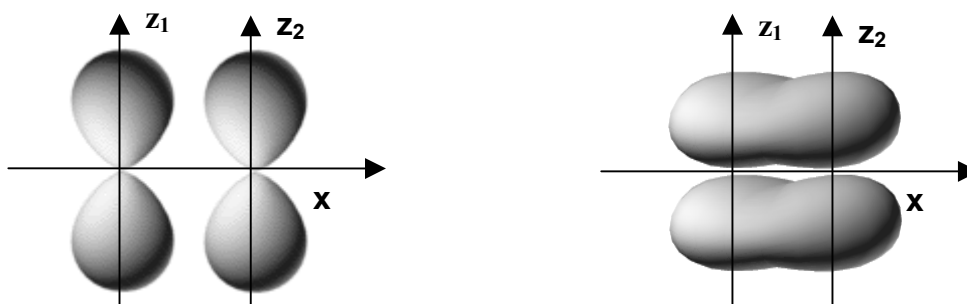


Abb. 20 Zwei s-Orbitale mit Überlappung zu einer σ -Bindung

Die sogenannten π -Bindungen entsprechen den Elektronen, die sich mehr oder weniger frei bewegen können, parallel zu, aber nicht in der Ebene des (Teil-)Moleküls. Wenn die betroffenen Kerne auf der x-Achse liegen, können diese Orbitale auf der Basis von atomaren p_y - bzw. p_z -orbitalen definiert werden. Sie kommen z.B. bei den Doppel- und Dreifachbindungen zwischen Kohlenstoffatomen organischer Moleküle vor. Sie sind von zentraler Bedeutung für die Ringstrukturen der Photosensibilisatormoleküle.



Zwei p_z -Orbitale mit Überlappung zu einer π -Bindung

Abb. 21 π - molekulare Orbitale

Wie bei Atomen ist das wichtigste Orbital für die Reaktivität das mit den am schwächsten gebundenen Elektronen. Es wird als das HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital* = höchstes besetztes Molekularorbital) bezeichnet. Das nächsthöhere Orbital heißt das LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* = tiefstes unbesetztes Molekularorbital). Der Quantensprung vom HOMO ins LUMO hat den geringsten Energiebedarf, er läßt sich also am leichtesten bewerkstelligen^{88,89}.

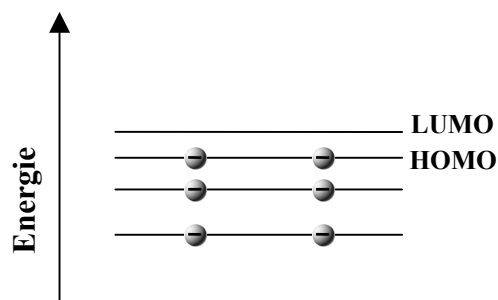


Abb. 22 **Energiediagramm: Darstellung von HOMO und LUMO**

3.5.2 Die Grundzustandsenergie

Die Energie des Grundzustands wird direkt durch die räumliche Verteilung der Elektronendichten bestimmt. Der Einfluß der Orbitale ist in diesem Sinn ein klassischer. Er läßt sich durch die elektrostatische Energie der Anziehungskraft der Elektronen zum Kern und die gegenseitige Abstoßung der Elektronen beschreiben.

3.5.3 Die Hund'schen Regeln für den Grundzustand

Nach der bisherigen Darlegung ist die Kombination eines symmetrischen Spinzustands mit einem antisymmetrischen Orbitalzustand, oder umgekehrt, eine quantenmechanisch gültige Konfiguration. Die Ladung der Elektronen und deren Einfluß auf die Energie wurden jedoch bisher nicht berücksichtigt.

Die *Hund'schen Regeln*, die die Elektronenkonfigurationen von Atomen und Molekülen beschreiben, wurden anhand spektroskopischer Analysen entwickelt. Sie charakterisieren den Grundzustand⁹⁰, und besagen, daß die Orbitale eines Energieniveaus möglichst einzelbesetzt sind. Die physikalische Basis dieser Regel liegt in der gegenseitigen Abstoßung der gleichgeladenen Elektronen. Klassisch gesehen sind die Bahnen des Grundzustands gerade die, worin die Elektronen möglichst lange möglichst weit voneinander entfernt bleiben.

Eine Betrachtung der atomaren Orbitale der Elemente Bor, Kohlenstoff, und Stickstoff, wie in Tabelle 2 aufgelistet, verdeutlicht die Regel. Durch den „Aufbauschritt“ von Bor zu Kohlenstoff geht das zusätzliche Elektron in das $2p_y$ -Orbital. Beim nächsten Schritt, von Kohlenstoff zu Stickstoff, geht das nächste Elektron in das $2p_z$ -Orbital. Wenn zwei Elektronen sich in verschiedenen Orbitalen befinden, ist die entsprechende räumliche Zustandsfunktion antisymmetrisch. Aufgrund der Antisymmetrie des Gesamtzustands

verlangt dies wiederum die Symmetrie des Spinzustandes. Die Elektronen der zweiten Energieschale besetzen zwar andere Orbitale, sind aber gleichzeitig möglichst „parallel“ zueinander. Erst wenn die drei 2p-Orbitale gefüllt sind mit Einzelelektronen, wird eins mit antiparallelen Elektronen besetzt, und zwar bei dem „Aufbau“ zum Sauerstoffatom.

Die Orbitale der meisten kovalent gebundenen organischen Verbindungen sind geschlossen. Die Elektronen sind gepaart, ihre Spins antiparallel, einschließlich die des HOMOs. Somit sind ihre Grundzustände grundsätzlich Singulets. Die herausragende Ausnahme unter den biologisch bedeutenden Molekülen ist Sauerstoff mit seinem Triplettgrundzustand.

3.5.4 Der Sauerstoffgrundzustand

Bei Sauerstoff sind die höchsten Orbitale nicht geschlossen. Das O₂-Molekül hat insgesamt 16 Elektronen, 6 davon in den höchsten π -Orbitalen. Die zwei energetisch höchsten Elektronen sind im gleichen Energiezustand, in unterschiedlichen molekularen Orbitalen und mit symmetrischer Spinfunktion. Der Grundzustand von Sauerstoff ist ein Triplett^{78,84,91}.

Molekulares Orbital	H ₂ Wasserstoff	Li ₂ Lithium	Be ₂ Beryllium	B ₂ Bor	C ₂ Kohlenstoff	N ₂ Stickstoff	O ₂ Sauerstoff	F ₂ Fluor
$\sigma(1s)$	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑
$\sigma^*(1s)$		↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑
$\sigma(2s)$		↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑
$\sigma^*(2s)$			↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑
$\pi(2p_y)$				↓	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑
$\pi(2p_z)$				↓	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑
$\sigma(2p_x)$						↓↑	↓↑	↓↑
$\pi^*(2p_y)$							↓	↓↑
$\pi^*(2p_z)$							↓	↓↑
$\sigma^*(2p_x)$								

Tabelle 3 Besetzung der molekularen Elektronenorbitale (LCAO-Modell)

3.5.5 Die aktivierten Sauerstoffspezies (ROS)

3.5.5.1 Anregung aus dem Grundzustand: erlaubte Übergänge und Spinverbot

Die Bedingungen für die Absorption oder Emission von Licht involvieren mehr als nur Energie. Die quantenmechanischen Funktionen für die Zustände von Elektronen und Photonen besitzen räumliche Symmetrieeigenschaften. Sowohl die Energie des Systems aus

Elektron und Photon, als auch die Symmetrie des ganzen Systems müssen erhalten bleiben. Diese *Auswahlregeln* schränken das Verhältnis zwischen Initial- und Endzustand ein, und somit die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen Materie und Licht.

