

Kapitel 2

Allgemeine Grundlagen

Die von mir angewandten Methoden der magnetischen Resonanz sowie ihre theoretischen Grundlagen sind der Gegenstand des folgenden Kapitels. Im ersten Abschnitt werden die verschiedenen Beiträge zu den Übergangsenergien des EPR-Spektrums sowie ihre physikalischen Ursachen erklärt. Zur Simulation der EPR-Spektren wurden die Energien eines $S = \frac{1}{2}$ -Systems mit anisotropem g-Tensor berechnet, wobei die Hyperfeinwechselwirkungen teilweise explizit und teilweise als Linienverbreiterung des Pulverspektrums berücksichtigt wurden. In Abschnitt 2.5 werden die angewandten Methoden – cw-EPR, zwei-dimensionale gepulste EPR und gepulstes 'Davies'-ENDOR – erläutert.

2.1 Das EPR-Spektrum

Ganz allgemein wird die Energie eines Spinsystems durch seinen Hamiltonoperator beschrieben. Für ein System aus einem Elektronen-Spin ($S = \frac{1}{2}$) und einem Kern-Spin ($I = \frac{1}{2}$) lautet der Spin-Hamiltonoperator [19]:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_{\text{E-Zee}} + \mathcal{H}_{\text{HF}} + \mathcal{H}_{\text{K-Zee}} \quad (2.1)$$

Die Beiträge zum Spin-Hamiltonoperator sind: die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung ($\mathcal{H}_{\text{E-Zee}}$), die Hyperfeinwechselwirkung (\mathcal{H}_{HF}) und die Kern-Zeeman-Wechselwirkung ($\mathcal{H}_{\text{K-Zee}}$). In den folgenden Unterabschnitten werden die einzelnen Beiträge diskutiert. Nicht berücksichtigt wurden: die Wechselwirkungen zwischen den Elektronenspins und die Kern-Quadrupol-Wechselwirkung, da sie für die von uns untersuchten Systeme keine messbaren Beiträge zum EPR-Spektrum liefern. Deshalb auch die Beschränkung auf $S = \frac{1}{2}$ - und $I = \frac{1}{2}$ -Systeme.

2.1.1 Elektron-Zeeman-Wechselwirkung und g-Tensor ($\hat{\mathbf{g}}$)

Für die Wechselwirkung eines ungepaarten Elektronenspins in einem paramagnetischen System mit einer äußeren magnetischen Induktion¹ \mathbf{B}_0 (Zeeman-Wechselwirkung) lautet der statische Elektronen-Zeeman-Hamiltonoperator [19]:

$$\mathcal{H}_{\text{E-Zee}} = \mu_{\text{B}} \hat{\mathbf{S}} \hat{\mathbf{g}} \mathbf{B}_0 \quad (2.2)$$

In dieser Gleichung ist $\hat{\mathbf{S}}$ der Spinoperator, $\mu_{\text{B}} = e\hbar/2m_{\text{E}}$ das Bohrsche Magneton und $\hat{\mathbf{g}}$ der g-Tensor. Der g-Tensor ist ein Maß für die richtungsabhängige Abweichung des gemessenen g-Wertes von g_{E} , dem Wert des freien Elektrons. Diese Abweichung folgt aus der Kopplung zwischen dem Elektronenspin und dem magnetischen Moment des Bahndrehimpulses $\mu_{\text{L}} = \mu_{\text{B}}L$. Im Kristallfeld eines Festkörpers kann die Kopplung zwischen $\hat{\mathbf{S}}$ und $\hat{\mathbf{L}}$ vollständig aufgehoben sein (*orbital quenching*), so dass sich das Elektron wie ein freies Elektron verhält. Häufig wird die Bahnmomentauslöschung beim Einschalten eines äußeren Magnetfeldes jedoch wieder teilweise aufgehoben [19, 20]. Für den Elektronenspin kommt dadurch eine Zusatzenergie zustande, die von der Größe des Spin-Bahn-Kopplungsparameters ξ und der Orientierung des kristallelektrischen Feldes zum äußeren Feld abhängt. Diese Zusatzenergie kann als Störung \mathcal{H}' des Hamiltonoperators \mathcal{H}_0 des Elektrons angesehen werden.

$$\mathcal{H}' = \xi \hat{\mathbf{L}} \hat{\mathbf{S}} + \mu_{\text{B}} (\hat{\mathbf{L}} + g_{\text{E}} \hat{\mathbf{S}}) \mathbf{B} \quad (2.3)$$

Unter der Voraussetzung, dass \mathcal{H}_0 keine auf den Spin wirkenden Operatoren enthält, sondern nur die kinetische Energie und die Coulomb-Wechselwirkung, kann mit Hilfe der Störungstheorie zweiter Ordnung ein effektiver Spin-Hamiltonoperator für $S = \frac{1}{2}$ entwickelt werden [21]:

$$\mathcal{H}'_{\text{eff}} = \mu_{\text{B}} \mathbf{B} \cdot (g_{\text{E}} \mathbf{1} + 2\xi \Lambda) \cdot \hat{\mathbf{S}} \quad (2.4)$$

$\mathbf{1}$ ist die 3×3 -Einheitsmatrix. Die im ersten Beitrag enthaltene Korrektur des g-Faktors wird zum anisotropen g-Tensor zusammengefasst.

$$\hat{\mathbf{g}} = g_{\text{E}} + 2\xi \Lambda \quad (2.5)$$

Der Tensor Λ ist durch die Matrixelemente von $\hat{\mathbf{L}}$ zwischen dem Grundzustand (ψ_0) des ungepaarten Elektrons und dem n -ten angeregten Zustand des Elektrons

¹In vielen Arbeiten über magnetische Resonanz werden sowohl die magnetische Induktion \mathbf{B} als auch die magnetische Feldstärke \mathbf{H} als Magnetfeld bezeichnet. Im weiteren Verlauf der Arbeit ist immer, wenn vom äußeren Feld die Rede ist, \mathbf{B}_0 die durch den supraleitenden Magneten am Probenort erzeugte magnetische Induktion gemeint.

(ψ_n) sowie durch deren Energieabstände $(E_0 - E_n)$ bestimmt [21, 22]:

$$\Lambda_{ij} = \sum_{n \neq 0} \frac{\langle \psi_0 | L_i | \psi_n \rangle \langle \psi_n | L_j | \psi_0 \rangle}{E_0 - E_n} \quad (2.6)$$

Im weiteren Verlauf dieses Unterabschnitts wird dargestellt, wie die Hauptwerte des g-Tensors aus den Eigenwerten des Hamiltonoperators bestimmt werden können. Für das äußere Feld wählt man im EPR-Experiment meist $\mathbf{B}_0 = (0, 0, B_0)$. Mit Hilfe von Rotationsmatrizen lässt sich \mathbf{B}_0 aus dem Laborkoordinatensystem in das Koordinatensystem von $\hat{\mathbf{g}}$ transformieren:

$$\frac{\mathbf{B}_0}{B_0} = \begin{pmatrix} \sin \vartheta \cdot \cos \varphi \\ \sin \vartheta \cdot \sin \varphi \\ \cos \vartheta \end{pmatrix} \quad (2.7)$$

φ und ϑ sind hier die Azimuthal- und Polarwinkel, welche die relative Lage des Feldes zum Referenzachsensystem von $\hat{\mathbf{g}}$ festlegen. Gleichung 2.23 lautet dann:

$$\mathcal{H}_{E-Zee} = \mu_B B_0 (g_{XX} \hat{\mathbf{S}}_X \sin \vartheta \cos \varphi + g_{YY} \hat{\mathbf{S}}_Y \sin \vartheta \cdot \sin \varphi + g_{ZZ} \hat{\mathbf{S}}_Z \cos \vartheta) \quad (2.8)$$

