

CIDNP als Werkzeug zur Untersuchung biologischer Radikalstrukturen

Im Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereichte Dissertation

vorgelegt von

Talea Köchling

aus Delmenhorst



Institut für Experimentalphysik der Freien Universität Berlin

2011

Erster Gutachter: Prof. Dr. Hans-Martin Vieth

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Robert Bittl

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2011

Kurzfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss der Umgebung eines Radikalzentrums auf die gebildete Radikalstruktur, den Reaktionsmechanismus und den Reaktionsweg in Peptiden zu analysieren.

Zur Untersuchung kurzlebiger Radikale bietet die NMR mit dem Effekt der chemisch induzierten, dynamischen Kernspinpolarisation (CIDNP) eine geeignete spektroskopische Methode. Nach dem Durchlaufen einer Radikalpaarreaktion wird dabei das Auftreten eines vom thermischen Gleichgewicht abweichenden Polarisationsmusters und dessen Abhängigkeit von den Radikalparametern der vorliegenden Reaktion ausgenutzt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Anwendungsgebiet der CIDNP durch die Einführung einer Methode erweitert werden, mit welcher es (unter sehr allgemein gehaltenen Bedingungen) möglich ist, Hyperfeinkopplungskonstanten der primär gebildeten Radikale zu bestimmen. Auf Grund der Proportionalität des CIDNP-Signals eines Kernes zur Hyperfeinkopplung desselben ist es somit leicht möglich, Verhältnisse von Hyperfeinkopplungen und darüber hinaus bei Kenntnis eines Kopplungswertes des Radikalpartners absolute Kopplungen zu bestimmen. Die theoretischen Überlegungen und methodischen Voraussetzungen dazu werden vorgestellt und experimentell bestätigt. Dabei hat sich herausgestellt, dass Untersuchungen der Zeitabhängigkeit der CIDNP-Signale essentiell sind, um die primäre Radikalpaarreaktion von später einsetzenden Folgereaktionen zu trennen. Durch Kombination dieser Methode mit Messungen der Magnetfeldabhängigkeit des CIDNP-Signals ist es erstmals möglich, Informationen über die magnetischen Parameter (Hyperfeinkopplungskonstanten und g -Faktoren) der an der Primärreaktion beteiligten Radikale allein mittels NMR-Methoden zu ermitteln. Außerdem können durch Analyse der gesamten Zeitabhängigkeit Reaktionswege und Reaktionsraten bestimmt werden.

Hier wird eine systematische Studie vorgestellt, in der freie Aminosäuren und einfache Dipeptide mit Thioethergruppen unter nahezu physiologischen Bedingungen untersucht und miteinander verglichen werden. Dabei werden verschiedene Kombinationen der Residuen Glycin, Methionin und S-Methyl-Cystein verwendet, wobei deren Stellung zueinander (*cis*- bzw. *trans*-Konformere) variiert wird. In diesem Zusammenhang ist es einerseits möglich, den Einfluss der Veränderung des Abstandes zwischen Schwefelatom und Aminosäuregruppe bzw. Peptidrückgrat zu ermitteln. Andererseits wird die Auswirkung des Peptidrückgrates und benachbarter Residuen auf das beobachtete CIDNP-Signal analysiert. Trotz des gleichen Reaktionsmechanismus werden unterschiedliche Radikaltypen gebildet, da sich das zunächst entstehende schwefelzentrierte Kationradikal abhängig von der Umgebung durch Bildung einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit Hilfe freier Elektronenpaare benachbarter Atome stabilisiert. Die auffälligen Differenzen in den beobachteten Radikalstrukturen und Reaktionsraten werden diskutiert und die Implikationen dieser Ergebnisse für zukünftige Untersuchungen an Peptiden und Proteinen beurteilt.

Abstract

This work focuses on how radical structures and pathways of radical reactions are influenced by structurally changing the surroundings of the radical center. Therefore, radicals of free amino acids and peptides containing a thioether group are investigated.

By applying NMR spectroscopy to photoreactions it is possible to acquire structural information of radical intermediates which are often too short lived to be directly detected by ESR, and reaction pathways. This method is known as chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP). Typically, formation of a radical pair originating from a photo-excited dye and a quencher molecule gives rise to polarization of the NMR spectrum. Using a pulsed version of this experiment, time resolved measurements with microsecond resolution are conducted allowing differentiation between geminate and bulk processes and thus extracting reaction pathways and rate constants. This in combination with the magnetic field dependence of CIDNP allows determining magnetic resonance parameters (hyperfine coupling constants and g-factor) of the elusive radicals.

Using a new methodological approach, we demonstrate the possibility of extracting hyperfine couplings of the geminate pairs directly from the CIDNP spectrum recorded directly after the laser flash for quite general conditions. Taking into account, that the CIDNP intensity is proportional to the hyperfine coupling of the corresponding nucleus, ratios of hyperfine couplings in a radical can be obtained immediately. Furthermore we show that absolute values and signs can be determined, when the couplings of one of the radical partners are known. The theoretical ideas and methodical requirements as well as the experimental proof are presented. For the first time the hyperfine coupling constants and g-factors were extracted using CIDNP results only.

It is well known for sulfur-centered radical cations that they tend to stabilize themselves by forming a three electron bond between sulfur and neighbouring atoms with lone electron pairs. This should induce differences in reaction pathways and radical structures depending on the proximity of the sulfur atom. This work will present CIDNP results of a systematic study comparing the thioether-group containing amino acids methionine and methionine and peptides containing these acids with various co-residues (methionine, methionine and glycine) in aqueous solution at ambient conditions. In this context methionine and methionine differ in the sulfur-backbone-distance. First, the impact of this displacement will be shown. Second, for studying the influence of geometric factors, measurements are performed on cyclic dipeptide structures in different enantiomeric forms. Here, we focus particularly on the influences of the backbone and interactions with other side chains. By comparing these systems, distinct differences in reaction kinetics and radical structure are discussed based on the formation of a three electron bond between sulfur and its neighbouring atoms. Furthermore, primary and secondary reaction steps are differentiated and their rate constants are determined.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie	5
2.1	Theoretische Grundlagen der CIDNP	5
2.1.1	Der Radikalpaarmechanismus im Hochfeld	6
2.1.2	Quantitative Beschreibung	8
2.1.3	Netto- und Multiplett-CIDNP	13
2.1.4	CIDNP-Feldabhängigkeit	16
2.1.5	Überlegung zur Hyperfeinkopplungsbestimmung mittels CIDNP	18
2.1.6	Zeitliche Entwicklung des CIDNP-Signals (CIDNP-Kinetik)	21
2.2	Relaxationsprozesse	25
3	Experimentelles	29
3.1	Das zeitauflösende Spektrometer	29
3.1.1	Experimenteller Aufbau	29
3.1.2	Messabläufe	30
3.1.3	Auswertung	32
3.2	Das feldzyklisierende Spektrometer	34
3.2.1	Experimenteller Aufbau	35
3.2.2	Messabläufe	38
3.2.3	Auswertung	41
3.3	Verwendete Programme	42
3.4	Probenpräparation	43
4	Bestimmung von Hyperfeinkopplungskonstanten	45
4.1	Überprüfung der Methode	45
4.2	Anwendung der Methode auf weitere Systeme	49
4.2.1	Das kationische Tryptophanradikal	49
4.2.2	Das Ketylradikal von 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon	52
4.2.3	Das Radikalanion von 4-Carboxybenzophenon	55
4.2.4	Das Ketylradikal von 4-Carboxybenzophenon	60
4.3	Zusammenfassung	64

5	Untersuchungen zum Einfluss der chemischen Struktur auf den CIDNP-Effekt	67
5.1	Effekte der Kettenlänge	71
5.1.1	CIDNP-Messung an S-Methyl-L-Cystein in neutraler Lösung	72
5.1.2	CIDNP-Messung an S-Methyl-L-Cystein in basischer Lösung	83
5.1.3	Beurteilung und Diskussion der Ergebnisse	89
5.2	Einfluss des Peptidrückgrates	91
5.2.1	Zyklisches Glycin-Methionin (GM)	92
5.2.2	Zyklisches Glycin-S-Methylcystein (GC)	107
5.2.3	Vergleich der zyklischen Dipeptide Glycin-Methionin und Glycin-S-Methylcystein	115
5.3	Wechselwirkung benachbarter CIDNP-aktiver Seitenketten	117
5.3.1	Zyklische Peptide in trans-Konformation	118
5.3.2	Zyklische Peptide in cis-Konformation	125
5.4	CIDNP-Intensitäten als Funktion struktureller Parameter	137
5.4.1	Diskussion bekannter Einflüsse auf die CIDNP-Intensität	138
5.4.2	Ergebnisse für Substanzen mit gleicher Radikalstruktur	140
5.4.3	Ergebnisse bei unterschiedlicher Radikalstruktur	144
5.4.4	Abschließende Bemerkungen	146
5.5	Zusammenfassung	147
6	Zusammenfassung und Ausblick	153
	Literaturverzeichnis	157

Abbildungsverzeichnis

2.1	Reaktionsschema einer Radikalpaarreaktion mit CIDNP-Bildung	6
2.2	Energieniveaus der Singulett- und Triplettzustände eines Radikalpaares in Abhängigkeit des Abstandes r der Radikalpartner	7
2.3	Netto-CIDNP-Effekt	14
2.4	CIDNP-Multipletteffekt	15
2.5	Veranschaulichung der Gültigkeit der Proportionalität zwischen der CIDNP- Signalamplitude und der Hyperfeinkopplung	20
2.6	Einfluss der paramagnetischen Relaxationszeit der Kernspins T_1^{para} auf die CIDNP-Kinetik	22
2.7	Einfluss der Rate des degenerierten Elektronenaustausches auf die CIDNP- Kinetik	23
2.8	Typische Relaxationsdispersion	27
3.1	Aufbau des zeitauflösenden Spektrometers	30
3.2	Messablauf der zeitaufgelösten CIDNP-Experimente	31
3.3	Aufbau des feldzyklisierenden Spektrometers	36
3.4	Verlauf der Magnetfeldstärke und des Feldgradienten in Abhängigkeit von der Probenposition	37
3.5	Ablauf der Messung der CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit	39
3.6	Ablauf der zeitaufgelösten CIDNP-Experimente am feldzyklisierenden Spek- trometer	40
4.1	Struktur von L-Tyrosin und Benzophenon	46
4.2	NMR- und CIDNP-Spektrum von Tyr mit BP	47
4.3	Korrelation zwischen den CIDNP-Intensitäten aus der Photoreaktion von Tyr und BP und den entsprechenden Hyperfeinkopplungskonstanten	48
4.4	Struktur von L-Tryptophan und 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon	49
4.5	NMR- und CIDNP-Spektrum von Trp mit TCBP bei pH 8	50
4.6	Bestimmung der absoluten Hyperfeinkopplung von $\text{Trp}^{\bullet+}$	51
4.7	Struktur von L-Tyrosin und 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon	52
4.8	NMR- und CIDNP-Spektrum von Tyr mit TCBP bei pH 7,3	54
4.9	Bestimmung der absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten von TCBPH^{\bullet}	54

4.10	Korrelation zwischen den CIDNP-Intensitäten aus der Photoreaktion von Tyr und TCBP und den Hyperfeinkopplungskonstanten des anionischen TCBP-Radikals	55
4.11	Struktur von L-Tryptophan und 4-Carboxybenzophenon	56
4.12	NMR- und CIDNP-Spektrum von Trp mit 4CBP bei pH 7,8	56
4.13	Bestimmung der absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten von 4CBP ^{•-}	57
4.14	Korrelation zwischen den relativen CIDNP-Intensitäten aus der Reaktion von S-Methyl-L-Cystein mit 4CBP und der Hyperfeinkopplungskonstanten aus der Photoreaktion von Trp mit 4CBP	59
4.15	Magnetfeldabhängigkeit der γ -Protonen von Cys(Me) aus der Reaktion mit 4CBP und mit TCBP	60
4.16	Struktur von L-Tyrosin und 4-Carboxybenzophenon	61
4.17	Korrelation zwischen den CIDNP-Intensitäten von 4CBP aus der Photoreaktion von Tyr mit 4CBP und den Hyperfeinkopplungskonstanten des anionischen 4CBP-Radikals	61
4.18	NMR- und CIDNP-Spektrum von Tyr mit 4CBP bei pH 7,2	62
4.19	Bestimmung der absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten von 4CBP ^{H•}	63
5.1	Struktur der zyklischen Dipeptide	69
5.2	Struktur der Farbstoffe 4CBP und AQS	71
5.3	Struktur von S-Methyl-L-Cystein und Methionin	72
5.4	NMR-Spektrum von Cys(Me)	73
5.5	CIDNP-Spektrum von Cys(Me) in neutraler Lösung	74
5.6	CIDNP-Spektrum von Cys(Me) 100 μ s nach der Laseranregung bei pH 7	76
5.7	CIDNP-Kinetik von Cys(Me) bei pH 7	77
5.8	CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit von Cys(Me) bei pH 7	77
5.9	Bestimmung der Hyperfeinkopplungskonstanten von Cys(Me) ^{•+}	78
5.10	Radikalstruktur von Cys(Me) ^{+•}	80
5.11	CIDNP-Spektrum 100 μ s nach der Laseranregung bei pH 7 mit Zuordnung der Nebenproduktlinien	81
5.12	Radikalpaar- und Folgereaktion von Cys(Me) mit 4CBP bei pH 7	82
5.13	CIDNP-Spektren von Cys(Me) in basischen Lösungen	83
5.14	CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit von Cys(Me) in basischer Lösung	85
5.15	Netto- und Multiplett-CIDNP-Effekt von Cys(Me) bei pH 12	86
5.16	CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit von Vinylamin	86
5.17	Radikalpaar- und Folgereaktion von Cys(Me) bei pH 11,9	87
5.18	Struktur der zyklischen Peptide GM und GC	92
5.19	NMR-Spektrum von GM	93
5.20	CIDNP-Spektrum von GM mit 4CBP und AQS	94
5.21	CIDNP-Feldabhängigkeit von GM	95

5.22	Radikalstruktur von $GM^{+\bullet}$	96
5.23	CIDNP-Spektrum von GM 0,5 μ s und 100 μ s nach der Laseranregung	97
5.24	CIDNP-Kinetik von GM	97
5.25	CIDNP-Spektrum 100 μ s nach Laseranregung und CIDNP-Kinetiken aus der Reaktion mit GM	99
5.26	NMR-Spektren von GM bei unterschiedlichen pH-Werten	101
5.27	CIDNP-Spektren von GM bei pH 12,5	102
5.28	pH-Abhängigkeit der CIDNP-Kinetik von GM	103
5.29	NMR-Spektrum von GC	108
5.30	CIDNP-Spektrum von GC	109
5.31	CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit von GC	110
5.32	Radikalstruktur von $GC^{+\bullet}$	112
5.33	CIDNP-Spektrum 100 μ s nach der Laseranregung und CIDNP-Kinetik von GC	113
5.34	Vergleich der CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit von GM und GC	115
5.35	Vergleich der CIDNP-Kinetiken von GM und GC	116
5.36	Struktur der Transpeptide	118
5.37	NMR-Spektrum der Transpeptide	120
5.38	CIDNP-Spektrum und CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit der Transpeptide	121
5.39	Vergleich der CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit der Transpeptide mit GM und GC	122
5.40	Radikalstrukturen der Transpeptide	123
5.41	CIDNP-Kinetik von MM-trans	124
5.42	Strukturen der Cispeptide	125
5.43	NMR-Spektrum der Cispeptide	127
5.44	CIDNP-Spektrum und CIDNP-Feldabhängigkeit der Cispeptide	129
5.45	Radikalstrukturen der Cispeptide	132
5.46	CIDNP-Kinetiken der Cispeptide	133
5.47	Vergleich der CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit von MC-trans und MC-cis	136
5.48	Vergleich der CIDNP-Kinetiken von MM-trans, MM-cis und MC-cis	136
5.49	Vergleich der absoluten CIDNP-Intensität in den zyklischen Dipeptiden	139
5.50	Struktur des zyklischen Peptides LC	142
5.51	CIDNP-Spektrum von LC mit 4CBP	143
5.52	Vergleich der absoluten CIDNP-Intensität der Cys(Me)-Seitenkette.	143

Kapitel 1

Einleitung

Kenntnisse über die Funktionsweisen biochemisch relevanter Makromoleküle sind der Schlüssel zum Verständnis und zur Kontrolle einer Vielzahl von Prozessen von höchster Relevanz, angefangen bei der Photosynthese bis hin zu Krankheiten oder ganz allgemein dem Vorgang des Alterns des Menschen. Ein entscheidender Schritt zum Verständnis dieser Prozesse ist dabei die Analyse interner Reaktionsprozesse und ihrer Steuerung auf molekularer Ebene. Dabei hat sich herausgestellt, dass für eine große Anzahl molekularbiologischer Wirkungsmechanismen ein inter- bzw. intramolekularer Elektronentransfer essentiell ist. In diesen Reaktionen entstehen zeitlich nicht stabile (transiente) Radikale oder Radikalpaare, welchen aufgrund ihrer hohen Reaktivität oft eine Schlüsselfunktion für nachfolgende biochemische Prozesse zukommt. Beispiele für derartige Prozesse unter Beteiligung radikalischer Zustände reichen von der Photosynthese über die photochemische DNA-Reparatur [1] bis hin zur Alterung [2, 3] und (nach wie vor unheilbaren) Krankheiten wie Alzheimer [4, 5] und Parkinson [6]. Die genaue spektroskopische Untersuchung radikalischer Zustände in biologischen Prozessen lässt wesentliche Rückschlüsse auf die Funktionsweise des jeweiligen Systems zu und ist deshalb von zentraler Bedeutung für dessen detailliertes Verständnis und damit essentiell zur Lösung drängender Fragen von globaler Relevanz.

Die oft kurze Lebensdauer der Radikale und Radikalpaare schränkt die Wahl der möglichen Methoden ihrer Untersuchung ein. Häufig werden optische Methoden (z.B. Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie) oder Elektronenspinresonanz (ESR) zur Beobachtung von Radikalen verwendet. Allerdings können erstere dabei zwar mit einer Zeitauflösung im Femtosekundenbereich arbeiten, aber nur zwischen verschiedenen elektronischen Anregungszuständen unterscheiden, wodurch optische Spektroskopie für einige Prozesse (z.B. degenerierten Elektronenaustausch) blind ist. ESR dagegen besitzt den Vorteil der direkten Detektion des Radikalzustandes, wird aber häufig dadurch eingeschränkt, dass kurzlebige oder flüchtige Radikale auf Grund ihrer geringen Lebensdauer und Signalstärke nicht in flüssiger Lösung vermessen werden können. Daher muss oft auf tiefe, also unphysiologische Temperaturen ausgewichen werden.

Kernspinresonanz (NMR¹) hat sich in den letzten Jahrzehnten bereits als eine Stan-

¹engl. Nuclear Magnetic Resonanz

Standardmethode der makromolekularen Strukturbestimmung etabliert. Mit der chemisch induzierten, dynamischen Kernspinpolarisation (CIDNP²) existiert darüber hinaus jedoch auch eine Möglichkeit der spezifischen Untersuchung auftretender Radikalpaarreaktionen. Dabei wird eine dynamische, nicht thermische Polarisation auf denjenigen Kernen erzeugt, die in der Nähe des ungepaarten Elektrons liegen und somit eine von Null verschiedene Hyperfeinwechselwirkung mit dem radikalischen Elektron besitzen. Somit lassen sich zwei Nachteile der NMR-Spektroskopie vermeiden. Erstens kann die niedrige Sensitivität in der NMR auf Grund des niedrigen Besetzungszahlunterschiedes der Energieniveaus, wodurch üblicherweise entweder eine große Anzahl Moleküle oder lange Akkumulationszeiten zur Messung benötigt werden, durch die Bildung einer dynamischen Polarisation erhöht werden. Zweitens wird die Überlagerung der vielen Linien bei Makromolekülen, die eine Zuordnung der Linien in den NMR-Spektren erschwert, durch die hohe Selektivität der Polarisation auf Kerne mit nicht verschwindender Hyperfeinkopplung deutlich reduziert. Demzufolge ergibt sich die Möglichkeit, mittels CIDNP Informationen über Radikalstrukturen, Reaktionsmechanismen und Reaktionspfade zu erhalten.

Obwohl die NMR eine vergleichsweise langsame Methode zur Detektion darstellt, ist es durch die indirekte Betrachtung mittels CIDNP möglich, die Information des paramagnetischen Zwischenzustandes noch lange nach seinem Zerfall bis in die Sekundenzeitskala im diamagnetischen Produkt zu speichern. Hierbei muss die Lebensdauer des Radikalpaarzustandes in der Größenordnung der inversen Hyperfeinwechselwirkung liegen. In diesem Zusammenhang lassen sich häufig auch für die ESR zu kurzlebige Radikale in Lösung untersuchen. Ein weiterer Vorteil der CIDNP besteht in der hohen spektralen Auflösung und damit in der Möglichkeit der direkten Zuordnung auftretender Hyperfeinkopplungskonstanten zu den einzelnen Kernpositionen.

In der vorliegenden Arbeit werden Photo-CIDNP-Untersuchungen an Reaktionssystemen mit frei diffundierenden Radikalpaaren durchgeführt. Hierbei wird eine photoaktive Substanz durch Lichteinwirkung angeregt und im Anschluss daran durch einen Elektronen- oder Wasserstoffatomtransfer zwischen diesen angeregten Farbstoffmolekülen und einem sogenannten Löscher³ unter Bildung eines Radikalpaares in den Grundzustand überführt („gelöscht“).

Bisher war CIDNP als Methode zur Vermessung von Radikaleigenschaften allerdings nur eingeschränkt nutzbar, da zwischen Polarisation und magnetischen Parametern im Allgemeinen ein komplexer Zusammenhang besteht. In Kapitel 5 dieser Arbeit wird nun gezeigt, dass die Polarisation unter häufig erfüllten Bedingungen direkt proportional zur Hyperfeinkopplung des entsprechenden Kernes ist. Damit ist es möglich, aus dem CIDNP-Spektrum absolute Hyperfeinkopplungskonstanten zu bestimmen, wenn die magnetischen Eigenschaften des Radikalpartners bekannt sind. Dabei ist eine zeitauflösende Methode es-

²engl. Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarisation

³engl. quencher

sentiell, um das Signal der primären Radikalpaarreaktion von Folgeprozessen zu separieren und damit den Einfluss letzterer auf die Polarisierung zu unterdrücken. Wird die in dieser Arbeit vorgestellte Methode mit der Untersuchung der Abhängigkeit des CIDNP-Signals von der Stärke des externen Magnetfeldes verbunden, so können die magnetischen Parameter (Hyperfeinkopplungskonstanten und g -Faktoren) und damit die Struktur der an der Reaktion beteiligten Radikale allein mittels CIDNP charakterisiert werden. Darüber hinaus ist es möglich, aus der zeitlichen Entwicklung des CIDNP-Signals Informationen über den Reaktionsverlauf und auftretende Folgereaktion zu extrahieren.

Ein Ziel der CIDNP-Entwicklung ist es, diese spektroskopische Methode auch für große Biomoleküle, z.B. Proteine, zu verwenden. Hierzu gibt es zwei Ansätze. Erstens können Radikalprozesse untersucht und auftauchende Radikaltypen charakterisiert sowie Reaktionsverläufe analysiert werden. Zweitens soll die dynamische Kernspinpolarisation durch ihre hohe Selektivität zur Aufklärung von Oberflächenstrukturen, die für die Wechselwirkung mit anderen Molekülen besonders wichtig sind, beitragen. Die Idee ist hierbei, dass nur an der Oberfläche vorkommende Seitenketten in der Lage sind, mit dem Farbstoff zu reagieren und Polarisierung zu erzeugen [7]. Das CIDNP-Signal hängt dann direkt von der Erreichbarkeit der Seitenkette für den Farbstoff ab, wodurch eine Sonde zum Abtasten der Oberflächengeometrie zur Verfügung steht. Für beide Anwendungen ist es aber zunächst nötig, in systematischen Studien zu prüfen, welche Einflüsse Änderungen in der Molekülstruktur und damit Änderungen der direkten Umgebung des Radikalzentrums auf die Kernspinpolarisation haben. Erst im Anschluss daran können auftauchende Unterschiede durch mögliche chemische oder biologische Effekte begründet werden.

Die hier vorgestellte Arbeit leistet einen Beitrag zur Beantwortung dieser Fragen, indem der Einfluss der Umgebung eines Radikalzentrums auf die Radikalstrukturen, Reaktionsmechanismen, Reaktionspfade und CIDNP-Intensitäten an einfachen Modellsystemen untersucht wird. Hierbei werden Aminosäuren mit Thioethergruppen in freier Form sowie als Residuum in Dipeptiden betrachtet.

Zu Beginn der Arbeit (Kapitel 2) werden die theoretischen Hintergründe vorgestellt. Dabei wird als erstes die Polarisationsbildung in einer Photoreaktion mit frei diffundierenden Radikalpaaren anhand des Radikalpaarmechanismus qualitativ wie quantitativ erklärt. Ferner werden sowohl die Abhängigkeit der Polarisierung von der Magnetfeldstärke als auch die theoretischen Überlegungen, unter welchen Bedingungen die Polarisierung proportional zur Hyperfeinkopplungskonstanten des entsprechenden Kernes ist, diskutiert. Gegen Ende des Kapitels werden der typische zeitliche Verlauf des CIDNP-Signals, übliche Folgeprozesse und typische Relaxationseffekte sowie der zu Grunde liegende Relaxationsprozess vorgestellt.

Die experimentelle Methodik zur Untersuchung von CIDNP-Prozessen wird in Kapitel 3 zusammengestellt. Dabei werden zwei unterschiedliche Spektrometern vorgestellt, an denen alle Messungen dieser Arbeit (zeitaufgelöst sowie magnetfeldabhängig) durchgeführt

wurden. Für beide Spektrometer werden der Aufbau, die Messabläufe sowie die Auswertung der Messdaten diskutiert. Ferner werden die Probenpräparation sowie die benutzten Auswerte- und Simulationsprogramme vorgestellt.

Nachdem bereits in Kapitel 2 die theoretischen Grundlagen eingeführt wurden, wird an einem Testsystem mit sehr genau bekannten Hyperfeinkopplungskonstanten die Proportionalität der CIDNP-Signalstärke zu den entsprechenden Kopplungen überprüft (Kapitel 4). Dabei wurden Messungen an verschiedenen experimentellen Aufbauten durchgeführt. Danach wird diese neu eingeführte Methode zur Bestimmung absoluter Hyperfeinkopplungen an verschiedenen Radikalen angewendet. Eine Diskussion der Vor- und Nachteile gegenüber alternativen Ansätzen beschließt das Kapitel.

Kapitel 5 widmet sich der Fragestellung, welchen Einfluss die Umgebung des Radikalzentrums auf die Radikalstruktur, den Reaktionsmechanismus, den Reaktionsweg und die absoluten CIDNP-Intensitäten besitzt. Dabei werden Aminosäuren mit Thioethergruppen in freier Form sowie eingebaut in Dipeptiden untersucht. Es wird erörtert, welche Unterschiede sich bei einer Veränderung der Kettenlängen zwischen Schwefelatom und Aminosäuregruppe bzw. Peptidrückgrat ergeben und welche Einflüsse das Peptidrückgrat sowie benachbarte Seitenketten haben. Daneben wird die Art des zweiten Residuums sowie die Stellung der beiden Residuen zueinander variiert. Am Ende der Arbeit erfolgt eine Zusammenfassung der vorgestellten Ergebnisse sowie eine Diskussion der Eignung der CIDNP-Spektroskopie in Bezug auf biologische und biochemische Radikalpaarprozesse und eine Beurteilung dieser Methode in Hinblick auf die Bestimmung von Oberflächenstrukturen.

Kapitel 2

Theorie

2.1 Theoretische Grundlagen der CIDNP

Das Auftauchen ungewöhnlicher Intensitätsmuster von NMR- oder ESR-Linien bei Systemen, die kurz zuvor eine chemische Reaktion durchlaufen haben, kann durch chemisch induzierte dynamische Kernspinpolarisation (CIDNP¹) und durch chemisch induzierte dynamische Elektronenspinpolarisation (CIDEP²) beschrieben werden. Dabei wird in Folge einer Radikalpaarreaktion eine nichtthermische Kernspinpolarisation der diamagnetischen Produkte bzw. eine Elektronenspinpolarisation der Radikale erzeugt. Besonders eindrucksvoll ist dabei die Existenz emissiver Linien, die durch Überbevölkerung des höheren Energieniveaus eines Spinzustandpaares, welches am NMR- oder ESR-Übergang teilnimmt, entstehen.

CIDEP wurde erstmals 1963 von Fessenden und Schuler [8] und CIDNP einige Jahre später (1967) zeitgleich sowohl von Bargon und Fischer [9] als auch von Ward und Lawler [10] entdeckt. Es dauerte noch zwei weitere Jahre, bis schließlich Closs [11, 12] und unabhängig davon Kaptain und Ostenhoff [13, 14] eine brauchbare Erklärung für diesen Effekt in Form des Radikalpaarmechanismus (Abk.: RPM) lieferten. Die Grundidee des Radikalpaarmechanismus ist die spinselektive Rekombination des Radikalpaares, da während chemischer Reaktionen der Spin erhalten bleibt. Weiterhin muss die elektronische Singulett-Triplett-Umwandlung den Engpass für die Rekombination der beiden Radikalpartner darstellen. Die Rate dieser Übergänge hängt von magnetischen Wechselwirkungen innerhalb der Radikale (Zeeman- und Hyperfeinwechselwirkung³) ab. Hierbei spielt die Trennung der Radikalpartner durch Diffusion und das erneute Aufeinandertreffen der Radikale auf einer Zeitskala, in der sich die schwachen magnetischen Wechselwirkungen auswirken können, eine wichtige Rolle.

In den folgenden Unterkapiteln wird zunächst der Radikalpaarmechanismus qualitativ

¹engl. Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarisation

²engl. Chemically Induced Dynamic Electron Polarisation

³Wenn die Übergangsrate von der Kernspinkonfiguration abhängt, ergeben sich unterschiedliche Reaktivitäten der Rekombination verschiedener Spinkonfigurationen. Dies führt dann zu den ungewöhnlichen Intensitätsmustern in der NMR.

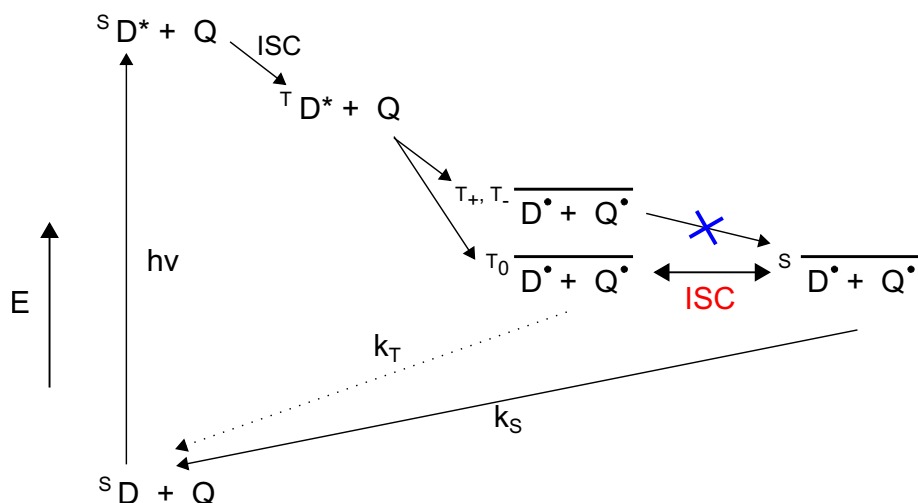


Abbildung 2.1: Allgemeines Reaktionsschema einer Radikalpaarreaktion mit CIDNP-Bildung für einen Triplettvorläuferzustand in niederviskosen Lösungen und hohem Magnetfeld. Für Details wird auf den Text verwiesen (ISC Abkürzung für „Inter-System-Crossing“).

(2.1.1) sowie quantitativ (2.1.2) erklärt. In 2.1.6 wird auf den Einfluss des zeitlichen Verlaufs der CIDNP-Amplitude sowie in 2.1.4 auf die Abhängigkeit des CIDNP-Signals vom magnetischen Feld eingegangen. Weiterhin werden theoretische Überlegungen zur Bestimmung absoluter Hyperfeinkopplungskonstanten mit Hilfe von CIDNP in 2.1.5 vorgestellt. Generell wird nur auf den Mechanismus in hohen magnetischen Feldern eingegangen, da nur dieser in der vorgestellten Arbeit von Relevanz sind.

2.1.1 Der Radikalpaarmechanismus im Hochfeld

Das Radikalpaar⁴ kann auf unterschiedliche Weise (z.B. durch thermische Anregung) gebildet werden. In dieser Arbeit wird das Radikalpaar durch eine Photoreaktion erzeugt; im Folgenden wird eine typische photochemisch angeregte Radikalreaktion in Lösung kurz vorgestellt (siehe Abbildung 2.1).