Durch die Absorption von einem Photon wird ein Elektron beispielsweise aus dem HOMO in ein höheres Orbital angeregt. Die Paarung wird somit aufgehoben, und es ist zunächst nicht ersichtlich, ob die Spins dieser Elektronen einer symmetrischen oder antisymmetrischen Konfiguration angehören.

Eine Auswahlregel zur Emission bzw. Absorption von Photonen, fundamental für die Erklärung der PDT, besagt, daß solche „extrinsischen“ Einwirkungen den Spin eines Elektrons nicht beeinflussen. Sie können die Spinmultiplizität eines Zustandes nicht ändern. Der Übergang beispielsweise vom Singulett-Grundzustand eines Moleküles zu einem Triplett wird als *spinverboten* bezeichnet. Der Übergang vom diesem Grundzustand in den nächsthöheren Singulettzustand wäre dagegen *erlaubt*.

3.5.5.2 Folgen der Tripletteigenschaft des Sauerstoffgrundzustands

Die Kombination eines Moleküls im Singulettzustand (beispielsweise angeregter Photosensibilisator) und eines im Triplettzustand (beispielsweise Sauerstoff im Grundzustand) besitzt genau ein Orbital mit „symmetrischen“ Spins. Chemische Reaktionen führen nicht zu einer Spinumkehr, das Produkt wäre demzufolge immer noch in einem Triplettzustand. Eine solche Reaktion kann nur nach der Zufuhr zusätzlicher Energie stattfinden^{90,92}.

Der Sauerstoff muß also *aktiviert* werden. Dies kann physikalisch erfolgen, entweder durch eine direkte Umwandlung des Spinzustands von einer Triplett- in eine Singulettform, z.B. mit Hilfe eines Photosensibilisators, oder durch eine stärkere Einmischung des Singulettanteils durch den Mechanismus der Spin-Bahn-Kopplung (s.u.). Eine Aktivierung kann aber auch biologisch durch eine Elektronübertragung erfolgen, d.h. durch die Reduktion des Sauerstoffmoleküls zum Superoxidation $O_2^{\bullet-}$, wie mit dem Xanthinoxidasesystem. Die Entstehung von Metall-Sauerstoff-Komplexen während Reaktionen zellulärer Metallenzyme mit molekularem Sauerstoff, wie beispielsweise bei den Oxygenasen und mischfunktionellen Oxidoreduktasen in der Leber, ist anderer Natur, und beruht auf den besonderen Eigenschaften der Elektronenhüllen der enthaltenen Übergangsmetalle.

3.5.6 Radikale

Der Begriff *Radikal* stammt aus früheren Beobachtungen, daß die Teilung kovalent gebundener Moleküle zu zwei Rümpfen führen konnte, wobei das Elektronenpaar, das die zwei Bruchstücke verbunden hatte, auch geteilt wurde. Die Bruchstücke mit jeweils einem ungepaarten Elektron hießen Radikale des ursprünglichen Moleküls ("Radix" = Wurzel). Der Begriff des Radikals ist seitdem auf alle Moleküle oder Molekülteile mit einem ungepaarten Elektron ausgeweitet worden⁴⁴.

Ungepaarte Elektronen sind für die Reaktivität von Radikalen wegen der sehr starken Neigung zur Paarung der Elektronen verantwortlich.

Das Sauerstoffmolekül weist hier eine Besonderheit auf. Es hat zwei ungepaarte Elektronen, und zwar in der äußersten Energieschale, und wird entsprechend als ein Biradikal bezeichnet.

Ein Radikalmolekül M wird als M• durch den Punkt besonders gekennzeichnet.

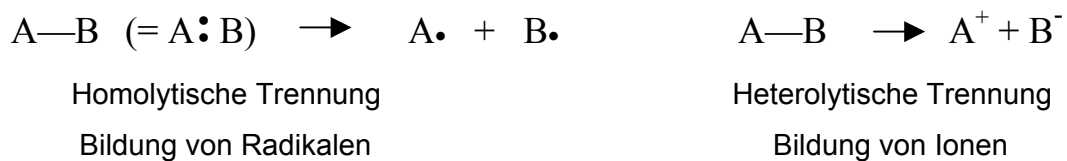


Abb. 23 Homolytische und heterolytische Trennung von Molekülbindungen

3.5.6.1 Sauerstoffradikale

Die Atmungskette, die in den Mitochondrien abläuft, und gekoppelt ist mit dem Zitrat-Zyklus und der β -Oxidation, stellt das biologische System für die Reduktion von Sauerstoff dar. Das System vermag, vier Elektronen auf ein Sauerstoffmolekül zu übertragen. Das Ergebnis besteht aus zwei Molekülen Wasser, und Energie in Form von ATP. Andere Enzymsysteme, wie z.B. Oxidasen und Peroxidasen, sind in der Lage, ein oder zwei Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen. Die Allgegenwärtigkeit der Oxidoreduktasen und ihrer Coenzyme führt ständig zur Generierung und zum Abbau von Superoxid und Wasserstoffperoxid in den Zellen⁹³.

Es gibt ein Fließgleichgewicht zwischen der enzymatischen Erzeugung dieser reaktiven Sauerstoffspezies und deren Vernichtung durch kombinierte Schutzmechanismen, wie gekoppelte Systeme von enzymatischen und niedermolekularen Antioxidantien. Der Einfluß der zusätzlichen Belastung durch die Wirkung von Photosensibilisatoren kann dieses

Gleichgewicht so weit stören, daß eine ausreichende Entgiftung der hochtoxischen Sauerstoffspezies nicht mehr gewährleistet ist. Wegen ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften ist anzunehmen, daß die genaue Spezies der photodynamisch gebildeten Produkte von Bedeutung ist. Die reaktivsten Radikale sind die Hydroxylradikale. Es sind noch keine enzymatischen Mechanismen bekannt, die die Zellen gegen die oxidative Wirkung dieser Radikale schützen können, obgleich Antioxidantien, wie beispielsweise Tocopherole, Flavonoide, Phenole, Ascorbinsäure, Harnsäure und Glutathion dabei von großer Wichtigkeit sind⁹⁴. Demgegenüber sind die Zellen durchaus in der Lage, mit Hilfe von Enzymen die Primärerzeugung von OH-Radikalen unter normalen Bedingungen zu reduzieren, indem sie die Generierung von Vorstufen wie Wasserstoffperoxid und Superoxid unterdrücken.

Man kann die Reduktion von Sauerstoff von seinem ursprünglichen molekularen Zustand bis zum Endprodukt Wasser schematisch in der Form von 4 Einzelelektronenübertragungen verfolgen. Drei- und vierfach geladene Produkte kommen in der Natur nicht vor, da sich die Bindung zwischen den beiden Sauerstoffatomen bei der Reduktion von H₂O₂ auflöst. Dabei werden ein Molekül H₂O und ein OH-Radikal erzeugt.