In Matrixschreibweise ist der Hamiltonoperator aus Gleichung 2.8:

$$\mathcal{H}_{E-Zee} = \frac{1}{2} \mu_B B_0 \begin{pmatrix} g_{ZZ} \cos \vartheta & g_{XX} \sin \vartheta \cos \varphi - i g_{YY} \sin \vartheta \sin \varphi \\ g_{XX} \sin \vartheta \cos \varphi + i g_{YY} \sin \vartheta \sin \varphi & -g_{ZZ} \cos \vartheta \end{pmatrix} \quad (2.9)$$

Durch Diagonalisierung erhält man die Energieeigenwerte dieses Operators [19]:

$$E_+(\vartheta, \varphi) = +\frac{1}{2} \mu_B g_{\text{eff}}(\vartheta, \varphi) B_0 m_S \quad (2.10)$$

und

$$E_-(\vartheta, \varphi) = -\frac{1}{2} \mu_B g_{\text{eff}}(\vartheta, \varphi) B_0 m_S \quad (2.11)$$

g_{eff} ist der g-Wert entlang einer beliebigen Orientierung des äußeren Feldes.

$$g_{\text{eff}}(\vartheta, \varphi) = \sqrt{g_{ZZ}^2 \cos^2 \vartheta + g_{XX}^2 \sin^2 \vartheta \cos^2 \varphi + g_{YY}^2 \sin^2 \vartheta \sin^2 \varphi} \quad (2.12)$$

2.1.2 Hyperfeinwechselwirkung

Zwischen dem Elektronenspin $\hat{\mathbf{S}}$ und den Kernspins $\hat{\mathbf{I}}$ besteht die Hyperfeinwechselwirkung. Um den Einfluss der Hyperfeinwechselwirkung auf das EPR-Spektrum explizit zu berechnen, muss der Hyperfein-Hamiltonoperator (\mathcal{H}_{HF}) bei der Berechnung von \mathcal{H}_0 berücksichtigt werden [19]. Die Hyperfeinwechselwirkung wird durch den Tensor $\hat{\mathbf{A}}$ beschrieben, der einen isotropen (A_{iso}) und einen anisotropen Teil ($\hat{\mathbf{A}}'$) enthält.

$$\mathcal{H}_{\text{HF}} = \hat{\mathbf{S}} \cdot \hat{\mathbf{A}} \cdot \hat{\mathbf{I}} = \hat{\mathbf{S}} \cdot \hat{\mathbf{A}}' \cdot \hat{\mathbf{I}} + A_{\text{iso}} \hat{\mathbf{S}} \hat{\mathbf{I}} \quad (2.13)$$

Die Ursache des isotropen Anteils ist die Fermi-Kontaktwechselwirkung. A_{iso} ist direkt proportional zur Aufenthaltswahrscheinlichkeit $|\psi(0)|^2$ des Elektrons in einem s -Orbital eines bestimmten Kerns [21].

$$A_{\text{iso}} = \frac{2}{3} \mu_0 \mu_B \mu_N g_E g_N |\psi(0)|^2 \quad (2.14)$$

Für die anisotrope Hyperfeinwechselwirkung gilt analog zur klassischen Energie zweier magnetischer Dipole im Abstand \mathbf{r} folgende Beziehung:

$$\mathcal{H}_{\text{HF}} = \hat{\mathbf{S}} \cdot \hat{\mathbf{A}}' \cdot \hat{\mathbf{I}} = -\frac{\mu_0}{4\pi} g_E \mu_B g_N \mu_N \left[\frac{\hat{\mathbf{S}}^T \cdot \hat{\mathbf{I}}}{r^3} - \frac{3(\hat{\mathbf{S}}^T \cdot \mathbf{r})(\hat{\mathbf{I}}^T \cdot \mathbf{r})}{r^5} \right] \quad (2.15)$$

Die anisotropen Hyperfeintensoren ($\hat{\mathbf{A}}$) der mit dem Elektron wechselwirkenden Kerne sind in Koordinatensystemen definiert, deren Achsen weder zueinander noch zum Referenzachsensystem des g -Tensors kollinear sein müssen. Deshalb müssen zur Berechnung der EPR- und ENDOR-Spektren die Tensoren in der Matrix einer gemeinsamen Basis dargestellt werden. Üblicherweise ist dies das g -Tensorsystem. Der Hyperfeinterm des Hamiltonoperators eines bestimmten Kerns lautet dann:

$$\mathcal{H}_{\text{HF}} = \hat{\mathbf{S}} \cdot \hat{\mathbf{A}} \cdot \hat{\mathbf{I}} = \hat{\mathbf{S}} R(\phi_A, \theta_A, \psi_A) \hat{\mathbf{A}} R(\phi_A, \theta_A, \psi_A) \hat{\mathbf{I}} \quad (2.16)$$

$R(\phi_A, \theta_A, \psi_A)$ sind die Euler-Rotationsmatrizen, wie in [23] definiert.

2.1.3 Kern-Zeeman-Wechselwirkung

Analog zur Elektron-Zeeman-Wechselwirkung gilt für einen Kernspin in einem äußeren Feld \mathbf{B}_0 folgender Kern-Zeeman-Hamiltonoperator:

$$\mathcal{H}_{\text{K-Zee}} = \mu_N \hat{\mathbf{I}} \cdot \hat{\mathbf{g}}_N \cdot \mathbf{B}_0 \quad (2.17)$$

$\hat{\mathbf{g}}_N$ ist der g -Tensor des Kerns, der eine spezifische Eigenschaft jedes Isotops ist. Bei der Berechnung von EPR-Spektren können die Kernspinübergänge vernachlässigt werden, wenn entweder $\mathcal{H}_{\text{HF}} \ll \mathcal{H}_{\text{K-Zee}}$ oder $\mathcal{H}_{\text{K-Zee}} \ll \mathcal{H}_{\text{HF}}$ gilt. Im ENDOR-Spektrum bestimmt die Kernlarmorfrequenz den Mittelpunkt des Spektrums. Dies ist der Grund dafür, dass die ENDOR-Spektren verschiedener Kerne bei niedrigen Feldern überlappen und bei höheren Feldern immer besser voneinander getrennt werden können.

2.1.4 Linienverbreiterungsmechanismen

Neben der Lage der Resonanzlinien im EPR-Spektrum enthält ihre Form wichtige strukturelle und dynamische Informationen über die Umgebung des Spins.

Man unterscheidet bei den Linienverbreiterungsmechanismen homogene Linienverbreiterungen, deren Ursache die Relaxation der durch die Mikrowelle angeregten Spinzustände ist, und inhomogene Linienverbreiterungen, die durch eine Überlagerung unaufgelöster EPR-Linien zustande kommen. Eine durch Inhomogenitäten des äußeren Feldes verursachte Verbreiterung kann gegenüber dem genannten Effekt bei EPR-Untersuchungen (anders als bei Kernspinresonanzuntersuchungen) vernachlässigt werden. Die Auflösung der inhomogenen Linienverbreiterungen ist das Ziel von Doppelresonanzmethoden (ELDOR und ENDOR [24]). Die Parameter der homogenen Linienverbreiterung – die Relaxationszeiten – können durch gepulste EPR-Experimente (siehe Unterabschnitt 2.5.3) ermittelt werden.