Ein in Lösung befindlicher Farbstoff im Singulettgrundzustand $^S D$ wird durch einen Laserpuls in den angeregten Zustand $^S D^*$ angeregt. Häufig ändert der Farbstoff durch die Spinbahnwechselwirkung danach seine Multiplizität und geht über in den angeregten Triplettzustand $^T D^*$. Wie in Abbildung 2.1 gezeigt wird, reagiert der Farbstoff mit einem anderen Molekül Q und bildet durch Elektronen- oder Wasserstoffatomtransfer (bzw. Elektronen- und Protonentransfer) ein Radikalpaar. Diese Spinseparation findet dabei auf einer Zeitskala, in der sich die aus dem Vorläuferzustand übernommene Symmetrie nicht ändert, statt (in den in dieser Arbeit betrachteten Fällen befindet sich das Radikalpaar

⁴Zwei nicht abgepaarte Elektronenspins, die in zwei räumlich getrennten Orbitalen liegen aber miteinander wechselwirken

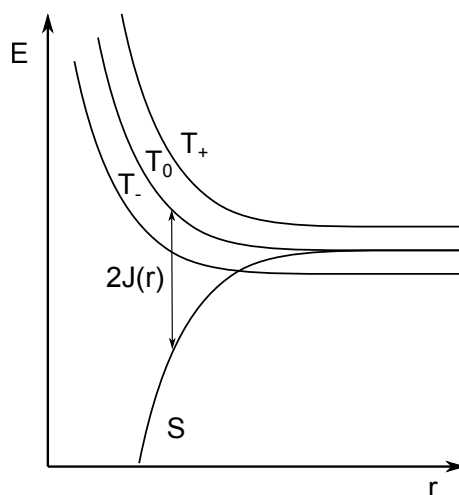


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Energieniveaus der Singulett- und Triplettzustände eines Radikalpaares in Abhängigkeit des Abstandes r der Radikalpartner zueinander. Dabei ist das Singulett- $|S\rangle$ vom Triplettniveau $|T_0\rangle$ durch die Austauschwechselwirkung $2J(r)$ getrennt [15].

nach der Bildung im elektronischen Triplettzustand). Weil der Spin während chemischer Reaktionen erhalten bleibt, ist die Reaktion vom nichtreaktivem Triplett- in den reaktiven Singulettzustand verboten bzw. findet sehr viel langsamer statt ($k_S \gg k_T$). Folglich diffundieren die beiden Radikale auseinander, wobei die elektronische Austauschwechselwirkung $J(r)$ mit dem Abstand der Radikale r exponentiell abnimmt und für große Abstände vernachlässigt werden kann (siehe Abbildung 2.2). Unter diesen Bedingungen sind der elektronische Singulett $|S\rangle$ und der Triplettzustand $|T_0\rangle$ energetisch äquivalent und Oszillationen zwischen diesen beiden Niveaus auf Grund des Unterschiedes in der Zeemanwechselwirkung sowie auf Grund der Hyperfeinwechselwirkung der beiden Radikale werden möglich. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich die im selben Prozess gebildeten Radikalpaare (Geminate-Paare⁵) wiedertreffen, ist groß, so lange sie sich „im Käfig der Lösung“ befinden. Der „Käfig“ wird als die Region definiert, in der die Reaktion mit dem ursprünglichen Radikalpartner (Geminate-Paare) sehr wahrscheinlich und Reaktionen mit Radikalen aus anderen Radikalpaaren (Escape-Paare⁶) im Vergleich dazu sehr unwahrscheinlich ist. Die im „Käfig“ gebildeten diamagnetischen Produkte entstehen nur bei direktem Kontakt und werden „Käfigprodukte“, welche vorwiegend durch die Reaktion der Geminate-Paare entstanden sind, genannt. Da die Übergangsrate direkt von der Hyperfeinkopplung abhängt, ist die Wahrscheinlichkeit für bestimmte Kernspinprojektionen höher beim erneuten Zusammentreffen im Singulett zu sein als für die anderen. Erstere sind bevorzugt in den diamagnetischen Grundzustand zurückzureagieren, und bilden somit die Geminate-Produkte.

⁵eng. geminate pairs; Übersetzung: Zwillingspaare

⁶engl. escape pairs; Übersetzung: „Paare, die dem im selben Prozess gebildeten Radikalpartner ausgewichen sind“

Im Gegensatz dazu verbleiben die Radikale mit anderer Kernspinkonfiguration im radikalischen Zustand, da sie wieder auseinander diffundieren. Sie bilden damit die sogenannten Escape-Paare. Diese können später mit anderen Radikalpartnern paarweise reagieren, aber zuvor sind sie möglicherweise an unterschiedlichen Reaktionen beteiligt, wie z.B. Fragmentierung oder degeneriertem Elektronenaustausch (vgl. Kapitel 2.1.6).

Eine wichtige Eigenschaft des Radikalpaarmechanismus im Hochfeld, der auch $S-T_0$ -Mechanismus⁷ genannt wird, besteht darin, dass die Kernspins nur in unterschiedliche Kanäle sortiert werden. Dabei entsteht keine absolute Polarisation. Das bedeutet folglich, dass die Polarisation der Geminate-Produkte genau entgegengesetzt der Polarisation der Escape-Paare sein muss. Im Folgenden wird der Begriff Geminate-Paare auch für die diamagnetischen Produkte verwendet, wenn keine Verwechslungsgefahr besteht.

Auch soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in dieser Arbeit der Fall vorliegt, dass Übergänge zwischen dem Singulett $|S\rangle$ und den Triplett-niveaus $|T_{\pm}\rangle$ verboten sind (vgl. Abbildung 2.1 und 2.2). Auch wenn in Abbildung 2.2 eine Niveaureuzung des Singulett $|S\rangle$ mit dem Triplett $|T_{-}\rangle$ stattfindet, ist üblicherweise kein Übergang zwischen diesen Niveaus möglich, weil die Radikalpaarseparation normalerweise sehr schnell verläuft.

Zusammenfassend müssen folgende Bedingungen erfüllt sein, um CIDNP in hohen magnetischen Feldern zu erhalten:

1. Das Radikalpaar muss in einem definierten elektronischen Spinzustand rekombinieren.
2. Eine Voraussetzung ist, dass unterschiedliche Reaktionswege oder zumindest unterschiedliche Reaktionswahrscheinlichkeiten für elektronische Singulett- und Triplett-paare existieren.
3. Die Rate der Übergänge zwischen $|S\rangle$ - und $|T_0\rangle$ -Zustand hängt von der Kernspinorientierung bezüglich des äußeren Magnetfeldes ab und führt damit zur Sortierung der Kernspinprojektionen in diamagnetische Produkte und Radikale. Dabei ist das Auseinanderdiffundieren der Radikalpartner ein notwendiger Schritt, damit die Energieniveaus der elektronischen Zustände $|S\rangle$ und $|T_0\rangle$ entartet sind und Übergänge auf Grund der Hyperfeinwechselwirkung möglich werden.

2.1.2 Quantitative Beschreibung

Die Liouvillegleichung

Der Radikalpaarmechanismus wird im allgemeinsten Fall durch die stochastische Liouvillegleichung mit der positionsabhängigen Elektronenspindichtematrix $\rho(\mathbf{r}, t)$ beschrieben:

⁷da Übergänge zwischen dem Singulett $|S\rangle$ und nur einem der drei Triplett-niveaus, nämlich $|T_0\rangle$ stattfinden

$$\frac{d\rho(\mathbf{r}, t)}{dt} = (H^* + K^* + L^* + R^*) \cdot \rho(\mathbf{r}, t) \quad (2.1)$$

wobei H^* , K^* , L^* und R^* sogenannte Superoperatoren im Liouvillerraum sind. H^* beschreibt die kohärente Elektronenspinbewegung und ist dabei wie folgt mit dem Spinhamiltonoperator $\widehat{\mathcal{H}}_{Spin}$ verknüpft:

$$H^* \rho = -i [\widehat{\mathcal{H}}_{Spin}, \rho] \quad (2.2)$$

Der Reaktionsoperator K^* beschreibt die chemischen Reaktionen, die in und aus dem Radikalpaarzustand führen. Häufig existieren unterschiedliche Reaktionswahrscheinlichkeiten für den Singulett- oder Triplettzustand des Elektronenpaares. L^* beschreibt die molekulare Dynamik des Radikalpaares und wird im Falle von Flüssigkeiten Diffusionsoperator genannt. Der Relaxationsoperator R^* beschreibt die Relaxation der Elektronenspins ins thermische Gleichgewicht (für organische Radikale typischerweise in der Größenordnung einiger μs). Dieser Anteil kann in den hier betrachteten Fällen vernachlässigt werden, da er auf der relevanten Zeitskala der Polarisationsbildung der Geminate-Paare ($< 10\text{ ns}$; siehe Abschnitt 2.1.6) üblicherweise keine Rolle spielt.

Gleichung 2.1 ist eine semiklassische Gleichung für niederviskose Lösungen, in der die Spinentwicklung quantenmechanisch und die molekulare Bewegung durch klassische Rattengleichungen beschrieben ist. Deshalb hat $\rho(\mathbf{r}, t)$ sowohl die Eigenschaften einer Spindichtematrix als auch der klassischen Dichteverteilung zur Diffusionsbeschreibung. Weiterreichende Erklärungen findet man in [16].

Es gibt keine geschlossene analytische Lösung für die Gleichung 2.1, weil der Spin- nicht vom Diffusionsanteil getrennt werden kann.

Spinentwicklung im S - T_0 -Mechanismus

Die Spinentwicklung wird durch den folgenden Spinhamiltonoperator in Einheiten von \hbar beschrieben:

$$\begin{aligned} \widehat{\mathcal{H}}_{Spin} = & -J(r) \left(2\widehat{\mathbf{S}}_1 \cdot \widehat{\mathbf{S}}_2 + \frac{1}{2} \right) + \mu_B \left(g_1\widehat{\mathbf{S}}_1 + g_2\widehat{\mathbf{S}}_2 \right) \mathbf{B} + \\ & + \sum_k a_k \widehat{\mathbf{I}}_{1k} \widehat{\mathbf{S}}_{1k} + \sum_n a_n \widehat{\mathbf{I}}_{2n} \widehat{\mathbf{S}}_{2n} \end{aligned} \quad (2.3)$$

Der erste Term stellt die Austauschwechselwirkung dar, welche die elektronischen Singulett- und Triplettzustände mit $2J(r) = E_S - E_T$ aufspaltet. Dabei sind $\widehat{\mathbf{S}}_1$ und $\widehat{\mathbf{S}}_2$ die Elektronenspins von Radikal 1 und Radikal 2 und r der Abstand zwischen den Radikalen. Wie in Abbildung 2.2 zu sehen ist, ist $J(r)$ üblicherweise nur kurzreichweitig und kann mit folgender Funktion angenähert werden:

$$J(r) = J_0 e^{-\lambda(r-r_0)} \quad (2.4)$$

Der nächste Term beschreibt die magnetische Wechselwirkung der Elektronenspins mit dem äußeren Magnetfeld \mathbf{B} (Zeemanwechselwirkung), wobei μ_B das Bohrsche Magneton und g_1 bzw. g_2 die g -Faktoren der beiden Radikale sind. Schließlich stellen die beiden letzten Terme die magnetische Wechselwirkung der Kernspins mit dem vom jeweiligen Elektronenspin erzeugten Magnetfeld (Hyperfeinwechselwirkung) dar. Dabei sind a_k und $\hat{\mathbf{I}}_{1\mathbf{k}}$ die Hyperfeinkopplungskonstante und der Spin des k -ten Kerns in Radikal 1 und a_n und $\hat{\mathbf{I}}_{2\mathbf{n}}$ die entsprechenden Größen in Radikal 2. Zu beachten ist, dass in Gleichung 2.3 für die g -Faktoren und Hyperfeinkopplungen nur die isotropen Werte eingehen. Die anisotropen Terme können vernachlässigt werden, weil sich diese durch die schnelle Bewegung der Moleküle im Vergleich zur langsamen Oszillation zwischen dem elektronischen Singulett- und Triplettzustand ausmitteln (Vergleiche Tabelle 2.1 auf Seite 22).

Für hohe Magnetfelder (ca. $B > 0,1$ T) können die nichtsäkularen Terme in Gleichung 2.3 weggelassen werden. Dies führt bei einem in z -Richtung angelegten äußeren Magnetfeld zu:

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}_{Spin} = & -J(r) \left(2\hat{\mathbf{S}}_1 \cdot \hat{\mathbf{S}}_2 + \frac{1}{2} \right) + \mu_B (g_1\hat{S}_{1z} + g_2\hat{S}_{2z}) B_z + \\ & + \sum_k a_k \hat{I}_{1kz} \hat{S}_{1kz} + \sum_n a_n \hat{I}_{2nz} \hat{S}_{2nz} \end{aligned} \quad (2.5)$$

Die Entwicklung der Spins im Radikalpaarzustand kann durch die zeitabhängige Schrödingergleichung beschrieben werden:

$$\hat{\mathcal{H}}_{spin} |\psi(t)\rangle = i \frac{\partial |\psi\rangle}{\partial t} \quad (2.6)$$

Zur Beschreibung eines Systems mit zwei korrelierten Elektronenspins bieten sich die üblichen Zeemaneigenzustände an:

$$\begin{aligned} |T_+\rangle &= |\uparrow\uparrow\rangle \\ |T_0\rangle &= \sqrt{\frac{1}{2}} (|\uparrow\downarrow\rangle + |\downarrow\uparrow\rangle) \\ |T_-\rangle &= |\downarrow\downarrow\rangle \\ |S\rangle &= \sqrt{\frac{1}{2}} (|\uparrow\downarrow\rangle - |\downarrow\uparrow\rangle) \end{aligned} \quad (2.7)$$

In hohen Magnetfeldern kann der Spinanteil ψ der Gesamtwellenfunktion als Produkt der Spinwellenfunktion der Elektronen (siehe Gleichungen 2.7) mit derjenigen der Kerne ϕ_{ab}^N , welche die Kernspinzustände des Radikals 1 mit a bzw. des Radikals 2 mit b bezeichnet, geschrieben werden. Somit ergibt sich als Lösung für Gleichung 2.6:

$$|\psi(t)\rangle = (C_S(t) |S\rangle + C_T(t) |T_0\rangle) \phi_{ab}^N \quad (2.8)$$

Hierbei wurden die elektronischen Triplettzustände $|T_+\rangle$ und $|T_-\rangle$ zur Konstruktion des verschränkten Zustands weggelassen, da sie in starken Magnetfeldern energetisch so weit

von $|S\rangle$ und $|T_0\rangle$ separiert sind, dass keine Übergänge zwischen diesen möglich sind. Das Übergangsmatrixelement Q_{ab} zwischen dem Singulett- $|S\rangle$ und dem Triplettzustand $|T_0\rangle$ ist

$$Q_{ab} = \langle S | \langle \phi_{ab}^N | \hat{H} | T_0 \rangle | \phi_{ab}^N \rangle = \sqrt{(\omega_{ab}^2 + J^2)} \quad (2.9)$$

$$(2.10)$$

mit

$$\begin{aligned} \omega_{ab} &= \frac{1}{2} \mu_B B (g_1 - g_2) + \frac{1}{2} \sum_k a_k M_{1k}^a - \frac{1}{2} \sum_n a_n M_{2n}^b \\ &= \frac{1}{2} \mu_B \Delta g B + \frac{1}{2} \sum_k a_k M_{1k}^a - \frac{1}{2} \sum_n a_n M_{2n}^b \end{aligned} \quad (2.11)$$

Hierbei ist M_{1k}^a die magnetische Quantenzahl des k-ten Kernspins des Radikals 1 und M_{2n}^b die entsprechende Größe für Radikal 2. Solange $J > \omega_{ab}$ gilt, ist die Übergangsfrequenz zwar groß, aber es finden kaum Übergänge statt, da für große J die Singulett- und Triplett-radikalpaarzustände gute Eigenzustände des Systems darstellen und somit im verschränkten Zwischenzustand die Beimischung der zweiten Multiplizität gering ausfällt. Oszillationen zwischen den Zuständen können erst auftreten, wenn die beiden Radikale sich so weit voneinander entfernt haben⁸, dass $|J(r)| \leq |\omega_{ab}|$ gilt und sich damit die durch ω_{ab} beschriebenen Kohärenzen entwickeln können. Da die Radikale sehr schnell auseinander diffundieren und $J(r)$ kurzreichweitig ist (vergleiche Gleichung 2.4), gilt die meiste Zeit für das Radikalpaar $|J(r)| \ll |\omega_{ab}|$ und damit kann für die weitere Betrachtung $J = 0$ angenommen werden. Dies erfolgt in Übereinstimmung mit [17]. Dabei wird in Anlehnung an die Literatur die Hyperfeinkopplungskonstante a im weiteren Verlauf der Arbeit in Magnetfeldeinheiten angegeben. Genauso wird mit dem ersten Term der Übergangsrate in Gleichung 2.11 verfahren.

Mit $J = 0$ und der Annahme, dass das Radikalpaar im Triplettzustand erzeugt wurde, ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Radikalpaar sich nach der Zeit t im Singulettzustand befindet:

$$|C_S(t)|^2 = \frac{1}{3} \sin^2 \omega_{ab} t \quad (2.12)$$

Dabei wurde berücksichtigt, dass sich im thermischen Mittel nur $\frac{1}{3}$ der Triplets im Zustand $|T_0\rangle$ befindet.

Erwähnenswert ist hierbei noch, dass ω_{ab} auch geschrieben werden kann als

$$\omega_{ab} = \omega_{1a} - \omega_{2b} \quad \text{mit} \quad \omega_{im} = \frac{1}{2} \mu_B g_i + \frac{1}{2} \sum_k a_k M_{ik}^m$$

Es sind ω_{1a} und ω_{2b} die Larmorfrequenzen, mit denen die individuellen Elektronenspins der Radikale 1 und 2 im effektiven Magnetfeld (äußeres Feld und Hyperfeinfeld) präzedieren. In

⁸da erst dann die Energieniveaus entartet sind (vgl. Abbildung 2.2)

Folge dessen hängt die Präzession und damit auch die Übergangswahrscheinlichkeit in den Singulettzustand direkt von der magnetischen Quantenzahl und somit von der Orientierung des Kernspins im äußeren Magnetfeld ab.

Berücksichtigung der Diffusion

Wie schon Kapitel 2.1.1 verdeutlicht, ist die Trennung der Radikalpartner durch Diffusion (und damit Ausschaltung der Austauschwechselwirkung $J \rightarrow 0$) essentiell für den S - T_0 -Mechanismus und damit für die Bildung von CIDNP. Weiterhin hängt die Polarisationsbildung der Geminat-Paare von einem erneuten Zusammentreffen der beiden Radikalpaare im Singulettzustand ab. Hierbei soll noch darauf hingewiesen werden, dass theoretisch bei der Entstehung des Radikalpaares auch gleich eine Reaktion bzw. Rückreaktion in den Grundzustand stattfinden kann (z.B. bei einem Singulettvorläuferzustand). In diesem Fall bildet sich keine Polarisation, da sich kein verschränkter Zustand ausbilden konnte, der Übergänge induziert hätte. Für die CIDNP-Bildung sind nur die Paare von Bedeutung, die nach dem Auseinanderdiffundieren erneut zusammentreffen und reagieren. Die gesamte Reaktionswahrscheinlichkeit eines Radikalpaares ergibt sich damit zu

$$P_R = \lambda_S \int_0^\infty P_S(t) P_E(t) dt \quad (2.13)$$

wobei λ die Reaktionswahrscheinlichkeit ist, dass zwei im Singulettzustand befindliche Radikalpartner reagieren, P_S die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden Radikale sich im Singulett treffen und $P_E dt$ die Wahrscheinlichkeit, dass sich beide Radikalpartner im Zeitfenster dt wiedertreffen. P_S ist direkt aus der Spinhamiltonfunktion berechenbar und entspricht damit $|C_S(t)|^2$ (siehe Gleichung 2.12). P_E kann mit unterschiedlichen Diffusionsmodellen und Randbedingungen berechnet werden (z.B. [17, 18]). Die Diffusion und damit auch die Wahl für das Modell für P_E hängen aber folglich stark vom System ab, in dem sich die zu untersuchende Substanz befindet. Für niederviskose Lösungen ergibt das nach Adrian benannte Diffusionsmodell folgende Abhängigkeit des Übergangsmatrixelementes von ω_{ab} und Diffusionszeit τ_{dz} (charakteristische Zeit um den Lösemittelkäfig zu verlassen⁹) [17]:

$$P_R \propto \sqrt{|\omega_{ab}| \tau_{dz}} \quad \text{und} \quad N_{ab} \propto P_R \propto \sqrt{|\omega_{ab}| \tau_{dz}} \quad (2.14)$$

wobei sich folglich für die Bevölkerung N_{ab} des jeweiligen Energieniveaus dieselbe Abhängigkeit ergibt. Das Modell ist nur unter der Annahme gültig, dass die Diffusionszeit kurz gegenüber der Übergangsfrequenz ist $\left[(|\omega_{ab}| \tau_{dz})^{\frac{1}{2}} \ll 1 \right]$ [17]. Die Polarisation lässt sich dann aus der Besetzungszahldifferenz der beiden Kernspinkonfigurationen (ab) und (a'b') berechnen [17]:

$$P_{ab} \propto N_{ab} - N_{a'b'} \propto \sqrt{|\omega_{ab}| \tau_{dz}} - \sqrt{|\omega_{a'b'}| \tau_{dz}} \quad (2.15)$$

⁹in niederviskosen Lösungen bei Raumtemperatur: $\tau_{dz} \approx 10^{-12}$ bis 10^{-11} s

Die Übergangsmatrixelemente ω_{ab} und $\omega_{a'b'}$ unterscheiden sich auf Grund der unterschiedlichen Orientierung des Kernspins zum äußeren Magnetfeld und führen somit zu den ungewöhnlichen Linienintensitäten im NMR-Spektrum.

2.1.3 Netto- und Multiplett-CIDNP

CIDNP beruht auf dem Effekt, dass verschiedene Kernspinorientierungen in unterschiedliche Kanäle sortiert werden. Abhängig von der Art der Sortierung spricht man von Netto- oder Multiplett-CIDNP. Bei Netto-CIDNP trennt man die Kernspins mit der Kernspinprojektion parallel zum äußeren Feld, sogenannte $|\uparrow\rangle$ oder α , von denen mit der Kernspinprojektion antiparallel zum äußeren Feld, sogenannte $|\downarrow\rangle$ oder β . Der Multipletteffekt ergibt sich aus der Verknüpfung zwischen Spinorientierungen, z. B. sind die Zustände $\alpha\alpha$ und $\beta\beta$ in einem Kanal und $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ in einem anderen Kanal bevorzugt.

Netto-CIDNP-Effekt

Der Netto-CIDNP-Effekt tritt auf, wenn die g -Faktoren der Radikale unterschiedlich sind ($\Delta g \neq 0$). Im einfachsten Fall hat Radikal 1 einen Kern mit Spin $\frac{1}{2}$ und Radikal 2 besitzt keine Kernspins. Das Radikalpaar soll im elektronischen Triplettzustand gebildet worden sein und wir nehmen für die g -Faktordifferenz der beiden separierten Radikale $\Delta g > 0$ und für die Hyperfeinkopplung $a_1 > 0$ an. Außerdem wird von dem allgemeinen Fall ausgegangen, dass das Energieniveau des α -Zustands (mit der Magnetquantenzahl $M_1 = +\frac{1}{2}$) niedriger als das des β -Zustandes (mit der Magnetquantenzahl $M_1 = -\frac{1}{2}$) ist. Dann ergibt sich für die Übergangsrate aus Gleichung 2.11:

$$\omega_{\pm} = \frac{1}{2} \left(\mu_B \Delta g B \pm \frac{1}{2} a_1 \right) \quad (2.16)$$

Demnach ist die Übergangsrate für die Spins mit $M_1 = +\frac{1}{2}$ höher als für diejenigen mit $M_1 = -\frac{1}{2}$. Damit werden erstere bevorzugt in den Grundzustand zurückreagieren, während letztere im Triplettzustand verbleiben und später die Escape-Produkte bilden. Dies bedeutet für die Produkte aus den Geminate-Paaren, dass der α -Zustand stärker bevölkert ist und das CIDNP-Spektrum verstärkte Absorption (A-CIDNP) zeigt (siehe Abbildung 2.3). Weil keine Spins umgeklappt, sondern nur sortiert werden, zeigen die später reagierenden Escape-Produkte emissive Linien im CIDNP-Spektrum (E-CIDNP), wobei sich die Linien für Geminate- und Escape-Paare bei gleicher Produktbildung nach hinreichend langer Zeit aufheben müssten, wenn keine anderen Prozesse (z.B. Relaxation) stattfinden würden (siehe Abschnitt 2.1.6).

Ändert man das Vorzeichen der Hyperfeinkopplung zu $a_1 < 0$ oder der g -Faktordifferenz $\Delta g < 0$, wird sich das CIDNP-Muster ändern. Die Produkte der Geminate-Paare zeigen dann Emission und die der Escape-Paare verstärkte Absorption. Das gleiche gilt, wenn

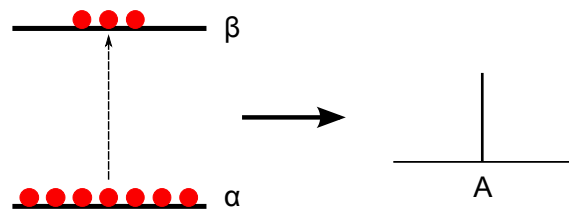


Abbildung 2.3: Erklärung des Netto-CIDNP-Effekts: Links: schematische Zeichnung der Populationsverteilung der Kernzustände der Geminat-Paare (mit folgenden Annahmen: Radikal 1 besitzt nur einen Spin- $\frac{1}{2}$ -Kern, Radikal 2 keinen, $\Delta g > 0$, $a_1 > 0$). Rechts: das resultierende CIDNP-Spektrum (hier verstärkte Absorption).

die Multiplizität des Vorläuferzustandes verändert, also das Radikalpaar im elektronischen Singulett gebildet wird. Diese qualitativen Vorhersagen wurden 1971 von Kaptein in seinen Regeln zusammengefasst [19]:

$$\Gamma_{NE}^i = \mu \cdot \epsilon \cdot \text{Sign}(\Delta g) \cdot \text{Sign}(a_i) = \pm 1 \quad (2.17)$$

Der Wert von Γ_{NE}^i sagt die Polarisationsphase für die Linie des i -ten Kernes von Radikal 1 voraus ($\Gamma_{NE}^i = +1$: verstärkte Absorption und $\Gamma_{NE}^i = -1$: Emission). Dabei gehen die Vorzeichen der Hyperfeinkopplung des i -ten Kernes $\text{Sign}(a_i)$ sowie des g -Faktorunterschiedes $\text{Sign}(\Delta g)$ ein. Im Ausdruck $\Delta g = g_1 - g_2$ bezieht sich der Index 1 immer auf das untersuchte Radikal mit dem Kern i und der Index 2 auf das Partnerradikal. Betrachtet man die NMR-Linien der Kerne des anderen Radikals, ist für diese der g -Faktorunterschied folglich immer invertiert, so dass sich das Polarisationsmuster bei gleichem Vorzeichen der Hyperfeinkopplung umkehrt. Die weiteren Symbole bezeichnen:

$$\mu = \begin{cases} + & \text{für Triplett-Vorläuferzustand} \\ - & \text{für Singulett-Vorläuferzustand} \end{cases}$$

$$\epsilon = \begin{cases} + & \text{Rekombination im Käfig} \\ - & \text{Rekombination der Escape-Produkte} \end{cases}$$

Zu beachten ist, dass der Netto-CIDNP-Effekt nur bei nichtverschwindenden a und Δg auftauchen kann. Letzteres resultiert aus der Tatsache, dass nur das Betragsquadrat der Übergangsfrequenz in die Polarisation eingeht und die Rekombination der Radikale in den Grundzustand für $a = 0$ unabhängig vom Kernspin ist.

Multipllett-CIDNP-Effekt

Für $\Delta g = 0$ kann es keine Nettopolarisation, aber dafür sogenannte Multipllettpolarisation geben. Diese kann nur in einem Multipllett auftauchen, das heißt, nur bei Kernen, die im

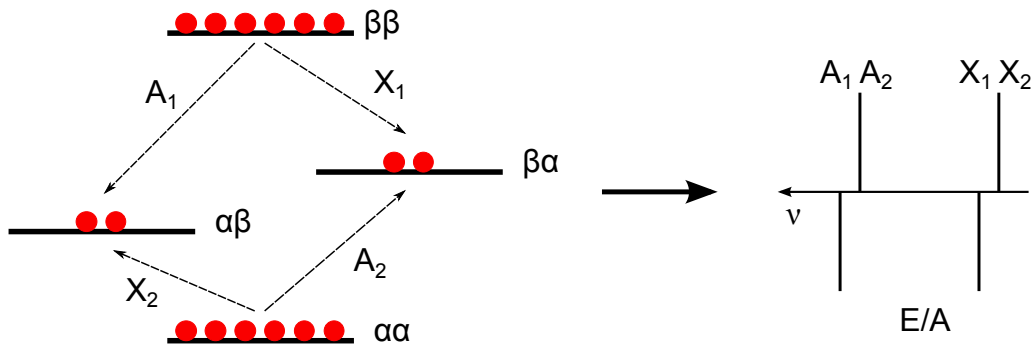


Abbildung 2.4: Erklärung des CIDNP-Multipletteffekts: Links: schematische Zeichnung der Populationsverteilung der Kernzustände der Geminat-Paare (mit folgenden Annahmen: Radikal 1 besitzt zwei Spin- $\frac{1}{2}$ -Kerne, Radikal 2 keine, $\Delta g > 0$, $a_1, a_2 > 0$, $j_{12} > 0$). Rechts: das resultierende CIDNP-Spektrum (hier Emissions-Absorptions-Muster in einem Multiplett).

Reaktionsprodukt durch die skalare Spin-Spin-Wechselwirkung (j -Kopplung) verbunden sind. Charakteristisch erscheinen im CIDNP-Spektrum sowohl emissive als auch absorptive Linien in einem Multiplett. Für diesen Fall wird Radikal 1 mit 2 Kernspins und Radikal 2 mit keinem betrachtet. Wir gehen erneut davon aus, dass das Radikalpaar im Tripletzustand gebildet wurde, die Hyperfeinkopplungen der Kerne positiv sind ($a_1, a_2 > 0$), die g -Faktoren beider Radikale gleich sind ($\Delta g = 0$) und die skalare Spin-Spin-Wechselwirkung positiv ist ($j_{12} > 0$). Dies führt zu dem in Abbildung 2.4 dargestellten Fall. Offensichtlich ist $|\omega_{ab}|$ gleich für die beiden antiparallelen Kernspinzustände $\alpha_1\beta_2$ und $\beta_1\alpha_2$ sowie für die beiden parallelen Kernspinzustände $\alpha_1\alpha_2$ und $\beta_1\beta_2$, wobei die antiparallelen Zustände kleiner als die parallelen sind. Aus Gleichung 2.11 erhält man folgende Übergangsraten:

$$|\omega_{\alpha_1\alpha_2}| = |\omega_{\beta_1\beta_2}| = \frac{a_{11} + a_{12}}{4} \quad (2.18)$$

$$|\omega_{\alpha_1\beta_2}| = |\omega_{\beta_1\alpha_2}| = \frac{a_{11} - a_{12}}{4} \quad (2.19)$$

Damit werden die Zustände mit parallelen Kernspins eher in den Grundzustand zurückreaktieren und die Käfigprodukte bilden, während die antiparallelen Paare im Tripletzustand verbleiben und später zu den Produkten der Escape-Paare reagieren. Mit dieser Besetzungsverteilung bildet sich, wie in Abbildung 2.4 zu sehen ist, im Multiplett ein Emissions-Absorptions-CIDNP-Muster (E/A-Muster). In den Produkten der Escape-Paare entsteht entsprechend ein A/E-Muster.

Bei einer Änderung des Vorzeichens einer der Hyperfeinkopplungen ($a_1 < 0$ oder $a_2 < 0$) oder der skalaren j -Kopplung dreht sich das Polarisationsmuster der Käfigprodukte von E/A in A/E um. Dasselbe gilt, wenn jedes Radikal einen Kernspin besitzt und diese beiden skalar gekoppelt sind. Diese Einflüsse werden in den Kapteinschen Regeln zusammengefasst [19]:

$$\Gamma_{MP}^{ij} = \mu \cdot \epsilon \cdot \text{Sign}(a_i) \cdot \text{Sign}(a_j) \cdot \text{Sign}(j_{ij}) \cdot \text{Sign}(\sigma_{ij}) = \pm 1 \quad (2.20)$$

Dabei bezeichnet $\text{Sign}(a_i)$ bzw. $\text{Sign}(a_j)$ das Vorzeichen der Hyperfeinkopplung des i -ten Kerns a_i bzw. des j -ten Kerns a_j sowie $\text{Sign}(j_{ij})$ das Vorzeichen der skalaren j -Kopplung j_{ij} zwischen den Kernen i und j . ϵ und μ wurden bereits für Gleichung 2.17 erklärt und für σ_{ij} gilt

$$\sigma_{ij} \begin{cases} + & \text{wenn Kerne } i \text{ und } j \text{ zum gleichen Radikal gehören} \\ - & \text{wenn Kerne } i \text{ und } j \text{ zu unterschiedlichen Radikalen gehören} \end{cases}$$

Dabei ist zu beachten, dass in einem Multiplett immer sowohl emissive als auch absorptive Linien auftauchen und die Gesamtpolarisation aller Linien in einem Multiplett immer Null ist.

Im Folgenden soll der Einfluss der j -Kopplung genauer betrachtet werden. Wenn die j -Kopplung klein gegenüber dem Unterschied der Zeemanwechselwirkungen mit dem externen Feld ist ($|\nu_1 - \nu_2| > j_{12}$ ¹⁰), besteht das NMR-Spektrum aus zwei Dublett-paaren, die aus den separaten NMR-Übergängen der Kernspins I_1 mit ν_1 und I_2 mit ν_2 entstehen, die jeweils durch die j -Kopplung zwischen diesen beiden Kernen noch einmal aufgespalten sind. Ohne die j -Kopplung wären die Übergangsfrequenzen X_1 und X_2 sowie A_1 und A_2 in Abbildung 2.4 gleich groß. Das NMR-Muster ergäbe kein Multiplett und kein CIDNP-Signal wäre sichtbar. Für $j_{12} > 0$ sind die Energieniveaus der parallelen Spinkonfigurationen ($\alpha\alpha$ und $\beta\beta$) im Verhältnis zu denen der antiparallelen Zustände angehoben. Dies führt dazu, dass die Übergänge von $\alpha\alpha$ (A_2, X_2) zu etwas kleineren Frequenzen und die von $\beta\beta$ (A_1, X_1) zu etwas größeren Frequenzen verschoben sind (siehe Abbildung 2.4). Bei negativem Vorzeichen der j -Kopplung dagegen werden die Energieniveaus der parallelen Spinkonfigurationen im Verhältnis zu denen der antiparallelen abgesenkt, so dass die Übergänge von $\alpha\alpha$ zu größeren Frequenzen (A_1, X_1) und von $\beta\beta$ zu kleineren Frequenzen (A_2, X_2) verschoben werden. Dadurch wird das Polarisationsmuster trotz gleichbleibendem CIDNP-Prozess umgedreht.

Der Multipletteffekt ist nicht nur bei $\Delta g = 0$ sichtbar. Es können auch Kombinationen der beiden beschriebenen Effekte auftreten, wobei der Multipletteffekt jedoch nur bei kleinem Δg gut beobachtet werden kann, da dieser bei großem Δg an Einfluss verliert.