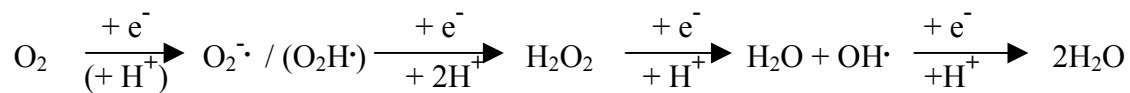


Abb. 24 Die Reduktionsstufen von Sauerstoff

Die Produkte sind das Superoxidanion bzw. das Hydroperoxyradikal, Wasserstoffperoxid, das Hydroxylradikal und als letztes Wasser.

Singulett-Sauerstoff weist eine ähnlich hohe Reaktivität wie das OH-Radikal auf⁹⁵.

3.5.6.2 Die Superoxidanion- und Hydroperoxyradikale

Die erste Reduktion, die zur Erzeugung des Superoxidanions O₂^{•-} führt, hat ein Redoxpotential im wässrigen Milieu von -0,33 Volt. Dies bedeutet, daß die Reduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxidanion Energie verbraucht. Wegen dieses Potentials kann das Superoxidanion sowohl als Reduktions- als auch als Oxidationsmittel wirken. Das Superoxidanion kann mit Protonen unter Bildung des Hydroperoxyradikals HO₂[•] reagieren. Im biologischen Milieu ist eine hohe Verfügbarkeit von Protonen, insbesondere in der unmittelbaren Nähe von Phospholipidmembranen (*Gouy-Chapman-Stern-Schicht*), wo der pH um etwa 3 höher liegen kann als in der wässrigen Umgebung. Durch die Protonierung wird

Energie gewonnen. Das Redoxpotential für die Bildung wird in der Literatur mit +1 Volt angegeben⁹⁶. Dementsprechend ist HO₂• bedeutender als biologisches Oxidans als das Superoxid, nicht nur wegen seiner Oxidationskraft, die mehr als 1 Volt höher liegt als die von O₂⁻•, sondern auch wegen seiner höheren Konzentration in unmittelbarer Nähe von biologischen Membranen⁹⁶.

Es hängt vom Redoxpotential des Reaktionspartners ab, ob das Superoxid als Oxidans oder als Reduktans fungiert. Wenn der Partner eine höhere Elektrophilie als das Superoxid vorweist, also ein stärkeres Oxidans ist, wird das Superoxid ihn reduzieren können. Als das Paradebeispiel des Reduktionsvermögens von O₂⁻• gilt die Reaktion mit dem Enzym Cytochrom c, die häufig als Nachweismethode für das Superoxidanion benutzt wird:



Das Superoxid kann auch biologisch relevante Moleküle oxidieren, beispielsweise Adrenalin, Hydroxylamine und Hydrochinone.

Die Relevanz des Superoxid für die PDT liegt u.a. in seiner Fähigkeit, Oxidantien wie das Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal zu bilden.

3.5.6.3 Wasserstoffperoxid

Biologisch wird die Bildung von Wasserstoffperoxid durch die Superoxid-Dismutase (SOD) erheblich beschleunigt. Der biologische Zellschutz funktioniert primär nicht durch die Unterdrückung der Wasserstoffperoxidbildung, sondern paradoxerweise durch deren Beschleunigung. Die zelluläre Schutzwirkung der SOD gründet auf der im Vergleich zum Wasserstoffperoxid höheren Zelltoxizität des Superoxid- bzw. Hydroperoxyradikals. Der anschließend rapide Abbau von Wasserstoffperoxid wird sowohl durch die Katalase als auch durch verschiedene Peroxidasen sehr effektiv umgesetzt^{45,94}.

H₂O₂ kann auch anhand einer Reduktion durch Hydrochinone entstehen:



Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Zusammenwirken von Semichinonen und Sauerstoff unter dem Einfluß von Superoxidradikalen:



mit anschließender Regenerierung des Superoxidanions



zusammengefaßt als



Die Chinone, zusammen mit den einfach reduzierten Semichinonen und den zweifach reduzierten Hydrochinonen, sind von erheblicher Bedeutung als Teilsysteme biologischer Redoxsysteme. Sie sind Coenzyme der Oxidoreduktasen. Sie fungieren dabei als prosthetische Gruppen der Flavoproteine, wie z.B. bei dem Flavoadenindinucleotid (FAD) oder Flavinmononucleotid (FMN). Diese Proteine sind Bestandteile der Atmungskette, die in der mitochondrialen Membran lokalisiert ist. Die von manchen Photosensibilisatoren bevorzugte Anreicherung insbesondere in diesen Membranen, mit Bildung von Superoxid- und Hydroperoxyradikalen in unmittelbarer Nähe zu diesen oxidoreduktiven Enzymkomplexen, ist für deren toxische Wirkung von Bedeutung⁹⁴.

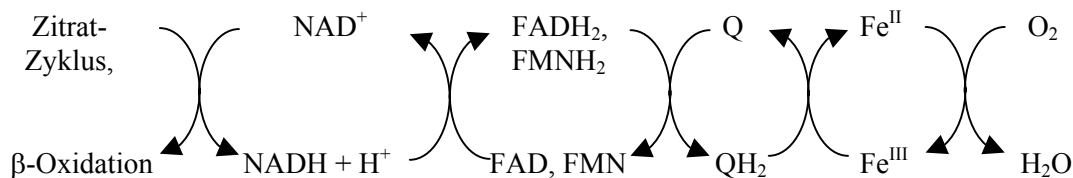


Abb. 25 Die Atmungskette

Man erkennt vier Klassen von Oxidoreduktasen in der Kette: außer der Flavin-Coenzyme FMN und FAD, des Ubichinon-Hydrochinon-Systems und der Häm-Gruppen in Form von Cytochrom-c sind auch die Pyridin-Nucleotide NAD^+ und NADP^+ von Bedeutung.

Eine andere Art der flavinkatalysierten Reaktionen kommt durch die Wirkungsweise der Xanthinoxidase zur Erscheinung. Dieses Enzym reduziert Sauerstoff unter Bildung von Superoxid. Dabei entsteht in einer Zwischenstufe ein flavingebundener Peroxidrest (HOO^-). Peroxide sind sehr zelltoxisch, da sie unter Erzeugung von Peroxylradikalen weiterreagieren können.

Die Katalase katalysiert die Bildung von Wasser und molekularem Sauerstoff aus H_2O_2 :



Peroxidasen induzieren die Reduktion von H_2O_2 durch SH_2 -Gruppen, wie sie zum Beispiel in Glutathion vorhanden sind, unter Bildung von Wasser:



Die monovalente Reduktion von Wasserstoffperoxid stellt eine Reaktion von sehr großer Bedeutung dar, da sie zur Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals führt.

3.5.6.4 Das OH-Radikal

Beim H_2O_2 werden die beiden Sauerstoffatome durch lediglich ein Elektronpaar gebunden. Durch einen weiteren Reduktionsschritt überwiegt nun der antibindende Einfluß der insgesamt nach drei Reduktionsschritten hinzugekommenen drei Elektronen die zusammenhaltende Wirkung dieses Paares. Die Bindung zwischen den beiden Sauerstoffatomen wird gelöst. Aus einem Wasserstoffperoxidmolekül entsteht ein Molekül Wasser und ein Hydroxyl-Radikal⁹⁵.

Eine Möglichkeit zur Bildung des OH-Radikals aus Wasserstoffperoxid besteht in der Reduktion durch hydratisierte Elektronen, die durch ionisierende Strahlung erzeugt werden können. Sie ist zentral für die biologische Wirkung von z.B. Röntgenstrahlung in der Strahlentherapie, aber scheinbar ohne Relevanz für die PDT.