Homogene Linienbreite

Ein EPR-Übergang kann nur beobachtet werden, wenn eine Besetzungszahldifferenz der Energieniveaus der Elektronenspins besteht. Im thermischen Gleichgewicht wird die Bevölkerung der Spinniveaus durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben. Die endliche Aufenthaltsdauer des Elektrons in den durch die Mikrowelleneinstrahlung bevölkerten höheren Energieniveaus führt durch die Unschärferelation $\Delta\nu\Delta t \approx 1$ zu endlichen Linienbreiten. Die bei der Relaxation in den Grundzustand frei werdende Energie wird strahlungslos an das umgebende Gitter abgegeben. Dabei versteht man unter 'Gitter' alle Energiefreiheitsgrade der die Spins tragenden Moleküle bzw. Molekülteile außer dem der Spineinstellung selbst. Der mit dieser Wechselwirkung verbundene Mechanismus heißt Spin-Gitter-Relaxation. Er stellt, mit der Zeitkonstante T_1 , exponentiell das Boltzmann-Gleichgewicht wieder her. Daneben werden die EPR-Linien durch Fluktuationen der Lage der Energieniveaus verbreitert. Meist handelt es sich bei diesem Prozess um eine Änderung der Larmorfrequenz durch stochastische Fluktuationen in den Wechselwirkungen mit Spins in der Umgebung. Deshalb heißt die Zeitkonstante dieses Relaxationsprozesses Spin-Spin-Relaxationszeit T_2' . Aus der Spin-Gitter und der Spin-Spin-Relaxationszeit ergibt sich die Halbwertsbreite der EPR-Absorptionslinie (zu Absorption und Dispersion siehe auch Gleichung 3.10 und 3.9 in Abschnitt 3.4):

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2'} \quad (2.18)$$

Die resultierende Linienform ist eine Lorentzlinie [20, 25]:

$$g(\omega) = \frac{T_2}{\pi} \frac{1}{1 + T_2^2(\omega - \omega_0)^2} \quad (2.19)$$

ω_0 ist die EPR-Resonanzfrequenz und ω die Frequenz der eingestrahlten Mikrowelle. Um Relaxationszeiten zu messen, wendet man am besten gepulste Verfahren an. T_2 kann aus dem Echozerfall einer zwei-Puls-Sequenz (siehe Abschnitt 2.5.3) bestimmt werden [24]. T_1 misst man mit einer *inversion-* oder *saturation-recovery*-Sequenz oder über den Zerfall stimulierter Echos [24].

Inhomogene Linienbreite

Die durch die Relaxation bedingte homogene Linienbreite wird häufig verdeckt durch die Überlagerung vieler einzelner Linien, die im EPR-Spektrum nicht aufgelöst werden können. Die von mir untersuchten EPR-Spektren von Proteinkofaktoren sind vor allem durch unaufgelöste Hyperfeinstruktur und *g-strain*² [26, 27] verbreitert. Die sich durch die Überlagerung all dieser homogenen Linien ergebende Einhüllende hat die Form einer Gaußschen Fehlerfunktion [20, 25].

$$g(\omega) = \frac{1}{b_0\sqrt{\pi}} \exp \frac{-(\omega - \omega_0)^2}{b_0^2} \quad (2.20)$$

b_0 ist die Breite der Häufigkeitsverteilung der Spinpakete in Frequenzeinheiten.

²Unter *g-strain* versteht man eine durch heterogene Wechselwirkungen mit der Umgebung hervorgerufene Verteilung der g-Werte.

2.2 Auswertung der Spektren

Für die Simulation der cw-EPR-Spektren wurde das von Martin Fuchs an der FU-Berlin in der Programmiersprache Matlab [28] geschriebene Programm `fxfix/fn-p*` [17] verwendet. Das Programm ist in [14, 17] dargestellt. Deshalb beschränke ich mich auf die Aspekte, die für die Gewinnung der in Kapitel 4 und 5 diskutierten EPR-Parameter von Bedeutung waren. Die 360-GHz-Spektren müssen vor den Simulationen in der Regel auf die im folgenden Unterabschnitt beschriebene Weise numerisch geeicht werden.

2.2.1 Feld-und Phasenkalibrierung

Feldkalibrierung

Um die Nichtlinearität der Feldänderung bei einer Änderung des Spulenstroms, also der Funktion $B(I)$, während des EPR-Experiments zu kompensieren, wurde die Feldachse der Spektren nachträglich numerisch gegen einen mit der Probe gemessenen Feldstandard geeicht. Als Standard wurden die sechs Linien von $^{55}\text{Mn}^{2+}$ -Ionen in einer polykristallinen MnO/MgO-Matrix verwendet.³ Entsprechend den in [5, 14] beschriebenen Algorithmen wurden die Manganlinien des Spektrums simuliert, wobei die von Burghaus *et al.* bestimmten Parameter des $^{55}\text{Mn}^{2+}$ -Hamiltonoperators [5] sowie die Mikrowellenfrequenz in die Simulation eingehen. Das B_0 -Feld wird als freier Parameter durch die Simulation optimiert. Da die $^{55}\text{Mn}^{2+}$ -Linien häufig übermoduliert sind, wird für die Qualität der Simulationen die Lage des Nulldurchgangs der EPR-Linien gewählt. Der Fehler bei der Bestimmung von g -Werten wird daher vom Fehler der Feldeichung festgelegt. Die Genauigkeit bei der absoluten Bestimmung von g -Werten beträgt $\pm 5 \cdot 10^{-5}$, für Differenzen zwischen den g -Werten eines Spektrums ist die Genauigkeit mit $\pm 1 \cdot 10^{-5}$ größer. Allerdings gelten diese Fehlergrenzen nur für Spektren, die innerhalb der Linien des Standards liegen. Ist das Spektrum breiter als das Manganspektrum oder ist es auf der Strom/Feldachse gegen das Manganspektrum verschoben, ist nur eine unzureichende Feldkorrektur durch den Standard möglich. Für die 360-GHz-Messungen wurde das MnO/MgO zusammen mit Polystyrol in Toluol gelöst und zu einem dünnen Film ausgestrichen (Dicke < 0.1 mm). Um Fehler durch statische Feldinhomogenitäten zu vermeiden, wurde der Standard nahe der Probe auf den gewölbten Spiegel des Fabry-Pérot-Resonators (siehe Abbildung 3.24) aufgebracht. Bei den W-Band-Messungen wurde der Stan-

³Bei 12.8 T beobachtet man von den 30 erlaubten Übergängen eines $S = \frac{5}{2}$ und $I = \frac{5}{2}$ Systems nur noch die sechs Übergänge $M_S = \pm \frac{1}{2}$

dard mit Vakuumfett auf einen der Kolben des Hohlraumresonators aufgeklebt.