2.1.4 CIDNP-Feldabhängigkeit

Bei der Betrachtung der Übergangsfrequenz aus Gleichung 2.11 fällt sofort die Abhängigkeit des Δg -Terms vom äußeren Magnetfeld B auf. Da die Effizienz der Spinsortierung aus dem Wettbewerb des Δg - und des Hyperfeinterms resultiert, hängt diese daher auch von B ab. Im einfachsten Fall eines einzelnen, nur an Radikal 1 koppelnden Kernspins ergibt sich ω_{\pm}

¹⁰ ν_i sind die jeweiligen Larmorfrequenzen und j_{ij} ist die skalare Spin-Spin-Kopplung

aus Gleichung 2.11 zu:

$$\omega_{\pm} = \frac{1}{2} \left(\Delta g \mu_B B \pm \frac{1}{2} a \right) \quad (2.21)$$

Dabei markiert der Index \pm die beiden auftretenden Kernspinprojektionen, + für α und – für β . Da in die Polarisation nur der Betrag der Übergangsfrequenz eingeht (siehe Gleichung 2.15), ist die Effizienz der Spinsortierung am größten, wenn für eine Kernspinkonfiguration keine Oszillation stattfindet. Daraus folgt die Bedingung:

$$2 \Delta g \mu_B B_{\max} = a \quad (2.22)$$

Für $\Delta g > 0$ und $a > 0$ folgt hieraus $\omega_- = 0$ und $\omega_+ = \frac{1}{2} (\Delta g \mu_B B + \frac{1}{2} a)$. Das bedeutet, dass die β -Kernspins nicht zwischen den Zuständen oszillieren und folglich im Triplettzustand verbleiben, während die α -Kernspins eine endliche Wahrscheinlichkeit besitzen in den Singulettzustand zu wechseln und damit in den Grundzustand zurückreagieren können. Das Magnetfeld des höchsten CIDNP-Signals, B_{\max} , hängt direkt vom Unterschied in den g -Faktoren Δg und der Hyperfeinkopplung a ab. Generell verschiebt (laut Gleichung 2.22) ein großes Δg das Maximum der Polarisation zu kleineren Magnetfeldern, während eine große Hyperfeinkopplung das Maximum zu größeren Feldern verschiebt. Damit lässt sich aus dem Polarisationsmaximum der Feldabhängigkeit entweder die Hyperfeinkopplung oder der Unterschied der g -Faktoren bestimmen. Beide Größen sind von entscheidender Bedeutung, da ein Radikal durch seinen g -Faktor, der in Molekülen vom Wert des freien Elektrons auf Grund der Spin-Bahn-Wechselwirkung abweicht, und seine Hyperfeinkopplungskonstanten, die ein Maß für die Spindichteverteilung des Elektrons darstellen, charakterisiert wird. Zur Modellierung wird das in Abschnitt 2.1.2 auf Seite 12 vorgestellte Adrianmodell [17] benutzt. Obwohl nur die Polarisation der Geminate-Paare berücksichtigt wird, erzielt die Modellrechnung eine hohe Übereinstimmung mit den experimentellen Resultaten.

Das Adrianmodell sowie die Überlegungen in den letzten Absätzen gelten nur für hohe Magnetfelder: $|\Delta g \mu_B B| \gg |a|$. Für kleinere Magnetfelder treten andere Polarisationsmechanismen auf. Anstelle des $S-T_0$ -Mechanismus tritt der $S-T_{\pm}$ -Mechanismus. Bei letzterem werden Übergänge erzeugt, bei denen durch Umklappen des Elektronenspins auch der Kernspin invertiert wird. Dies führt zu keiner Sortierung von Kernspins, sondern zur Entstehung von „echter“ Polarisation durch Umklappen der Kernspins, also einer Anreicherung derselben Kernspinprojektion im Grundzustand sowie im radikalischen Zustand. Da dieser Fall in der vorliegenden Arbeit nicht auftritt, wird der $S-T_{\pm}$ -Mechanismus oder Niederfeldmechanismus hier nur vollständigheitshalber erwähnt. Weiterführende Literatur findet man z. B. in [20].

2.1.5 Überlegung zur Hyperfeinkopplungsbestimmung mittels CIDNP

Wie in den Gleichungen 2.14 und 2.15 aus Kapitel 2.1.2 beschrieben wurde, hängen die Bevölkerung der Kernspinzustände sowie das CIDNP-Signal vom Übergangsmatrixelement ω_{ab} ab.

Im Allgemeinen kann Gleichung 2.15 nicht weiter vereinfacht werden. Im Folgenden werden jedoch Bedingungen vorgestellt, unter denen Vereinfachungen möglich sind. Beispielfhaft soll die Abhängigkeit der Polarisation des ersten Kerns von Radikal 1 von seiner Hyperfeinkopplung a_1 betrachtet werden. Gleichung 2.11 wird mit den magnetischen Quantenzahlen der Kernspins von Radikal 1 und 2 (M_{1k} und M_{2n}) umgeschrieben zu:

$$\omega_{ab}(M_{11}, \dots, M_{1k}; M_{21}, \dots, M_{2n}) = \frac{1}{2} (\delta + a_1 M_{11} + A_1) \quad (2.23)$$

Hierbei ist $\delta = \mu_B \Delta g B$ und A_1 enthält die Terme aller Hyperfeinkopplungen der Kerne mit Ausnahme des ersten:

$$A_1 = \sum_{k \neq 1} a_k M_{1k} - \sum_n a_n M_{2n} \quad (2.24)$$

Wenn nun $|a_1 M_{11}| \ll |\delta + A_1|$ gilt, dann lässt sich der Ausdruck für die Polarisation annähern als [21]:

$$\begin{aligned} P_1 &= C_0 \sum_{A_1} \left(\sqrt{|\delta + A_1 + \frac{a_1}{2}|} - \sqrt{|\delta + A_1 - \frac{a_1}{2}|} \right) \\ &\approx \frac{a_1}{2} C_0 \sum_{A_1} \frac{1}{\sqrt{|\delta + A_1|}} = C_1 a_1 \propto a_1 \end{aligned} \quad (2.25)$$

Wenn die Summe der anderen Hyperfeinkopplungen im Radikalpaar und der Unterschied in den Zeemanenergien sehr viel größer als die einzelne Hyperfeinkopplung a_1 ist, folgt daraus, dass die Polarisation (und damit die CIDNP-Amplitude) der betreffenden Kernlinie direkt proportional zu dieser einen Hyperfeinkopplung ist. Die Bedingung $|a_1 M_{11}| \ll |\delta + A_1|$ ist für die folgenden Fälle erfüllt:

1. Der Δg -Term ist viel größer als der Hyperfeinkopplungsterm [22].
2. Der Δg -Term ist klein, aber ein Kern mit einer Hyperfeinkopplung, deren Betrag viel größer als die der anderen ist, existiert. Dann gilt die Proportionalität allerdings nur für die restlichen Kerne.
3. Der Δg -Term ist zwar klein, aber eine große Anzahl N ähnlich großer Hyperfeinkopplungen liegt vor.

Während die Gültigkeit von Punkt 1 und 2 in Hinblick auf Gleichung 2.25 leicht ersichtlich ist, ist diese für Punkt 3 nicht sofort zu sehen. Allerdings ist dieser Fall von besonderer praktischer Relevanz, da in vielen Systemen eine große Anzahl ähnlich koppelnder Kernspins vorliegt. Zum Beweis der direkten Proportionalität $P_n \propto a_n$ unter diesen Voraussetzungen nehmen wir an, nur Radikal 1 besitze nicht verschwindende Hyperfeinkopplungen.

Ferner sollen diese statistisch verteilt zwischen $-a_{\max}$ und a_{\max} liegen. Unter dieser Bedingung ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine einzelne Hyperfeinkopplung größer ist als die effektive Hyperfeinkopplung der restlichen Kerne ($a_i > A_i$), sehr klein. Nach dem zentralen Grenzwertsatz sind die A_i aus Gleichung 2.24 normalverteilt und bilden eine Gaußkurve $f(A_i)$:

$$f(A_1) = \frac{1}{a_{\max}} \sqrt{\frac{3}{2\pi(N-1)}} \exp\left(-\frac{3A_i^2}{2(N-1)a_{\max}^2}\right) \quad (2.26)$$

Es existieren immer solche A_i , für die $|a_1 M_{11}| \ll |\delta + A_1|$ nicht gilt. Wenn das statistische Gewicht dieser „ungewollten Fälle“ klein genug ist, gilt aber trotzdem näherungsweise $P_i = C_i a_i$. Wenn die einzelnen Hyperfeinkopplungen a_k alle jeweils für den Betrag der Summe A_i (siehe Gleichung 2.24) vernachlässigbar sind, gilt sogar darüber hinaus $C_i = C$ für alle i . Dies ist dann gegeben, wenn viele Hyperfeinkopplungskonstanten in der gleichen Größenordnung liegen. Das Gewicht der „ungewollten Fälle“ erhält man durch Integration von Gleichung 2.26:

$$\begin{aligned} S &= \int_{-\delta - \frac{a_i}{2}}^{-\delta + \frac{a_i}{2}} f(A_i) dA_i \\ &\approx \frac{|a_i|}{a_{\max}} \sqrt{\frac{3}{2\pi(N-1)}} \exp\left(-\frac{3\delta^2}{2(N-1)a_{\max}^2}\right) \end{aligned} \quad (2.27)$$

Wenn die Bedingung $S \ll 1$ erfüllt ist, was von der Breite der Verteilung abhängt (siehe Abbildung 2.5), gilt die Proportionalität zwischen Hyperfeinkopplung und CIDNP-Signal. Die quadratische Abweichung von der Proportionalität ist durch S^2 gegeben. Unter der Annahme, dass a_i und a_{\max} in der gleichen Größenordnung liegen, gilt:

$$S^2(x, N) \approx \frac{3}{2\pi(N-1)} \exp\left(-\frac{3x^2}{N-1}\right) \quad (2.28)$$

mit $x = \frac{\delta}{a_{\max}}$. Die Abweichung sinkt exponentiell mit wachsendem x und insofern wachsendem Δg für konstante N . Aber auch bei $|x| < 1$ fällt S^2 mit $\frac{1}{N}$ ab, wodurch die Proportionalität bei einer großen Anzahl Kerne erhalten bleibt.

In Abbildung 2.5 ist die Verteilung der A_i für verschiedene N dargestellt. Zur Veranschaulichung wurde für $a_{\max} = 1$ mT ein typischer Hyperfeinkopplungswert und für $\delta = 0,5$ mT absichtlich ein sehr kleiner Wert¹¹ verwendet. Man erkennt deutlich, dass mit steigendem N die Kurven deutlich breiter und flacher werden. Die grau unterlegte Fläche zeigt die „unerwünschten Ereignisse“. Der Anteil dieser Fläche am gesamten Integral nimmt mit steigendem N deutlich ab. Während bei $N = 2$ die „unerwünschten Ereignisse“ noch ca. 47% der Gesamtfläche belegen, sind es bei $N = 10$ nur noch ca. 20%, was nur noch zu einer quadratischen Abweichung von ca. 5% führt und damit im Bereich des

¹¹entspricht bei $B = 7$ T einem $\Delta g \approx 7 \cdot 10^{-5}$

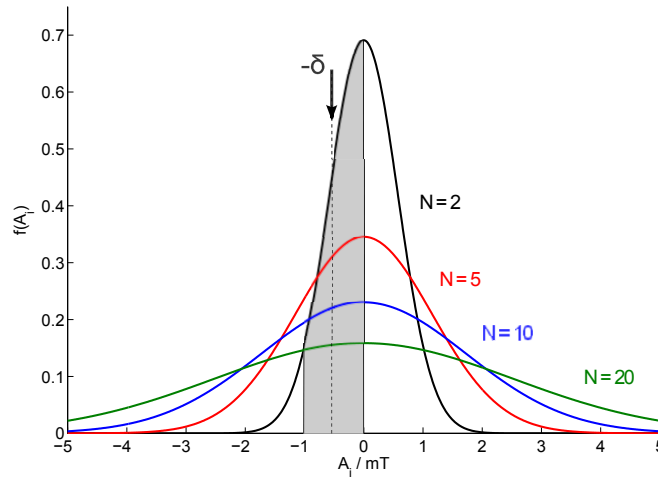


Abbildung 2.5: Veranschaulichung der Gültigkeit der Proportionalität zwischen der CIDNP-Signalamplitude und der Hyperfeinkopplung ($P_i = Ca_i$) in Abhängigkeit von der Anzahl N der Kerne im Radikal. Diese ist nicht gegeben bei der grau unterlegten Fläche, da hier Kernspin-konfigurationen vorliegen, für die $|a_1 M_{11}| \geq |\delta + A_1|$ gilt. Mit steigendem N wird die Verteilung breiter und der Einfluss der „unerwünschten Ereignisse“ nimmt ab. Parameter der Verteilung sind $a_{max} = 1 \text{ mT}$ und $\delta = 0,5 \text{ mT}$.

Messfehlers liegt. Da δ üblicherweise größer als die oben betrachteten $\delta = 0,5 \text{ mT}$ sein wird¹², verschiebt sich die grau unterlegte Kurve zusätzlich stärker in den Randbereich, was wiederum zu einem geringen Einfluss der „unerwünschten Ereignisse“ führt. Werden die Hyperfeinkopplungen des zweiten Radikalpartners auch noch berücksichtigt, so erhöht sich die Anzahl der Kerne N und die Genauigkeit der Proportionalität steigt. Bei Proportionalität zwischen der CIDNP-Amplitude und der entsprechenden Hyperfeinkopplung ist es somit möglich relative Hyperfeinkopplungswerte (Verhältnisse von Hyperfeinkopplungskonstanten) zu bestimmen.

Im Allgemeinen gilt die Proportionalitätsrelation auch für den Radikalpaarpartner, jedoch mit umgekehrtem Vorzeichen des Proportionalitätskoeffizienten ($P_j = -Cb_j$). Dies resultiert aus der Tatsache, dass die Polarisationsphase mit δ gemäß den Kapteinschen Regeln (Gleichung 2.17) ihr Vorzeichen ändert. Wie im Kapitel 2.1.3 in den Kapteinschen Regeln erläutert wurde, bezieht sich der Index 1 im Ausdruck $\delta = \mu_B B(g_1 - g_2)$ auf das betrachtete Radikal und der Index 2 auf das Partnerradikal. Wenn die absoluten Hyperfeinkopplungen eines der Radikalpartner bekannt sind, ist es damit möglich die CIDNP-Amplituden als Referenz zu benutzen um die CIDNP-Amplituden des Partners zu kalibrieren. Da der Betrag der Proportionalitätskonstanten $|C|$ für beide Radikale gleich sein muss, ist es dann möglich absolute Hyperfeinkopplungen des Partnerradikals durch

¹² $\Delta g \approx 5 \cdot 10^{-4}$ bis $5 \cdot 10^{-3} \Rightarrow \delta \approx 3 \text{ mT}$ bis 30 mT bei $B = 7 \text{ T}$

CIDNP-Amplitudenvergleich bei Invertierung des Vorzeichens von C zu bestimmen.

2.1.6 Zeitliche Entwicklung des CIDNP-Signals (CIDNP-Kinetik)

Da CIDNP eine nichtthermische Polarisation ist, ist der Effekt zeitabhängig. Die genaue Form dieser Abhängigkeit soll im Folgenden erläutert werden.

Das Radikalpaar bildet sich unter Standardbedingungen¹³ bei einer Konzentration des Lösers¹⁴ im mM-Bereich ca. 10^{-8} s nach der Laseranregung. Die Rekombination mit dem gleichen Radikalpartner ist in niederviskosen Lösungen nach ca. weiteren 10^{-8} s abgeschlossen (Geminate-Paare). Danach rekombinieren nur noch Partner aus unterschiedlichen Radikalpaaren (freie Radikalpaare). Diese können abhängig von der gebildeten Radikalpaarkonzentration (typischerweise 10^{-5} M) eine Lebensdauer von bis zu 10^{-4} s haben. Da für freie Radikalpaare (sog. F-Paare) die Wahrscheinlichkeit, dass sie beim Aufeinandertreffen im elektronischen Triplettzustand sind, $3/4$ beträgt, bildet sich ein neues korreliertes Elektronenpaar. Dadurch sind wiederum Oszillationen zwischen Triplett- und Singulett-niveaus abhängig von der Hyperfeinwechselwirkung möglich. Dieser Prozess entspricht dem bei Geminate-Paaren vorgestellten Radikalpaarmechanismus (siehe Abschnitt 2.1.1 und 2.1.2), tritt aber zu einem späteren Zeitpunkt auf. Da für die Polarisationsbildung der Geminate-Paare und F-Paare derselbe Mechanismus zu Grunde liegt, ist das daraus resultierende CIDNP-Signalmuster für beide Fälle identisch. In Tabelle 2.1 sind die Zeitskalen der für CIDNP relevanten Prozesse aufgeführt.

Unter einer CIDNP-Kinetik wird im Folgenden die Abhängigkeit der CIDNP-Polarisation von der Wartezeit nach der Laseranregung verstanden. Durch ihre Analyse ist es möglich, die ursprüngliche Radikalpaarreaktion von Folgereaktionen mit anderen Molekülen aus der Lösung zu trennen und somit Informationen über den Reaktionsweg und -mechanismus zu erhalten.

In Abbildung 2.6 ist eine typische CIDNP-Kinetik einer zyklischen Reaktion dargestellt. Da auf Grund der Abhängigkeit der Übergangsrate (zwischen $|S\rangle$ und $|T_0\rangle$) von der Hyperfeinkopplung für eine bestimmte Kernspinkonfiguration die Rückreaktion in den Grundzustand im „Käfig“ wahrscheinlicher ist (siehe Abschnitt 2.1.1 und 2.1.2), bildet sich im Submikrosekundenbereich eine Polarisation im diamagnetischen Zustand, die nur von den Geminate-Paaren kommt. Weil der Aufbau der Geminate-Paare experimentell nicht aufgelöst werden kann (vgl. Kapitel 3.1.2), wird der erste Messpunkt einer typischen Kinetik bereits eine hohe Polarisation aufweisen. Darauf folgend reagieren sukzessive auch die anderen Spinkonfigurationen in den diamagnetischen Zustand zurück, was einen Abfall in der Kinetik verursacht. Häufig ist während der ersten Mikrosekunden noch ein Ansteigen der Kinetik zu erkennen. Dieser Anstieg resultiert nicht mehr aus den Geminate-Paaren,

¹³Raumtemperatur, niederviskose Lösungen

¹⁴engl. quencher

Prozess	Zeitskala in s
Molekülreorientierung	$10^{-12} - 10^{-11}$
Radikalpaarbildung ^a	$10^{-9} - 10^{-7}$
Produktbildung der Geminate-Paare	$10^{-9} - 10^{-8}$
<i>S-T</i> ₀ -Übergang	$10^{-9} - 10^{-8}$
Produktbildung der F-Paare ^b	$10^{-7} - 10^{-4}$
T_1^{para} der Kernspins (im radikalischen Zustand)	$10^{-5} - 10^{-3}$
T_1^{dia} der Kernspins (im diamagnetischen Zustand)	$1 - 10^2$

Tabelle 2.1: Übersicht über die in der CIDNP in niederviskosen Lösungen vorkommenden Zeitskalen. ^a Unter der Annahme einer Löscherkonzentration im mM-Bereich bei typischen Löschraten von etwa 10^{10} bis $10^{11} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; ^b unter der Annahme einer Radikalpaarkonzentration von etwa 10^{-5} M .

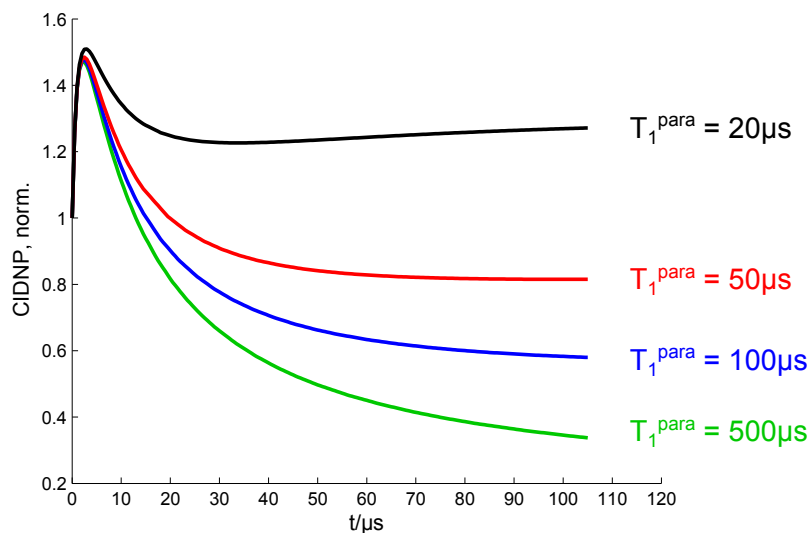


Abbildung 2.6: Einfluss der Relaxationszeit der Kernspins im radikalischen Zustand T_1^{para} auf die CIDNP-Kinetik. Kleinere T_1^{para} führen zu einer größeren, bis in den Sekundenbereich sichtbaren Polarisation. Die Kurven wurden mit den Gleichungen 2.29 und 2.30 und den folgenden Parametern erzeugt: $R_0 k_t = 4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$, $k_{ex} C = 0$, $P^G = 1$ (zur Erläuterung der Parameter siehe Text auf Seite 24).

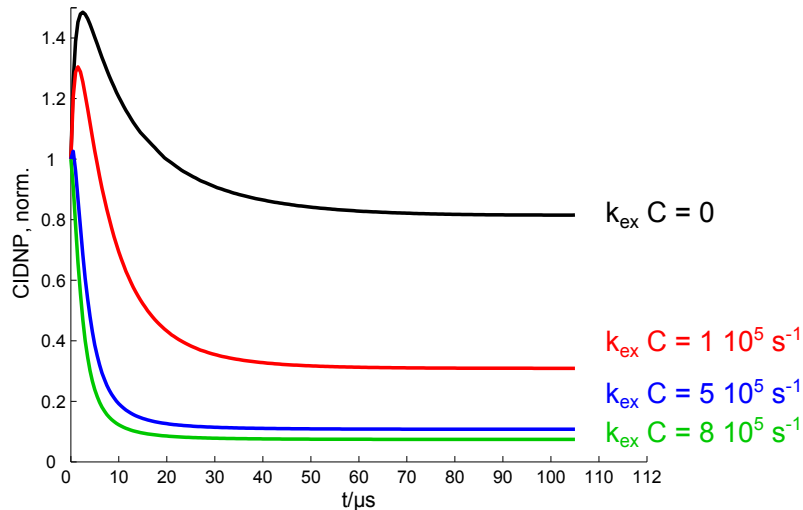


Abbildung 2.7: Einfluss der Rate des degenerierten Elektronenaustausches k_{ex} und der Konzentration des diamagnetischen Moleküls C auf die CIDNP-Kinetik. Eine höhere Konzentration des diamagnetischen Moleküls C oder eine höhere Austauschrate k_{ex} führen zu einer schnelleren Zerstörung des CIDNP-Signals. Die Kurven wurden mit Gleichungen 2.29 und 2.30 und den folgenden Parametern erzeugt: $R_0 k_t = 4 \cdot 10^4 s^{-1}$, $T_1^{para} = 50 \mu s$, $P^G = 1$ (zur Erläuterung der Parameter siehe Text auf Seite 24).

sondern aus den F-Paaren, die dieselbe Polarisation wie die Geminate-Paare tragen. Auch nachdem alle Radikale zurückreagiert sind, ist die Polarisation ungleich Null, da einige Kernspins im radikalischen Zustand umgeklappt sind. Ursache hierfür ist die kurze paramagnetische Relaxationszeit der Kernspins T_1^{para} in der Größenordnung von 10^{-4} s.

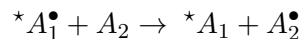
Im Gegensatz zu den Kernspins im radikalischen Zustand relaxieren innerhalb des betrachteten Zeitintervalls kaum Kernspins im diamagnetischen Produkt, da die diamagnetische Relaxationszeit T_1^{dia} in der Größenordnung einiger Sekunden liegt. In Abbildung 2.6 erkennt man, dass der Einfluss von T_1^{para} besonders bei den langen Wartezeiten t deutlich wird. Bei Molekülen mit kleinerem T_1^{para} werden mehr Kernspins bereits im radikalischen Zustand umgeklappt. In Folge dessen ist die Verringerung des CIDNP-Signals der Geminate-Paare durch die Escape-Paare geschwächt und ein größeres stationäres Signal¹⁵ ist bis in den Sekundenbereich sichtbar.

Es gibt aber noch andere Prozesse, die die Kinetik beeinflussen. Hierzu zählt der degenerierte e^- -Austausch¹⁶. Bei diesem Prozess tauschen ein Radikal und ein diamagnetisches Molekül ein Elektron aus. Dieser Prozess soll nun näher erläutert werden: Nachdem die Kerne mittels der Projektion ihrer Spins auf die z -Achse grob in eine diamagnetische und eine paramagnetische Subpopulation aufgeteilt wurden, ist die Wahrscheinlichkeit für die

¹⁵englisch: „steady state signal“

¹⁶engl. degenerate electron exchange

Escape-Paare sehr hoch während der diffusiven Bewegung ein anderes Molekül von gleicher Sorte zu treffen, welches sich noch im Grundzustand befindet.¹⁷ Unterscheiden sich diese beiden Edukte nur durch die Anzahl der Elektronen, kann ohne Energieverlust ein Elektron vom diamagnetischen Molekül zum Radikal übertragen werden. Dadurch wird letzteres direkt in den Grundzustand überführt:



Hierbei markiert * dasjenige Molekül, welches die Polarisation trägt und sich nach der Reaktion im Grundzustand befindet. Die Effizienz dieses Prozesses hängt zum einen vom Überlapp der Orbitale beim Zusammenstoß und andererseits von eventuell notwendigen Konformationsänderungen der Moleküle zur Erzeugung einer energetischen Entartung ab. Ersteres ist im einfachsten Fall eine Funktion des geometrischen Faktors und damit der Größe des Moleküls.

Durch diesen Prozess wird die Polarisation der Escape-Paare sehr effektiv in den Grundzustand überführt und damit die Polarisation der diamagnetischen Produkte verringert, was zu einem schnellen Abfall des CIDNP-Signals führt (siehe Abbildung 2.7). Die Auswirkungen des degenerierten e^- -Austausches auf die Kinetik hängen stark von der Konzentration des vermessenen Moleküls ab (siehe Abbildung 2.7). Trotz der effektiven Zerstörung der detektierten Polarisation erhält man durch Auftauchen des Effektes Informationen über die Struktur des radikalischen Zustands, da sich Radikal und Grundzustand nur durch ein Elektron unterscheiden können.¹⁸

Um die CIDNP-Kinetiken für zyklische Reaktionen zu modellieren wird nach dem Ansatz von Vollenweider [23] ein gekoppeltes System von Differentialgleichungen an die Daten angepasst.

$$R(t) = \frac{R_0}{1 + k_t R_0 t} \quad \beta = \frac{\gamma P^G}{R_0}$$

$$\frac{dP(R)}{dt} = -k_t P(R)R - k_t \beta R^2 - \frac{P(R)}{T_1^{\text{para}}} - k_{\text{ex}} C P(R) \quad (2.29)$$

$$\frac{dP(Pr)}{dt} = k_t P(R)R + k_t \beta R^2 + k_{\text{ex}} C P(R) \quad (2.30)$$

Hier ist k_t die radikalische Terminierungsrate, R_0 die anfängliche Radikalpaarkonzentration, $P(R)$ und $P(Pr)$ sind die Polarisationen in den Radikalen bzw. in den diamagnetischen Produkten, T_1^{para} ist die paramagnetische Kernspinrelaxationszeit, wobei in den folgenden Kapiteln immer die paramagnetische Relaxationsrate $k_1^{\text{para}} = 1/T_1^{\text{para}}$ angegeben wird, k_{ex}

¹⁷Dies liegt an der Konzentration der Radikale, die um zwei bis drei Größenordnungen kleiner als diejenige der diamagnetischen Moleküle ist.

¹⁸Zum Beispiel schließt die Beobachtung des degenerierten Elektronentransfers einen Protonentransfer oder Bindungsbrüche an einem der beiden beteiligten Moleküle aus.

die Rate des degenerierten e^- -Austausches und C die Konzentration des an der Austauschreaktion teilnehmenden diamagnetischen Moleküls. Hierbei wird angenommen, dass der degenerierte e^- -Austausch irreversibel stattfindet, weil die Konzentration der diamagnetischen Moleküle viel größer als die anfängliche Radikalpaarkonzentration ist. Der Parameter β gibt die von freien Radikalpaaren erzeugte und auf deren Gesamtanzahl normierte Polarisation an. Dabei ist P^G die Polarisation aus den Geminate-Paaren und γ bezeichnet das Verhältnis von Polarisation erzeugt in F-Paaren zu derjenigen erzeugt in Geminate-Paaren an. Für einen Triplettvorläuferzustand und eine rein statistische Verteilung müsste $\gamma = 3$ gelten. In Übereinstimmung mit der Literatur [23] wurde in dieser Arbeit $\gamma = 2,8$ benutzt.

Der erste und letzte Term in Gleichung 2.29 und 2.30 beschreibt den Polarisationstransfer der Radikale in den Grundzustand (mittels Terminierungsreaktion bzw. durch degenerierten e^- -Austausch). Der zweite Summand stellt die Polarisation durch freie Paare da. Der dritte Term in Gleichung 2.29 steht für den Verlust der Polarisation der Radikale durch Kernspinrelaxation. Dies ist die Komponente, die durch Spinumklappung eine Polarisation bis in den Sekundenbereich erzeugt. Dabei wird der experimentell nicht auflösbare Aufbau der Polarisation der Geminate-Paare im vorgestellten Gleichungssystem nicht berücksichtigt.

Üblicherweise (z.B. in [24, 25, 26]) und auch in der vorliegenden Arbeit werden nur zyklische Reaktionen betrachtet. Alle darüber hinaus auftretenden Reaktionen werden als Seitenreaktionen bezeichnet (z.B. Decarboxylierung in Kapitel 5.1). Weil eine generelle Beschreibung dieser Prozesse zu komplex wäre, müssen die Formeln in Gleichung 2.29 und 2.29 bei auftauchenden Seitenreaktionen dem jeweiligen Reaktionsschema angepasst werden.

2.2 Relaxationsprozesse

Relaxation in der NMR ist der Prozess der Herstellung des thermischen Gleichgewichts der Kernspinpolarisation durch Wechselwirkung der Kernspins mit der Umgebung. Damit werden das CIDNP-Signal und die darin enthaltenden Information zerstört. Zur quantitativen Analyse der gemessenen Signale muss der Relaxationsprozess berücksichtigt werden, zumindest dann, wenn lange Wartezeiten zwischen Laseranregung und NMR-Detektion existieren. Dies ist bei den Messungen in Abhängigkeit der Magnetfeldstärke (siehe Kapitel 3.2.2) der Fall.

Eine Änderung der longitudinalen Relaxationsrate k_1 oder der longitudinalen Relaxationszeit T_1 in Abhängigkeit vom anliegenden Magnetfeld nennt man Relaxationsdispersion. Diese reflektiert direkt die intra- und intermolekulare Dynamik [27]. Damit ist sie nicht nur für spindynamische Prozesse von Bedeutung, sondern insbesondere auch in der Biophysik, da die Mobilität in Beziehung zur Funktion des Biomoleküls steht [27, 28, 29, 30].

In dem einfachsten theoretischen Relaxationsmodell (Redfield-Näherung [31]) relaxiert ein Ensemble von identischen, nicht miteinander wechselwirkenden Kernspins durch dipolare Wechselwirkung eines fluktuierenden lokalen magnetischen Feldes. Die Zeitabhängigkeit der dipolaren Wechselwirkung resultiert aus der Reorientierung der Moleküle und Atomgruppen im Molekül. Da sich die Molekülgruppen unterschiedlich schnell bewegen, ändert sich der Winkel zwischen zwei wechselwirkenden magnetischen Momenten, was zu einem zeitabhängigen lokalen Magnetfeld führt. Dabei ist die longitudinale Relaxationsrate k_1 durch folgende Gleichung gegeben:

$$\begin{aligned} k_1 &= \frac{1}{T_1} \propto J(\omega) \\ &= (\Delta B)^2 \frac{\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} \end{aligned} \quad (2.31)$$

Hierbei ist ΔB die Fluktuationsamplitude des lokalen dipolaren Magnetfeldes, τ_c die Korrelationszeit der stochastischen Molekülbewegung der Reorientierung und $\omega = 2\pi\nu$, wobei ν die Larmorfrequenz ist. $J(\omega)$ ist die spektrale Dichteverteilung, die Fouriertransformierte der Autokorrelationsfunktion der Bewegung. Damit liefert k_1 direkt Informationen über die vorkommenden Frequenzen in der Molekülbewegung. In Abbildung 2.8 erkennt man, dass für kleine Frequenzen und damit auch kleine Magnetfelder ($\omega\tau_c \ll 1$) k_1 unabhängig von der Frequenz ist ($k_1 \sim \tau_c$)¹⁹. Für große Frequenzen bzw. große Magnetfelder allerdings geht k_1 gegen Null ($k_1 \sim \omega^{-2}$)²⁰. Damit wird die Bewegung des Moleküls direkt durch den Umkehrpunkt der Relaxationsdispersion (Übergang vom „fast motion regime“ zum „slow motion regime“) und dieser durch die Korrelationszeit τ_c beschrieben. Große Moleküle können sich nicht so schnell bewegen wie kleinere und haben somit eine größere Korrelationszeit.