3.5.7 Radikalkettenreaktion und Autooxidation

Die Bedeutung der oxidativen Kettenreaktion liegt nicht nur in dem höheren Ausmaß der Zerstörung, sondern auch in deren unter Umständen weitaus größeren Reichweite. Die Einwirkung von Sauerstoffradikalen und Singulett-Sauerstoff auf die Lipide der zellulären Membranstrukturen führt unter Bildung von Alkoxy- und Peroxyradikalen zu Schäden unter benachbarten Lipidmolekülen. Radikalkettenreaktionen werden unterteilt in die Schritte Initiation, Propagation und Termination^{44,95}.

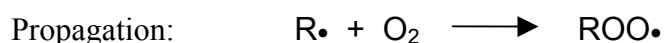


Abb. 26 Die Autooxidation ungesättigter Lipide

Langkettige Fettsäuren sind in verschiedenen Formen in Zellen weit verbreitet, beispielsweise mit Glycerol in Form von Triglyceriden kombiniert, oder in Membranen als Komponenten der Phospholipide. Sehr häufig sind Fettsäurereste mit 18 Kohlenstoffatomen, wie Linol-, Linolen und Arachidonsäure. Letztere haben eine Dienstruktur, d.h. zwei Doppelbindungen. Das Kohlenstoffatom dazwischen ist besonders anfällig für einen Radikalangriff.

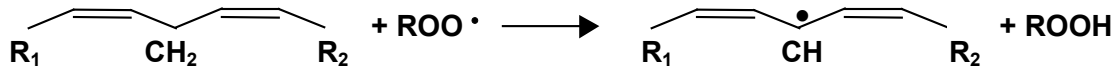


Abb. 27 Autooxidation von Linol-, Linolen- oder Arachidonsäure

3.6 Photoinduzierter Elektronentransfer

Radikale werden oft in photochemischen Prozessen erzeugt. Nach Lichtabsorption geht ein Elektron des betroffenen Moleküls in ein höheres Orbital über. Wenn ein Molekül in unmittelbarer Nähe von einem anderen Redoxpotential ist, kann ein Elektronentransfer leicht stattfinden^{76,97,98}.

Eine wäßrige Umgebung stabilisiert den dadurch erzeugten ionischen Produktzustand. Wassermoleküle sind polar, und es entstehen Wechselwirkungen zwischen ihnen und den geladenen Ionen. Die H₂O-Moleküle bilden eine Art Wasserkäfig um die einzelnen Ionen. Das Gesamtsystem gewinnt an Ordnung, die Systemenergie wird erniedrigt, das System wird stabilisiert.

Die Anregung eines Photosensibilisatormoleküls kann zu einem solchen Elektronentransferprozeß führen. Der erste Schritt ist energetisch:



Wenn ein Molekül X mit positiverem Redoxpotential sich in der Umgebung des angeregten Photosensibilisatormoleküls PS* befindet, kann es ein Elektron gewinnen, d.h. es fungiert als Elektronakzeptor. Der Photosensibilisator wird oxidiert, der Prozeß wird als *oxidatives Quenching* bezeichnet. Es bildet sich ein Radikationenpaar.



Analog gibt es das *reduktive Quenching*, wenn X als Elektronendonator fungiert:



3.6.1 Typ I-Sauerstoffaktivierung

3.6.1.1 Bildung von Superoxidradikalen

Die Erzeugung von Superoxid durch die PDT kann durch oxidatives Quenching durch Sauerstoff erfolgen.



Nach dem oben dargestellten Schema des photoinduzierten Elektronentransfers können jedoch angeregte Photosensibilisatormoleküle auch Elektronen von Substratmolekülen entziehen, und sich dabei in Radikalanionen umwandeln (siehe (11)).

Sauerstoff kann mit beiden Radikalanionen reagieren. In allen Fällen ist das Endprodukt ein oxidiertes Substrat. Die Folgen einer Reaktion von Sauerstoff mit Photosensibilisator-Radikalanionen sind jedoch anders als bei einer direkten Reaktion mit Substrat-Radikalkationen. Durch erstere werden Superoxidradikale erzeugt, die Substratmoleküle oxidieren können:



Die Reaktion ist somit beendet.

Superoxid spielt keine Rolle bei der zweiten Reaktion, wobei die Möglichkeit einer Kettenreaktion gegeben ist:



so daß $\text{X}^{\bullet+}$ regeneriert wird. Die Voraussetzung dafür ist, daß das Redoxpotential des Radikalkations $\text{XO}_2^{\bullet+}$ größer ist als das des Substrats X.



Elektronendonatoren können die Kettenreaktion unterbrechen:



Als Elektronendonatoren können auch die Radikale selbst fungieren.

Eine gemessene Quantenausbeute Φ_{XO_2} , die größer als 1 ist, zeigt eine stattfindende Kettenreaktion an⁷⁶.

3.6.1.2 Bildung von Wasserstoffperoxid

H₂O₂ gilt als stabiles Produkt der Reduktionen von Sauerstoff. Es gibt mehrere indirekte Möglichkeiten für seine Bildung, beispielsweise durch eine einfache Dismutation von Superoxid:

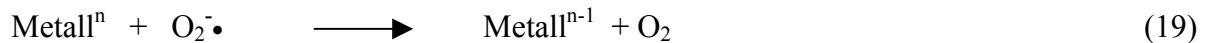
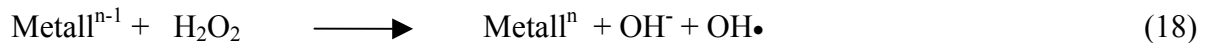


3.6.1.3 OH-Radikalbildung

Eine relevante Möglichkeit der OH-Radikal-Erzeugung entsteht, wenn sowohl Superoxid als auch Wasserstoffperoxid gebildet werden. Das Superoxidanion ist in dieser Hinsicht der Elektronendonator für das Wasserstoffperoxid. Der dazugehörige Reaktionsweg ist als die Haber-Weiss-Reaktion bekannt:



In der unkatalysierten Form läuft sie langsam ab. Verschiedene Metalle können sie beschleunigen, so daß sie um Größenordnungen schneller ablaufen kann:



Der erste Teilschritt, die Reduktion von Wasserstoffperoxid, ist die Fenton-Reaktion. Sie ist vor allem mit Metallⁿ in der Gestalt von Fe^{III} bekannt.

Eine durch die PDT verursachte OH-Radikalbildung kann anhand dieser Reaktionswege durch die Bildung von Superoxidradikalen erklärt werden. Eine Wasserstoffperoxidbildung, entsprechend der Reaktionsgleichung (8), zusammen mit einer anschließenden Haber-Weiss - Reaktion unterliegt diesem Prozeß⁹⁶.

3.6.2 Typ II-Sauerstoffaktivierung: Photoinduzierte Energieübertragung

Die Redox-Reaktionen entsprechen einer *chemischen* Aktivierung von Sauerstoff, d.h. sie betreffen Elektronenübertragungen. Im Gegensatz dazu stehen *physikalische* Aktivierungen, wobei die Absorption von Licht zu einer Änderung der elektronischen Struktur des Moleküles führt. Hierbei wird ein Elektron aus einem Orbital in eine höhere Stufe gehoben, in der Regel aus dem HOMO in das LUMO. Dieser Zustand hat eine beschränkte Lebensdauer, bis das Elektron die absorbierte Energie wieder abgibt⁸³.