Numerische Phasenkorrektur

Die für die in Kapitel 4 und 5 dargestellten EPR-Messungen verwendete Konfiguration des 360-GHz-Spektrometers liefert Spektren, die eine Mischung aus dispersiven und absorptiven Anteilen aufweisen. Da die cw-EPR-Spektren mit einem Lock-In-Detektor aufgenommen werden, misst man abgeleitete Signale. Die physikalischen Gründe und mögliche apparative Lösungen für das Problem der Phasenverschiebung sind in Unterabschnitt 3.4.4 diskutiert. An dieser Stelle möchte ich nur auf den Algorithmus eingehen, nach dem die Linienform verändert wird, um eine abgeleitete Absorptionslinie zu erhalten. Vor der Phasenkorrektur müssen in der Regel Untergrundsignale korrigiert werden. Als Kriterien, ob man ein rein absorptives Signal detektiert oder eine Mischung aus Absorption und Dispersion, kann die Symmetrie der $^{55}\text{Mn}^{2+}$ -Linien oder das integrierte Signal verwendet werden. Ist das Signal mit einem Phasenfehler behaftet, weicht die Linienform des integrierten EPR-Signals von der eines reinen Absorptionssignal ab. Zur Korrektur dieser Fehler wurde die Phase des Signals mit Hilfe einer Hilbert Transformation korrigiert ⁴. Die Hilbert-Transformation erzeugt zwei Vektoren, das ursprüngliche Signal y_{exp} und das um 90° phasengedrehte Signal $y_{\text{exp}-90^\circ}$. Mit Hilfe der Gleichung

$$y_{\text{kor}} = \cos(\varphi) \times y_{\text{exp}} + \sin(\varphi) \times y_{\text{exp}-90} \quad (2.21)$$

wird der Korrekturwinkel φ solange variiert, bis das Signal das oben beschriebene Kriterium erfüllt. Eine Voraussetzung für die Richtigkeit dieser Prozedur ist, dass die Kramers-Kronig-Relationen (Gleichung 3.10) gelten. In unserem Fall konnte gezeigt werden, dass dies gilt, wenn der Phasenfehler über das ganze Spektrum konstant bleibt und von einer linearen Systemantwort ausgegangen werden kann (siehe auch Abbildung 3.18).

⁴Zur Korrektur der im 360-GHz-Spektrometer gemessenen cw-EPR-Spektren wurde von Martin Fuchs in der Programmiersprache Matlab [28] ein Programmpaket mit folgenden Funktionen entwickelt:

- `fxbaseline` – Subtraktion von Untergrundsignalen.
- `fxphase` – Hilberttransformation zur Phasenkorrektur.
- `fxmn` – Feldkalibrierung mit Hilfe der $^{55}\text{Mn}^{2+}$ -Linien.

2.2.2 Simulation der cw-Spektren

Resonanzpositionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich EPR-Spektren von $S = \frac{1}{2}$ Systemen untersucht, deren Resonanzpositionen entsprechend Gleichung 2.9 in Unterabschnitt 2.1.1 mit Hilfe einer numerischen Diagonalisierung berechnet wurden. Für die Simulation der EPR-Spektren von Bakteriochlorophyllen (Kapitel 4) und Chinonen (Kapitel 6) ist die Berechnung der Zeeman-Energieniveaus bereits ausreichend. Die Änderung der Energieniveaus durch die Hyperfeinwechselwirkung braucht in diesem Fall nur als Linienbreiteneffekt berücksichtigt werden (siehe Abschnitt 2.1.4). In vielen anderen Fällen, wie z.B. dem ebenfalls untersuchten Flavin (Kapitel 5), muss der Beitrag der Hyperfeinwechselwirkung zum Hamiltonoperator (siehe Gleichung 2.15) explizit mitberechnet werden.

Linienbreiten

Als Linienbreite wird eine Gaußsche Linienform angenommen, in die der g -strain und die Hyperfeinverbreiterung zu unbekanntem Anteil eingehen. In Hochfeldspektren beobachtet man in vielen Fällen eine starke Orientierungsabhängigkeit der Linienbreite; deshalb wird für jede Resonanzposition eine effektive Linienbreite berechnet [14]. Die Intensität I des Pulverspektrums beim Feldwert B wird durch eine Integration über alle möglichen Orientierungen [14] berechnet:

$$I(B) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} P(\vartheta, \varphi) \Gamma(B - B_{\text{res}}(\vartheta, \varphi), \Delta B(\vartheta, \varphi)) \sin \vartheta d\varphi d\vartheta \quad (2.22)$$

$\Gamma(B, \Delta B)$ ist die Linienformfunktion mit $\Delta B(\vartheta, \varphi)$ als Linienbreite des Spin-Pakets einer bestimmten Orientierung (siehe Abschnitt 2.1.4), $P(\vartheta, \varphi)$ ist die orientierungsabhängige Übergangswahrscheinlichkeit der Elektronenspins. Die in Kapitel 4 und 5 wiedergegebenen g -Tensor-Hauptwerte wurden durch eine Anpassung der simulierten Spektren an die experimentellen Daten mit Hilfe eines *least-squares-fit*-Algorithmus [28] gewonnen.

2.3 T_1 und T_2 im *fast motion limit*

Neben der Berechnung von cw-EPR-Spektren zur Bestimmung von g-Tensor-Hauptwerten (siehe Kapitel 4 und 5) habe ich in meiner Arbeit die Relaxation gepulster Spektren untersucht (siehe Kapitel 6). Zur Berechnung von Relaxationszeiten müssen neben den zeitunabhängigen Beiträgen zur Gesamtenergie des Systems zeitabhängige Beiträge berücksichtigt werden. Der Gesamthamiltonoperator des Spinsystems lautet dann [19]:

$$\mathcal{H}(t) = \mathcal{H}_0 + \mathcal{H}'(t) \quad (2.23)$$

ist die spurlose, stochastisch modulierte Störung des Hamiltonoperators, deren zeitlicher Mittelwert Null ist und für die gilt, $\mathcal{H}_0 \gg \mathcal{H}'(t)$. \mathcal{H}_0 ist der zeitunabhängige Teil des Hamiltonoperators. Auf diese Weise kann das Problem mittels zeitabhängiger Störungstheorie gelöst werden. Um die zeitliche Entwicklung des Hamiltonoperators der Spins im äußeren Feld zu ermitteln muss folgende Bewegungsgleichung der Dichtematrix, die als Liouville/von Neumann-Gleichung bekannt ist, gelöst werden:

$$\frac{d\rho}{dt} = \frac{i}{\hbar} [\rho, \mathcal{H}_0 + \mathcal{H}(t)] \quad (2.24)$$

ρ ist die $n \times n$ -dimensionale Dichtematrix eines Systems im Hilbertraum mit n Zuständen. Sie enthält als Diagonalelemente die reellen Besetzungszahlen (nullte Spinkohärenzen) der Spinzustände und in den Nebendiagonalelementen die höheren Kohärenzen zwischen diesen Zuständen. Ausgangspunkt der meisten Beschreibungen von Spin-Relaxation in der EPR- und NMR-Literatur ist die von Redfield [19, 29]⁵ entwickelte Formulierung der Bewegungsgleichung (*master equation*):

$$\frac{d\rho_{\alpha\alpha'}}{dt} = \frac{i}{\hbar} [\rho(t), \mathcal{H}_0]_{\alpha\alpha'} + \sum_{\beta\beta'} R_{\alpha\alpha'\beta\beta'} e^{-i(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega_{\beta\beta'})t} \{\rho'_{\beta\beta'}(t) - \rho_{\beta\beta'}^0\} \quad (2.25)$$

$\rho_{\beta\beta'}^0$ ist der Gleichgewichtswert von $\rho_{\beta\beta'}$, $R_{\alpha\alpha'\beta\beta'}$ ist ein Element der Relaxationsmatrix, deren Werte von der jeweiligen magnetischen Wechselwirkung abhängen, Allgemein lautet sie:

$$R_{\alpha\alpha'\beta\beta'} = \frac{1}{\hbar^2} \{j_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\omega_{\alpha\beta}) + j_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\omega_{\beta'\alpha'})\} - \frac{1}{\hbar^2} \left\{ \delta_{\alpha\beta} \sum_{\gamma} j_{\beta'\gamma\alpha'\gamma}(\omega_{\beta'\gamma'}) - \delta_{\alpha'\beta'} \sum_{\gamma} j_{\alpha\gamma\beta\gamma}(\omega_{\gamma\beta}) \right\} \quad (2.26)$$

⁵Ausführliche Beschreibungen der Redfield-Theorie finden sich auch in [19, 30, 31] in den jeweiligen Kapiteln über Relaxation.