In realen Systemen existieren intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den relaxierenden Spins, in Flüssigkeiten hat die j-Kopplung den größten Einfluss, während in Festkörpern der Einfluss der dipolaren Kopplung stärker ist. Man bezeichnet zwei Spins in der NMR als stark gekoppelt, wenn der Unterschied ihrer Zeemanwechselwirkung mit dem externen Feld kleiner als die skalare Spin-Spin Wechselwirkung (j-Kopplung) zwischen ihnen ist: $|\nu_1 - \nu_2| < j_{12}$. Dies kann mit beliebig kleinen Magnetfeldern immer erreicht werden und hat zur Folge, dass die Zeemanzustände der einzelnen Kerne keine Eigenfunktionen des Systems mehr sind, sondern die stark gekoppelten Kerne durch neue kollektive Eigenzustände beschrieben werden. Demzufolge werden einzelne Kernspins, welche im hohen Magnetfeld sehr unterschiedliche Relaxationszeiten haben, im niedrigen Magnetfeld gleich relaxieren (experimentelle Ergebnisse z. B. in [32]). Falls mehr als zwei Spins stark gekoppelt sind, sieht man auch Strukturen (Stufen, Einbuchtungen und Hervorhebungen) in den Dispersionskurven bei solchen Feldstärken, bei denen sich Spinniveaus kreuzen. Voraussetzung für das Auftreten der Effekte der starken Kopplung ist, dass die Relaxationszeit

¹⁹ „fast motion regime“

²⁰ „slow motion regime“

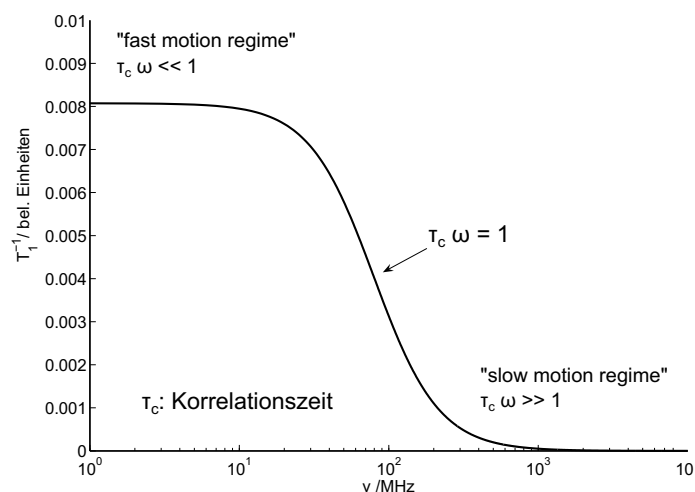


Abbildung 2.8: Typische Relaxationsdispersion charakterisiert durch die Korrelationszeit τ_C der Molekülreorientierung.

so lang ist, dass sich die starke Kopplung überhaupt entwickeln kann ($T_1^1 j_{12} > 1$). Eine theoretische Beschreibung dazu findet sich in [33]. Diese kollektiven Eigenzustände führen nicht nur zu einer gemeinsamen Relaxationszeit der gekoppelten Kernspins, sondern auch zu Polarisationstransfer des CIDNP-Signals zwischen diesen (siehe [34]).

Wie schon in Kapitel 2.1.6 eingeführt wurde, existieren diamagnetische und paramagnetische²¹ Relaxationszeiten der Kernspins. Beide können im einfachsten Fall mit Gleichung 2.31 beschrieben werden. Die Korrelationszeit τ_c , welche die Reorientierung des Moleküls bzw. der Atomgruppe im Molekül beschreibt, sollte sich bei starren Molekülen im Allgemeinen nicht ändern. Der Unterschied in den Relaxationszeiten von ca. 4 Größenordnung resultiert deshalb hauptsächlich aus dem Unterschied der Fluktuationsamplituden ΔB . In beiden Fällen wird ΔB durch die Wechselwirkung mit einem anderen Spin erzeugt: im diamagnetischen Fall durch die Dipol-Dipol-Wechselwirkung mit anderen Kernspins (meist intramolekularen) und im paramagnetischen Fall durch den anisotropen Anteil der Hyperfeinwechselwirkung mit dem Elektronenspin. Da das magnetische Moment des Elektrons viel größer als das des Kernes ist, sind auch die Fluktuationsamplituden größer und damit die Relaxationszeiten kleiner.

²¹Relaxationszeit im radikalischen Zustand

Kapitel 3

Experimentelles

Zur Untersuchung von CIDNP-Prozessen mittels NMR kann ein konventionelles NMR-Spektrometer benutzt werden. Allerdings ist es notwendig die Probe innerhalb des Spektrometers definiert zu belichten. Die dazu notwendigen instrumentellen Umbauten sind in Berlin an zwei verschiedenen Versuchsaufbauten realisiert. Zum einen existiert ein zeitauflösendes Spektrometer, mit welchem CIDNP-Kinetiken und Hyperfeinkopplungskonstanten bestimmt werden können. Zum anderen steht ein an der Freien Universität gebautes, feldzyklisierendes Spektrometer zur Verfügung, mit dem es möglich ist, Messungen bei variablen Magnetfeld durchzuführen [35]. Die beiden Versuchsaufbauten, sowie die Messabläufe, werden im Folgenden vorgestellt. Auf den allgemeinen Aufbau eines typischen NMR-Spektrometers (Magnet, Probenkopf, Pulsradiofrequenzeinheit, Datenverarbeitung mittels ADC-Konverter und Computer, Ansteuerung der einzelnen Geräte mittels Computer) wird hier nicht weiter eingegangen. Dieser ist zu genüge in der Literatur, z. B. in [36], beschrieben. Im Folgenden werden nur die Besonderheiten der hier benutzten Aufbauten dargestellt.

Am Ende folgt ein Abschnitt über die benutzten Programme sowie über die Probenpräparation.

3.1 Das zeitauflösende Spektrometer

Die Hauptaufgabe dieses Spektrometers ist es, den zeitlichen Verlauf des CIDNP-Signals zu detektieren (vgl. Kapitel 2.1.6), um Informationen über die primäre Radikalpaarreaktion zu erhalten und diese von auftretenden Folgereaktionen zu trennen.

3.1.1 Experimenteller Aufbau

Das zeitauflösende Spektrometer an der Freien Universität Berlin besteht aus dem kommerziellen NMR-Spektrometer CXP 300 MHz von Bruker¹ und einem BrilliantB Nd:YAG

¹Bruker Biospin, Rheinstetten, Deutschland; Detektionsfeld $B_0 = 7 T$

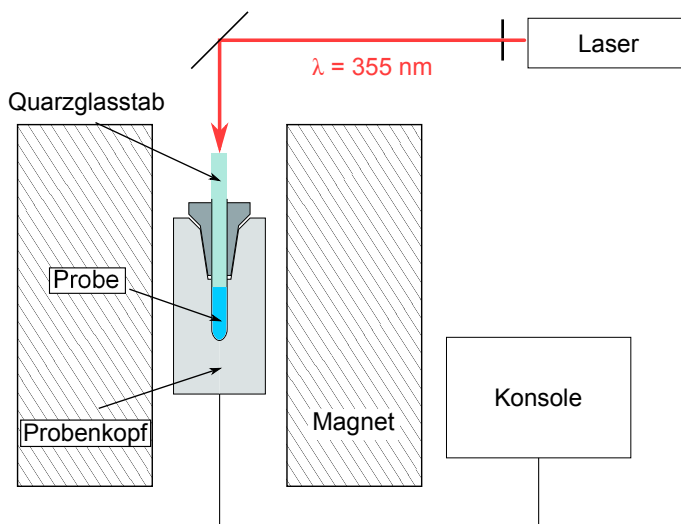


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Aufbaus des zeitauflösenden Spektrometers. Für Details wird auf den Text verwiesen.

Laser von Quantel² mit dem dazugehörigen Verdoppler- und Verdreifachmodul, das Arbeiten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 355 \text{ nm}$ erlaubt. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, wird die Probe durch ein Belichtungssystem bestehend aus einer Blende vor dem Laser, einem 90° Umlenkspiegel direkt über der Achse des Magneten und durch einen beidseitig planar polierten Quarzglasstab von oben bestrahlt. Radius und Position des Glasstabes sind so gewählt, dass dieser die Oberfläche der Probensubstanz vollständig berührt. Das untere Ende des Quarzglasstabes wird dabei 2 mm über dem oberen Ende der NMR-Spule im Probenkopf positioniert, um die Probe einerseits gut ausleuchten zu können und um andererseits Magnetfeldinhomogenitäten infolge des Quarzglasstabes niedrig zu halten. Die Position der Probe bezüglich der NMR-Spule kann um bis zu 0,4 mm variieren.

Die Pulslänge des Lasers (Halbwertsbreite) beträgt etwa 5 ns bei einer Pulsenergie zwischen 33 mJ und 37 mJ. Das Belichtungssystem wurde etwa alle 4 Wochen überprüft und eventuell nachjustiert, wobei die Einstellung während einer Messreihe stabil war. Es können Halbwertslinienbreiten der NMR-Übergänge von bis zu 0,3 Hz erreicht werden. Die Länge eines typischen $\pi/2$ -RF-Pulses beträgt ca. $3,5 \mu\text{s}$.

3.1.2 Messabläufe

Die typische zeitliche Entwicklung einer CIDNP-Kinetik wurde bereits in Kapitel 2.1.6 vorgestellt. Um diese zu untersuchen, wird der in Abbildung 3.2 dargestellte Messablauf benutzt. Um möglichst nur das durch Licht entstandene CIDNP-Signal zu detektieren, wird die thermische Polarisation mit Hilfe einer Sättigungssequenz zerstört. In dieser wechseln

²Quantel, Les Ulis CEDEX, Frankreich; BrilliatB mit Wellenlänge $\lambda = 1065 \text{ nm}$

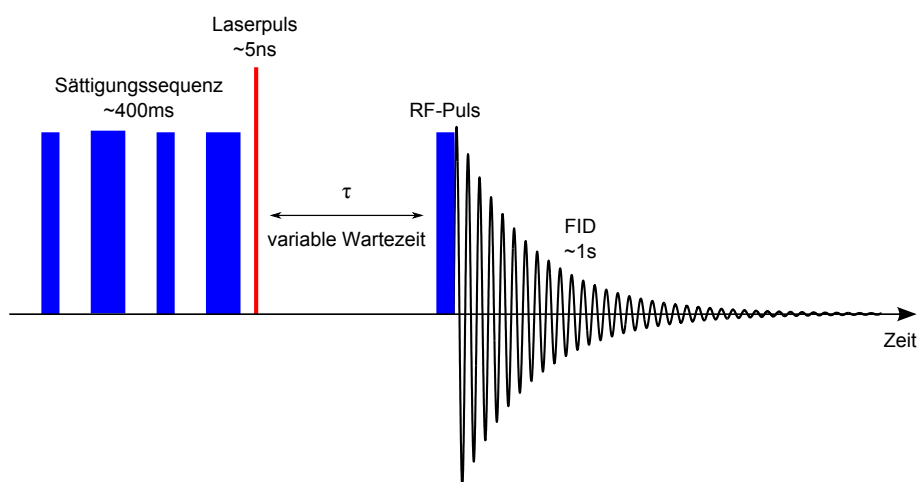


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Ablaufs der zeitaufgelösten CIDNP-Experimente mit der variablen Wartezeit τ zwischen Laseranregung und RF-Nachweispuls (typischerweise mit einer Länge von $1\ \mu\text{s}$).

sich RF-Pulse variabler Länge und ein in z-Richtung angelegtes Gradientenfeld ab, so dass die Magnetisierung der Kernspins verloren geht. Durch die Belichtung der Probe wird die Radikalpaarreaktion initiiert. Das CIDNP-Signal kann sich dann während der variablen Wartezeit τ entwickeln und anschließend als Polarisation der diamagnetischen Moleküle mit einem RF-Puls nachgewiesen werden. Dabei findet die zeitliche Entwicklung der CIDNP-Intensität nicht nur während der Wartezeit τ sondern auch während des Laserpulses sowie während des RF-Nachweispulses statt. Weil der Laserpuls sehr viel kürzer als der übliche $\pi/2$ -RF-Puls ist ($5\ \text{ns}$ vs. $3,5\ \mu\text{s}$), hängt die zeitliche Auflösung hauptsächlich von der Länge des NMR-Nachweispulses ab. Deshalb wird für diese Messungen ein Puls mit einer Länge von $1\ \mu\text{s}$ benutzt, auch wenn dies zu Lasten des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses geht. Die Aufnahme des FID³ erfolgt in der in der NMR gewohnten Weise.

Betonen möchte ich hier noch einmal, dass bei diesem Experiment nur die diamagnetischen Produkte nachgewiesen werden. Die Übergänge der paramagnetischen Spezies sind durch die Hyperfeinkopplung zum Elektron (üblicherweise im MHz-Bereich) zu deutlich anderen Frequenzen verschoben und werden durch den RF-Puls im Allgemeinen nicht mehr angeregt (kHz-Bereich).

Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wird das Experiment mehrmals wiederholt und die Spektren werden aufakkumuliert. Trotz der Sättigung der Probe vor der Belichtung kann das NMR-Signal, hauptsächlich das der dominanten Lösungsmittellinie (im Allgemeinen Wasser), nicht immer komplett zerstört werden. Um die restliche NMR-Intensität zu unterdrücken wird im Allgemeinen zu jedem Experiment mit Belichtung (HELLSPEKTRUM) immer ein entsprechendes Dunkelexperiment (DUNKELSPEKTRUM) durchge-

³engl. Free Induction Decay (Freier Induktionszerfall)

führt. Erst die Differenz liefert den lichtinduzierten CIDNP-Effekt. Nur im Einzelfall kann das Dunkelspektrum vernachlässigt werden. Jedoch unterscheiden sich die Dunkelspektren für die verschiedenen Wartezeiten τ so wenig, dass mit einem Dunkelspektrum für alle Spektren einer CIDNP-Kinetik gearbeitet werden kann.

Im Allgemeinen hängt die CIDNP-Polarisation von der Anzahl früherer Belichtungen ab, da der Photoprozess nicht vollständig zyklisch abläuft. Deshalb ist es nicht möglich eine Probe beliebig häufig zu bestrahlen und es werden für die Kinetikmessungen üblicherweise mehrere Proben benötigt. Zur Bestimmung der Ausbleichkurve wird vor der Kinetik bzw. vor der Messung bei $\tau = 0 \mu\text{s}$ das CIDNP-Signal in Abhängigkeit von der Anzahl der Laserblitze aufgenommen. Ein Probenwechsel erfolgt spätestens, wenn die Polarisation auf 50% abgesunken ist, da sich eine längere Messung ungünstig auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auswirken würde. Die damit „erlaubte“ Anzahl von Laserblitzen läßt sich aus der Ausbleichkurve bestimmen.

Für eine CIDNP-Kinetik werden in dieser Arbeit üblicherweise Spektren für 10 verschiedene Wartezeiten zwischen $0,1 \mu\text{s}$ und $100 \mu\text{s}$ aufgenommen. Dabei wurden die Schrittweiten von τ nicht kleiner als $1 \mu\text{s}$ gewählt, da die zeitliche Auflösung durch die Länge des RF-Pulses (üblicherweise $1 \mu\text{s}$) gegeben ist.

Wie oben erwähnt, nimmt das CIDNP-Signal mit der Anzahl der auf die Probe bestrahlten Laserblitze ab. Es ist zwar prinzipiell möglich die Kinetikmessungen mit Hilfe der Ausbleichkurve zu korrigieren, bei den hier durchgeführten Experimenten wurde aber ein anderer Ansatz gewählt: Um für jede Wartezeit im Mittel gleiche Versuchsbedingungen zur Unterdrückung systematischer Fehler zu gewährleisten und unabhängig von der Ausbleichkurve zu sein, wird jeder Wartezeitpunkt einmal bei jedem Ausbleichkurvenpunkt vermessen. Dabei wird der Startwert der Wartezeiten für jede Probe variiert. Dafür muss die Anzahl der Proben gleich der Anzahl der Wartezeiten sein, so dass sich diese Methode insbesondere bei Systemen, bei denen sowieso viele Akkumulationen notwendig sind, anbietet.

3.1.3 Auswertung

Mit der im letzten Unterkapitel beschriebenen Methode ist es möglich zwei verschiedene Observablen zu untersuchen: Zum einen können Hyperfeinkopplungskonstanten bestimmt werden, zum anderen durch die CIDNP-Kinetik Folgereaktionen bestimmt werden. Für beide Auswertungen muss zunächst das CIDNP-Spektrum aus der Differenz des Hell- und des Dunkelspektrums gewonnen werden.

Auswertung der CIDNP-Kinetik

Eine CIDNP-Kinetik stellt die Abhängigkeit der Amplitude des CIDNP-Signals des entsprechenden Kerns von der Wartezeit τ^4 dar. Da Polarisation, die sich bis zum Ende des Nachweispulses bilden konnte, detektiert wird, muss die Länge des Nachweispulses in einer effektiven Wartezeit berücksichtigt werden. Die effektive Wartezeit t setzt sich aus der Wartezeit τ und der halben Pulslänge (im Allgemeinen $0,5 \mu\text{s}$) zusammen. Bei einer Wartezeit von $\tau = 0 \mu\text{s}$ ist die effektive Wartezeit folglich $t = 0,5 \mu\text{s}$. In allen in dieser Arbeiten dargestellten Kinetiken ist immer die effektive Wartezeit dargestellt.

Weiterhin führt die Begrenzung der zeitlichen Auflösung durch den RF-Puls dazu, dass der Aufbau der Polarisation der Geminate-Paare nicht mehr auflösen ist, sondern nur deren Zerfall (vgl. Kapitel 2.1.6 und insbesondere Tabelle 2.1 auf Seite 22). Der typische Verlauf einer CIDNP-Kinetik wurde bereits in Kapitel 2.1.6 vorgestellt. Weil die gemessene Polarisation bei einer Wartezeit von $\tau = 0 \mu\text{s}$ hauptsächlich von den Geminate-Paaren und bei längeren Wartezeiten auch von Folgereaktion beeinflusst ist, kann die primäre Reaktion von den Folgereaktionen getrennt werden (vgl. Kapitel 2.1.6)

Durch Anpassen der Gleichungen 2.29 und 2.30 an die gemessenen Daten ist es möglich Reaktionsraten (meist die Zerfallsrate der Radikale sowie die Rate des degenerierten Elektronenaustausches) und paramagnetische Relaxationsraten der Kernspins zu bestimmen.

Der Fehler der Amplitudenschwankung des CIDNP-Signals setzt sich aus dem Fehler für das Rauschen im CIDNP-Spektrum und dem Fehler aus der Abweichung der Energie in den einzelnen Laserblitzen zusammen. Bei 120 Akkumulationen für jede Zeitposition wird letzterer mit 1% abgeschätzt. Der Fehler für das Rauschen im CIDNP-Spektrum hängt direkt vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis ab. Dieser hängt vom betrachteten System, der untersuchten Linie und der Position in der Kinetik ab. Er variiert für den ersten Datenpunkt der Kinetik etwa zwischen 4% und 15%, so dass der Fehler durch die Belichtung für letztere vernachlässigbar ist. Der Fehler der Parameter aus der Anpassung ergibt sich aus der maximal möglichen Änderung dieses Parameters in Hinblick auf die fehlerbehafteten Datenpunkte.

Auswertung der Hyperfeinkopplungskonstanten

Für eine Wartezeit $\tau = 0 \mu\text{s}$ bzw. für den ersten Punkt der CIDNP-Kinetik kann die detektierte Polarisation in guter Näherung der Rekombination der Geminate-Paare zugeordnet werden. Die CIDNP-Intensitäten dieser sind unter bestimmten Voraussetzungen proportional zu den isotropen Hyperfeinkopplungskonstanten des entsprechenden Kerns (vgl. Kapitel 2.1.5). Durch Vergleich der einzelnen Intensitäten des CIDNP-Spektrums für $\tau = 0 \mu\text{s}$ untereinander ist es möglich die relative Stärke der Hyperfeinkopplungen zu bestimmen. Zur

⁴ τ ist die Zeit zwischen Laserpuls und RF-Puls

korrekten Auswertung müssen die erhaltenen CIDNP-Intensitäten auf die Anzahl der zu der NMR-Linie beitragenden Kerne normiert werden. Weiterhin wurde bei überlappenden Linien im Spektrum eine mittlere Hyperfeinkopplung (aus dem Durchschnitt der Intensität aller beteiligten Kerne) berechnet. Da die Hyperfeinkopplungskonstanten charakteristisch für jedes Radikal sind, kann mit Hilfe der Kopplungskonstanten ein Radikal identifiziert werden.

Wenn die absoluten Hyperfeinkopplungen eines der Radikalpartner bekannt sind, ist es damit möglich seine CIDNP-Intensitäten als Referenz zu benutzen und so die CIDNP-Intensitäten des Partners zu kalibrieren. Dies geschieht durch Auftragen der CIDNP-Intensität des ersteren gegen die absoluten Hyperfeinkopplungen ($P_i = Ca_i$) und Ermittlung des Proportionalitätsfaktor C durch Anpassung einer Nullpunktsgaden. Aus dem daraus gewonnenen Proportionalitätskoeffizienten C können die unbekannt Hyperfeinkopplungskonstanten des Partnerradikals berechnet werden ($a_j = -C^{-1}P_j$). Dabei ist zu beachten, dass die Proportionalitätskonstante des Partnerradikals nach den Kapteinschen Regeln das umgekehrte Vorzeichen besitzt (vgl. Kapitel 2.1.5). Dieses Verfahren wird in Kapitel 4 diskutiert und mehrmals angewandt.

Der Fehler der CIDNP-Intensität ergibt sich nur aus dem Fehler für das Rauschen im CIDNP-Spektrum. Der Fehler aus der Abweichung der Energie in den einzelnen Laserblitze spielt keine Rolle, da die verglichenen Signale alle bei denselben Laserpulsen entstanden sind. Der Fehler für die absolute Hyperfeinkopplung berechnet sich aus dem Anpassungsfehler des Proportionalitätsfaktors und dem Fehler der einzelnen CIDNP-Intensität.

3.2 Das feldzyklisierende Spektrometer

Um eine bessere Sensitivität und Auflösung zu erhalten, arbeiten NMR-Spektrometer normalerweise bei einem festen Magnetfeld. Wenn der Einfluss des Magnetfeldes auf eine Observable untersucht werden soll, ist es deshalb erforderlich an vielen unterschiedlichen Spektrometern zu messen. Dies ist zum einen sehr umständlich, zum anderen werden die Messbedingungen an den verschiedenen Spektrometern nicht immer gleich sein, so dass der direkte Vergleich der Resultate problematisch wird. Eine gute Alternative ist es, feldzyklisierende Experimente [37] durchzuführen, d.h. Experimente, bei denen während der Messung das Magnetfeld variiert wird. Die Grundidee ist dabei, dass die Probe zunächst in ein veränderliches Polarisationsfeld B_{pol} , in dem sich die Spins entwickeln können, gebracht wird. Erst im Anschluss wird die Probe zur Detektion des NMR-Signals in das Nachweisfeld B_0 gefahren. Dabei wird immer das gleiche Nachweisfeld eingestellt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu garantieren. Für eine hohe spektrale Auflösung sowie für ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist es sinnvoll das höchstmögliche Magnetfeld B_0 für den Signalnachweis zu benutzen.

Es gibt zwei Möglichkeiten die Feldzyklisierung, auch „Zwei-Felder-Technik“ genannt,

zu realisieren. Entweder die Probe bleibt während der Messung an derselben Position und das Magnetfeld wird geändert (Feldschalten) [38, 27] oder die Probe wird zwischen zwei Magnetfeldern transferiert (Probentransfer) [39, 40]. Da bisher kein kommerzielles hochauflösendes feldzyklisierendes Spektrometer existiert, wurde der hier vorgestellte Aufbau entsprechend dem zweiten Ansatz entwickelt und an der Freien Universität Berlin gebaut [35, 41]. Dabei ist die hohe spektrale Auflösung entscheidend, wenn die Polarisation auf einzelnen Kernen untersucht werden soll.

3.2.1 Experimenteller Aufbau

Die Grundidee des in Berlin realisierten Aufbaus ist der mechanische Transfer des kompletten NMR-Probenkopfs mit Hilfe eines Schrittmotors zwischen dem höchsten Feld eines supraleitenden Magneten (Nachweisfeld) und seinem Streufeld bzw. einem durch einen zusätzlichen Elektromagneten angelegten Magnetfeld (variables Polarisationsfeld) [35, 41]. Die Belichtung erfolgt über einen flexiblen Lichtleiter, so dass die gleichen Belichtungsbedingungen für jede Probenposition sicher gestellt sind.

Die Transfereinheit

Der Probenkopf ist über eine abschraubbare Stange mit dem Transportschlitten verbunden. Dieser wiederum ist an einem Zahnriemen fixiert, der über einen zweiten Zahnriemen mit dem Schrittmotor verbunden ist. Der Probenkopf kann über eine Kunststoffführungsschiene von der zentralen Position im Elektromagneten bis zum Nachweisfeld entlang der Bohrungsachse des Kryomagneten jede beliebige Position mit einer Genauigkeit von besser als 0,1 mm einnehmen. Für die Gesamtstrecke von etwa 620 mm und bei einer Masse von ca. 0,3 kg beträgt die Dauer des Probentransfers weniger als 0,3 s.

Die Magnetfelder

Eine Besonderheit des hier dargestellten Aufbaus ist die Möglichkeit Polarisationsfelder von 100 μT bis 7 T einzustellen und im gesamten Feldbereich bei den Messungen eine konstant hohe spektrale Auflösung zu erreichen. Da mit dem Schrittmotor jede beliebige Position entlang der Führungsschiene definiert eingestellt werden kann, ist es möglich das Streufeld des 7 T Kryomagneten als Polarisationsfeld zu benutzen. Die Magnetfeldgenauigkeit wird folglich durch den Feldgradienten über das Probenvolumen mit einer Höhe von 10 mm begrenzt. Bei einem maximalen Feldgradienten von knapp 60 T/m (siehe Abbildung 3.4) beträgt damit die geringste Feldauflösung knapp 300 mT.

Für Magnetfelder kleiner als 0,1 T wird ein zusätzlicher Elektromagnet genutzt. Dieser befindet sich direkt unterhalb des Kryomagneten, 620 mm unter der Nachweispule des

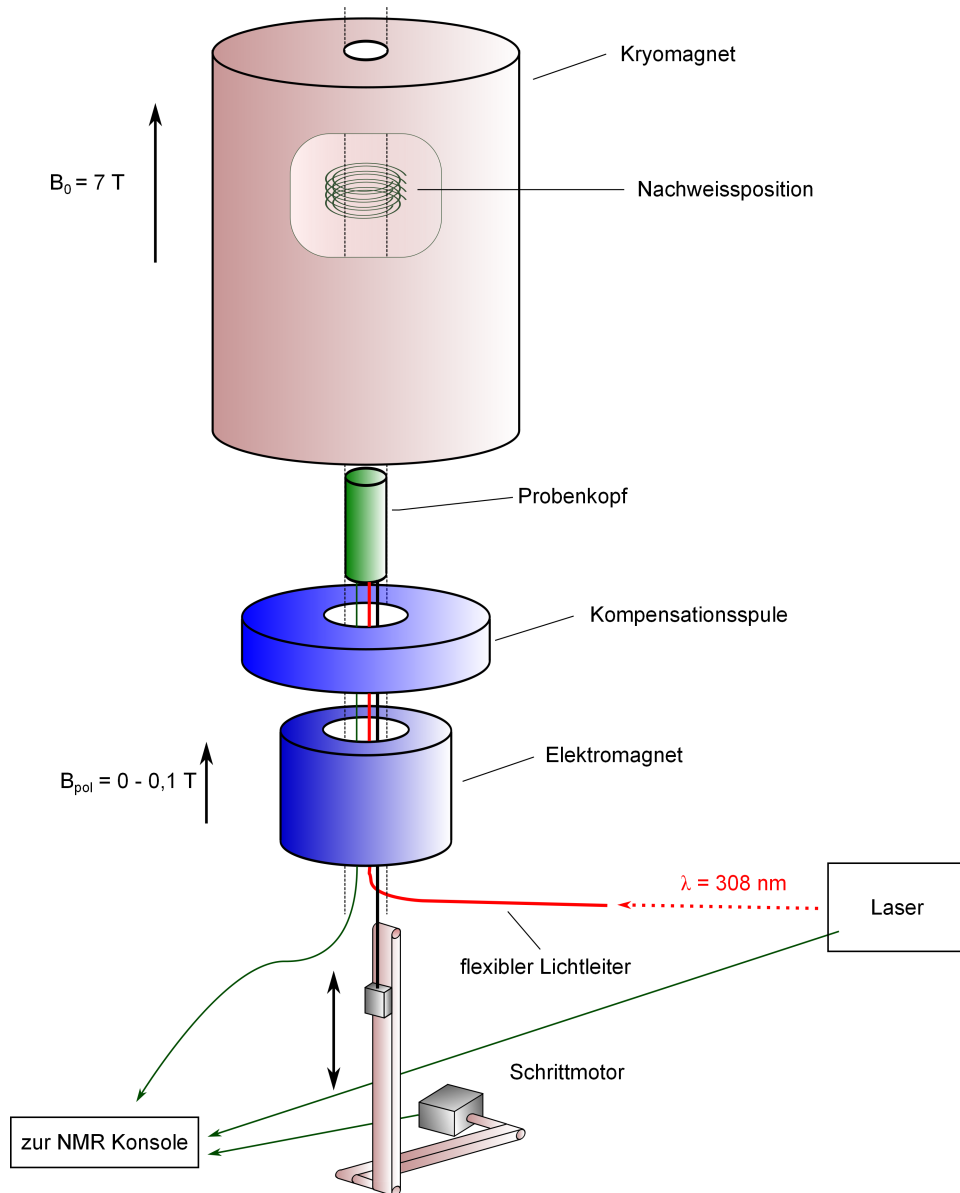


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Aufbaus des feldzyklisierenden Spektrometers mit digitalem Schrittmotorantrieb. Für Details siehe Text.

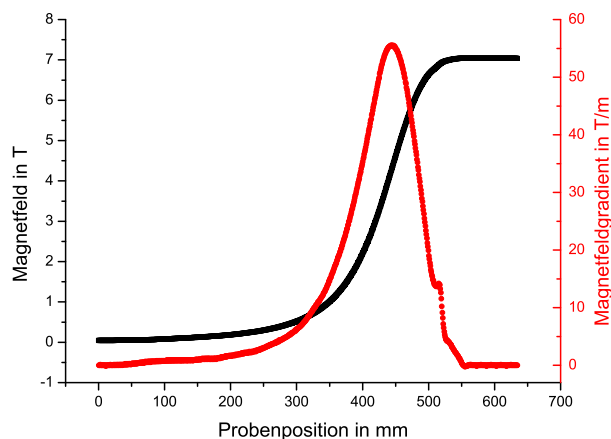


Abbildung 3.4: Magnetfeld (schwarz) und Feldgradient (rot) in Abhängigkeit von der Probenposition entlang der Achse des Kryomagneten. Dabei entspricht die Angabe „0 mm“ der Probenposition im Zentrum des Elektromagneten und „620 mm“ der Position im Kryomagneten, in der die Signale detektiert werden.

Kryomagneten⁵. Die z-Achsen beider Magneten stimmen überein. Diese Position wurde gewählt um kurze Transferzeiten zu realisieren, ohne dass das Streufeld des Kryomagneten zu groß (und damit schwer zu kompensieren) ist. Abhängig von der erzeugten Feldrichtung im Elektromagneten können Feldstärken von ca. 100 μ T (durch Kompensation des verbleibenden Streufeldes) bis zu 100 mT (durch Addition des Streufeldes) erreicht werden. Eine gleichmäßige Temperierung der Spule des Elektromagneten, um die thermische Ausdehnung von diesem zu verhindern, ermöglicht hierbei Magnetfeldgenauigkeiten von $\pm 100 \mu$ T. Um andererseits den Einfluss des Elektromagneten auf die Nachweisposition zu korrigieren, ist eine zusätzliche Kompensationsspule zwischen dem Elektromagnet und dem Kryomagneten positioniert.

Insgesamt besteht somit die Möglichkeit, das Polarisationsfeld zwischen 100 μ T - 0,1 T mit Hilfe des Elektromagneten und zwischen 0,1 T - 7 T mit Hilfe des Streufeldes des Kryomagneten zu variieren.

Das Belichtungssystem

Um die Radikalpaarreaktion zu starten ist es notwendig die Probe zu belichten. Als Lichtquelle steht dabei ein Excimer-Laser: EMG 101 MSG von Lambda Physik⁶ zur Verfügung, welcher mit einer Füllung aus XeCl bei einer Wellenlänge von $\lambda = 308$ nm arbeitet. Da die Probe unter gleichen Bedingungen unabhängig vom Polarisationsfeld bzw. der Proben-

⁵an dieser Position beträgt das Streufeld noch etwa 50 mT

⁶Lambda Physik (heute Coherent), Göttingen, Deutschland;

position belichtet werden soll, wird das Licht über ein optisches System aus Spiegel und Linse gefolgt von einem flexiblen Lichtleiter zum Probenkopf geführt. Der Lichtleiter ist am unteren Ende des Probenkopfs fixiert und ab dort wird das Licht durch einen runden Quarzglasstab in die Probe geleitet. Das obere Ende des Quarzglasstabs ist etwa 40° angeschrägt. Die dadurch entstandene Oberfläche reflektiert das Licht direkt von der Seite in die Probe. Dabei wird nicht die gesamte Probe ausgeleuchtet, sondern nur der Teil, der sich innerhalb der NMR-Nachweisspule befindet.

Die Energie pro Laserpuls hinter dem Lichtleiter ist je nach Einstellung maximal 55 mJ. Während sich die Probe im Polarisationsfeld befindet, wird diese mit einer Pulsrate von 50 Hz belichtet.

Der Probenkopf

Da der Probenkopf im inhomogenen Streufeld des Kryomagneten schnell transferiert wird, ist es nötig die dabei auftauchenden Wirbelströme so weit wie möglich zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurden möglichst viele Komponenten des Probenkopfs aus Metall durch ein spezielles Plastik ersetzt, in dem die diamagnetischen durch die entsprechenden paramagnetischen Anteile der Suszeptibilität kompensiert werden [42]. Die Benutzung von Plastik hat noch weitere Vorteile, wie hohe Stabilität und geringe Masse des Probenkopfs. Insgesamt führt dies zu der kurzen Transferzeit von < 300 ms.

Zusätzlich wird die spektrale Auflösung durch Rotation (etwa 20 Hz) der Probe erhöht. Durch das Rotationssystem, dessen Aufbau dem Standard in der hochauflösenden NMR entspricht, können Halbwertslinienbreiten der NMR-Übergänge von 0,3 Hz und besser erreicht werden. Um während des Probentransfers keine Probe zu verlieren und die Vermischung von polarisierter und unpolarisierter Probe beim Probentransfer zu vermeiden, wird bei den Messungen am feldzyklisierenden Spektrometer ein Teflonstopfen auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgesetzt.