3.6.3 Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Die Energiefreigabe kann auf drei Wegen geschehen:

- Licht wird rasch mit geringem Energieverlust wieder ausgestrahlt (*Fluoreszenz*)
- Licht wird mit einer Verzögerung und mit größerem Verlust wieder ausgestrahlt (*Phosphoreszenz*)
- die Energie wird auf ein anderes Molekül wie z.B. Sauerstoff übertragen

Die Phänomene von Fluoreszenz und Phosphoreszenz stellen deswegen Prozesse dar, die mit der Anregung von Sauerstoff konkurrieren. Dies unterstreicht einen grundsätzlichen Unterschied zwischen den diagnostischen und therapeutischen Verwendungen von Photosensibilisatoren. Protoporphyrin IX wird beispielsweise für beide eingesetzt.

Die normale Konfiguration des Grundzustands eines Photosensibilisator-Moleküles, wie der meisten organischen Moleküle, entspricht einem Singulettzustand. Das heißt, daß alle Elektronen-Orbitale geschlossen sind. Der Grundzustand wird als S_0 bezeichnet. Der erste angeregte Zustand ist auch ein Singulett, und wird als S_1 bezeichnet. Übergänge in den Triplettzustand sind spinverboten, das heißt, daß die Wahrscheinlichkeit eines solchen Überganges von der Kraft der Spinbahnkopplung abhängt. Für die meisten organischen Moleküle ist diese schwach, und wird durch die Anwesenheit von schweren Atomen, z.B. Metallen, verstärkt. Der Triplettanteil im Grundzustand eines organischen Moleküles ist deswegen typischerweise gering.

Phosphoreszenz entspricht dem umgekehrten Prozeß, ist also auch ein verbotener Übergang, mit der Emission von Licht und Transition vom Triplett- zum Singulettzustand.

Fluoreszenz kennzeichnet den Prozeß, in dem absorbierte Lichtenergie aus einem S_1 -Singulettzustand wieder ausgestrahlt wird. Dies ist der einfachste Prozeß, der es dem Photosensibilisator ermöglicht, zum Grundzustand zurückzukehren. Der Prozeß ist nicht spinverboten, so daß es zu keiner bedeutenden Verzögerung kommt.

Phosphoreszenz beschreibt die Lichtemission aus dem besetzten T_1 -Triplettzustand. Der T_1 - zu S_0 -Übergang ist auch verboten, so daß es eine bedeutende Zeitverzögerung zwischen Absorption und Emission gibt. Die Phosphoreszenz stellt eine Möglichkeit für die energetische Abregung des Photosensibilisators dar, die die Aktivierung des Sauerstoffs vom Triplett- zum Singulettzustand umgeht, wie bei der *Photodynamische Diagnostik*, PDD.

3.6.4 Die Spin-Bahn-Kopplung

Das Konstrukt der Konzepte von erlaubten und verbotenen Übergängen ist eine Vereinfachung. Faktisch finden verbotene Übergänge statt – nicht, weil die Gesetze der Quantenmechanik versagen, sondern, weil die strenge Unterteilung in Singulett- und Triplettzustände eine Idealisierung ist.

Vom Standpunkt der Kerne aus sind es die Elektronen, die sich bewegen. Vom Standpunkt eines Elektrons aus sind es die Kerne des Moleküls, die sich bewegen. Sie sind positiv geladen, und stellen einen (positiven) Strom dar, der, wie bei der Elektromagnetspule, auch ein kleines magnetisches Feld - am Ort des Elektrons - erzeugt. Da der Spin selbst einem Magneten entspricht, entsteht eine magnetische Interaktion zwischen den Teilchen. Die Elektronbewegung und der Spin werden somit verzahnt. Es gibt eine *Spin-Bahn-Wechselwirkung*. Weder ein Singulett- noch ein Triplettzustand sind rein. Durch die Verbindung zwischen Raum- und Spinfunktionen werden auch Triplett- und Singulettzustände vermischt.

Ein Übergang kann somit vom Triplettanteil des nominellen Singulettgrundzustands zu einem höherliegenden Triplettzustand erfolgen. Wegen des normalerweise geringen Mischungsgrads sind solche Übergänge generell relativ unwichtig, obgleich sie in der PDT eine sehr bedeutende Rolle spielen. Die Moleküle können in die zwei Gruppen der Singulett- und Triplettzuständen unterteilt werden. Diese Gruppen werden als *Systeme* bezeichnet. Ein Übergang von einem Singulett- in einen Triplettzustand oder umgekehrt wird entsprechend als ein *Intersystem-Crossing (ISC)* bezeichnet⁷⁶.

3.7 Photosensibilisator-Anregung

3.7.1 Farbmittel vs Farbstoffe und andere Photosensibilisatoren

Ein wirksamer Photosensibilisator muß ein gutes Farbmittel sein, d.h., er muß eine hohe Lichtabsorption aufweisen. Aber die $^1\text{O}_2$ -Produktion hängt auch von der Übergangswahrscheinlichkeit vom S_1 - zum T_1 -Zustand, und von der Lebensdauer des Triplettzustandes des Photosensibilisatormoleküls ab. Diese Faktoren sind unabhängig von der Absorption. Ein leistungsfähiger Photosensibilisator wird gekennzeichnet durch eine hohe Wahrscheinlichkeit für den S_1 - T_1 -Übergang und eine niedrige bezüglich des T_1 - S_0 -Übergangs.

Die Energieübertragung vom Photosensibilisator zu Sauerstoff ist der Prozeß, der zur Generation des sehr giftigen, nichtradikalischen Singulett-Sauerstoffs führt. Der Schrittmacher in diesem Prozeß ist die Besetzung des Photosensibilisator- T_1 -Zustandes. Weil der S_0 - T_1 -Übergang verboten ist, hängt die Wahrscheinlichkeit der Besetzung des T_1 -Zustandes im wesentlichen von dem des S_1 -Zustandes ab, so daß der Absorptionskoeffizient des Photosensibilisators ein wichtiger Parameter bezüglich der Singulett-Sauerstoffgeneration ist.

Der gemeinsame Faktor zwischen PDD und PDT ist die selektive Anreicherung des Photosensibilisators. Sie führt zu einer relativen Erhöhung

- der Ausstrahlung von rotem Licht aus den Tumorzellen bei PDD, wodurch diese sich besser abgrenzen lassen, bzw.
- der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff in den Tumorzellen bei PDT.

3.7.3 Die Elektronenspinresonanz

Wie oben dargestellt, besteht die Elektronenkonfiguration gewöhnlicher organischer Moleküle im Grundzustand aus geschlossenen Orbitalen. Die Spins in einem geschlossenen Orbital sind gepaart, entsprechend gegenläufigen Strömen. Die Summe der magnetischen Felder jedes einzelnen Orbitals, und demnach des gesamten Moleküls, ist gleich null.

Radikale dagegen haben ein ungepaartes Elektron, dessen zugehöriges magnetisches Dipolfeld detektiert werden kann. Das Feld des Einzelektrons wird vom molekularen Feld beeinflusst, wodurch es Auskunft über die Struktur des Radikals gibt.