Aus der Gleichung ist zu ersehen, dass sich die Elemente der Relaxationsmatrix aus spektralen Dichten j bei unterschiedlichen Frequenzen zusammensetzen. Definiert sind die spektralen Dichten durch die Fouriertransformation der Korrelationsfunktionen des zeitabhängigen Teils des Hamiltonoperators zum Zeitpunkt t und zu einem Zeitpunkt $t + \tau$:

$$j_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\omega_{\alpha\beta}) = \int_0^{\infty} \overline{\langle \alpha | \mathcal{H}(t + \tau) | \beta \rangle \langle \beta' | \mathcal{H}(t) | \alpha' \rangle} \exp(-i\omega_{\alpha\beta}\tau) dt \quad (2.27)$$

Nimmt man an, dass zwischen den verschiedenen Komponenten des zeitabhängigen Feldes keine Korrelation besteht, lässt sich die spektrale Dichte im halbklassischen Formalismus, durch die folgende Summe über die Spinoperatoren $S_{q=X,Y,Z}$ ausdrücken.

$$j_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\omega_{\alpha\beta}) = (g\mu_B)^2 \sum_q \langle \alpha | S_q | \beta \rangle \langle \beta' | S_q | \alpha' \rangle \int_0^{\infty} \overline{B_q(t + \tau) B_q(t)} \exp(-i\omega_{\alpha\beta}\tau) dt \quad (2.28)$$

Im vorliegenden Fall wurde eine Fluktuation zwischen zwei Feldwerten gleicher Wahrscheinlichkeit sowie eine rotatorische Diffusion der die Spins tragenden Teilchen angenommen. Dann reduziert sich die Korrelationsfunktion zu ([19], Appendix 10):

$$\overline{B_q(t + \tau) B_q(t)} = \overline{B_q^2} \exp(-|\tau|/\tau_c) \quad (2.29)$$

$\overline{B_q^2}$ ist das zeitliche quadratische Mittel des Feldes und τ_c die charakteristische Korrelationszeit der Bewegung. Mit dieser Beziehung lässt sich das Integral in $j_{\alpha\beta\alpha'\beta'}$ berechnen:

$$j_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\omega_{\alpha\beta}) = (g\mu_B)^2 \sum_q \langle \alpha | \hat{S}_q | \beta \rangle \langle \beta' | \hat{S}_q | \alpha' \rangle \overline{B_q^2} \frac{\tau_c}{1 + i\omega_{\alpha\beta}\tau_c} \quad (2.30)$$

Aus diesem Ausdruck kann die Relaxationsmatrix errechnet und damit die Lösung der Liouville/von Neumann-Gleichung bestimmt werden. Diese Lösung enthält theoretische Ausdrücke für die von Bloch [32] empirisch eingeführten Relaxationszeiten. Der Ausdruck für die Spin-Gitter-Relaxationsrate lautet:

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{g\mu_B}{\hbar} \right)^2 \left(\overline{B_X^2} + \overline{B_Y^2} \right) \frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} \quad (2.31)$$

Physikalisch entspricht dieser Term den Fourierkomponenten des fluktuierenden Feldes, welche mit der Frequenz ω_0 oszillieren und senkrecht zum statischen Magnetfeld stehen. Diese Komponenten bewirken Übergänge zwischen den Energieniveaus des Spins. Ein zweiter Term entspricht dem Zerfall der durch Nebendiagonalmatrixelemente quantifizierten Kohärenzen und ist somit identisch mit der

Spin-Spin-Relaxationsrate:

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{g\mu_B}{\hbar}\right)^2 \left(\overline{B_Z^2} \tau_c + \frac{1}{2} \left(\overline{B_X^2} + \overline{B_Y^2} \right) \frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} \right) \quad (2.32)$$

In der Herleitung der Relaxationszeiten mit Hilfe der Redfield-Theorie gehen eine Reihe von Näherungen ein, die für die Gültigkeit der Ausdrücke 2.31 und 2.32 gewährleistet sein müssen:

- Die oben hergeleiteten Ausdrücke der Relaxationszeiten gelten nur im *fast motion limit*⁶, das heißt $\overline{B_q^2} \tau_c^2 \ll 1$. In diesem Zeitbereich werden die Störungen im Spektrum nicht aufgelöst.
- Die Korrelationszeiten müssen kurz sein gegenüber der Zeitentwicklung der Dichtematrix ($T_1 \gg \tau_c$).
- In den Rechnungen werden nur Zustände berücksichtigt, für die die sekuläre Näherung $\omega_{\alpha\alpha'} = \omega_{\beta\beta'}$ gilt.

2.4 Berechnung von T_2 durch stochastische Fluktuationen von $\hat{\mathbf{g}}$

In dem von uns untersuchten Fall ist T_1 viel länger als T_2 . Das bedeutet, dass der Beitrag von T_1 bei der Berechnung von T_2 (siehe Gl. 2.32) vernachlässigt werden kann. Wegen der beobachteten Abhängigkeit der Relaxationszeit T_2 von der Orientierung des g -Tensors relativ zum äußeren Feld (siehe Abbildung 6.6) wurde angenommen, dass die orientierungsabhängige Relaxation durch eine stochastische Fluktuation des g -Tensors um seine Symmetrieachsen zustande kommt. Das ist mathematisch gleichbedeutend mit einer Modulation von \mathbf{B}_0 , da das fluktuierende Feld $\overline{B_Z^2}$ durch eine Modulation der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung hervorgerufen wird:

$$\overline{B_Z^2} = \frac{B_0^2}{g_{\text{eff}}^2(\vartheta, \varphi)} \overline{\delta g^2} \quad (2.33)$$

mit der mittleren quadratischen Amplitude der g -Fluktuation $\overline{\delta g^2} = \overline{(g_{\text{eff}} - g(t))^2}$. Auf Grund dieser Annahmen vereinfacht sich T_2 zu:

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{g\mu_B}{\hbar}\right)^2 \overline{B_Z^2} \tau_c = \overline{\delta \omega^2(\vartheta, \varphi)} \tau_c \quad (2.34)$$

⁶Das *fast motion limit* wird häufig auch als *motional narrowing regime* bezeichnet.

Um T_2 berechnen zu können, muss also sowohl die Korrelationszeit τ_c als auch die Amplitude $\overline{\delta g^2}$ bekannt sein. Ausgehend von der Vorstellung, dass die T_2 -Relaxation durch eine Fluktuation des effektiven g-Wertes hervorgerufen wird, haben wir ein Bewegungsmodell für die Auslenkung des Chinons in seiner Proteinbindungstasche entwickelt. In den Rechnungen wurden die stochastischen Fluktuationen des g-Tensors der Chinonmoleküle durch diskrete Sprünge um die Achse g_{XX} (siehe Abbildung 2.1) mit der Amplitude $\pm\delta X$, modelliert. Die veränderte Orientierungsabhängigkeit bei höheren Temperaturen wurde durch die Auslenkung der Librationsachse g_{XX} auf dem Mantel eines Konus mit dem Öffnungswinkel δX_c simuliert. Die Matrix, welche den g-Tensor des Chinons in die durch die Winkel $\pm\delta X$ bestimmten Orientierungen dreht, lautet:

$$\widehat{\mathbf{R}}(\pm\delta X, \delta X_c, \alpha) = \widehat{\mathbf{R}}_X^{\pm 1}(\delta X) \left[\widehat{\mathbf{R}}_X^{-1}(\alpha) \widehat{\mathbf{R}}_Y(\delta X_c) \widehat{\mathbf{R}}_X(\alpha) \right] \quad (2.35)$$

α bezeichnet hier den Winkel zwischen den verschiedenen Einstellungen auf dem Konus, über welche man mitteln muss, um $\overline{\delta g^2}$ zu erhalten (siehe Gleichung 2.37).