3.2.2 Messabläufe

Messung der CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit

Ein typischer zeitlicher Ablauf des feldzyklisierenden Experiment zur Bestimmung der Magnetfeldabhängigkeit der CIDNP-Intensität mit Hilfe des Streufeldes ist in Abbildung 3.5 gezeigt. Normalerweise beginnt der Zyklus mit der Positionierung der Probe in einem möglichst niedrigen Magnetfeld, um die thermische Polarisation zu minimieren. Hierfür befindet sich die Probe im Zentrum des Elektromagneten, in dem das Streufeld des Kryomagneten nur noch 50 mT beträgt. Danach wird die Probe an die Stelle im Streufeld transferiert, die dem gewünschten Polarisationsfeld B_{pol} entspricht. Dort wird die Probe nun mit der angegebenen Anzahl Laserblitze mit einer Pulsrate von 50 Hz belichtet. Nach Beendigung

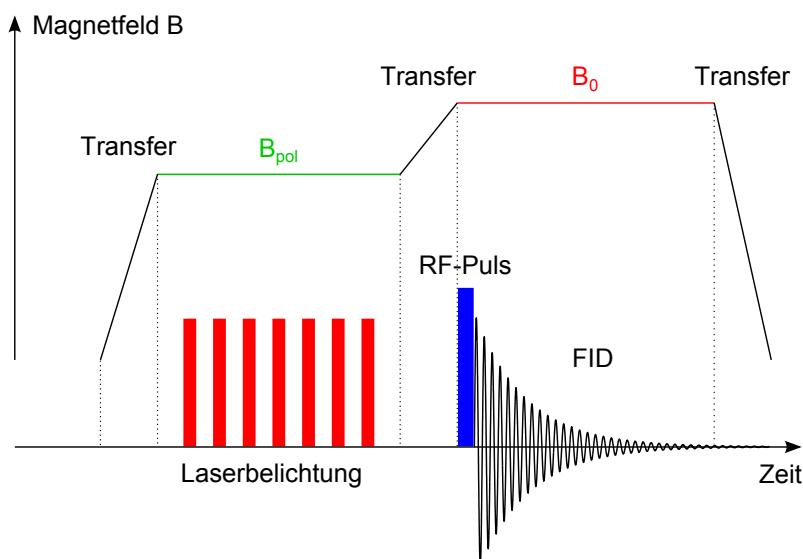


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Messung der CIDNP-Magnetfeldabhängigkeit. Die Probe relaxiert in einem sehr niedrigen Magnetfeld. Dann wird sie zur Belichtung in das variable Polarisationsfeld B_{pol} im Streufeld des Kryomagneteten gefahren und nach der Laserbestrahlung zum Nachweisfeld $B_0 = 7\text{ T}$ transferiert.

der Belichtung wird die Probe schnellst möglich ins Nachweisfeld B_0 transferiert, in welchem die Polarisation der diamagnetischen Moleküle durch einen RF-Puls abgefragt und der FID aufgenommen wird. Üblicherweise wird hierfür ein $\pi/2$ -Puls zum Nachweis der Polarisation verwendet, um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Für den nächsten Zyklus wird die Probe wieder in das niedrigstmögliche Magnetfeld gebracht und verweilt hier, bis die vorhandene Polarisation der Kerne relaxiert ist (mindestens $3T_1$, aber typischerweise $6T_1$).

Die Belichtungszeit und damit die Verweildauer t_{Licht} der Probe im Polarisationsfeld hängt auf Grund der konstanten Pulsrate des Lasers direkt von der gewünschten Anzahl der Laserblitze ab. t_{Licht} sollte möglichst kurz gewählt werden, damit die Ausbleichung der Probe pro Messung möglichst gering ausfällt und die Polarisation nicht durch longitudinale Kernspinrelaxation des Rekombinationsprodukt zerstört wird. Auf der anderen Seite muss t_{Licht} lang genug sein, um eine gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten.

Bei Polarisationsfeldern, die kleiner als 0,1 T sind, wird der Ablauf der Messung leicht variiert, da das Polarisationsfeld dann mit dem zusätzlichen Elektromagneten eingestellt wird, wobei der Transfer in dessen Zentrum erfolgt.

Sowohl während des Probentransfers als auch bei der Belichtung in hohen Polarisationsfeldern baut sich thermische Polarisation auf, weshalb das Experiment immer zweimal durchgeführt werden muss, einmal ohne Belichtung (Dunkelspektrum) und einmal mit Belichtung (Hellspektrum). Das CIDNP-Spektrum erhält man schließlich aus Differenz dieser

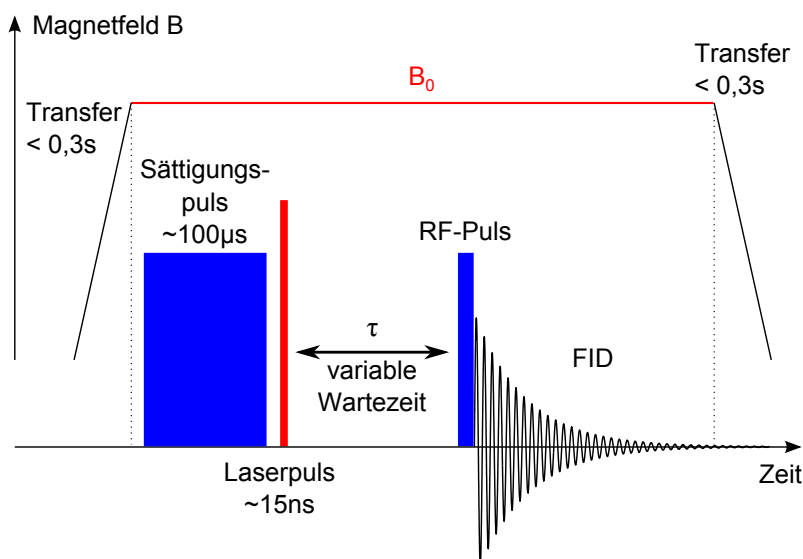


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Ablaufs der zeitaufgelösten CIDNP-Experimente mit der variablen Wartezeit τ zwischen Laseranregung und RF-Nachweispuls (typischerweise mit einer Länge von $1\ \mu\text{s}$) am feldzyklisierenden Spektrometer.

beiden Spektren. Nur im Einzelfall ist es möglich das Dunkelspektrum zu vernachlässigen.

Auch bei dieser Art der CIDNP-Messung hängt die Intensität der Polarisation von der Anzahl früherer Belichtungen der Probe ab (Ausbleichkurve). Da normalerweise mit einer Probe mehrere Magnetfelder vermessen werden, müssen die so erhaltenen Intensitäten hinterher mit der zuvor ermittelten Ausbleichkurve korrigiert werden. Als Kontrolle werden hier die letzten Felder⁷ der letzten Probe bei gleichen Bedingungen als erste Messungen der neuen Probe wiederholt, so dass ein Überlapp zwischen den Messungen entsteht.

Zeitaufgelöste Messungen am feldzyklisierenden Spektrometer

Das feldzyklisierende Spektrometer wurde so umgebaut [42], dass auch zeitaufgelöste Messungen an diesem möglich sind. Der Messverlauf (siehe Abbildung 3.6) ist bis auf die Art der Zerstörung der thermischen Polarisation gleich wie am zeitauflösenden Spektrometer (vgl. Abschnitt 3.1.2 und insbesondere Abbildung 3.2). Statt der Sättigung der Probe mit Hilfe von Gradientenspulen wird wie bei der Messung der Magnetfeldabhängigkeit (vgl. letzten Unterabschnitt auf Seite 38) zunächst die Probe in das niedrigstmögliche Magnetfeld (etwa $50\ \text{mT}$) gebracht. Zur noch besseren Zerstörung der thermischen Polarisation wird nach dem Proben transfer in der Nachweisposition vor dem Laserpuls noch ein $100\ \mu\text{s}$ langer RF-Puls eingestrahlt. Danach folgt, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, der Laserpuls, die Wartezeit τ , der üblicherweise $1\ \mu\text{s}$ lange RF-Nachweispuls und der FID. Für sonstige

⁷typischerweise zwei Magnetfelder

Besonderheiten der Durchführung und typische Parametereinstellungen wird auf Kapitel 3.1.2 verwiesen.

Abschließend soll noch darauf hingewiesen werden, dass zeitaufgelöste Messungen nur bei 7 T möglich sind, da die Transferzeit vom Polarisationsfeld ins Nachweisfeld (bis zu 300 ms) viel länger als die Wartezeit τ zwischen dem Laserpuls und dem RF-Puls (typischerweise maximal 100 μ s) ist.

3.2.3 Auswertung

CIDNP-Kinetiken und Hyperfeinkopplungskonstanten

Die Auswertung erfolgt wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben.

Auswertung der CIDNP-Feldabhängigkeiten

Die CIDNP-Feldabhängigkeit stellt die Abhängigkeit der CIDNP-Intensität je einer spektralen Linie vom Magnetfeld dar. Zunächst wird das CIDNP-Spektrum aus der Differenz des Hell- und des Dunkelspektrums bestimmt. Die Integrale der CIDNP-Intensitäten in den Spektren werden bestimmt und mit der Ausbleichkurve korrigiert. Die Resultate werden gegen die entsprechenden Magnetfelder aufgetragen. Wenn Felder mehrfach vermessen wurden, wurde der Mittelwert über die entsprechenden CIDNP-Intensitäten gebildet.

Eine typische Feldabhängigkeit, wie sie in der vorliegenden Arbeit betrachtet wird, besitzt ein Magnetfeld mit maximaler CIDNP-Polarisation B_{\max} . Die Lage von B_{\max} hängt vom Unterschied in den g -Faktoren Δg und den Hyperfeinkopplungen beider Radikale a_i ab. Da die Struktur eines Radikals durch seine Hyperfeinkopplungen und durch seinen g -Faktor charakterisiert wird, spiegelt die Feldabhängigkeit direkt die Struktur der beiden Radikalpartner wieder. Aus gleichen Radikalpaaren erzeugte Polarisation zeigt somit dieselbe Feldabhängigkeit. Unterschiedliche Feldabhängigkeiten zeigen, dass verschiedene Radikalpaare an der Reaktion beteiligt sind.

Durch Anpassung von Simulationen nach dem Adrianmodell (vgl. Kapitel 2.1.2 und 2.1.4) an die Datenpunkte kann bei bekannten Hyperfeinkopplungen der Unterschied der g -Faktoren bestimmt werden oder umgekehrt. Wenn nur von einem Radikal der g -Faktor und die Hyperfeinkopplungskonstanten bekannt sind, erhält man für seinen Partner eine Schar dazu passender g -Faktor-Hyperfeinkopplungspaare. Nur wenn alle magnetischen Parameter mit Ausnahme eines Wertes bekannt sind, kann daraus die fehlende Größe eindeutig bestimmt werden. Hierbei müssen kleine Hyperfeinkopplungen nicht unbedingt berücksichtigt werden, sofern diese die Magnetfeldabhängigkeit kaum beeinflussen. Dies ist der Fall, wenn der Beitrag dieser Werte zur Summe über alle beteiligten Hyperfeinkopplungen vernachlässigbar ist (vgl. Kapitel 2.1.2, insbesondere Gleichung 2.11 und 2.15).

Falls für ein Radikal kein Partner mit bekanntem g -Faktor und Hyperfeinkopplungen

gefunden wird, ist es mittels eines geeigneten „Brückengliedes“ trotzdem möglich, den fehlenden Parameter zu ermitteln. Für den Fall, dass sowohl der g -Faktor als auch die Hyperfeinkopplungskonstanten eines Radikals (1) bekannt sind und der g -Faktor eines zweiten Radikals (2) bei ebenfalls bekannten Hyperfeinkopplungen bestimmt werden soll, kann folgendermaßen vorgegangen werden: Zuerst wird (1) zusammen mit einem Radikalpaarpartner (P) vermessen, wobei die magnetischen Eigenschaften von (P) nicht bekannt sein müssen. Gemäß der gerade vorgestellten Argumentation kann somit ein zu den experimentellen Befunden „passender“ Parametersatz für (P) erzeugt werden. In einem zweiten Schritt erfolgt die Messung der Kombination (2) + (P), wobei nun der unbekannte g -Faktor des Radikals (2) berechnet werden kann. Dabei muss in beiden Messungen jeweils das gleiche Radikal als Ergebnis der Photoreaktionen gebildet werden, damit die im ersten Schritt ermittelten „hypothetischen“ Parameter von (P) bei der zweiten Messung verwendet werden können. Zu beachten ist dabei, dass die für (P) angesetzten Werte des g -Faktors bzw. der Hyperfeinkopplungen nicht den physikalisch korrekten Werten entsprechen müssen. Mit dieser Methode wird in Kapitel 4.2.3 der g -Faktor des anionischen Ketylradikals von 4-Carboxybenzophenon bestimmt.

Die Fehler der CIDNP-Intensitäten in der Feldabhängigkeit ergeben sich aus der Streuung der einzelnen Datenpunkte. Der Fehler für den g -Faktor ergibt sich aus dem Vergleich zwischen Simulation und Messdaten. Dabei wird der Fehler der Hyperfeinkopplungskonstanten auch berücksichtigt. Die Simulation wird jeweils für die kleinstmöglichen und größtmöglichen Hyperfeinkopplungskonstanten durchgeführt und aus dem Vergleich zwischen Simulation und Messdaten ergibt sich dann der Fehler für den g -Faktor.

3.3 Verwendete Programme

Zur Auswertung und Darstellung der Messdaten wurden die Programme Matlab⁸ (Matlab 7.1) und Origin⁹ (OriginPro 7.5) verwendet. Dabei wurden die vermessenen FIDs mit denen in der NMR gängigen Auswerteverfahren (Fouriertransformation, Phasierung usw.) zu den dargestellten NMR-Spektren weiterverarbeitet und durch Integration der einzelnen Linien die CIDNP-Intensitäten zum weiteren Vergleich gebildet.

Zur Anpassung der Korrelation der beobachteten CIDNP-Intensitäten mit den absoluten Hyperfeinkopplungen wurde die lineare Fittoolbox in Origin verwendet. Um die Raten der Folgeprozesse (degenerierter Elektronenaustausch und Kernspinrelaxation im radikalischen Zustand) abzuschätzen, wurde das in Kapitel 2.1.6 vorgestellte Gleichungssystem (Gleichung 2.29 und 2.30) mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Matlabscripts an die Datenpunkte angepasst.

Zur Bestimmung der chemischen Verschiebung δ und der skalaren j -Kopplung zwischen

⁸Firma: Mathworks; Sitz: Natick, Massachusetts (USA); <http://www.mathworks.de/>

⁹Firma: OriginLab Corporation; Sitz: Northampton, Massachusetts (USA); <http://www.originlab.com/>

den Kernen wurden die NMR-Spektren mit dem Programm Nuts¹⁰ (2D Version - 19990215) simuliert. Weiterhin konnten die Feldabhängigkeiten mit einem von K. Ivanov geschriebenen Programm [43] simuliert werden. Das Programm berechnet dabei nach dem in Kapitel 2.1.2 und 2.1.4 dargestellten Adrianmodell [17] für niederviskose Lösungen den Verlauf des CIDNP-Signals in Abhängigkeit vom Magnetfeld. Als Parameter werden dem Programm die g -Faktoren sowie die absoluten Hyperfeinkopplungen übergeben.

Um die in Kapitel 5 ermittelten absoluten Hyperfeinkopplungen vergleichen zu können, wurden dichtefunktionaltheoretische Berechnungen (DFT) von D. Pogocki (Institute of Chemistry and Nuclear Technology, Warschau) für die entsprechenden Substanzen durchgeführt [44]. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms Gaussian 03W, wobei die Geometrie unter Verwendung des B3LYP Funktionals [45] mit Basisset 6-31+G(d) [46] für schwere Atome optimiert wurde. Für die Berechnung der Hyperfeinkopplungskonstanten wurde das B3LYP Funktional und ESR-III Basisset [47] mit Erweiterung 6-311+G(2d) für Schwefelradikale verwendet. Weiterhin wurde das Lösungsmittel (Wasser) mit dem Model IEFPCM [48, 49, 50] berücksichtigt. Die Berechnungen wurden am Rechencluster der Universität Warschau durchgeführt.

3.4 Probenpräparation

Alle verwendeten Substanzen (Farbstoffe sowie Löscher) sind pulverförmig. Wenn nicht anders beschrieben, wird als Lösungsmittel D₂O mit 99,9% Deuterierungsgrad verwendet. Bei den hier vorgestellten CIDNP-Messungen besteht ein System immer aus zwei Substanzen (dem Farbstoffmolekül und dem Löscher (vgl. Kapitel 2.1.1)). Für beide Molekülsorten wird jeweils eine Stammlösung hergestellt, da das Pipettieren der Flüssigkeit präziser ist als das Abwiegen der Substanz. Insbesondere wenn Lösungen für CIDNP-Kinetiken verschiedener Konzentration hergestellt werden, ist es wichtig mit definiert unterschiedlichen Konzentrationen zu arbeiten. Die Konzentration des Farbstoffmoleküls wird durch seine lichtabsorbierenden Eigenschaften bestimmt. Dabei wird für eine gute Ausleuchtung der Probe mit einer optischen Dichte von etwa $OD \approx 1$ über die zu belichtende Wegstrecke gearbeitet. Bei der Belichtung von oben (zeitauflösendes Spektrometer) ist der Weg der auszuleuchtenden Probe etwa 17 mm und bei der Belichtung von der Seite (feldzyklisierendes Spektrometer) ist die Wegstrecke etwa 5 mm. Die Konzentration des Löschers wird so gewählt, dass eine möglichst große CIDNP-Polarisation erreicht wird.

Generell hat das Lösungsmittel einen Einfluss auf die an der Radikalpaarreaktion beteiligten Radikale sowie auf die Art des Ladungstransfers und damit den Verlauf der Reaktion. Damit hängen Radikalstruktur und Verlauf der Reaktion beim Arbeiten in wässriger Lösung von den pK_S -Werten sowohl der beteiligten diamagnetischen Moleküle als auch der Radikale ab (z.B. zu sehen in [51]). Um eine definierte Radikalsorte zu untersuchen,

¹⁰Firma: Acorn NMR Inc.; Sitz: Livermore, Kalifornien (USA); <http://www.acornnmr.com/nuts.htm>

wurde dabei im Allgemeinen bei einem pH-Wert weit weg von den jeweiligen pK_S -Werten ($|\text{pH} - pK_S| \geq 1$) gearbeitet. Der pH-Wert der Lösungen wurde durch Zugabe von DCl und NaOD eingestellt, wobei die Verschiebung durch den Deuteriumisotopeneffekt nicht korrigiert wurde [52] (so dass der pD-Wert der Lösung immer etwas höher als der angegebene pH-Wert ist).

Die Proben wurden direkt vor der Messung mit gasförmigen Stickstoff gespült, um den Sauerstoff aus der Probe zu entfernen, da dieser mit den entstandenen Radikalen reagieren kann.

Kapitel 4

Bestimmung von Hyperfeinkopplungskonstanten

Da die Ursache des CIDNP-Effektes, der Singulett-Triplett-Übergang eines Radikalpaares, durch die magnetischen Wechselwirkung innerhalb der Radikale beeinflusst wird, enthalten die CIDNP-Intensitäten und -Phasen Informationen über die magnetischen Eigenschaften der transienten Radikalpaarpartner (siehe Kapitel 2.1). Seit der Formulierung der entsprechenden Regeln durch Kaptein [53] (siehe Kapitel 2.1.3) wurde die Phase der CIDNP-Intensität bei bekannten g -Faktoren benutzt, um das Vorzeichen der Hyperfeinkopplung zu bestimmen (z.B. in [54]). Das CIDNP-Spektrum, welches direkt nach der Rekombination der Geminate-Paare aufgenommen wird, enthält sogar darüber hinausgehende Informationen. Wie in Kapitel 2.1.5 erläutert wurde, ist die einem Kern zugehörige CIDNP-Intensität direkt proportional zur Hyperfeinkopplungskonstante dieses Kernes, wenn entweder der Unterschied in den g -Faktoren beider Radikale sehr groß ist oder eine große Anzahl Kerne mit nicht verschwindender Hyperfeinkopplung vorliegt (siehe Kapitel 2.1.5). Damit ist es möglich aus der Analyse des CIDNP-Spektrums der Geminate-Paare die relativen und absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten der wechselwirkenden Partner zu ermitteln. Diese Methode bietet somit einen neuen Weg, um ESR-Parameter zu bestimmen.

In diesem Kapitel wird zunächst die Gültigkeit der theoretischen Überlegungen an einem Radikalpaar mit genau bekannten Hyperfeinkopplungskonstanten experimentell getestet. Zur besseren Überprüfung wurde dieselbe Messung dabei an verschiedenen Spektrometern mit unterschiedlicher Probenausleuchtung und Anregungswellenlänge durchgeführt. Zusätzlich wurde das gleiche System an einem dritten Spektrometer in Novosibirsk bei einem anderen Magnetfeld vermessen. Nach Validierung der Methode wird diese dann auf Systeme mit unbekannter Hyperfeinkopplung angewandt.

4.1 Überprüfung der Methode

Zur Validierung der Proportionalität zwischen CIDNP-Intensität und Hyperfeinkopplungskonstante des entsprechenden Kernes wurden die Systeme L-Tyrosin (Tyr) und Benzophe-

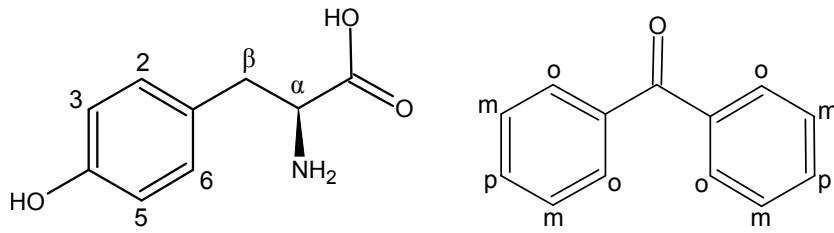
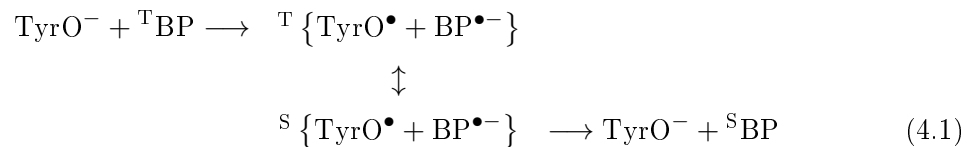


Abbildung 4.1: Struktur von *L*-Tyrosin (links) und Benzophenon (rechts).

non (BP) (Strukturen siehe Abbildung 4.1) ausgewählt, da hier die absoluten Hyperfeinkopplung aus ESR-Messungen bekannt sind [55, 56]. Weiterhin wurde diese Messung an zwei Spektrometern mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen und Probenausleuchtung (zeitauflösendes sowie feldzyklisierendes Spektrometer; siehe Kapitel 3.1 und 3.2) durchgeführt.

Da sich BP nur sehr schlecht in Wasser löst, wurde bei beiden Messungen mit einem Lösungsmittelgemisch aus Wasser und Acetonitril gearbeitet. Für die Messung am zeitauflösenden Spektrometer betrug das Volumenverhältnis deuteriertes Wasser zu deuteriertem Acetonitril 6:4, beim feldzyklisierenden Spektrometer 43:7. Vor Zugabe des Acetonitrils wurde der pH-Wert des Wassers auf 11,1 eingestellt, so dass der Phenolring des Tyrosins in seiner anionischen Form vorliegt. In diesem Fall ist der einzig mögliche Mechanismus zur Löschung des Triplettzustandes des BP ein Elektronentransfer zwischen den beiden Molekülen:



Die Radikale von Tyr und BP haben folgende magnetische Parameter:

TyrO^\bullet : $a_{\text{H}2} = a_{\text{H}6} = 0,15 \text{ mT}$, $a_{\text{H}3} = a_{\text{H}5} = -0,615 \text{ mT}$, $a_{\beta_1} = a_{\beta_2} = 0,77 \text{ mT}$, $g = 2,0041$ [55]

$\text{BP}^{\bullet-}$: $|a_p| = 0,350 \text{ mT}$, $|a_o| = 0,285 \text{ mT}$, $|a_m| = 0,104 \text{ mT}$, $g = 2,0035$ [56]

Ablauf und Auswertung der Messung erfolgte wie in Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben. In Abbildung 4.2 ist das CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare mit dem dazugehörigen NMR-Spektrum von Tyr mit BP dargestellt. CIDNP-Intensitäten können für die β -Protonen und die aromatischen Protonen H2, H3, H5, H6 von Tyr sowie für die aromatischen Ortho-, Para- und Metaprotonen von BP beobachtet werden. Dabei sind in Tyrosin die Protonen H2,6 sowie H3,5 äquivalent. Genauso existieren in BP drei Liniengruppen äquivalenter Protonen (Ortho, Para und Meta).

Aus den Phasen der CIDNP-Intensität der BP-Linien lassen sich mit Hilfe der Kap-

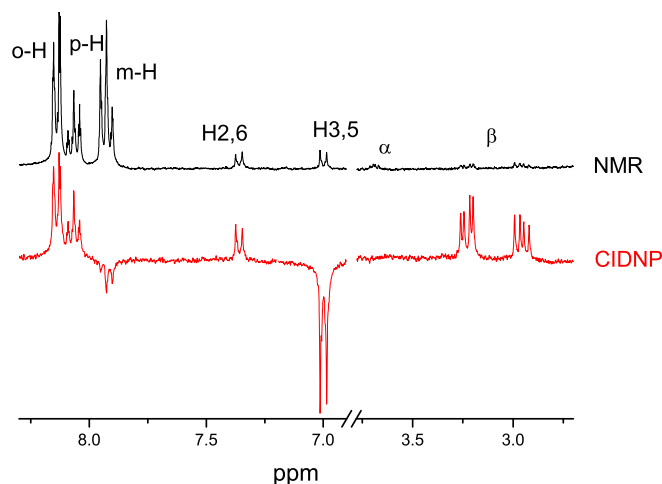


Abbildung 4.2: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum (rot) $0,5\ \mu\text{s}$ nach der Laseranregung von $2\ \text{mM}$ Tyr und $9\ \text{mM}$ BP in einem Gemisch aus deuteriertem Wasser und Acetonitril ($D_2O_{\text{pH}=11,1}$: $CD_3CN = 6:4$).

teinschen Regeln (Kapitel 2.1.3) die Vorzeichen der Hyperfeinkopplungen bestimmen. Aufgrund des hier negativen Vorzeichens von $\Delta g = g_{\text{BP}\cdot-} - g_{\text{TyrO}\cdot}$ [55, 56] müssen die absorptiven CIDNP-Signale der Ortho- und Paraprotonen negativen Hyperfeinkopplungskonstanten zugeordnet werden, während das emissive CIDNP-Multiplett der Metaprotonen einer positiven Hyperfeinkopplungskonstanten entspricht.

In Abbildung 4.3 sind die aus der Literatur bekannten Hyperfeinkopplungskonstanten ($a_{i,j}$) für die Messung am zeitaufgelösten Spektrometer bzw. am feldzyklisierenden Spektrometer in Abhängigkeit von der CIDNP-Intensitäten ($P_{i,j}$) aufgetragen. Der Verlauf beider Graphen wird sehr gut durch eine proportionale Funktion $P_i = Ca_i$ beschrieben. Die beste Anpassung an die Datenpunkte ist als durchgezogene Linie dargestellt. In Abbildung 4.3 oben beträgt der lineare Korrelationskoeffizient (R) 0,99911. Sein Quadrat entspricht etwa eins minus der quadratischen Abweichung von der Proportionalität ($R^2 = 1 - S^2$). Letztere beträgt in den in Abbildung 4.3 vorgestellten Ergebnissen nur 4%. Für die Messung am feldzyklisierenden Spektrometer (Abbildung 4.3 unten) beträgt der lineare Korrelationskoeffizient $R=0,99851$. Die Abweichung der Datenpunkte von der Linearität liegt somit ebenfalls bei etwa 4%.

In dem hier betrachteten Fall entspricht $\delta = \Delta g\mu_B B$ nur 4,2 mT. Damit ist die Bedingung $|\delta| \gg |A_i|$ im Allgemeinen nicht erfüllt (vgl. Kapitel 2.1.5). Trotzdem ist die Proportionalität zwischen Hyperfeinkopplungskonstanten und CIDNP-Intensitäten in beiden Messungen innerhalb der Messgenauigkeit sehr gut erfüllt.

Die theoretisch erwartete Abweichung von der Proportionalität S bzw. der Prozentsatz

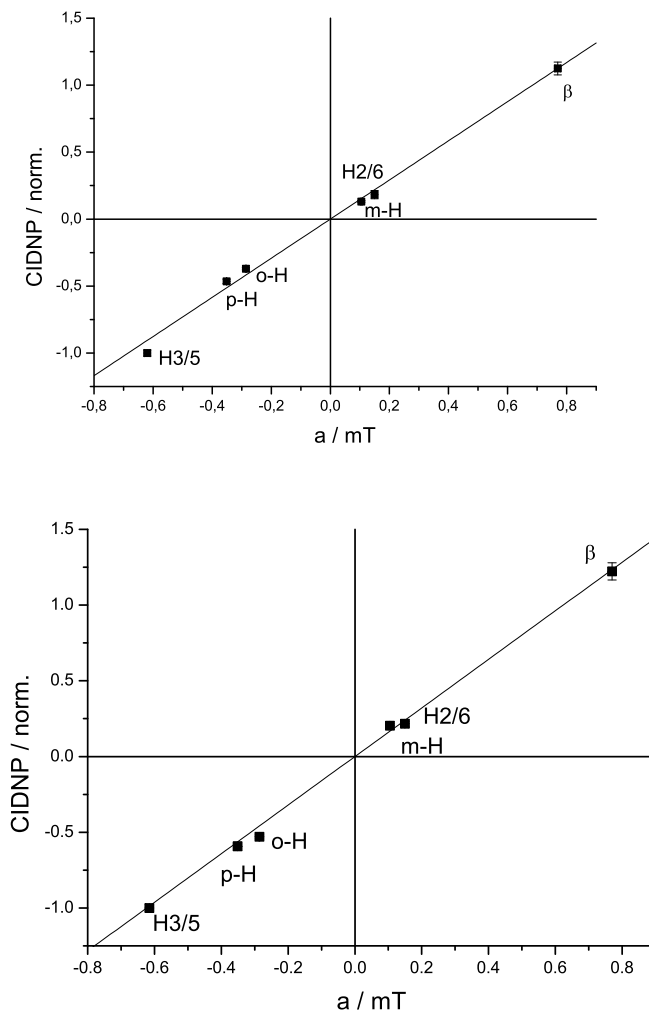


Abbildung 4.3: Korrelation der CIDNP-Intensitäten (P_i oder P_j) aus der Photoreaktion von Tyr und BP mit den entsprechenden Hyperfeinkopplungskonstanten (a_i oder a_j) des Tyrosyl- und des anionischen Benzophenonradikals bei einer Messung am zeitaufgelösten Spektrometer (oben) und am feldzyklisierenden Spektrometer (unten). Die durchgezogene Linie beschreibt jeweils die lineare Regression an die Daten mit $R=0,99911$ für oben und $R=0,99916$ für unten.

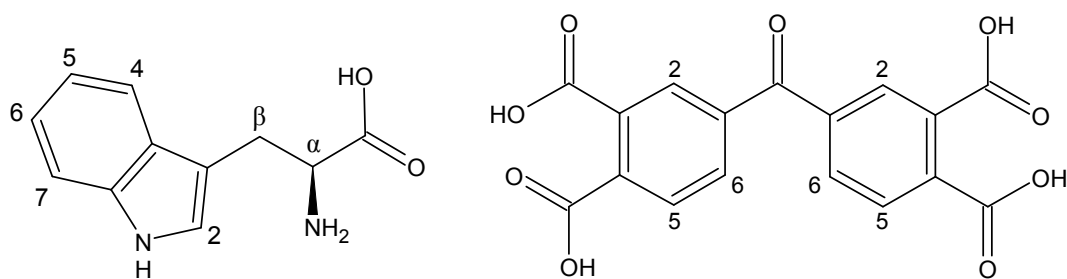


Abbildung 4.4: Struktur von *L*-Tryptophan (links) und 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon (rechts).

der „unerwünschten Fälle“ wird aus dem bekannten Wert für δ , der maximalen Hyperfeinkopplungskonstante ($a_{max} \approx 0,8 \text{ mT}$) und der Anzahl der Kerne mit nicht verschwindender Hyperfeinkopplung ($N \geq 16$) auf etwa 2% abgeschätzt (Berechnung vgl. Kapitel 2.1.5).

Damit ist experimentell nachgewiesen, dass die CIDNP-Intensitäten selbst bei kleinem δ proportional zu der entsprechenden Hyperfeinkopplungskonstanten sind, wenn genügend Hyperfeinkopplungen im betrachteten Radikalpaar existieren.