Genau wie Elektronen haben einzelne Protonen und Neutronen (ungeladene Bestandteile der Atomkerne) sowohl Spins als auch magnetische Dipolmomente. Paare von Protonen bzw. Neutronen dagegen haben, exakt wie ein Elektronenpaar in einem geschlossenen Orbital, ein effektives Feld gleich null. Ein Atomkern mit ungepaarten Protonen erzeugt ein Feld, genauso wie einer mit einem ungepaarten Neutron. Der Spin eines Kerns muß nicht unbedingt gleich $\frac{1}{2} h$ sein; insbesondere Stickstoff hat einen Spin von 1. Dies hat nichts mit der Spin-Bahn - Wechselwirkung zu tun.

3.7.4 Die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Bei der ESR-Spektroskopie wird eine Energiedifferenz zwischen den zwei Spinzuständen des Einzelelektrons, hier eines Radikals, durch das Anlegen eines externen Magnetfelds erzeugt (s. Kapitel 3.4.7.6). Naturgemäß wird das niedrigere Niveau bevorzugt besetzt. Die vorhandene Wärmeenergie führt zu einer partiellen Besetzung des höheren Niveaus, wenn

$$\frac{n_{\text{höher}}}{n_{\text{tiefer}}} = \text{Konst.} \times e^{-\Delta E/kT}$$

sich auch weniger Elektronen darin befinden als im unteren Niveau. Bei normalen Temperaturen kann dieses Verhältnis durch die sogenannte *Boltzmann-Verteilung*⁸³ gut angenähert werden, d.h.

Durch Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen mit einer zur Aufspaltungsenergie passenden Wellenlänge können Übergänge stattfinden. Wegen dieser Anpassung wird dieses Phänomen als *Resonanz* bezeichnet. Die Resonanzenergie, die das äußere Magnetfeld widerspiegelt, entspricht der sogenannten *Feinspaltung* der Atomphysik. Die Felder der Kerne ergeben zusammen mit dem äußeren Feld das Gesamtmagnetfeld. Der Schlüssel zum Einsatz der ESR-Spektroskopie besteht in der sogenannten *Hyperfeinaufspaltung*. Dies beschreibt den zum äußeren Magnetfeld zusätzlichen Einfluß der zum Einzelelektron benachbarten Kerne. Das energetische Verhalten eines freien Elektrons im äußeren, extern angelegten Magnetfeld ist bekannt; zunächst unbekannt ist das Molekularfeld. Durch die Wirkung des letzteren kommt eine zusätzliche energetische – in Anlehnung an das Lichtspektrum sagt man spektroskopische - Aufspaltung der Energieniveaus des Einzelelektrons zustande. Diese ist die Hyperfeinaufspaltung. Sie ist analog der chemischen Verschiebung in der NMR-Spektroskopie, die für ähnliche Zwecke eingesetzt wird. Die Analyse der Hyperfeinstruktur gibt so Aufschluß über das Radikal, bzw. das Spintrap-Radikaladdukt. Dies ist das Prinzip der Elektronenspinresonanz (ESR) als Methode der Radikalanalyse⁷⁷.

Die untersuchte Probe wird in einen Hohlraum innerhalb des Magnetfeldes gebracht. Die Einstrahlung von Mikrowellen, deren Quantenenergie in Übereinstimmung mit dem Energieabstand steht, führt zu einem Übergang zwischen den Zuständen, zur Resonanz. Es findet eine Energieabsorption statt.

Bei Mikrowellenfrequenzen, die, wie in dieser Arbeit verwendet, um 9000 MHz liegen (*X-Band*), ist deren Durchstimmung technisch schwierig zu realisieren, so daß üblicherweise die Magnetfeldstärke bei konstanter Mikrowellenfrequenz variiert wird. Der Energieabstand hängt linear von der Magnetfeldstärke ab. Das ESR-Spektrometer ist mit einem Detektor ausgestattet, der diese Absorption registriert, wenn die Magnetfeldstärke der Übergangsenergie entspricht (Feinaufspaltung).

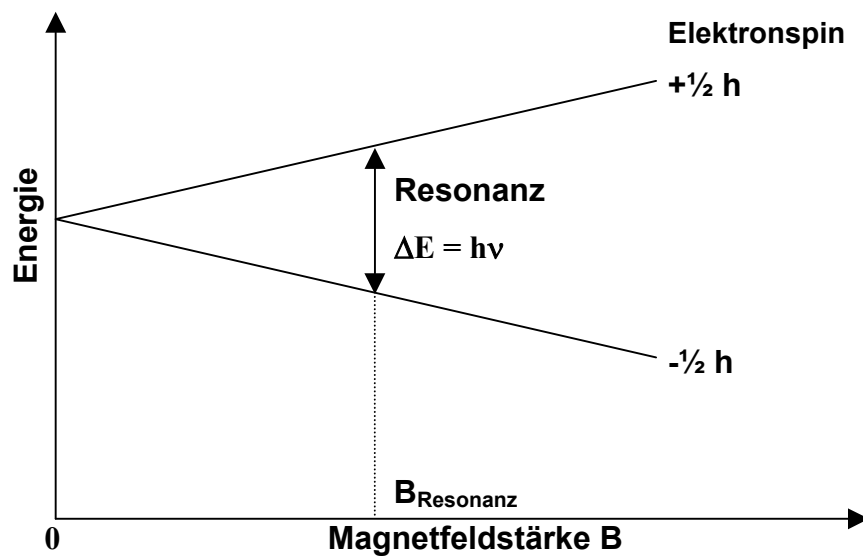


Abb. 30 Darstellung der Spinresonanz als Funktion der Magnetfeldstärke

3.7.5 Die Struktur des aufgezeichneten Spektrums

Die theoretischen Linien des Absorptionsspektrums werden in Banden durch thermische Bewegungen verbreitert. Aus technischen Gründen wird häufig nicht das Band selbst, sondern die erste Ableitung eines Bandes aufgezeichnet. Das Verhältnis der Ableitung zum Band wird unten dargestellt. Hierbei wird die Bandbreite als der Abstand zwischen den beiden Spitzen der Bandableitung definiert.