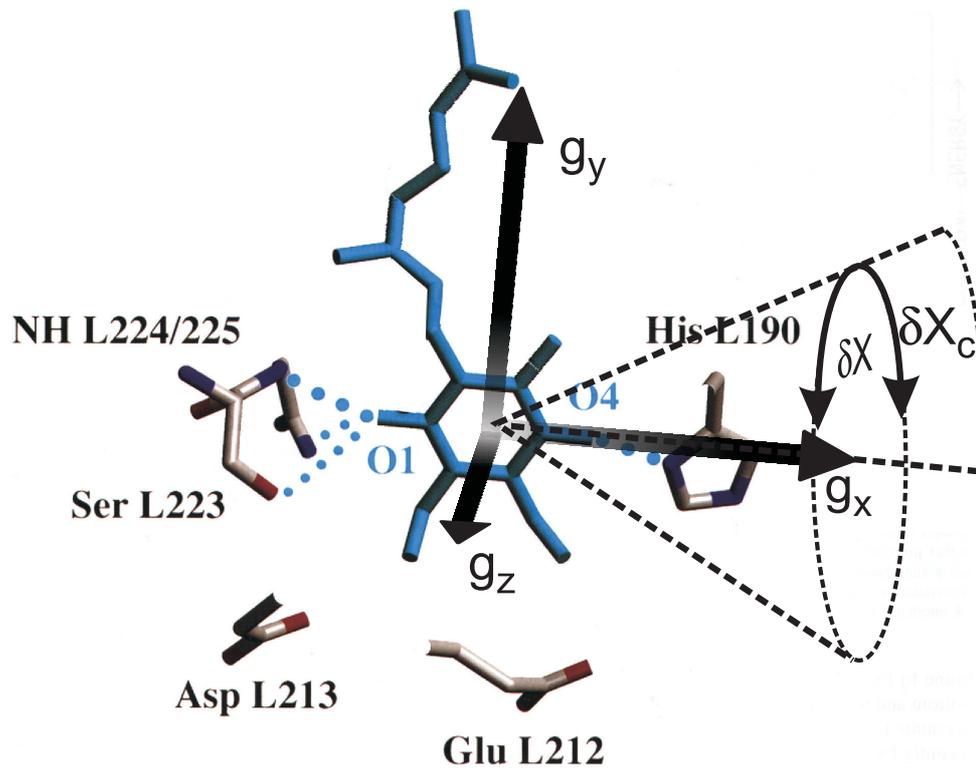


Abbildung 2.1: Modell der konischen Chinonbewegung in der Rz-Bindungstasche. Auf dem Bild ist die lokale Proteinumgebung von $Q_B^{\bullet-}$ im lichtangeregten Zustand gezeigt [33]. Die gepunktet eingezeichneten Wasserstoffbrücken wurden auf der Grundlage von Röntgenstruktur und ENDOR-Daten postuliert [34].

Die aus der Literatur bekannten Rotationsmatrizen [35] $\widehat{\mathbf{R}}_X$ und $\widehat{\mathbf{R}}_Y$ beschreiben Drehungen um die X- und Y-Achsen.

Daher ist der g-Wert für eine Auslenkung um $\pm\delta X$ gegeben durch:

$$g(\vartheta, \varphi, \delta X, \delta X_C, \alpha) = \sqrt{\frac{\mathbf{B}_0}{B_0} \cdot \widehat{\mathbf{R}}(\delta X, \delta X_C, \alpha) \cdot \widehat{\mathbf{g}} \cdot \widehat{\mathbf{g}} \cdot \widehat{\mathbf{R}}^{-1}(\delta X, \delta X_C, \alpha) \cdot \frac{\mathbf{B}_0}{B_0}^{-1}} \quad (2.36)$$

Sowohl die Auslenkung der molekularen X-Achse aus der Ruhelage als auch die Bewegung auf dem Konus sind Teil des stochastischen Prozesses. Die Standardabweichung der $\widehat{\mathbf{g}}$ -Modulation ist die Amplitude $\overline{\delta g^2}$ in Gl. (2.33) und (2.34). Man erhält sie durch Integration über alle möglichen Orientierungen des sich bewegenden Moleküls:

$$\overline{\delta g^2} = \frac{1}{4\pi} \int_{-\pi}^{\pi} [(g(\vartheta, \varphi, \delta X, \delta X_C, \alpha) - g_{\text{eff}})^2 + (g(\vartheta, \varphi, -\delta X, \delta X_C, \alpha) - g_{\text{eff}})^2] d\alpha \quad (2.37)$$

Zur Berechnung der richtungsabhängigen Relaxationszeit $T_2(\vartheta, \varphi)$ wurde das aus Gleichung 2.37 gewonnene $\overline{\delta g^2}$ in Gleichung 2.34 eingesetzt und mit einem skalaren τ_c multipliziert.

Die stochastischen Fluktuationen sind zwar der dominierende, nicht aber der einzige Relaxationsmechanismus. Aus Untersuchungen an Nitroxiden [36,37] ist z.B. bekannt, dass sogenannte Kern-Flip-Flop-Übergänge, die die dipolare Elektron-Kern-Wechselwirkung modulieren, einen weiteren wichtigen T_2 -Relaxationsmechanismus darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Mechanismen in einer zusätzlichen isotropen Relaxationszeit $T_{2_{\text{iso}}}$ zusammengefaßt (siehe [38] und das Kapitel Diskussion) und zu dem anisotropen $T_2(\vartheta, \varphi)$ addiert:

$$\frac{1}{T_{2_{\text{eff}}}} = \frac{1}{T_2(\vartheta, \varphi)} + \frac{1}{T_{2_{\text{iso}}}} \quad (2.38)$$

Aus diesem Ausdruck wurde T_2 berechnet und an die experimentell gewonnenen Zerfälle angefitet, wobei $T_{2_{\text{iso}}}$ ein weiterer Fitparameter ist.

2.5 EPR-Methoden

Neben der klassischen Dauerstrich(*continuous wave* (cw))-EPR (siehe Unterabschnitt 2.5.1) habe ich in meiner Arbeit gepulste EPR- und ENDOR-Verfahren eingesetzt (Unterabschnitt 2.5.2). Die cw-EPR-Spektren bei 360 GHz/12.8 T wurden mit dem in Kapitel 3 erläuterten Spektrometer aufgenommen, während die gepulsten Messungen bei 95 GHz/3.4 T und 180 GHz/6.3 T an den jeweils in [7, 39, 40] und [13] beschriebenen Spektrometern durchgeführt wurden.

2.5.1 cw-EPR

In einem typischen cw-EPR-Experiment [20, 41] wird die Probe mit einem Mikrowellenfeld konstanter Frequenz (ω_0) und Amplitude bestrahlt. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wird das äußere Feld zusätzlich moduliert und das Signal mit einem Lock-In-Verstärker detektiert. Die optimale Modulationsfrequenz (f_{mod}) liegt im 360-GHz-Spektrometer zwischen 1 kHz und 5 kHz. f_{mod} muss so gewählt werden, dass im Resonator möglichst geringe Eigenschwingungen (Mikrophonien) erzeugt werden. Außerdem muss die Modulationsfrequenz ausreichend weit von der Trägerfrequenz entfernt sein, um unempfindlich auf das Phasenrauschen der Quelle zu sein. Das bedeutet, die Modulationsfrequenz ist eine spektrometerspezifische Größe, die in erster Linie von der Geometrie des Resonators und dem Phasenrauschen der eingestrahlten Mikrowelle abhängt. Aufgrund der Modulation des Signals detektiert man abgeleitete Signale.