4.2 Anwendung der Methode auf weitere Systeme

In diesem Kapitel werden folgende Systeme (links) und radikalische Zwischenzustände (rechts) untersucht:

Tryptophan, 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon	(Trp ^{•+} , TCBP ^{•-})
Tyrosin, 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon	(TyrO [•] , TCBPH [•])
Tryptophan, 4-Carboxybenzophenon	(Trp ^{•+} , 4CBP ^{•-})
S-Methyl-L-Cystein, 4-Carboxybenzophenon	(Cys(Me) ^{•+} , 4CBP ^{•-})
Tyrosin, 4-Carboxybenzophenon	(TyrO [•] , 4CBPH [•])

4.2.1 Das kationische Tryptophanradikal

Die in deuteriertem Wasser bei pH 8,0 verwendeten Moleküle sind *L*-Tryptophan (Trp) und 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon (TCBP) (Strukturen siehe Abbildung 4.4). Unter diesen Bedingungen liegt Trp in seiner zwitterionischen Form vor und TCBP ist an den vier Carboxygruppen negativ geladen. Der übliche Reaktionsmechanismus von Trp mit einem im Triplettzustand angeregten Farbstoff über den gesamten pH-Bereich ist Elektronentransfer [25, 57]: Deshalb wird für die Reaktion von Trp mit TCBP derselbe Mechanismus angenommen:

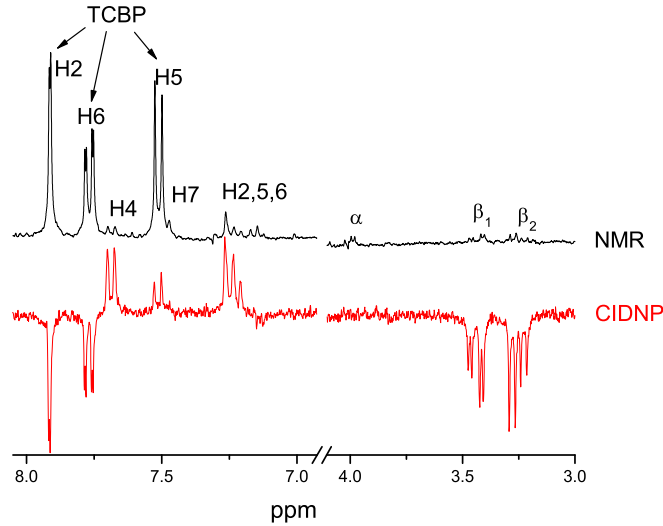
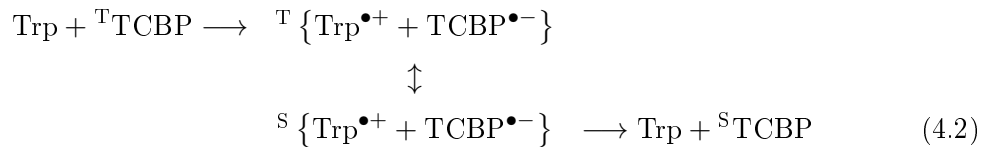


Abbildung 4.5: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum (rot) $0,5\mu\text{s}$ nach der Laseranregung von 1 mM Trp und 5 mM TCBP in deuteriertem Wasser bei $\text{pH } 8,0$.



In Abbildung 4.5 ist das CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare mit dem dazugehörigen NMR-Spektrum von Trp und TCBP aufgetragen. CIDNP-Signale sind für die aromatischen Protonen H2, H6 und H5 von TCBP sowie für die β - und aromatischen Protonen H4, H2, H5 und H6 von Trp zu sehen.

Aus [56] sind zwar die Beträge der Hyperfeinkopplungskonstanten von $\text{TCBP}^{\bullet-}$, nicht aber deren Vorzeichen bekannt. Mit Hilfe der Phasen des CIDNP-Spektrums und dem Unterschied in den g -Faktoren lassen sich diese unter Berücksichtigung der Kapteinschen Regeln bestimmen (Abschnitt 4.1). Da $g_{\text{TCBP}^{\bullet-}} = 2,0035 > g_{\text{Trp}^{\bullet+}} \sim 2,0028$ [56, 41, 58], weisen die mit den emissiven Signalen verknüpften Hyperfeinkopplungen (H2 und H6) ein negatives Vorzeichen und die dem absorptiven Signal zugeordnete Kopplung (H5) ein positives Vorzeichen auf.

Da in Abbildung 4.5 mindestens 13 Kerne (Trp: 7 Protonen polarisiert und TCBP: 6 Protonen polarisiert) eine nicht verschwindende Hyperfeinkopplung besitzen, kann angenommen werden, dass die CIDNP-Intensitäten proportional zu den entsprechenden Hyperfeinkopplungen sind. In Folge ist es möglich mit Hilfe der CIDNP-Intensitäten und der bekannten Hyperfeinkopplungen von $\text{TCBP}^{\bullet-}$ die entsprechenden Werte für das $\text{Trp}^{\bullet+}$

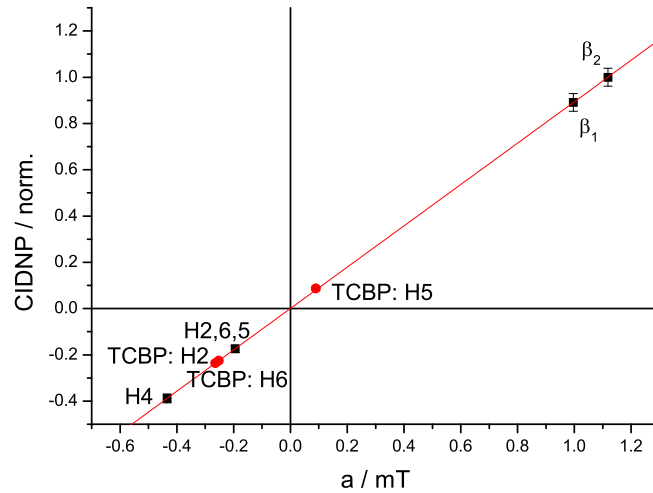


Abbildung 4.6: Korrelation der CIDNP-Intensitäten des TCBP (rot) mit der Hyperfeinkopplungskonstante a des $\text{TCBP}^{\bullet-}$ aus der Photoreaktion von Trp mit TCBP. Die durchgezogene Linie zeigt die lineare Regression ($R=0,99998$). Die Hyperfeinkopplungskonstanten von $\text{Trp}^{\bullet+}$ wurden mit Hilfe des Proportionalitätskoeffizienten aus den CIDNP-Intensitäten des Trp (schwarz) bestimmt.

zu bestimmen. In Abbildung 4.6 sind die CIDNP-Intensitäten des TCBP (rot) gegen die aus [56] bekannten Hyperfeinkopplungskonstanten des $\text{TCBP}^{\bullet-}$ aufgetragen, wobei die in [56] den falschen Kernen zugeordneten Hyperfeinkopplungen hier korrigiert wurden. Die durchgezogene Linie zeigt wiederum die lineare Regression der Daten von TCBP mit einem linearen Korrelationskoeffizient $R=0,99998$ ($< 1\%$ Abweichung). Aus dem daraus gewonnenen Proportionalitätskoeffizienten C können die Hyperfeinkopplungskonstanten des Tryptophanradikals berechnet werden ($a_j = -C^{-1}P_j$). Diese sind als schwarze Quadrate in der Grafik eingezeichnet aufgetragen.

Die Ergebnisse sowie die aus ESR-Messungen ermittelten Werte der Hyperfeinwechselwirkungen [59] sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Obwohl die hier bestimmten Kopplungskonstanten in derselben Größenordnung liegen wie die in [59] publizierten Werte, können Abweichungen beobachtet werden, welche allerdings keine Systematik aufweisen. Diese Unterschiede haben ihre Ursache in der geringen Genauigkeit der von Connor *et al.* verwendeten experimentellen Daten (rund 0,1 mT). Darüber hinaus wurde das ESR-Experiment unter Zugabe von 0,2 M H_2SO_4 und damit bei einem pH-Wert kleiner durchgeführt, wodurch der Protonierungszustand der Säuregruppe und somit das gebildete Radikal $\text{Trp}^{\bullet+}$ unterschiedlich ist.

Protonen	a/mT (diese Arbeit)	$ a /\text{mT}$ (aus [59])
H4	$-0,43 \pm 0,03$	0,54
$\frac{\text{H2} + \text{H5} + \text{H6}}{3}$	$-0,20 \pm 0,02$	0,26
β_1	$0,99 \pm 0,05$	0,71
β_2	$1,12 \pm 0,05$	1,07

Tabelle 4.1: Hyperfeinkopplungskonstanten des kationischen Tryptophanradikals $\text{Trp}^{\bullet+}$ bestimmt in dieser Arbeit sowie aus [59].

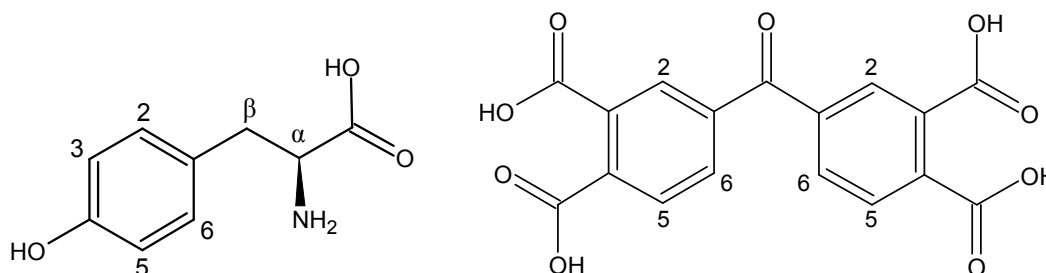


Abbildung 4.7: Struktur von *L*-Tyrosin (links) und 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon (rechts).

4.2.2 Das Ketylradikal von 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon

Zur Bestimmung des Ketylradikals von 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon wurden die Moleküle *L*-Tyrosin (Tyr) und 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon (TCBP) bei pH 7,0 vermessen (Strukturen siehe Abbildung 4.7). Unter diesen Bedingungen liegt Tyr in seiner zwitterionischen Form vor und TCBP ist an den vier Carboxygruppen jeweils einfach negativ geladen.

In neutralen Lösungen besteht die Möglichkeit, dass Tyr, anstatt ein Elektron abzugeben, das Wasserstoffatom der OH-Gruppe des Phenylrings abspaltet. Wenn dies der Fall ist, so wird anstelle des $\text{TCBP}^{\bullet-}$ das neutrale Ketylradikal TCBPH^{\bullet} als Zwischenprodukt erwartet. Abhängig vom Radikalpartner und pH-Wert konnten bisher beide Mechanismen beobachtet werden [57, 60]. Wenn unter den hier vorliegenden Bedingungen ein Elektronentransfer auftreten sollte, so wäre ein weiteres mögliches Testsystem zur Verifikation der Methode gefunden, da die Hyperfeinkopplungen von $\text{TCBP}^{\bullet-}$ und TyrO^{\bullet} bekannt sind [55, 56]. Zwar wird in Folge der Photoreaktion zunächst ein $\text{TyrOH}^{\bullet+}$ gebildet, dieses deprotoniert auf Grund des niedrigen pK_s -Wertes ($\text{pK}_s \sim -2$) [61, 62] in wässrigen Lösungen jedoch schnell gegenüber der Radikalpaarlebenszeit [60, 63].¹ Wird stattdessen ein

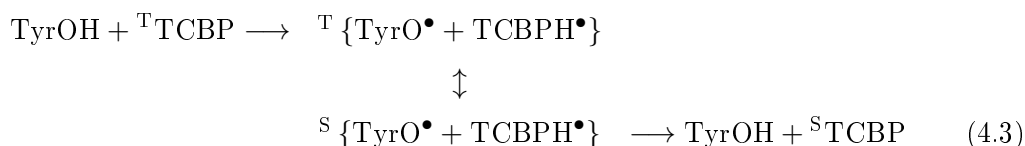
¹Dies bedeutet, dass die CIDNP-Polarisation des Radikalpaares unabhängig vom Reaktionsmechanismus immer mit TyrO^{\bullet} gebildet wird.

Wasserstoffatom abgegeben, entsteht dabei das neutrale Ketylradikal TCBPH^\bullet , welches möglicherweise eine im Vergleich zum $\text{TCBP}^{\bullet-}$ unterschiedliche Spindichteverteilung und damit unterschiedliche Hyperfeinkopplungskonstanten aufweist.

Tatsächlich existieren Indizien für das Vorliegen eines Wasserstofftransfers. Ein erstes Argument findet sich beim Vergleich der beiden Abbildungen 4.9 und 4.10. In Abbildung 4.10 sind die gemessenen CIDNP-Intensitäten des Farbstoffes gegen die bekannten Hyperfeinkopplungskonstanten von $\text{TCBP}^{\bullet-}$ aufgetragen, wobei die Abweichung der linearen Regression von den Daten mit ca. 10% relativ groß ist. Im Gegensatz dazu beträgt der entsprechende Fehler beim Vergleich der CIDNP-Intensitäten mit den Hyperfeinkopplungskonstanten des Tyrosylradikals (Abbildung 4.9) weniger als 1%. Die Proportionalitätsrelation ist für das Tyrosylradikal somit sehr gut erfüllt, während dies beim anionischen Radikal des TCBP nicht der Fall ist. Dies läßt nur den Schluss zu, dass in dieser Photoreaktion ein anderes Radikal des TCBP gebildet wurde.

Ein weiterer Hinweis für einen Wasserstofftransfer zwischen den Reaktionspartnern ist die Tatsache, dass in basischer Lösung ($\text{pH} > 11$) kein CIDNP-Signal für das betrachtete System beobachtet werden konnte. Da das Proton der OH-Gruppe des Phenolrings bei hohen pH-Werten abgegeben wird, kann der Triplettzustand für pH-Werte oberhalb des pK_S -Wertes des Phenolrings des Tyr ($\text{pK}_\text{S} = 10,1$) nur durch Elektronentransfer vom TyrO^- gelöscht werden. Da dies nicht beobachtet wird, kann Elektronentransfer ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann demnach geschlussfolgert werden, dass höchstwahrscheinlich ein Wasserstofftransfer zwischen den Reaktionspartnern vorliegt:



In Abbildung 4.8 ist das CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare mit dem dazugehörigen NMR-Spektrum von Tyr mit TCBP bei pH 7,3 dargestellt. CIDNP-Intensitäten können für die β -Protonen und die aromatischen Protonen von Tyr (H2, H3, H5, H6) und von TCBP (H2, H5, H6) beobachtet werden.

Obwohl der g -Faktor von TCBPH^\bullet nicht bekannt ist, folgt aus der CIDNP-Phase der Tyrosinlinien:

$$g_{\text{TCBPH}^\bullet} < g_{\text{TyrO}^\bullet} = 2,0041 \text{ [55]}$$

Mit Hilfe der Kapteinschen Regeln lassen sich die absorptiven CIDNP-Signale der H2 und H6 Protonen zu negativen Hyperfeinkopplungskonstanten und das emissive CIDNP-Signal der H5 Protonen zu einer positiven Hyperfeinkopplungskonstante zuordnen.

Da im betrachteten System mindestens 12 Kerne (Tyr: 6 Protonen polarisiert und

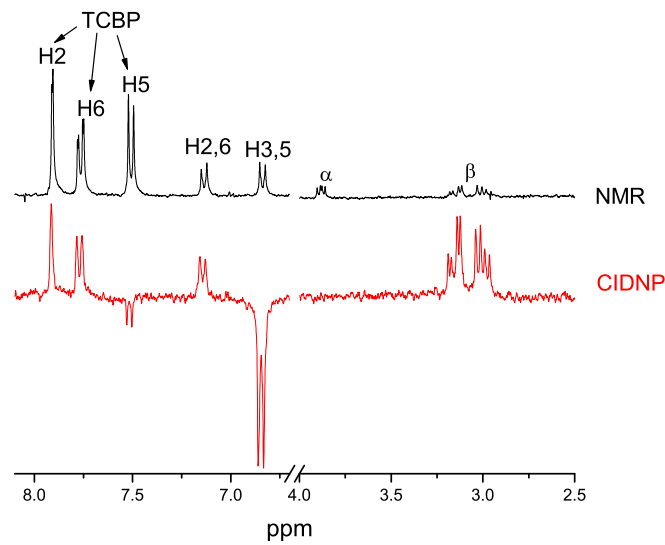


Abbildung 4.8: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum (rot) $0,5\mu\text{s}$ nach der Laseranregung von 2 mM Tyr und 5 mM TCBP in deuteriertem Wasser bei $\text{pH } 7,3$.

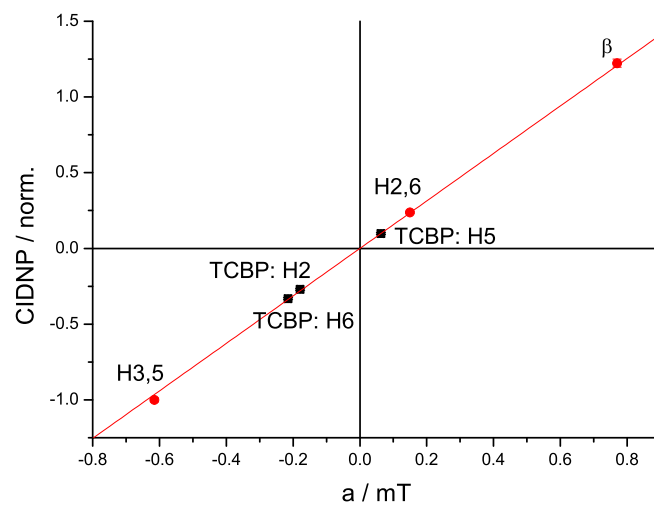


Abbildung 4.9: Korrelation der CIDNP-Intensitäten des Tyr mit der Hyperfeinkopplungskonstante a des Tyrosylradikals aus der Photoreaktion von Tyr mit TCBP (rot). Die durchgezogene rote Linie zeigt die lineare Regression ($R = 0,99997$). In schwarz als Quadrate sind die CIDNP-Intensitäten des TCBP gegen die hier berechneten Hyperfeinkopplungskonstanten von TCBPH^\bullet aufgetragen.

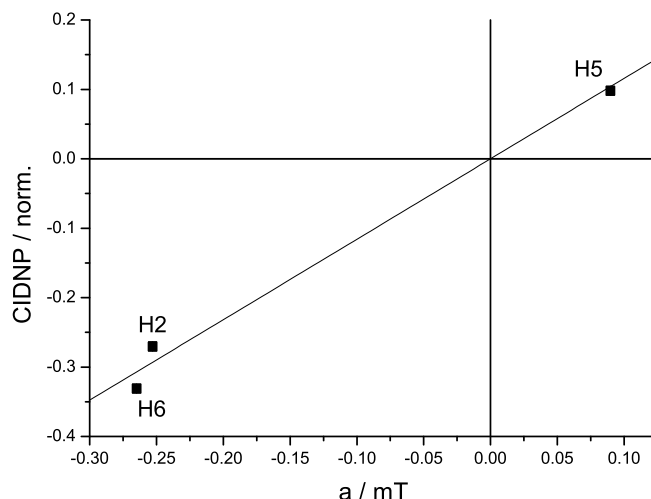


Abbildung 4.10: Korrelation der CIDNP-Intensitäten mit den Hyperfeinkopplungskonstanten a aus der Photoreaktion von 2 mM Tyr und 5 mM TCBP. Aufgetragen sind nur die Daten von TCBP gegen die bekannten Hyperfeinkopplungskonstanten des anionischen TCBP-Radikals $\text{TCBP}^{\bullet-}$. Die durchgezogene Linie zeigt die beste Anpassung einer linearen Funktion ($R = 0,9948$).

TCBP: 6 Protonen polarisiert) eine nicht verschwindende Hyperfeinkopplung besitzen, kann wiederum angenommen werden, dass die CIDNP-Intensitäten proportional zu den entsprechenden Hyperfeinkopplungen sind und damit ist es möglich die Kopplungen für TCBPH^{\bullet} zu bestimmen. Durch lineare Regression der aufgetragenen CIDNP-Intensitäten der Tyrosinlinien kann der Proportionalitätskoeffizient bestimmt werden. Durch diese Kalibrierung erhält man folgende Hyperfeinkopplungskonstanten für das Ketylradikal TCBPH^{\bullet} :

$$a_{\text{H5}} = 0,06 \pm 0,01 \text{ mT} \quad a_{\text{H6}} = -0,23 \pm 0,01 \text{ mT} \quad a_{\text{H2}} = -0,19 \pm 0,01 \text{ mT}$$

4.2.3 Das Radikalanion von 4-Carboxybenzophenon

Da in Kapitel 4.2.1 die Hyperfeinkopplungen des kationischen Tryptophanradikals bereits ermittelt wurden, lassen sich nun diese Resultate für die Bestimmung der unbekanntnen Hyperfeinkopplung des anionischen 4-Carboxybenzophenonradikals benutzen.

Die Messungen wurden mit L-Tryptophan und 4-Carboxybenzophenon (Strukturen siehe Abbildung 4.11) in deuteriertem Wasser (pH 7,8) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen liegt Trp in seiner zwitterionischen Form vor und 4CBP ist an seiner Carboxygruppe einfach negativ geladen. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 für die Reaktion mit TCPB wird auch hier von Elektronentransfer als Reaktionsmechanismus ausgegangen, da dies das über den gesamten pH-Bereich bekannte Verhalten von Trp in Kombination mit einem im Tri-

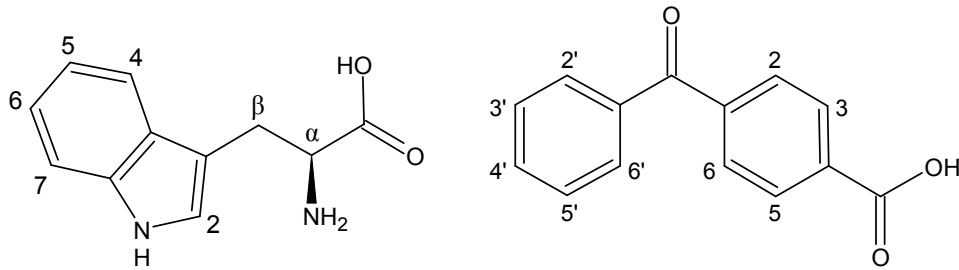


Abbildung 4.11: Struktur von *L*-Tryptophan (links) und 4-Carboxybenzophenon (rechts).

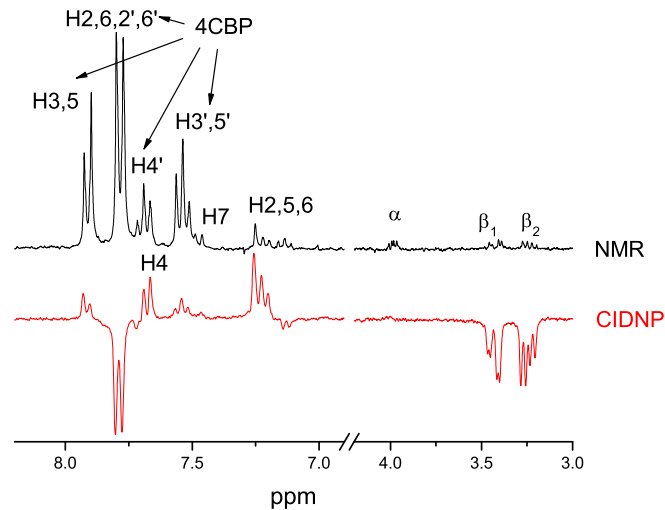
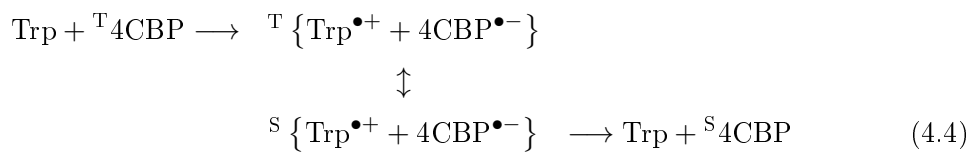


Abbildung 4.12: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum (rot) 0,5 μ s nach der Laseranregung von 1 mM Trp und 5 mM 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 7,8.

plettzustand angeregten Farbstoff ist [25, 57] (vgl. Kapitel 4.2.1).



In Abbildung 4.12 ist das CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare und das dazugehörige NMR-Spektrum dargestellt. CIDNP-Signale sind für die H4, H2, H5, H6 und die β -Protonen des Tryptophanradikals sowie für die aromatischen H2, H3, H5, H6, H2', H6', H3', H5' und H4' des Carboxyradikals zu erkennen. Da die H4-Linie des Tryptophans mit der H4'-Linie des 4CBP überlappt, kann dieses Signal zur Kalibration nicht benutzt und die entsprechende Hyperfeinkopplung damit nicht bestimmt werden. Aus den Phasen der

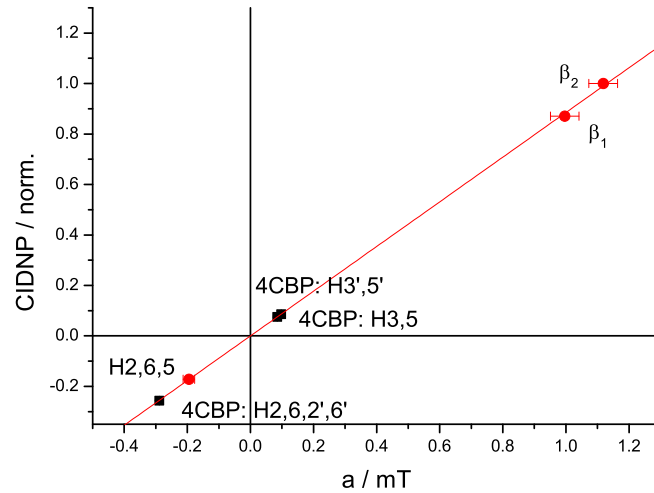


Abbildung 4.13: Korrelation der CIDNP-Intensitäten des Trp (rot) mit der Hyperfeinkopplungskonstante a des kationischen Tryptophanradikals aus der Photoreaktion von Trp mit 4CBP. Die durchgezogene Linie zeigt die lineare Regression ($R = 0,99986$). In Schwarz als Quadrate sind die CIDNP-Intensitäten des 4CBP gegen die hier berechneten Hyperfeinkopplungskonstanten von $4\text{CBP}^{\bullet-}$ aufgetragen.

Tryptophanlinien erhält man:

$$g_{4\text{CBP}^{\bullet-}} > g_{\text{Trp}^{\bullet+}} \approx 2,0028 [41, 58]$$

Damit können die emissiven CIDNP-Multipletts (H3,5; H3',5') des 4CBP einer positiven Hyperfeinkopplungskonstanten und die absorptiven (H2,6,2',6'; H4') einer negativen zugeordnet werden.

Insgesamt besitzen im betrachteten System mindestens 17 Kerne (Trp: 7 Protonen polarisiert und 4CBP: 10 Protonen polarisiert) eine nicht verschwindende Hyperfeinkopplung. Damit kann auch hier angenommen werden, dass die CIDNP-Intensitäten proportional zu den entsprechenden Hyperfeinkopplungen sind und diese können benutzt werden um die unbekannt Hyperfeinkopplungen für $4\text{CBP}^{\bullet-}$ zu bestimmen. In Abbildung 4.13 sind die CIDNP-Intensitäten des Tryptophan (rot) gegen die in Kapitel 4.2.1 bestimmten Hyperfeinkopplungskonstanten aufgetragen. Mit dem Proportionalitätsfaktor, der mit einem Fehler kleiner 2% bestimmt wurde, erhält man folgende Hyperfeinkopplungskonstanten für $4\text{CBP}^{\bullet-}$:

$$a_{\text{H}3,5} = 0,085 \pm 0,005 \text{ mT} \quad a_{\text{H}2,6,2',6'} = -0,289 \pm 0,005 \text{ mT} \quad a_{\text{H}3',5'} = 0,097 \pm 0,006 \text{ mT}$$

Da die Hyperfeinkopplungskonstante für das H4'-Proton von $4\text{CBP}^{\bullet-}$ hier nicht bestimmt werden konnte, muss dies durch die Messung eines weiteren Systems geschehen.

Hierbei bietet sich L-Tyrosin in basischer Lösung als Radikalpaarpartner an, da in diesem pH-Bereich nur Elektronentransfer zwischen den Reaktionspartnern möglich ist und die Hyperfeinkopplungskonstante des Tyrosylradikals bekannt sind. Bei Messungen mit unterschiedlichen Laserleistungen wurde allerdings beobachtet, dass sich die Verhältnisse der CIDNP-Intensitäten von 4CBP zu denen von Tyr ändern. Dieses Verhalten ist charakteristisch für auftretende Zweiphotonenprozesse. Des Weiteren erfolgt die Änderung des CIDNP-Signals als Funktion der Anzahl der Laserblitze für die Linien des 4CBP deutlich schneller als für die Tyrosinlinien (Faktor 3-4) und nach der Bestrahlung wurden neue Linien im NMR-Spektrum beobachtet, was auf zusätzliche Reaktionen im System schließen lässt.

Zweiphotonenprozesse von 4CBP in basischen Lösungen wurden schon in [56] beobachtet, wo 4CBP durch Absorption von zwei Photonen und Abgabe eines Elektrons zum Kation ($4\text{CBP}^{\bullet+}$) angeregt wurde und danach unter Aufnahme eines OH^- hauptsächlich zum Cyclohexadienylradikal weiterreagierte. Diese Substanz absorbiert Licht, wodurch sich der Unterschied in den Ausbleichkurven erklären lässt. Da die CIDNP-Intensitäten auch durch andere Reaktionen als der Radikalpaarreaktion, nämlich durch Zweiphotonenprozesse und deren Folgereaktion, beeinflusst sind, ist es folglich nicht möglich mit diesem System Hyperfeinkopplungen zu bestimmen.

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft wurde, dass bei den Messungen mit 4CBP in Lösungen mit neutralem pH-Wert (wie z. B. bei der Messung mit Trp bei pH 7,8) keine Zweiphotonenprozesse stattfinden.

Da in der Literatur kein geeigneter Reaktionspartner (bekannte Hyperfeinkopplungskonstanten, Elektronentransfer mit ^T4CBP) beschrieben ist, musste ein anderer Weg eingeschlagen werden um die Hyperfeinkopplungskonstante für das H4'-Proton von $4\text{CBP}^{\bullet-}$ zu ermitteln. Wenn als Reaktionspartner des 4CBP-Radikals S-Methyl-L-Cystein (mit unbekanntem Hyperfeinkopplungen) ausgewählt wird, dann sind alle relevanten Signale im CIDNP-Spektrum sichtbar und es treten keine Überlappung mit anderen NMR-Linien auf. Damit lassen sich die relativen Hyperfeinkopplungen für alle Protonen des 4CBP bestimmen. Da gleiche Radikale die gleichen relativen Hyperfeinkopplungen besitzen, ist es möglich durch Vergleich der bekannten drei absoluten Hyperfeinkopplungen aus der Messung mit Trp mit den CIDNP-Intensitäten aus der Messung mit S-Methyl-L-Cystein die unbekannte absolute Hyperfeinkopplung zu berechnen. Die Struktur von S-Methyl-L-Cystein und das CIDNP-Spektrum aus der Reaktion von 4CBP mit diesem Partner sind in Kapitel 5.1 dargestellt, wo auch ausführlich auf die Radikalstruktur und die Radikalreaktion der Substanz eingegangen wird. In Abbildung 4.14 sind nun die relativen Hyperfeinkopplungskonstanten von 4CBP aus der Messung mit S-Methyl-L-Cystein gegen die bereits aus der Messung mit Tryptophan bestimmten absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten aufgetragen (rote Punkte). Die gemessene CIDNP-Intensität der H4'-Liniengruppe des Farbstoffes aus der Messung mit S-Methyl-L-Cystein wird (als schwarzes Quadrat) auf die zuvor ermit-

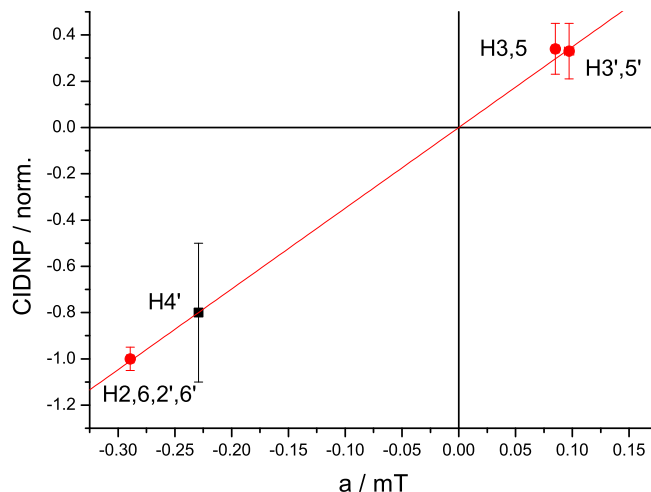


Abbildung 4.14: Korrelation der relativen CIDNP-Intensitäten aus der Reaktion von *S*-Methyl-*L*-Cystein mit 4CBP mit der Hyperfeinkopplungskonstante a aus der Photoreaktion von Trp mit 4CBP (rot). Die durchgezogene Linie zeigt die beste Anpassung durch die Funktion $P_i = Ca_i$ an die Daten ($R = 0,99943$). Die Hyperfeinkopplungskonstante des $H_{4'}$ Protons von 4CBP \bullet^- wurde mit $a_j = -C^{-1}P_j$ berechnet und als schwarzes Quadrat in den Graph eingezeichnet.

telte Ausgleichsgrade gesetzt und damit die Hyperfeinkopplung dieses Kernes bestimmt:

$$a_{H_{4'}} = (-0,23 \pm 0,12) \text{ mT}$$

Trotz des verhältnismäßig hohen Fehlers dieses Wertes (aufgrund des kleinen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses aus der Messung mit *S*-Methyl-*L*-Cystein) war es möglich auch für diesen Kern die Hyperfeinkopplungskonstante abzuschätzen. Eine Übersicht über alle ermittelten Hyperfeinkopplungen des Radikalanions von 4-Carboxybenzophenon befindet sich in Tabelle 4.2 auf Seite 65 am Ende des Kapitels.

Bestimmung des g -Faktors des Radikalanions von 4-Carboxybenzophenon

Die Intensität des detektierten CIDNP-Signals ist eine Funktion der Stärke des anliegenden Magnetfeldes, wobei die genaue Art dieser Verknüpfung vom Unterschied der g -Faktoren der beiden Radikalpartner sowie ihren Hyperfeinkopplungen abhängt. Daher ist es möglich aus den Feldabhängigkeiten bei bekannten Hyperfeinkopplungen und Kenntnis eines g -Faktors den entsprechenden Wert des Partners zu bestimmen (siehe Kapitel 2.1.4 und 3.2.3). Der g -Faktor von 4CBP \bullet^- wurde daher über die Messungen mit *S*-Methyl-*L*-Cystein (als „Brückenglied“) abgeschätzt (siehe Kapitel 3.2.3 auf Seite 41). Dafür wurde zuerst *S*-Methyl-*L*-Cystein mit TCBP und danach *S*-Methyl-*L*-Cystein mit 4CBP untersucht. Da Hyperfeinkopplungen und g -Faktor des TCBP \bullet^- bekannt sind [56], lässt sich aus der ersten

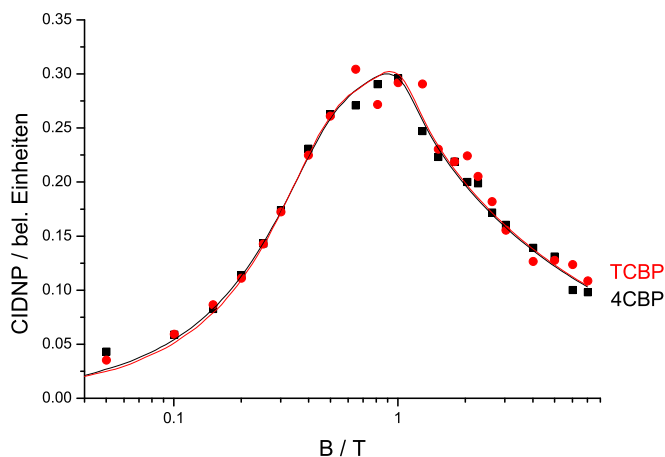


Abbildung 4.15: Magnetfeldabhängigkeit der normierten CIDNP-Intensitäten des γ -Protons von Methylcystein aus der Reaktion mit 4CBP (schwarz) bzw. mit TCBP (rot) sowie Simulation derselben (durchgezogene Linien) mit Hilfe des Adrianmodells.