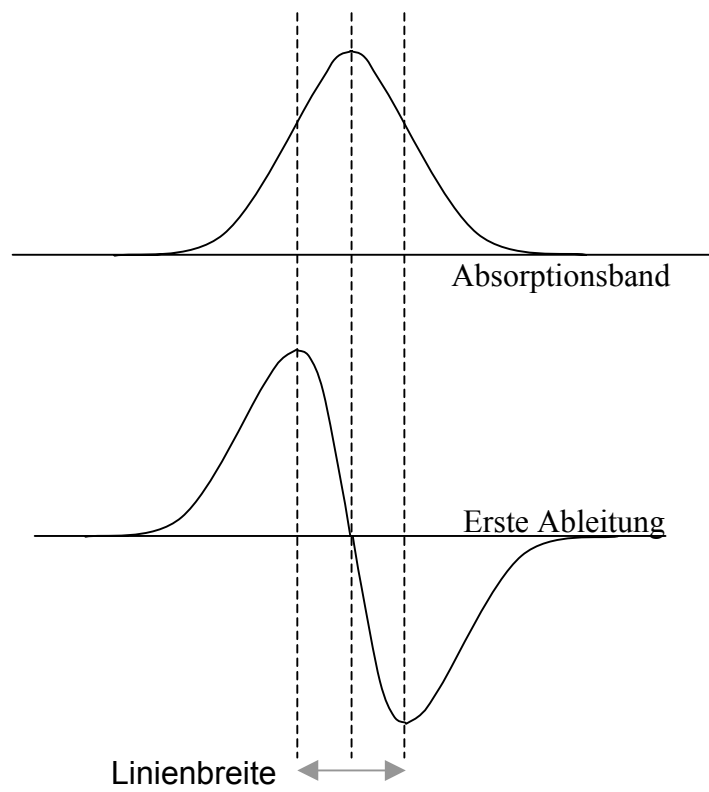


Abb. 31 ESR-Spektrumlinie als erste Ableitung des Absorptionsbandes

3.7.6 Der Einsatz von Spintraps

Die Sauerstoffradikale bzw. Singulett-Sauerstoff haben eine Lebensdauer in der Größenordnung von Mikrosekunden, und können somit mit konventionellen ESR-Geräten nicht detektiert werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, sie indirekt nachzuweisen, und zwar anhand der Stabilisierung beispielsweise durch den erwähnten Spintrap DMPO, bzw. im Falle von Singulett-Sauerstoff durch die Erzeugung des stabilen Radikals TEMPO. Sowohl DMPO als auch TEMPO besitzen ein Stickstoffatom, dessen Kern einen Spin von 1 hat, und der somit eine Tripletttaufspaltung in einem magnetischen Feld aufweist, genau wie ein Elektronenpaar.

Die Kerne, die von Interesse sind, besitzen selbst einen Spin, der nicht unbedingt gleich $\frac{1}{2} h$ ist. Stickstoff beispielsweise hat einen Spin von 1 h , und weist eine Tripletttaufspaltung auf (s. Abschnitt 3.4.13), genau wie zwei „parallele“ Elektronen.

Durch seinen Spin übt ein Stickstoffatom einen magnetischen Einfluß auf seine Umgebung aus, so daß ein vorhandenes Magnetfeld mit drei zusätzlichen Komponenten überlagert wird, entsprechend den Spinausrichtungen des ^{14}N -Kerns von -1 , 0 und 1 . Die zusätzliche Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Feld des Stickstoffkerns und einem Elektron führt zum Phänomen der Hyperfeinaufspaltung. Mikrowellen werden zu drei unterschiedlichen, aber eng benachbarten Frequenzen durch das Elektron absorbiert.

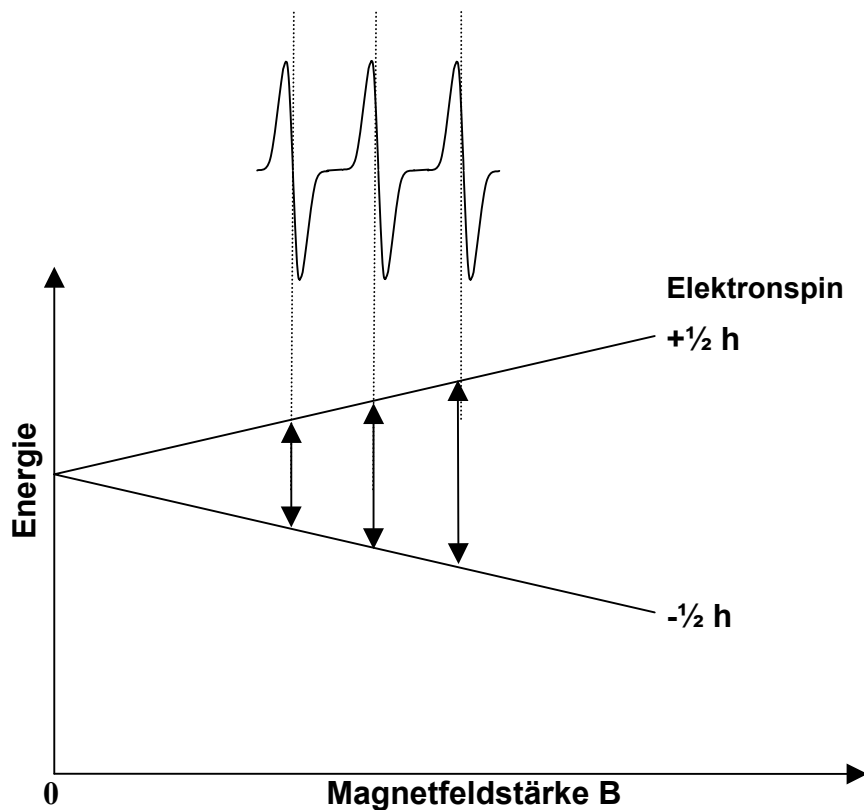


Abb. 32 Hyperfeinaufspaltung durch ^{14}N

Die hier verwendeten Substanzen, TEMP bzw. DMPO, bestehen aus einem Kohlenstoffring unter Einschluß eines Stickstoffatoms.

3.8 Detektion der $^1\text{O}_2$ -Erzeugung mit TEMP

TEMP wird durch $^1\text{O}_2$ zu dem stabilen Radikal TEMPO oxidiert. Es resultiert ein einfaches Triplettsspektrum durch die Aufspaltung über das N-Atom.

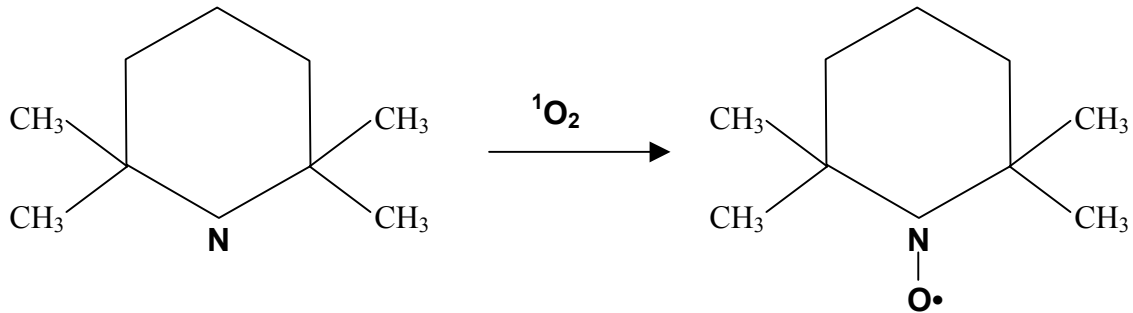


Abb. 33 Oxidation von TEMP durch Singulett-Sauerstoff

3.9 Detektion der Sauerstoffradikalbildung mit DMPO

DMPO agiert als Spintrap durch den Einfluß des Stickstoffatoms, das aufgrund dessen Elektronegativität das Einzelelektron eines Radikals anzieht.