2.5.2 Gepulste EPR

Obwohl die cw-Detektion immer noch ein Standardverfahren der EPR ist, nimmt die Bedeutung der gepulsten EPR ständig zu. Obwohl gepulste EPR- und ENDOR-Spektrometer für Frequenzen bis 95 GHz kommerziell erhältlich sind [10], gibt es nur sehr wenige Hochfeld-Spektrometer, die auf Grund ihrer Spezifikationen für die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten gepulsten Messungen in Frage kommen [6, 13, 42, 43]. In den folgenden beiden Unterabschnitten beschreibe ich die bei 95 GHz und 180 GHz angewandte Methode der zwei-dimensionalen gepulsten EPR und das bei 95 GHz angewandte 'Davies'-ENDOR. Ein aktueller Überblick über Grundlagen und Methoden der gepulsten EPR wird in [24] gegeben.

2.5.3 zwei-dimensionale gepulste EPR bei 95 GHz

Auf Grund der begrenzten Anregungsbandbreite der Mikrowellenpulse, werden gepulste Spektren in der EPR meist durch die Erzeugung eines Echos an einer be-

stimmten Feldposition und schrittweiser Veränderung von \mathbf{B}_0 , gewonnen. Durch Integration über die Echointensität erhält man für jeden Feldwert einen Punkt des EPR-Spektrums. Die einfachste Sequenz zur Erzeugung eines Echos ist die Hahn-Echosequenz. Hahn-Echos werden durch einen Mikrowellen-Puls, der das Spinsystem um 90° ($\pi/2$ -Puls) in die M_X - M_Y -Ebene dreht, und einen im Pulsabstand τ darauffolgenden 180° -Puls (π -Puls), der die Umlaufrichtung der Spins in der M_X - M_Y -Ebene invertiert, erzeugt. Da das Spinsystem stochastisch fluktuierenden Feldern in seiner Umgebung ausgesetzt ist, werden nicht alle Spins wieder refokussiert. Die Echointensität nimmt mit zunehmenden Pulsabstand τ ab. Auf diese Weise können statische (refokussierbare) von dynamischen (nicht refokussierbaren) Linienverbreiterungsmechanismen getrennt werden.⁷ Die Zerfallszeit der Echoamplitude heißt 'Phasengedächtniszeit des Systems' und entspricht unter bestimmten Umständen der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 ⁸. Bei T_2 -Messungen muss die Repetitionsrate der Pulssequenz wesentlich größer als $1/T_1$ sein, damit das System vollständig relaxieren kann. In Abbildung 2.2 ist die Pulssequenz zur Messung des Echozerfalls dargestellt. In einem durch den g-Tensor verbreiterten Spektrum kann die Relaxationszeit in Abhängigkeit von der Orientierung des Moleküls gemessen werden, indem Echozerfälle an verschiedenen Resonanzpositionen aufgenommen werden (siehe Abbildung 2.3). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, können an den Rändern des W-Band Spektrums sehr selektiv bestimmte Orientierungen angeregt werden, während an den Resonanzpositionen dazwischen immer eine Vielzahl von Orientierungen zum Spektrum beitragen.

⁷In meiner Arbeit habe ich zur Messung von T_2 eine Pulssequenz aus zwei $2/3$ - π -Pulsen verwendet. Diese Sequenz ist äquivalent zu einer $\pi/2$ - π -Sequenz.

⁸Von T_2 spricht man, wenn die Echos monoexponentiell zerfallen.

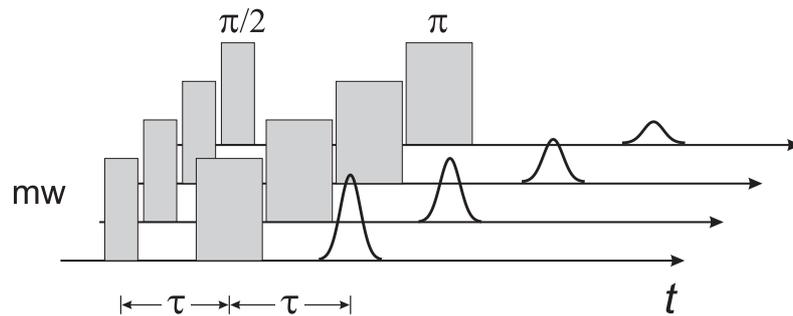


Abbildung 2.2: zwei-Puls-Sequenz zur Erzeugung von Elektronenspinechos. Echozerfälle werden durch Vergrößerung des Pulsabstands τ bei gleichbleibender Pulsdauer und konstantem \mathbf{B}_0 aufgenommen.

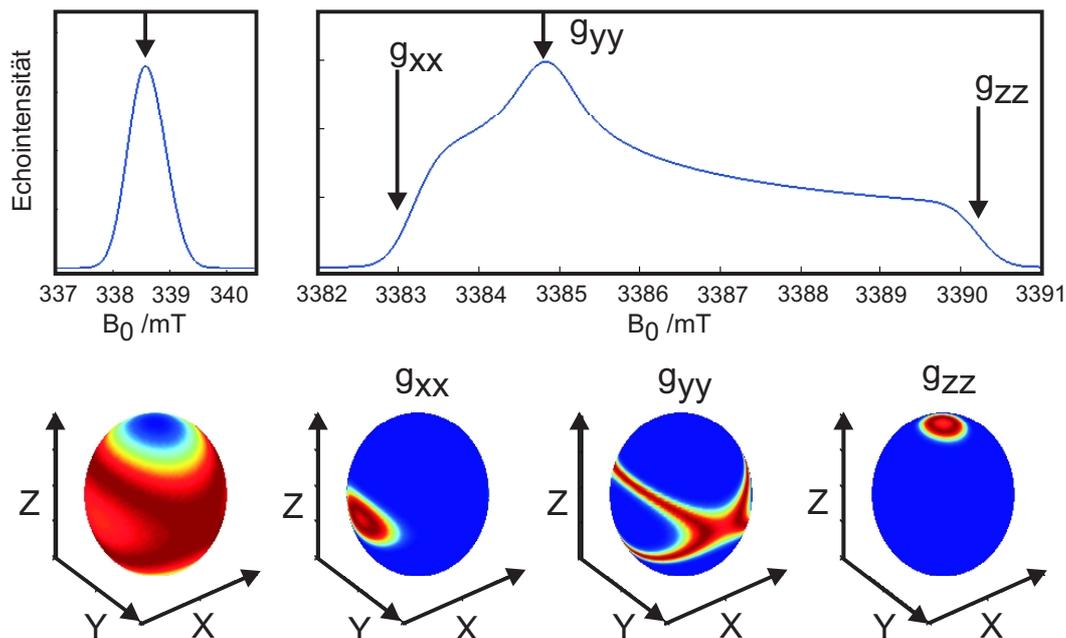


Abbildung 2.3: Oben: Simulation des gepulsten Pulverspektrums von $Q_B^{\bullet-}$ bei einem Feld von 0.34 T (links) und 3.4 T (rechts). Die Resonanzpositionen der g -Tensor-Hauptwerte sind mit Pfeilen dargestellt. Unten: Einheitskugeln mit der Selektion der Orientierungen eines 100 ns Pulses, im Zentrum des X-Band Spektrums und an der g_{XX} , g_{YY} und g_{ZZ} Position des W-Band Spektrums. Regionen starker Anregung sind rot, die nichtangeregten Regionen blau eingezeichnet. Die Orientungsselektion hängt von der Auflösung des Spektrums, also im Fall eines durch den g -Tensor verbreiterten Spektrums vom Magnetfeld und von der Pulslänge [24] ab.