Messung ein passendes g -Faktor-Hyperfeinkopplungspaar für S-Methyl-L-Cystein bestimmen. Dieses kann dann in der zweiten Messung benutzt werden, um mit Hilfe der oben bestimmten absoluten Hyperfeinkopplung des $4\text{CBP}^{\bullet-}$ den g -Faktor desselben zu berechnen. Der Messablauf und die Methodik der Auswertung dieses Ansatzes sind ausführlich in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben.

Beide aufgetragenen Feldabhängigkeiten (Abbildung 4.15) stimmen überein. Auf Grund der ähnlichen Hyperfeinkopplungskonstanten beider Farbstoffe müssen daher auch die g -Faktoren nahe beieinander liegen. Durch die Simulation beider Kurven ergibt sich:

$$g_{4\text{CBP}^{\bullet-}} = 2,0034 \pm 0,0006$$

Dies entspricht im wesentlichen den Resultaten für andere Benzophenonderivate ($g_{\text{TCBP}^{\bullet-}} = 2,0035 \pm 0,0006$, $g_{\text{BP}^{\bullet-}} = 2,0033 \pm 0,0004$ aus [56]).

4.2.4 Das Ketylradikal von 4-Carboxybenzophenon

Zur Charakterisierung des Ketylradikals von 4-Carboxybenzophenon (4CBP) wurden die Systeme L-Tyrosin und 4CBP (Strukturen siehe Abbildung 4.16) in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 7,2 untersucht. Tyr befindet sich somit in seiner zwitterionischen Form, während 4CBP an seiner Carboxygruppe einfach negativ geladen ist [64].

Wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben wurde, kommen als Reaktionsmechanismen zur Triplettlöschung des 4CBP entweder Elektronen- oder Wasserstofftransfer in Frage, da beide Reaktionen bereits an Tyr beobachtet wurden [57, 60, 62]. Da das bei Elektronentransfer

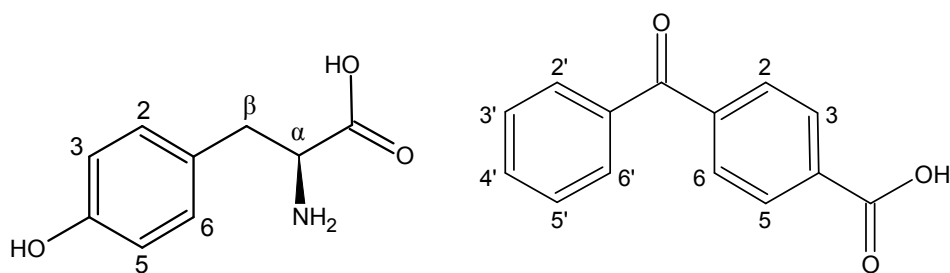


Abbildung 4.16: Struktur von *L*-Tyrosin (links) und 4-Carboxybenzophenon (rechts).

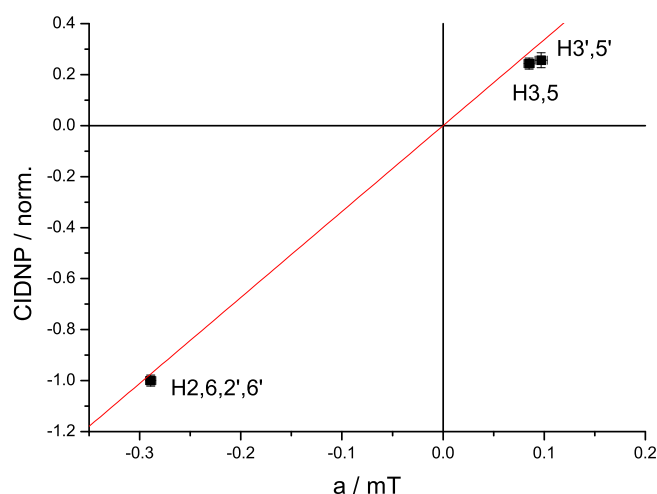


Abbildung 4.17: Korrelation der CIDNP-Intensitäten von 4CBP aus der Photoreaktion von Tyr mit 4CBP mit den in Abschnitt 4.2.3 bestimmten Hyperfeinkopplungskonstanten a des anionischen 4CBP-Radikals ($4CBP^{\bullet-}$). Die durchgezogene Linien zeigen die besten Anpassungen durch die Funktionen $P_i = Ca_i$ (rot).

entstehende $\text{TyrOH}^{\bullet+}$ in wässrigen Lösungen schnell gegenüber der Radikalpaarlebenszeit deprotoniert, wird die CIDNP-Polarisation unabhängig vom Reaktionsmechanismus mit TyrO^{\bullet} gebildet (vgl. Abschnitt 4.2.2). Damit können die bekannten Hyperfeinkopplungen des TyrO^{\bullet} unabhängig vom tatsächlich vorliegenden Reaktionsmechanismus als Kalibrationsdienen [55]. Wenn Elektronentransfer zwischen den Radikalpartnern stattfindet, müssen die bestimmten Hyperfeinkopplungskonstanten des Farbstoffes denen aus Abschnitt 4.2.3 entsprechen. Sollte dies nicht der Fall sein, so können entweder noch andere Reaktionen außer der primären Radikalpaarreaktion stattfinden oder durch z. B. Wasserstofftransfer ein anderes Radikal des 4CBP vorliegen.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung sind in Abbildung 4.17 die gemessenen CIDNP-Intensitäten des Farbstoffes gegen die aus Abschnitt 4.2.3 bestimmten Hyperfeinkopplungs-

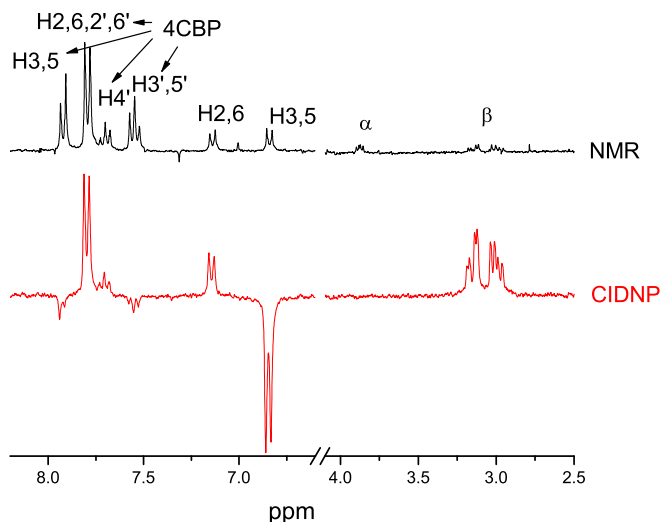
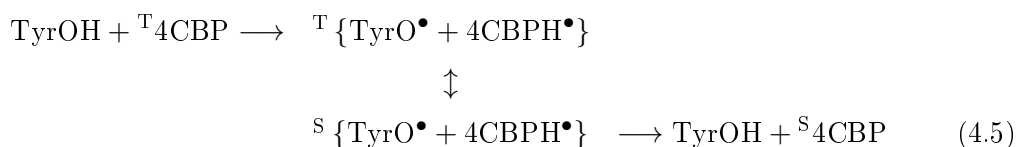


Abbildung 4.18: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum (rot) $0,5 \mu\text{s}$ nach der Laseranregung von 2 mM Tyr und 5 mM 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 7,2.

konstanten des $4\text{CBP}^{\bullet-}$ aufgetragen. Die rote Regressionsgrade zeigt die beste Anpassung mit der Funktion $P_i = Ca_i$ (direkte Proportionalität). Alle Datenpunkte haben einen signifikant geringeren Messfehler als der Abstand zur Ausgleichsgraden. Außerdem weichen alle Werte systematisch in eine Richtung ab. Das Vorliegen eines systematischen Fehlers bei der Intensitätsbestimmung aufgrund einer inkorrekten Definition der Nullpunktlinie des Spektrums wurde überprüft und kann ausgeschlossen werden. Die CIDNP-Intensitäten sind somit eindeutig nicht zu den Hyperfeinkopplungen des $4\text{CBP}^{\bullet-}$ proportional. Als mögliche Ursachen dieser Beobachtung kommen die Beeinflussung der CIDNP-Intensität durch zusätzlich auftretende Reaktionen oder die Bildung unterschiedlicher Radikale in beiden verglichenen Messungen in Frage. Da in den Experimenten keinerlei Anzeichen für weitere Reaktionen gefunden wurden², wird als Mechanismus der untersuchten Wechselwirkung das Auftreten von Wasserstofftransfer zwischen den Radikalpartnern angenommen:



In Abbildung 4.18 ist das NMR- und CIDNP-Spektrum der Geminate-Paare von Tyr und 4CBP bei pH 7,2 dargestellt. Polarisation kann bei den typischen Tyrosinlinien (β ;

²z.B. ist die Abhängigkeit des CIDNP-Signals von der Anzahl der Laserblitze für beide Radikalpartner identisch.

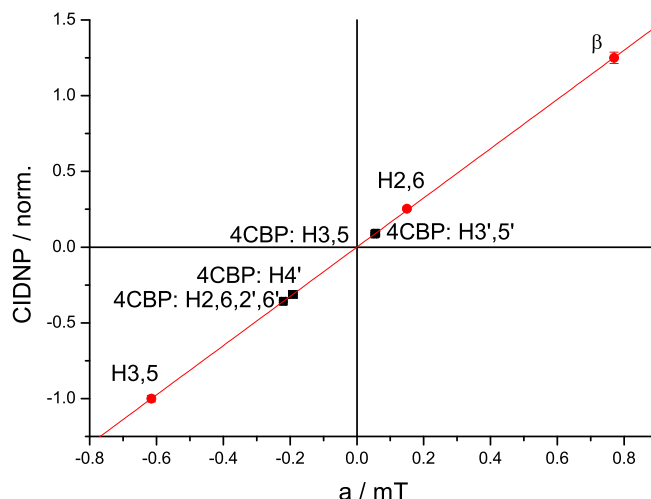


Abbildung 4.19: Korrelation der CIDNP-Intensitäten von Tyr (rot) mit den Hyperfeinkopplungskonstanten a des Tyrosylradikals aus der Photoreaktion von Tyr mit 4CBP. Die durchgezogene Linie zeigt die beste Anpassung durch die Funktion $P_i = Ca_i$ an die Daten ($R = 0,99998$). In schwarz als Quadrate sind die CIDNP-Intensitäten des TCBP gegen die hier bestimmten Hyperfeinkopplungskonstanten von 4CBPH \bullet aufgetragen.

H2,6; H3,5) und bei den aromatischen Protonen des Ketylradikals des 4CBP (H3,5; H2,6,2',6'; H4'; H3',5') beobachtet werden. Wegen der Polarisationsphase der Tyrosinlinien muss

$$g_{4CBPH\bullet} < g_{TyrO\bullet} = 2,0041 \text{ [55]}$$

gelten. Folglich besitzen die emissiven CIDNP-Signale der H2,6,2',6' und der H4' Protonen negative Hyperfeinkopplungskonstanten und die absorptiven Signale der H3,5 und der H3',5' entsprechend positive Werte.

Insgesamt besitzen im betrachteten System mindestens 16 Kerne (Trp: 6 Protonen polarisiert und 4CBP: 10 Protonen polarisiert) eine nicht verschwindende Hyperfeinkopplung. Damit kann auch hier angenommen werden, dass die CIDNP-Intensitäten proportional zu den entsprechenden Hyperfeinkopplungen sind und diese benutzt werden können, um die unbekanntes Hyperfeinkopplungen des 4CBPH \bullet zu bestimmen. Durch lineare Regression der Polarisierung der Tyrosinlinien an die bekannten Hyperfeinkopplungskonstanten lässt sich der Proportionalitätskoeffizient bestimmen (siehe Abbildung 4.19), wodurch sich die Hyperfeinkopplungskonstanten für das neutrale Ketylradikal 4CBPH \bullet ergeben:

$$\begin{aligned} a_{H3,5} &= 0,054 \pm 0,005 \text{ mT} & a_{H2,6,2',6'} &= -0,192 \pm 0,014 \text{ mT} \\ a_{H4'} &= -0,220 \pm 0,006 \text{ mT} & a_{H3',5'} &= 0,057 \pm 0,007 \text{ mT}. \end{aligned}$$

Da sich die Hyperfeinkopplungskonstanten signifikant von denen des in Abschnitt 4.2.3

bestimmten $4\text{CBP}^{\bullet-}$ unterscheiden, ergibt sich ein weiteres Indiz für das Auftreten von Wasserstofftransfer zwischen den beiden Partnern. Die hier ermittelten Hyperfeinkopplungswerte müssen somit dem Radikal 4CBPH^{\bullet} zugeordnet werden.

4.3 Zusammenfassung

In Kapitel 2.1 wurden theoretische Überlegungen vorgestellt, wonach die CIDNP-Intensität unter bestimmten Bedingungen proportional zur Hyperfeinkopplungskonstante des entsprechenden Kernes ist. Dies gilt nicht nur, wenn $|\Delta g\mu_B B|$ sehr viel größer als der Hyperfeinkopplungsterm ist, sondern auch, wenn viele Kerne eine nicht verschwindende Hyperfeinkopplung besitzen. Hier wurden diese theoretischen Überlegungen zuerst an einem System mit sehr genau bekannten Kopplungskonstanten überprüft. Dabei konnte die erwartete Proportionalität der CIDNP-Intensität zur Hyperfeinkopplungskonstante nicht nur innerhalb eines Radikals sondern auch für seinen Radikalpartner bestätigt werden. Für das Testsystem (L-Tyrosin und Benzophenon) wurden an drei unterschiedlichen Spektrometern konsistente Ergebnisse erhalten, wobei die dritte Messung in Nowosibirsk³ an einem bei 4,7 T arbeitenden Spektrometer bei einer Laserwellenlänge von 308 nm erfolgte [65]. Die Abweichung von der Proportionalität ist für alle Messungen kleiner gleich 4% und liegt damit im Bereich des Messfehlers.

Wenn die CIDNP-Intensitäten proportional zu den Hyperfeinkopplungskonstanten sind, können daraus nicht nur relative, sondern auch absolute Hyperfeinkopplungskonstanten eines Radikals bestimmt werden, falls die magnetischen Eigenschaften des Radikalpaarpartners bekannt sind. Dies wurde an einigen Systemen mit nicht oder nur ungenau bekannten Kopplungskonstanten exemplarisch vorgestellt. Die Ergebnisse sind zusammen mit Vergleichswerten aus der Literatur in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Radikale $\text{Trp}^{\bullet+}$ und TCBPH^{\bullet} wurden mit Hilfe derselben Methode ebenfalls in Nowosibirsk vermessen [65]. Die Resultate dieser Experimente sind mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten vergleichbar, lediglich zwei angegebene Konstanten (Protonen H6 und H2 des TCBPH^{\bullet}) liegen (knapp) nicht mehr im zweifachen Fehlerintervall. Da für die publizierten Ergebnisse in [65] allerdings keine Fehler angegeben sind, kann dabei nur der hier bestimmte Messfehler angesetzt werden, was eine Beurteilung der auftretenden Differenzen erschwert.

Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 angemerkt wurde, konnten die Hyperfeinkopplungen von $\text{Trp}^{\bullet+}$ bereits 2008 von Connor *et al.* publiziert werden [59]. Beim Vergleich dieser Werte mit den hier ermittelten Größen sind zwar kleinere Diskrepanzen festzustellen, diese Abweichungen liegen allerdings gut innerhalb der in [59] angegebenen experimentellen Unsicherheit von rund 0,1 mT. Da die auftretenden Unterschiede zudem keine Systematik aufweisen, kann eine gute Übereinstimmung der Resultate festgestellt werden.

³International Tomography Center of SB RAS, Nowosibirsk, Russland

Radikal	g -Faktor	Protonen	a/mT (diese Arbeit)	a/mT (andere Arbeiten)
Trp ^{•+}		H4	$-0,43 \pm 0,03$	$-0,45^a, 0,54^b$
		$\frac{H2 + H5 + H6}{3}$	$-0,20 \pm 0,02$	$-0,19^a, 0,26^b$
		β_1	$0,99 \pm 0,05$	$0,71^b$
		β_2	$1,12 \pm 0,05$	$1,07^b$
		β	$1,05 \pm 0,05$	$1,00^a$
TCBPH [•]	$< 2,0041$	H5	$0,06 \pm 0,01$	$0,068^a$
		H6	$-0,23 \pm 0,01$	$-0,252^a$
		H2	$-0,19 \pm 0,01$	$-0,209^a$
4CBPH [•]	$< 2,0041$	H3,5	$0,054 \pm 0,005$	
		H2,6,2',6'	$-0,192 \pm 0,014$	
		H4'	$-0,220 \pm 0,006$	
		H3',5'	$0,057 \pm 0,007$	
4CBP ^{•-}	$2,0034 \pm 0,0006$	H3,5	$0,085 \pm 0,005$	
		H2,6,2',6'	$-0,289 \pm 0,005$	
		H4'	$-0,23 \pm 0,12$	
		H3',5'	$0,097 \pm 0,006$	

Tabelle 4.2: In diesem Kapitel berechnete oder abgeschätzte Hyperfeinkopplungskonstanten und g -Faktoren sowie entsprechende Vergleichswerte aus [65] (^a) und [59] (^b) (nur Beträge der Hyperfeinkopplung; $\Delta a \sim 0,1 mT$).

Obwohl CIDNP eine indirekte Methode zur Beobachtung von Radikalen ist, hat diese Art der Bestimmung in einigen Fällen Vorteile gegenüber Standard-ESR-Messungen. Oft können die Parameter kurzlebiger oder flüchtiger Radikale in flüssiger Lösung auf Grund der geringen Lebensdauer nicht direkt vermessen werden und es muss häufig im Gegensatz zur CIDNP zu tiefen Temperaturen ausgewichen werden. Darüber hinaus besitzen CIDNP-Messungen die hohe spektrale Auflösung der NMR-Spektroskopie. Damit ist es sehr einfach möglich, die beobachteten Kopplungen den entsprechenden Kernen zuzuordnen. Außerdem kann nicht nur der Betrag der Hyperfeinkopplungskonstanten bestimmt werden, sondern auch ihr Vorzeichen, was mit ESR-Methoden nur schwer möglich ist. Die vorgestellte Methode ist somit ein eleganter und einfacher Weg um Hyperfeinkopplungen zu vermessen, sofern im Laufe der Untersuchungen keine zusätzlichen Reaktionen auftreten, welche die beobachteten CIDNP-Intensitäten beeinflussen. Zur vollständigen Bestimmung der Hyperfeinkopplungskonstanten eines Systems muss die Messung natürlich auch bei anderen Kernen angewandt werden. Insgesamt wurde die Methode nun auf eine so breite Basis gestellt, dass diese auch auf komplizierte Systeme angewandt werden kann. In Kapitel 5 wird diese z. B. für die Bestimmung der Hyperfeinkopplungen von Dipeptiden benutzt.

Kapitel 5

Untersuchungen zu Einflüssen der chemischen Struktur auf den CIDNP-Effekt an Aminosäuren mit Thioethergruppen

Ein Hauptgebiet der Biophysik und -chemie beschäftigt sich mit der Funktionsweise von Makromolekülen, die in lebenden Organismen vorkommen. Hierbei ist es zum einen wichtig Informationen über den räumlichen Aufbau und insbesondere der Oberfläche dieser Moleküle zu erhalten und zum anderen eventuell auftauchende Radikalpaarbildungsprozesse und ihre Auswirkung zu verstehen.

Dabei kann CIDNP an Farbstoff-Löcher-Radikalpaaren (in frei diffundierenden Systemen) zu beiden Fragestellungen einen Beitrag leisten. Zum einen ist es mit dieser Methode möglich, kurzlebige Radikale zu charakterisieren und Reaktionsverläufe zu analysieren. Zum anderen können Informationen über die Oberfläche von Molekülen erhalten werden. Einen ersten Schritt in diese Richtung ging Kaptein bereits 1978 mit der Idee, dass nur Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins CIDNP-Signale erzeugen können [7], da es nur diesen möglich ist, den angeregten Farbstoff zu löschen und ein Radikalpaar zu bilden. Damit wird die CIDNP-Intensität durch die Oberflächenlage¹ der jeweiligen Aminosäure beeinflusst und kann daher einen Beitrag zur Strukturbestimmung von Proteinen [66] sowie zur Aufklärung struktureller Änderungen im Verlauf von Faltungsprozessen [67, 68, 69] leisten.

Allerdings liefert dieser Ansatz von Kaptein lediglich qualitative Ergebnisse, da die Beobachtung eines entsprechenden CIDNP-Signals zunächst nur die Information, dass sich das entsprechende Residuum an der Oberfläche befindet, aber keine weiteren Informationen über die Geometrie der Oberfläche enthält. Um quantitative Aussagen über die Lage des Residuums innerhalb des Proteins und damit über die räumliche Geometrie des Proteins selbst treffen zu können, ist es notwendig zu verstehen, welche weiteren Faktoren

¹engl.: surface accessibility

die CIDNP-Signalstärke bestimmen. Die ursprüngliche Idee der direkten Abhängigkeit der CIDNP-Intensität von der Oberflächenlage F des entsprechenden Kernes (\sqrt{F} [70]) stellt sich als unzureichend heraus. Tatsächlich spielen noch andere Faktoren, wie z.B. die Reaktionswahrscheinlichkeit einer Aminosäure [51] oder intramolekularer Elektronentransfer [71], eine nicht vernachlässigbare Rolle. Um zu überprüfen, ob dennoch quantitative Aussagen über Oberflächenstrukturen möglich sind, ist es notwendig, eine systematische Studie durchzuführen, in der untersucht wird, welche strukturellen Parameter einen Einfluss auf die CIDNP-Intensitäten haben, und ob diese in Einzelfaktoren zerlegt werden können. Zu diesem Zweck müssen zunächst freie Aminosäuren vermessen werden, um zu ermitteln, welche von ihnen CIDNP-aktiv sind, mit welchen Farbstoffen sie reagieren, und welchen Einfluss das wässrige Medium hat. Dabei sind alle strukturellen und dynamischen Parameter zu bestimmen. Bislang wurden die Aminosäuren Histidin [60, 57], Tyrosin [72, 57], Tryptophan [25, 57] und die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin [73, 24, 42] und S-Methyl-Cystein [54] als CIDNP-aktiv charakterisiert. Auch Glycin zeigt prinzipiell CIDNP, allerdings nur in der N-Terminalendstellung in Peptiden [74]. Im zweiten Schritt werden nun einfache Peptide erforscht (erste Arbeiten auf diesem Gebiet z.B. in [75, 76]), um den Einfluss der Wechselwirkung zwischen benachbarten Seitenketten zu erkunden. Wenn letztere bekannt sind, kann später der Einfluss der Oberflächenstruktur von Proteinen analysiert werden.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zu Schritt zwei, indem thioetherenthaltende Aminosäuren und entsprechende Seitenketten in Dipeptiden untersucht werden, um insbesondere den Einfluss der Umgebung des Radikalzentrums zu bestimmen. Hierbei wird die Auswirkung durch das Peptidrückgrat sowie durch benachbarte Seitenketten betrachtet und analysiert.

Dabei werden zyklische Dipeptide verwendet, bei denen der C-Terminus der einen Aminosäure mit dem N-Terminus der anderen Aminosäure verknüpft ist, so dass eine Ringstruktur aus sechs Atomen entsteht (siehe Abbildung 5.1). Damit ist das zyklische Dipeptid ein einfaches Modellsystem für zwei Aminosäuren innerhalb der Proteinkette, da sie sich weder am C- noch am N-Terminus befinden und auftauchende Reaktionen nur von den Seitenketten und dem Peptidrückgrat abhängen können. Aus dem Fehlen der Endgruppen ergibt sich außerdem, dass die zyklischen Dipeptide im Rückgrat keine titrierbaren Gruppen besitzen und deshalb vom Peptidgrundgerüst keine pH-Abhängigkeit erwartet wird. Ferner sind Reihenfolgeeffekte ausgeschaltet, da durch die Ringstruktur die Sequenz der Aminosäuren beliebig ist. Das starre Ringgerüst bietet darüber hinaus noch einen experimentellen Vorteil: Die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung der beiden Seitenketten ist für die cis-Konformation, bei der die beiden Seitenketten auf derselben Seite des Rings liegen, sehr viel höher als für die trans-Konformation [77, 78]. Somit kann eine mögliche Wechselwirkung oder Reaktion zwischen den Seitenketten durch den Vergleich der Konformere untersucht werden.

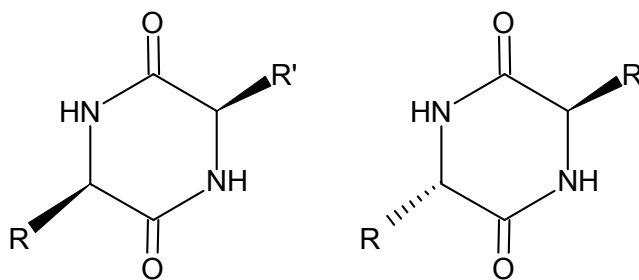


Abbildung 5.1: Struktur der zyklischen Dipeptide mit den Seitenketten R und R' ; links *cis*-Konformation und rechts *trans*-Konformation.

Die einzige essentielle Aminosäure mit einer Thioethereinheit ist Methionin, welche in Proteinen aller bekannten Lebewesen vorkommt. Ihren kationischen Radikalen wird eine entscheidende Funktion in vielen biologischen Prozessen (u. a. Alterung [2, 3], Krankheiten wie Alzheimer [4, 5] oder Parkinson [6]) zugeordnet. Dabei kann Methionin einerseits unter der Bildung von Methioninsulfoxid als Radikalfänger dienen, andererseits durch Elektronentransfer vom Schwefelatom unter Bildung des Kationradikals $S^{\bullet+}$ irreversible Proteinschäden erzeugen [5]. Letzteres konnte in Photooxidationsprozessen nachgewiesen werden, in denen ein angeregter Farbstoff im Triplettzustand von Methionin durch Elektronentransfer vom Schwefelatom gelöscht wurde. Dabei konnte die Verlauf der Reaktion untersucht sowie die magnetischen Parameter ermittelt werden [79, 80, 81, 73, 24]. Eine besondere Eigenschaft der schwefelzentrierten Kationradikale ($S^{\bullet+}$) ist, dass sie zur Stabilisierung über die Bildung einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit Hilfe freier Elektronenpaare² anderer Atome in der Umgebung des Schwefels [82] neigen. Bei Methionin führt dies in basischer Lösung zu einer Bildung einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung des Schwefels mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs (zyklisches $(S \cdot N)^+$ -Radikal) unter Bildung eines Fünferings [79, 81, 73, 24]. Bei Einbau der freien Aminosäure in Peptide stellt sich die interessante Frage, unter welchen Bedingungen eine Stabilisierung beobachtet werden kann. Erste Messungen zeigten bereits, dass ein $(S \cdot N)^+$ -Radikal nur beim Vorliegen der Methioninseitenkette am N-Terminus möglich ist [83, 42]. Ferner lieferten transiente Absorptionsmessungen an zyklischen Dipeptiden mit zwei Methioninseitenketten einen Hinweis auf die Bildung eines $(S \cdot S)^+$ -Radikals zwischen den beiden Residuen [84].

Darüber hinaus stellt sich die Frage, welchen Einfluss eine Verkürzung der Kettenlänge zwischen Aminosäuregruppe und Schwefelatom auf die Radikalstruktur hat. Deshalb wird die ebenfalls eine Thioethergruppe enthaltende Aminosäure S-Methyl-L-Cystein betrachtet, welche sich vom Methionin nur durch die um einen Kohlenstoff verkürzte Kette zwischen Aminosäuregruppe und Schwefelatom unterscheidet (vgl. die Struktur in Abbildung 5.3, Seite 72). Auch S-Methyl-L-Cystein bildet durch Oxidation am Schwefelatom ein kationisches Radikal [80]. Allerdings ist das ursprüngliche Radikal sehr kurzlebig und

²engl.: lone pairs

reagiert durch Decarboxylierung weiter zum α -Aminoalkylradikal [80]. Trotzdem wurde bereits die Bildung eines transienten $(S:\dot{O})^+$ -Radikals vor der Decarboxylierung zur Erklärung von ESR-Messungen vorgeschlagen [85]. Dies konnte aber bis jetzt nicht bestätigt werden.

Die vorliegende Arbeit baut auf den bisherigen Kenntnissen auf und ermittelt den Einfluss der Umgebung auf die Radikalstruktur, den Mechanismus der Bildung, den Reaktionspfad und die CIDNP-Intensität, wobei folgende Themen erörtert werden:

1. Der Einfluss der Kettenlänge zwischen Aminosäuregruppe bzw. Peptidgerüst und Schwefelatom wird untersucht. Zu diesem Zweck werden die Ergebnisse der Aminosäuren Methionin und S-Methyl-L-Cystein in freier Form (siehe Abschnitt 5.1) sowie, um den Einfluss von Seitenreaktionen zu minimieren, in zyklischen Dipeptiden (siehe Abschnitt 5.2.3) verglichen.
2. Die Veränderung durch den Einbau der freien Aminosäure in ein Peptid wird diskutiert und damit der Einfluss des Peptidrückgrats analysiert (siehe Abschnitt 5.2). Hierzu werden Dipeptide mit einer Thioethergruppe enthaltenden Aminosäure³ vermessen und die Differenzen untereinander und zu den freien Aminosäuren erörtert.
3. Der Einfluss einer zweiten Thioethergruppe enthaltenden Aminosäure wird untersucht (siehe Abschnitt 5.3). Dabei geht es insbesondere um die Fragestellung, ob bei Dipeptiden mit zwei schwefelhaltigen Aminosäuren eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit dem Schwefelatom des anderen Residuums beobachtet werden kann. Zu diesem Zweck werden cis- und trans-Konformere vermessen, die sich in der Fähigkeit einer direkten Wechselwirkung zwischen den Seitenketten unterscheiden [77, 78].

Dabei sind die einzelnen Abschnitte folgendermaßen gegliedert: Als erstes werden die Resultate der Messungen an den einzelnen Substanzen vorgestellt, danach folgen die Vergleiche unter den obigen Fragestellungen. Für jede Substanz wird zunächst das NMR-Spektrum zur Charakterisierung des diamagnetischen Zustandes analysiert, dann die Radikalstruktur bestimmt und auf den ermittelten Reaktionsmechanismus und Reaktionspfad eingegangen. Dabei werden die nicht äquivalenten β -Protonen entsprechend ihrer Position im NMR-Spektrum zugeordnet, wobei die Bezeichnung β_1 -Proton immer demjenigen, welches zu höheren Magnetfeldern verschoben ist, entspricht. Der Einfluss der CIDNP-Intensität und die Auswirkung, welche diese auf die Möglichkeit zur Bestimmung der Oberflächenlage hat, wird in Abschnitt 5.4 gesondert diskutiert.

L-Methionin reagiert unter der Bildung von CIDNP mit den Farbstoffen Flavin, 4-Carboxybenzophenon, 3-Carboxybenzophenon, Tetracarboxybenzophenon, Dipiridyl (nur in sauren Lösungen) und Anthrachinonsulfonsäure [86, 42]. Da bei den früheren Untersuchungen an Methionin und S-Methyl-L-Cystein mit Hilfe von CIDNP und optischen Methoden als Farbstoff 4-Carboxybenzophenon (4CBP) benutzt wurde [54, 80, 81, 73, 24,

³Die zweite im Dipeptid enthaltende Aminosäure ist immer Glycin.

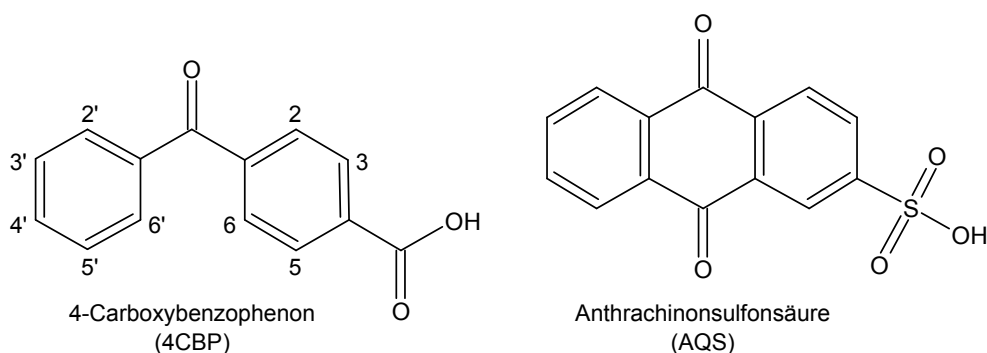


Abbildung 5.2: Struktur von 4-Carboxybenzophenon (links) und 9,10-Anthrachinon-2-Sulfonsäure (rechts).

87, 88, 42], wurde dieser ebenfalls in der hier vorliegenden Arbeit verwendet. Das anionische 4CBP-Radikal ($4CBP^{\bullet-}$) hat einen pK_S -Wert von 8,2 [89]. Zwar wird das in der Reaktion entstehende $4CBP^{\bullet-}$ durch das Lösungsmittel bei neutralem pH-Wert mit einer Rate von $k_{\text{prot}} \sim 2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ protoniert [90], dies spielt aber auf der CIDNP-Zeitskala der Geminate-Paarbildung ($\approx 10^{-8} \text{ s}$; vgl. Kapitel 2.1.6) keine Rolle. Da 4CBP in saurer Umgebung nicht in den benötigten Konzentrationen löslich ist, wurde der Farbstoff 9,10-Anthrachinon-2-Sulfonsäure (AQS)⁴ verwendet, um bei der Untersuchung des zyklischen Dipeptides Glycin-Methionin auch Messungen bei niedrigerem pH-Werten durchführen zu können. Die Strukturen beider verwendeter Farbstoffe sind in Abbildung 5.2 dargestellt.