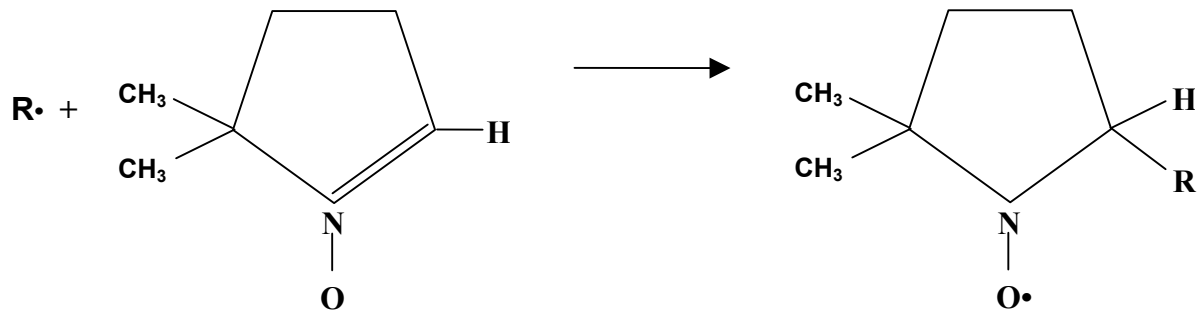


Abb. 34 Generation des DMPO-Radikal-Addukts

Das Addukt besitzt einen „Fingerabdruck“ durch den Einfluß sowohl des Stickstoffkerns als auch des Protons auf das Elektron des Radikals $\text{R}\cdot$. Genauso wie ein Elektron besitzt ein Proton einen Spin von $\frac{1}{2} h$, und verursacht eine zusätzliche Hyperfeinaufspaltung, so daß jede Linie des Triplets in zwei gespalten wird. Das ESR-Spektrum eines DMPO-Radikal-Addukts hat 6 Linien.

Das OH-Radikal mit $\text{R} = \text{OH}$ stellt einen Sonderfall dar: an der Position des Einzelektrons im Addukt ist die Stärke des Magnetfelds des Stickstoff-Kerns gleich der des Protons. Somit sind

die Triplettaufspaltung durch N und die Dublettaufspaltung durch H ebenfalls gleich groß. Das resultierende Spektrum kann als Überlagerung zweier Triplets repräsentiert werden. Es entsteht das spezifische DMPO-H Spektrum mit 4 Linien mit den relativen Intensitäten 1 : 2 : 2 : 1.

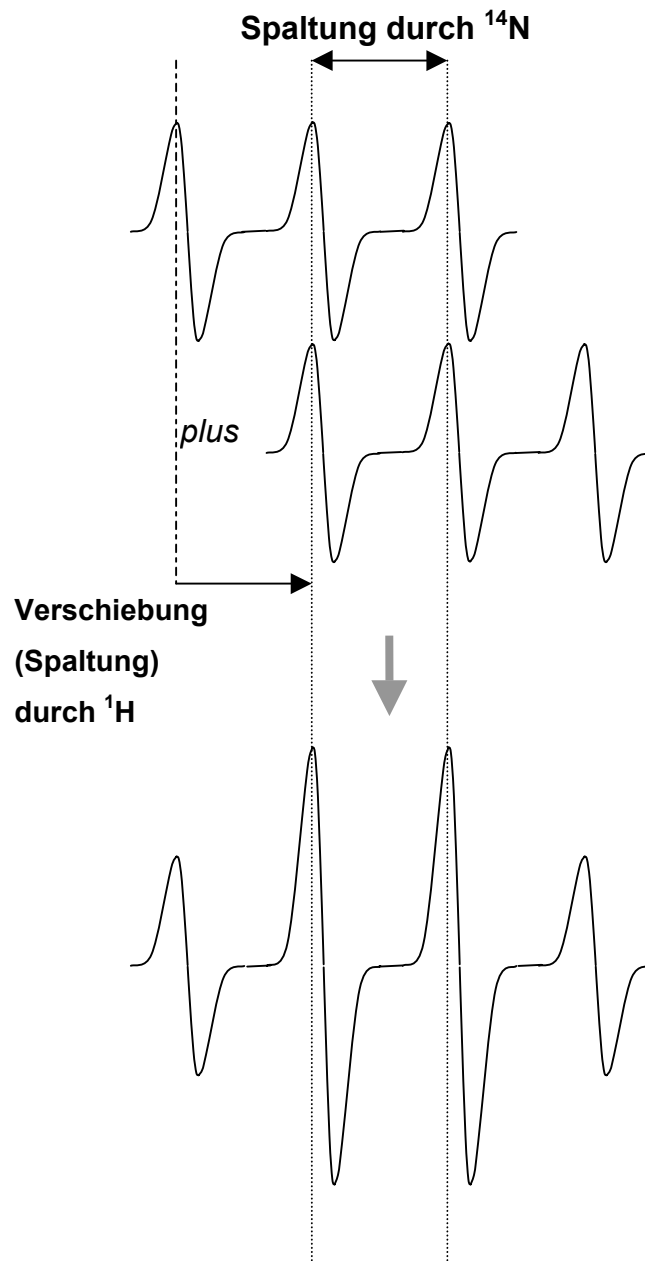
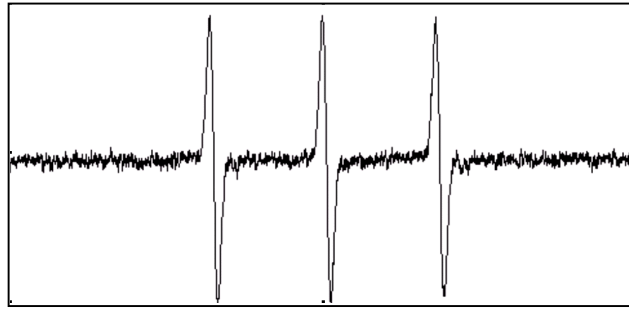
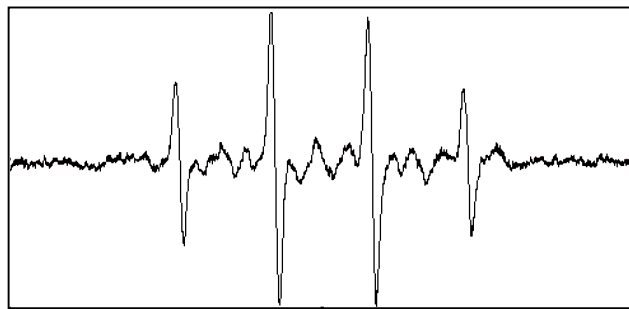


Abb. 35

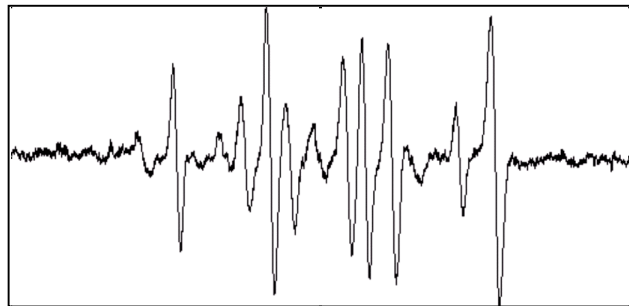
Spektrum des DMPO-OH-Addukts



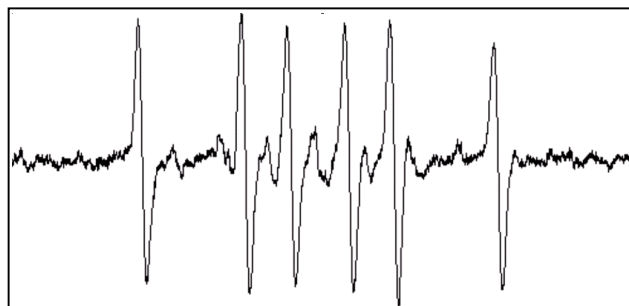
Singulett-sauerstoff-Messungen: Spektrum mit 2,2,6,6 Tetramethylpiperidin (TEMP)



Nachweis von OH-Radikalen: Spektrum mit 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DMPO)



DMPO-Spektrum: OH- und zunehmend kohlenstoffzentrierte-Radikale



DMPO-Spektrum: Überwiegend kohlenstoffzentrierte-Radikale