2.5.4 Gepulstes 'Davies'-ENDOR bei 95 GHz/145 MHz

Um Hyperfeinkopplungen zu bestimmen, wurden Experimente entwickelt, bei denen man die NMR-Übergänge über ein EPR-Experiment ermittelt, wodurch die hohe Empfindlichkeit der EPR auf das NMR-Experiment übertragen wird. Wird sowohl die Resonanzbedingung für ein Elektron als auch für einen Kern erfüllt, spricht man von Doppelresonanz, *Electron Nuclear Double Resonance* (ENDOR) [44]. Kapitel 12 in [24] enthält einen Überblick über die wichtigsten gepulsten ENDOR-Experimente.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die von Davies [45] entwickelte und nach ihm benannte Pulssequenz verwendet. Abbildung 2.4 zeigt die Wirkung einer 'Davies'-ENDOR-Pulssequenz auf ein Spinsystem, das durch die Elektron-Zeeman-Wech-

selwirkung und eine Hyperfeinkopplung zwischen dem Elektron und einem Kern aufgespalten ist. Es ergibt sich die in Abbildung 2.4 a) dargestellte Ausgangssituation des Spinsystem. Mit einem selektiven π -Puls wird die Polarisation *eines* Elektronenspinübergangs invertiert. Das ist nur mit Pulsen möglich, deren Anregungsbandbreite kleiner ist als die Differenz zwischen ω_{13} und ω_{24} . Als Folge des

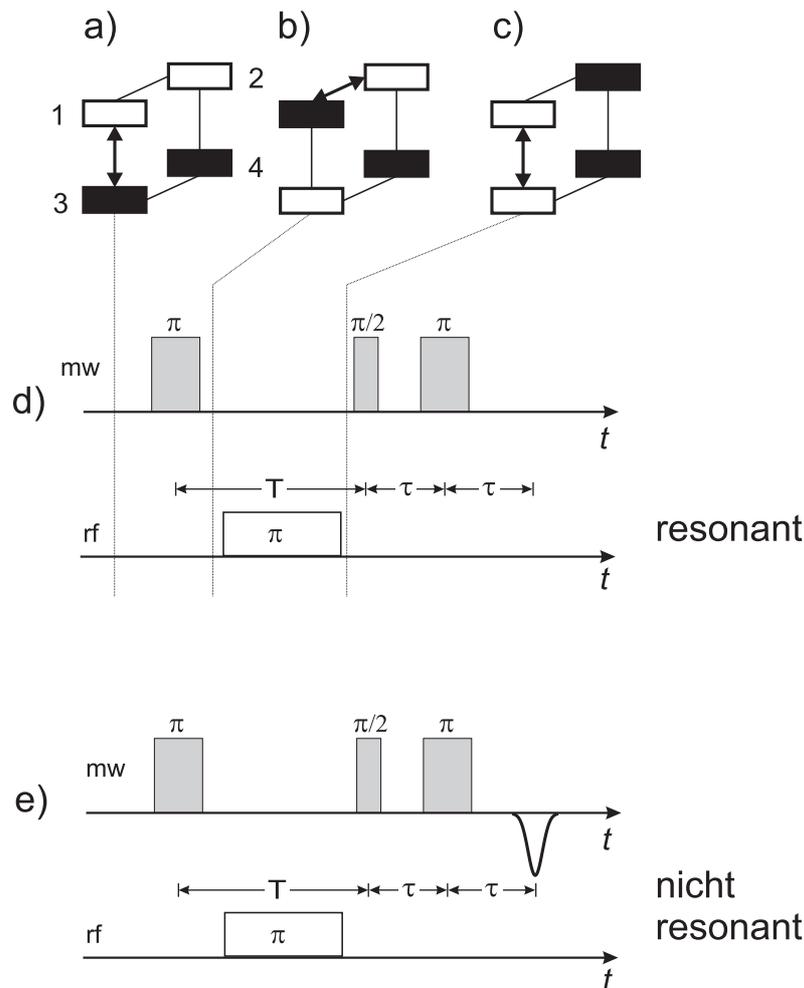


Abbildung 2.4: Wirkung einer 'Davies'-ENDOR-Pulssequenz auf die Besetzung der Energieniveaus eines mit einem Kern wechselwirkenden Elektrons. Von a) nach c) ist die Besetzung der Energieniveaus zu verschiedenen Zeiten der Pulssequenz dargestellt: a) Spinsystem vor einem Mikrowellen π -Puls, b) Polarisationstransfer durch einen Radiofrequenzpuls, c) Polarisation vor der $\pi/2$ - π -Mikrowellenpulssequenz zur Detektion, d) Wirkung eines resonanten Radiofrequenzpulses, e) Wirkung eines *nicht* resonanten Radiofrequenzpulses. Entspricht die Radiofrequenz der Übergangsfrequenz ω_{12} oder ω_{34} , verschwindet das Elektronenspinecho.

selektiven π -Pulses sind die beiden Elektronenspinübergänge mit negativem Vorzeichen polarisiert. Strahlt man wieder bei der Frequenz ω_{13} einen $\pi/2$ -Puls und nach einer Zeit τ einen π -Puls ein, so erhält man nach der Pulsseparationszeit τ ein negatives Echo (Abb. 2.4 d)). Der 'Davies'-ENDOR-Effekt wird dadurch erreicht, dass zwischen dem ersten π -Puls und dem $\pi/2$ -Puls ein Radiofrequenz-Puls eingestrahlt wird, der entweder die Besetzung zwischen den Niveaus 1 und 2 (Abb. 2.4 b)) oder zwischen den Niveaus 3 und 4 invertiert. Nach dieser Inversion verschwindet das Echo nach der $\pi/2 - \pi$ -Pulssequenz (Abb. 2.4 c) und e)). Die Gültigkeit dieser vereinfachten Beschreibung des Experiments hängt davon ab, ob der Radiofrequenzpuls so kurz gewählt werden kann, dass die Relaxionszeiten zwischen den Energieniveaus vernachlässigt werden können. Es gilt:

$$T_{1e} > T_{RF}, T_{1N} > T_{RF}, T_{2e} > \tau \quad (2.39)$$

Im Experiment nimmt man ENDOR-Spektren bei einer festen Position im EPR-Spektrum auf und variiert die Frequenz des eingestrahlten RF-Pulses. Die dadurch erzielte Veränderung der Echoamplitude wird als Spektrum über der Radiofrequenzachse aufgetragen. Im ENDOR-Spektrum überlagern sich häufig die Resonanzlinien unterschiedlicher Kerne und unterschiedlicher Orientierungen des Moleküls, wodurch eine Zuordnung der ENDOR-Linien erschwert wird. Diese Überlagerung lässt sich durch Hochfeld-ENDOR teilweise aufheben. Erhöht man das angelegte Feld, werden die Spektren unterschiedlicher Kerne auf Grund ihrer unterschiedlichen Larmorfrequenzen voneinander getrennt. Außerdem können die Richtungen von Hyperfeinkopplungen durch orientierungsselektive Hochfeld-Messungen an bestimmten Molekülorientierungen untersucht werden (siehe Abbildung 2.3).