Die benutzten Farbstoffe sowie S-Methyl-L-Cystein und das zyklische Dipeptid L-Methionin-L-Methionin sind kommerziell erhältlich⁵. Alle anderen verwendeten Dipeptide wurden von G. Hörner⁶ synthetisiert.

5.1 Effekte der Kettenlänge: S-Methyl-L-Cystein

In diesem Abschnitt werden zunächst die Untersuchungen an S-Methyl-L-Cystein vorgestellt, bevor in Kapitel 5.1.3 der Einfluss der Kettenlänge durch den Vergleich mit den Resultaten von Methionin diskutiert wird.

S-Methyl-L-Cystein, Cys(Me), ist eine Schwefel enthaltende Aminosäure, die sich vom Methionin nur durch eine um einen Kohlenstoff verkürzte Seitenkette zwischen Aminosäuregruppe und Schwefel unterscheidet (siehe Abbildung 5.3). Aus Untersuchungen mit Blitzlichtphotolyse ist bekannt, dass bei Triplettlöschung des Farbstoffes 4-Carboxybenzophenon (4CBP) zunächst Elektronentransfer zwischen Schwefel und Farbstoff stattfindet [80]:

⁴Abkürzung für engl. anthraquinonesulfonic acid

⁵Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

⁶Chemical Physics Department, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University Poznan, Poland

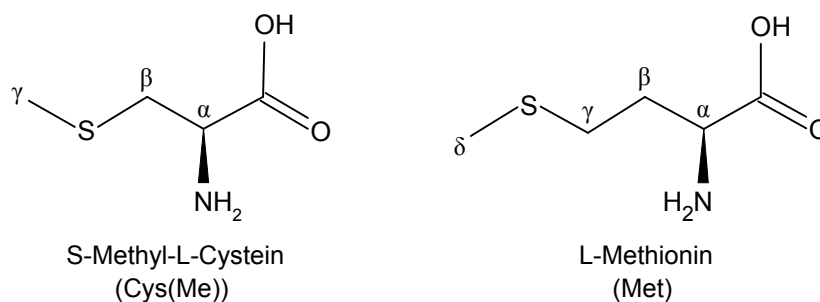
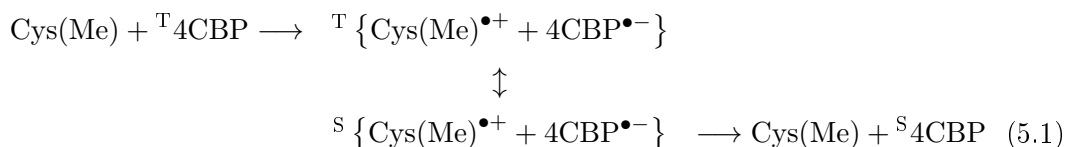


Abbildung 5.3: Struktur von *S*-Methyl-L-Cystein (links) und Methionin (rechts).



Das dadurch entstehende Kationradikal des Cys(Me) reagiert teilweise durch Decarboxylierung weiter zum α -Aminoalkylradikal [80], welches unter Bildung von $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH=NH}_2^+$ (Thioimin) die Grundzustandsmoleküle des 4CBP reduzieren kann [81]. Für Thioimine ist bekannt, dass sie unter Anlagerung von Wasser zu Aldehyden $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CHO}$ weiter reagieren können [91].

CIDNP-Untersuchungen von Göz *et al.* [54] bestätigen die obigen Ergebnisse und geben insbesondere noch weitere Einblicke in die Folgereaktionen. Bisher wurde nur der stationäre CIDNP-Zustand vermessen [54]. Allerdings wurde bereits für andere Aminosäuren gezeigt, dass Folgeprozesse wie z.B. degenerierter Elektronenaustausch die CIDNP-Intensitäten deutlich ändern können [51, 24]. Weiterhin ist die Radikalstruktur vor der Decarboxylierung ungeklärt. Es besteht die Möglichkeit, dass sich das zunächst entstehende Schwefelradikal durch Wechselwirkung mit inter- oder intramolekularen freien Elektronenpaaren von in der Umgebung befindlichen Atome versucht zu stabilisieren. Von Davies *et al.* [85] existieren bereits Hinweise auf eine Bindung zum Sauerstoff. Zur genaueren Untersuchung von Reaktionsverlauf und Struktur werden in den nächsten Abschnitten zeitaufgelöste und magnetfeldabhängige CIDNP-Messungen (vgl. Kapitel 3.1.2 und 3.2.2) in neutraler und basischer Lösung vorgestellt und deren Ergebnisse diskutiert. Da bei früheren Untersuchung an Cys(Me) mit Hilfe von CIDNP und optischen Methoden als Farbstoff 4CBP benutzt wurde [54, 80, 81], wird dieser in der vorliegenden Arbeit ebenfalls verwendet.

5.1.1 CIDNP-Messung an *S*-Methyl-L-Cystein in neutraler Lösung

Die Messungen von Cys(Me) und 4CBP (Strukturen siehe Abbildung 5.3 und 5.2) wurden in deuteriertem Wasser (pH 6,9) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen liegt Cys(Me) in

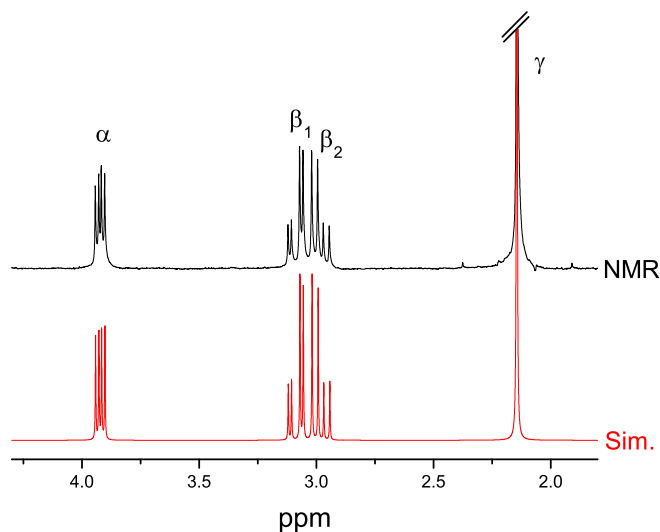


Abbildung 5.4: NMR-Spektrum (schwarz) und Simulation (rot) von 40 mM Cys(Me) bei pH 7 in deuteriertem Wasser.

seiner zwitterionischen Form vor und 4CBP ist an seiner Carboxygruppe einfach negativ geladen.

Zur Charakterisierung des diamagnetischen Moleküls Cys(Me) ist das NMR-Spektrum zusammen mit seiner Simulation in Abbildung 5.4 dargestellt. Aus der Simulation kann die chemische Verschiebung δ der einzelnen Linien und die skalare j -Kopplung der Kerne untereinander bestimmt werden. Die Resultate sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Proton	δ /ppm
α	$3,291 \pm 0,001$
β_1	$3,082 \pm 0,001$
β_2	$2,987 \pm 0,001$
γ	$2,144 \pm 0,001$

	j -Kopplung/Hz
J_{α,β_1}	$4,2 \pm 0,3$
J_{α,β_2}	$8,0 \pm 0,3$
J_{β_1,β_2}	$15,0 \pm 0,3$

Tabelle 5.1: Chemische Verschiebung δ und j -Kopplung von Cys(Me) bei pH 7.

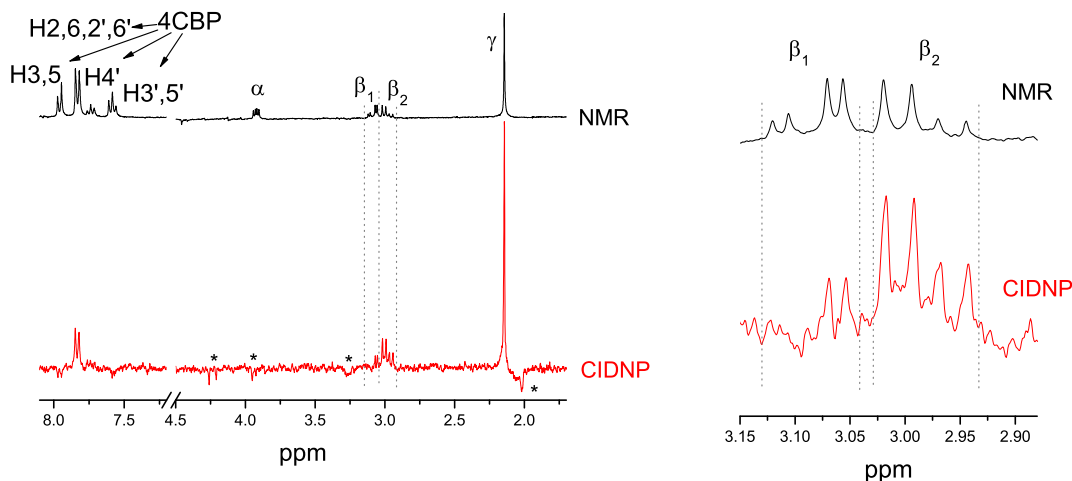


Abbildung 5.5: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum bei $t = 0,5 \mu\text{s}$ (rot) von 5 mM Cys(Me) und 5 mM 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 6,9 (320 Akkumulationen). Das Symbol „*“ markiert die in Seitenreaktionen entstandenen Nebenprodukte.

Struktur des Radikals von S-Methyl-L-Cystein

Um die Struktur quantitative zu charakterisieren, wird zunächst nach dem Ansatz verfahren, die Hyperfeinkopplungskonstanten aus dem CIDNP-Spektrum der Geminate-Paare und mit dieser Information den g -Faktor aus den Feldabhängigkeiten zu bestimmen. Dabei stellt sich zunächst heraus, dass nur relative Hyperfeinkopplungen auf Grund auftauchender Seitenreaktionen bestimmt werden können. Wie nachfolgend gezeigt wird, ist es aber durch Kenntnis der Magnetfeldabhängigkeiten doch möglich, eine untere Grenze für die absoluten Hyperfeinkopplungen aus den CIDNP-Spektren zu bestimmen, mit denen dann auch eine untere Grenze für den g -Faktor abgeschätzt werden kann.

In Abbildung 5.5 ist das CIDNP-Spektrum der Geminate-Paare und das dazugehörige NMR-Spektrum dargestellt. CIDNP-Signale sind für die γ - und β -Protonen von Cys(Me), für die aromatischen Protonen des 4CBP (H2, H3, H5, H6, H2', H6', H3', H5' und H4') sowie für einige Nebenprodukte aus Seitenreaktionen zu erkennen. Damit zeigen die CIDNP-Signale des Cys(Me) das typische Polarisationsmuster eines schwefelzentrierten Kationradikals, da nur die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen polarisiert sind.

Bei genauer Betrachtung der Abbildung 5.5 erkennt man deutlich, dass die beiden β -Protonen unterschiedlich stark polarisiert sind. Eine so große Differenz ist ungewöhnlich, bei anderen Radikalen von Aminosäuren, wie z.B. Tryptophan (vgl. Abbildung 4.5 auf Seite 50) oder Tyrosin (vgl. Abbildung 4.8 auf Seite 54), ist die Polarisation auf den β -Protonen auf Grund der ähnlichen Hyperfeinkopplung (vgl. Kapitel 4) fast gleich. Der naheliegend-

ste Grund für diesen Effekt ist ein signifikanter Unterschied in den isotropen Hyperfeinkopplungen der beiden Protonen (vgl. Kapitel 2.1.5). Neben dieser Ursache, könnte auch ein auftretender Multipletteffekt oder eine überlagernde emissive Linie eines Nebenproduktes vorliegen. Ein zusätzlich auftretender Multipletteffekt kann allerdings auf Grund des auftauchenden Polarisationsmusters ausgeschlossen werden (vgl. Kapitel 2.1.3). Sollte dagegen eine emissive Nebenproduktlinie an der Position des β_1 -Protons auftauchen, so bedeutet dies, dass diese Liniengruppe die gleiche chemische Verschiebung und die gleiche j -Kopplung wie das β_1 -Proton besitzt, da in dem Bereich zwischen 2,8 und 3,2 ppm keine sonstigen emissiven Signale zu erkennen sind. Dies ist sehr unwahrscheinlich. Ein weiterer Hinweis gegen die Existenz einer zusätzlichen Liniengruppe ergibt sich aus den Feldabhängigkeiten der CINDP-Signale. Auf Grund des notwendigen Probentransfers vom Polarisationsfeld zum Nachweisfeld und der starken Kopplung zwischen den β -Protonen im Polarisationsfeld wird die entstandene Polarisation zwischen diesen ausgetauscht, so dass beide Protonen CIDNP-Signale zeigen müssen [34, 33]. Bei dieser Messung zeigen beide β -Protonen tatsächlich ein fast gleiches CIDNP-Signal, eine zusätzlich vorhandene emissive Linie hätte aber auch hier auftauchen und die Polarisation der β_1 -Proton deutlich schwächen müssen. Da auch die CIDNP-Spektren für unterschiedliche Wartezeiten nach dem Laserpuls kein eindeutiges emissives Signal zeigen, müsste das mögliche Nebenprodukt zudem auch die gleiche Zeitabhängigkeit wie das β_1 -Proton aufweisen. Schließlich liefert der Vergleich der CIDNP-Spektren von Cys(Me) (siehe Abbildung 5.5) und vom zyklischen Dipeptid Glycin-S-Methyl-Cystein (siehe Abbildung 5.30 in Abschnitt 5.2.2) ein letztes Argument. Im Falle des Dipeptides ist das Polarisationsmuster der β -Protonen im Gegensatz zu Cys(Me) aus sterischen Gründen genau umgedreht. Diesmal ist das β_1 -Proton stärker als das β_2 -Proton polarisiert. Dass für diesen Fall auch ein Nebenprodukt existiert, welches genau die Polarisation des β_2 -Proton aufhebt, ist sehr unwahrscheinlich. Insgesamt ist damit festzustellen, dass die β -Protonen eine signifikant unterschiedliche Hyperfeinkopplung besitzen müssen.

Da bereits im CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare Nebenprodukte auftauchen, ist es zunächst nicht möglich, absolute Hyperfeinkopplungswerte durch einen Vergleich mit den CIDNP-Signalen des Farbstoffes 4CBP zu erhalten (wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben). Allerdings lassen sich relative Hyperfeinkopplungen (auf die Kopplungswerte der γ -Protonen normiert) für das Cys(Me) \bullet^+ bestimmen:

$$a_{\beta_1}^{\text{rel}} = 0,48 \pm 0,08 \quad a_{\beta_2}^{\text{rel}} = 1,21 \pm 0,08 \quad a_{\gamma}^{\text{rel}} = 1,00 \pm 0,02$$

Obwohl der g -Faktor von Cys(Me) \bullet^+ nicht bekannt ist, folgt aus der CIDNP-Phase der Farbstofflinien unter der Annahme, dass der Einfluss der Seitenreaktionen auf die Farbstoffamplituden geringer ist als der Einfluss der primären Radikalreaktion:

$$g_{\text{Cys(Me)}\bullet^+} > g_{4\text{CBP}\bullet^-} = 2,0034 \pm 0,0006$$

Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, in der schwefelzentrierte Kationradikale

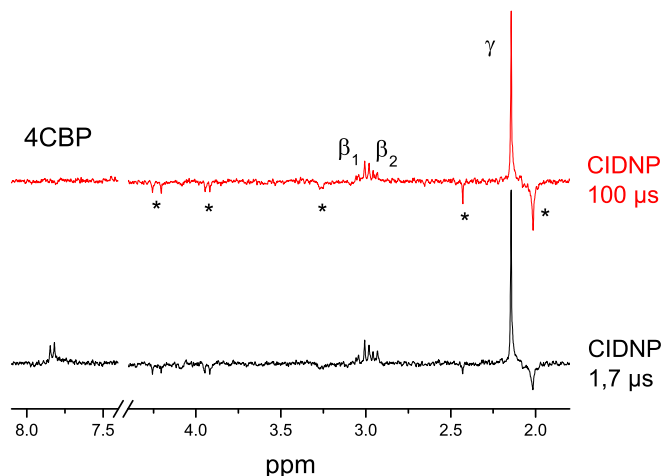


Abbildung 5.6: CIDNP-Spektrum 1,7 μ s (schwarz) und 100 μ s (rot) nach der Laseranregung von 5 mM Cys(Me) und 5 mM 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 7,1 (jeweils 40 Akkumulationen). Die Messung wurde mit einem $\pi/2$ -Puls durchgeführt. Das Symbol „*“ markiert die in Seitenreaktionen entstandenen Nebenprodukte.

üblicherweise einen hohen g -Faktor ($g \approx 2,01$ [79]) besitzen. Aus dem positiven Vorzeichen des Unterschieds der g -Faktoren der beiden Radikale ($\Delta g = g_{\text{Cys(Me)}^{\bullet+}} - g_{4\text{CBP}^{\bullet-}}$) lassen sich mit Hilfe der Kapteinschen Regeln (siehe Abschnitt 2.1.3, Gleichung 2.17) die absorptiven CIDNP-Signale der γ - und β -Protonen jeweils positiven Hyperfeinkopplungskonstanten zuordnen.

In Abbildung 5.7 ist die CIDNP-Kinetik der γ -Protonen von Cys(Me) dargestellt. Wie man sieht, ist die CIDNP-Intensität unabhängig von der Wartezeit zwischen Laserpuls und Detektion. Dies bedeutet, dass nur die ersten Radikalrekombinationen zu den ursprünglichen Molekülen zurückreagieren. Danach finden Seitenreaktionen statt, deren resultierende CIDNP-Signale bei anderen Frequenzen auftauchen und somit das Signal der Käfigprodukte der zyklischen Reaktion nicht schwächen. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass zumindest Teile der auftauchenden Nebenprodukte durch Weiterreaktion des Kationradikals Cys(Me) $^{\bullet+}$ entstanden sind. Das wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die Nebenprodukte ihre Intensität nach 100 μ s etwa verdoppelt haben (siehe Abbildung 5.6).

Der Verlauf der Magnetfeldabhängigkeit und damit das Magnetfeld mit maximaler CIDNP-Intensität B_{max} hängt von dem Unterschied der g -Faktoren der beiden beteiligten Radikale Δg und ihren Hyperfeinkopplungen ab (vgl. Kapitel 2.1.4). Da in der Feldabhängigkeit der Cys(Me)-Linien in Abbildung 5.8 $B_{\text{max}} \approx 1$ T relativ klein ist, muss Δg groß sein oder die Hyperfeinkopplungen des Cys(Me) sehr klein (vgl. Kapitel 2.1.4). Demzu-

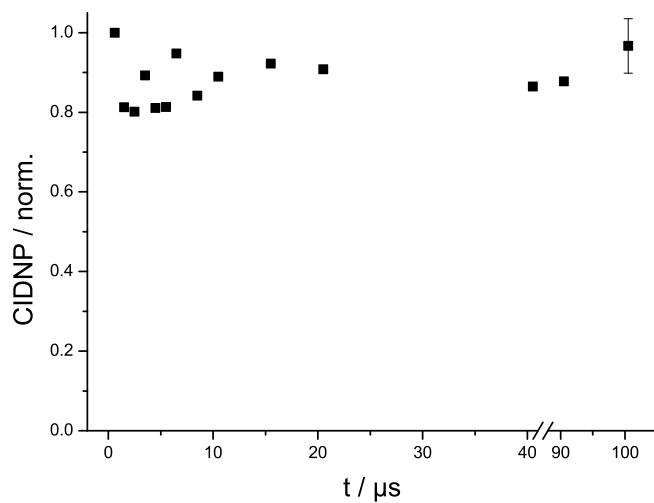


Abbildung 5.7: CIDNP-Kinetik der γ -Protonen vom *Cys(Me)*. Die CIDNP-Intensität bleibt innerhalb der Fehlertoleranz konstant.

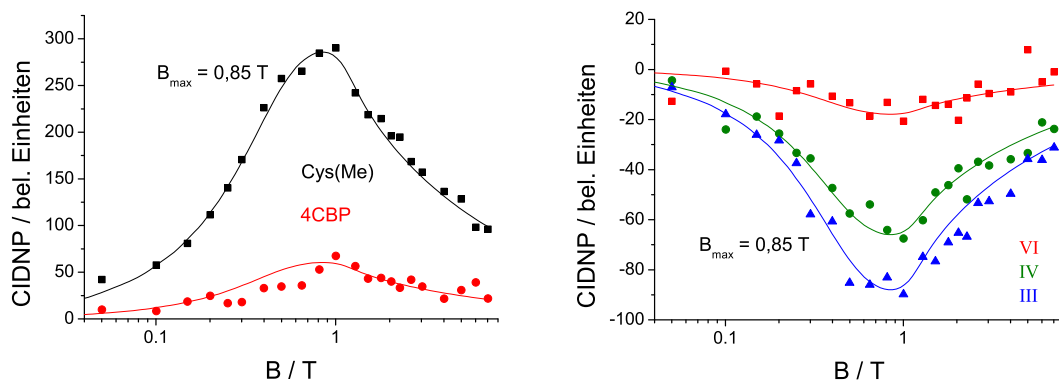


Abbildung 5.8: Abhängigkeit der CIDNP-Intensität vom Magnetfeld, links für *Cys(Me)* (γ -Protonen) und 4CBP ($H_{2,6,2',6'}$) und rechts für die Nebenprodukte (Nummerierung vergleiche Tabelle 5.3 und Abbildung 5.11).

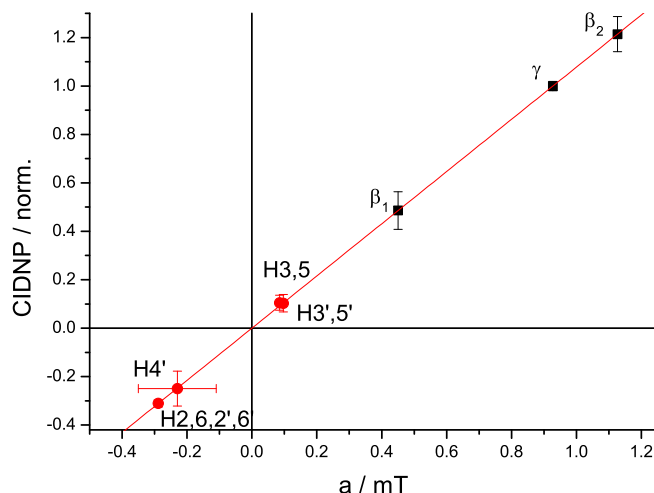


Abbildung 5.9: Korrelation der CIDNP-Intensitäten des 4CBP (rot) und der Hyperfeinkopplungskonstante a des 4CBP \bullet^- aus der Photoreaktion von Cys(Me) mit 4CBP. Die durchgezogene Linie zeigt die lineare Regression ($R=0.99976$). Die untere Grenze für die Hyperfeinkopplungskonstanten von Cys(Me) \bullet^+ wurden mit Hilfe des Proportionalitätskoeffizienten aus den CIDNP-Intensitäten des Cys(Me) (schwarz) bestimmt ($a_\gamma = 0,93 \pm 0,02 \text{ mT}$; $a_{\beta_1} = 0,45 \pm 0,08 \text{ mT}$; $a_{\beta_2} = 1,13 \pm 0,07 \text{ mT}$).

folge ist die Messung der Kinetik und des Spektrums der Geminat-Paare bei 7 T nicht optimal gewählt. Eine Durchführung des Experiments bei kleineren Magnetfeldern sollte zu einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen. Die CIDNP-Polarisation der Farbstofflinien und der Nebenprodukte zeigen die gleiche Abhängigkeit vom Magnetfeld wie die Cys(Me)-Linien. Dies bedeutet, dass die gesamte Polarisation aus dem primär gebildeten Radikalpaar stammt. Die Nebenprodukte können deshalb nicht aus einer anderen Radikalpaarreaktion entstehen oder an einer weiteren Radikalpaarreaktionen teilnehmen, sondern müssen direkte Folgeprodukte der ursprünglichen Radikale (Cys(Me) \bullet^+ , 4CBP \bullet^-) sein. Damit lassen die ausschließlich emissiven Polarisationsphasen der Nebenprodukte den eindeutigen Schluss zu, dass es sich um Produkte der Escape-Paare handelt. Nur die Käfigprodukte reagieren zu den ursprünglichen diamagnetischen Produkten (Cys(Me) und 4CBP) zurück.

Mit der Kenntnis, dass die Linien aller Nebenprodukte im nichtaromatischen Bereich des NMR-Spektrums liegen und dass das Cys(Me) \bullet^+ -Radikal offenbar nach kurzer Zeit weiterreagiert, kann geschlussfolgert werden, dass alle Nebenprodukte aus dem Schwefelradikal gebildet werden. Damit kann aus dem Spektrum der Geminat-Paare durch den Vergleich der CIDNP-Intensitäten des 4CBP und des Cys(Me) eine untere Grenze für die Hyperfeinkopplungen des Cys(Me) \bullet^+ abgeschätzt werden. Wie im Kapitel 4 mehrmals gezeigt

g -Faktor	Protonen	$a_i^{\text{rel}} = \frac{a_i}{a_\gamma}$	a_i/mT
$g_{\text{Cys(Me)}^{\bullet+}} > 2,0073$	γ	$1,00 \pm 0,02$	$> 0,9$
	β_1	$0,48 \pm 0,08$	$> 0,36$
	β_2	$1,21 \pm 0,08$	$> 1,05$

Tabelle 5.2: Charakterisierung (relative Hyperfeinkopplungskonstanten sowie Abschätzung der unteren Grenze absoluter Kopplungswerte und des g -Faktors) des kationischen Methylcysteinradikals $\text{Cys(Me)}^{\bullet+}$.

wurde, wird dafür die CIDNP-Intensität der Linien des 4CBP gegen ihre in Kapitel 4.2.3 bestimmte Hyperfeinkopplungskonstante aufgetragen (siehe Abbildung 5.9). Die durchgezogene Linie veranschaulicht dabei die lineare Regression der Daten von 4CBP. Aus dem daraus gewonnenen Proportionalitätskoeffizienten C können die Hyperfeinkopplungskonstanten des Kationradikals berechnet werden ($a_j = -C^{-1}P_j$). Diese sind als schwarze Punkte in den Graph eingezeichnet. Die damit bestimmten Werte ($a_\gamma = 0,93 \pm 0,02$ mT; $a_{\beta_1} = 0,45 \pm 0,08$ mT; $a_{\beta_2} = 1,13 \pm 0,07$ mT) können nur als untere Grenze dienen, da ein Teil der schwefelzentrierten Kationradikale weiterreagiert ist und damit nicht mehr zu dem vermessenen Signal beiträgt. Die Ergebnisse für die unteren Grenzen sind zusammen mit den relativen Hyperfeinkopplungen in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Mit dieser Einschränkung der absoluten Hyperfeinkopplungen lässt sich aus der CIDNP-Feldabhängigkeit der γ -Protonen von Cys(Me) (vgl. Abbildung 5.8 links) nun auch eine untere Grenze für den g -Faktor bestimmen (vgl. Kapitel 3.2.3):

$$g_{\text{Cys(Me)}^{\bullet+}} > 2,0073$$

Unter Berücksichtigung der möglichen Werte des g -Faktors ist es möglich, dass ein nur auf dem Schwefel zentriertes Kationradikal $\text{S}^{\bullet+}$ ($g = 2,1012$ [79]) vorliegt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass es sich um eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit dem freien Elektronenpaar des Sauerstoffs (zyklisches $(\text{S}:\text{O})^+$ -Radikal) unter Bildung eines Fünferings handelt. Für ein $(\text{S}:\text{O})^+$ -Radikal sollten auch nur die Protonen an dem zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen polarisiert sein, da sich in der Nähe des Sauerstoffs kein Proton befindet (vgl. Struktur in Abbildung 5.3 auf Seite 72).

Bis jetzt wurden nur g -Faktoren einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung des Schwefels mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffes und eines anderen Schwefels bestimmt [79]. Das $(\text{S}:\text{N})^+$ -Radikal besitzt durch die reduzierte Spinbahnkopplung, da das Radikalzentrum zwischen Schwefel und Stickstoff aufgeteilt ist, einen kleineren g -Faktor ($g = 2,0073$) als ein $\text{S}^{\bullet+}$ -Radikal [79]. Im Analogieschluss kann auch für das $(\text{S}:\text{O})^+$ -Radikal von einem kleineren g -Faktor ausgegangen werden. Wie in Abschnitt 5.2.2 dargestellt wird, ist

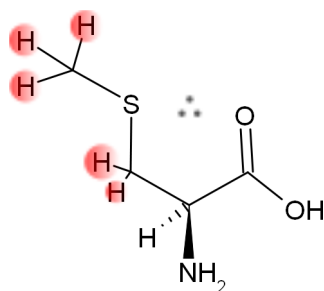


Abbildung 5.10: Radikalstruktur von $\text{Cys}(\text{Me})^{\bullet+}$ mit schematische Darstellung der $(\text{S}:\text{O})^+$ -Bindung. Die Stärke der Hyperfeinkopplung der einzelnen Protonen wird durch die Fläche eines Kreises und das positive Vorzeichen durch die rote Farbe dargestellt.

Struktur	Name	Nr.	Proton	δ/ppm
4CBP-S-CH_3		III	γ (CH_3)	2,015
$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CHO}$	Aldehyd	IV	γ (CH_3) β (CH_2)	2,429 3,261
$\text{H}_2\text{C=CH-NH}_2$	Vinylamin	VI	β_1 (CH_2) β_2 (CH_2)	4,204 3,918

Tabelle 5.3: Nebenprodukte der Reaktion $\text{Cys}(\text{Me})$ mit dem Triplettzustand des 4CBP (Zuordnung laut [54]) und ihre chemische Verschiebung δ .

es schließlich möglich ein $(\text{S}:\text{O})^+$ -Radikal in einem Peptid mit $g \sim 2,0085$ zu charakterisieren, was die letzte Annahme unterstützt. Da sowohl für das nur auf dem Schwefel zentrierte als auch mit dem Sauerstoff stabilisierte schwefelzentrierte Kationradikal vermutlich $g > 2,007$ gilt, liegt bisher kein eindeutiger Nachweis für Letzteres vor. Der Vergleich der Resultate mit denen für Methionin und denen für das zyklische Peptid Glycin-S-Methyl-Cystein (vgl. Abschnitt 5.1.3) stützt die These der Bildung eines $(\text{S}:\text{O})^+$ -Radikals deutlich, so dass von der Bildung eines $(\text{S}:\text{O})^+$ -Radikals ausgegangen werden kann (siehe Abbildung 5.10).

Folgereaktionen und deren Verlauf

Wie im letzten Abschnitt dargestellt wurde, entstehen bei der betrachteten Photoreaktion mehrere Nebenprodukte (vgl. Abbildung 5.11). Die Nummerierung sowie die Zuordnung der Nebenprodukte wurden aus [54] übernommen und sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Darüber hinaus kann auch dem von Göz und Mitarbeitern [54] vorgeschlagenen Reaktions-

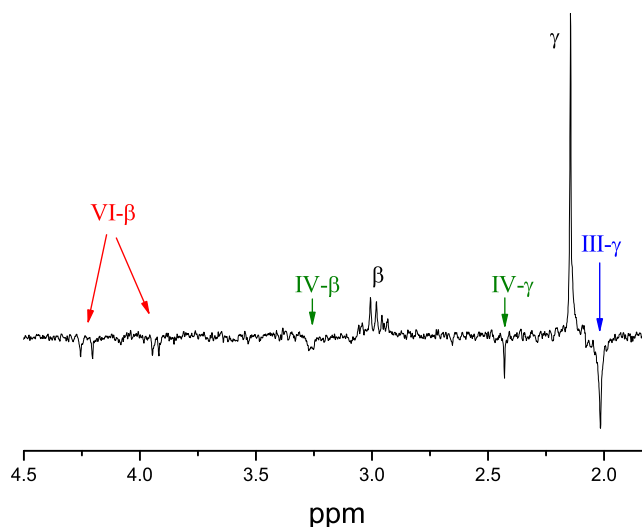


Abbildung 5.11: CIDNP-Spektrum 100 μ s nach der Laseranregung von 5 mM Cys(Me) und 5 mM 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 7,1 (40 Akkumulationen). Die Zuordnung der Nebenprodukte ist in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

verlauf im Prinzip zugestimmt werden (Abbildung 5.12). Allerdings weisen die im letzten Abschnitt dargestellten Feldabhängigkeiten darauf hin, dass das von ihnen aufgestellte Postulat zweier unterschiedlicher Radikalpaarreaktionen bei pH 7 falsch ist. Der primären Radikalpaarreaktion nachgelagert geht das Kationradikal des Cys(Me) dabei durch Decarboxylierung und intramolekularen Elektronentransfer zum α -Aminoalkylradikal über [80]. Hier spalten sich nach [54] die Folgereaktionen auf. Ein Teil der α -Aminoalkylradikale reduziert die Grundzustandsmoleküle des 4CBP unter Bildung von $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH=NH}_2^+$ [81], welches unter Anlagerung von Wasser zum Aldehyd $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CHO}$ weiterreagiert. Dies ist laut [54] als Nebenprodukt mit Nummer IV in Abbildung 5.11 zu sehen. Beim anderen Teil der α -Aminoalkylradikale bricht die Bindung zwischen Schwefel und β -Kohlenstoff unter Bildung von Vinylamin ($\text{H}_2\text{C=CH-NH}_2$) auf, bezeichnet mit der Nummer VI. Das übrig gebliebene $\text{CH}_3\text{-S}^\bullet$ reagiert mit dem Farbstoff zu einem Kombinationsprodukt (4CBP-S-CH_3), welches in Abbildung 5.11 mit der Nummer III markiert ist.

Da alle Endprodukte aus derselben primären Radikalpaarreaktion stammen, und die Polarisationsphase der Nebenprodukte entgegengesetzt zur Phase der Rekombinationsprodukte ist, müssen die Nebenprodukte aus den Escape-Paaren entstanden sein. Damit lässt sich die Reaktionsrate für die Decarboxylierung abschätzen. Sie muss nach der Rekombination der Geminat-Paare (10^{-8} s) und vor Beendigung des NMR-Nachweispulses (10^{-6} s)

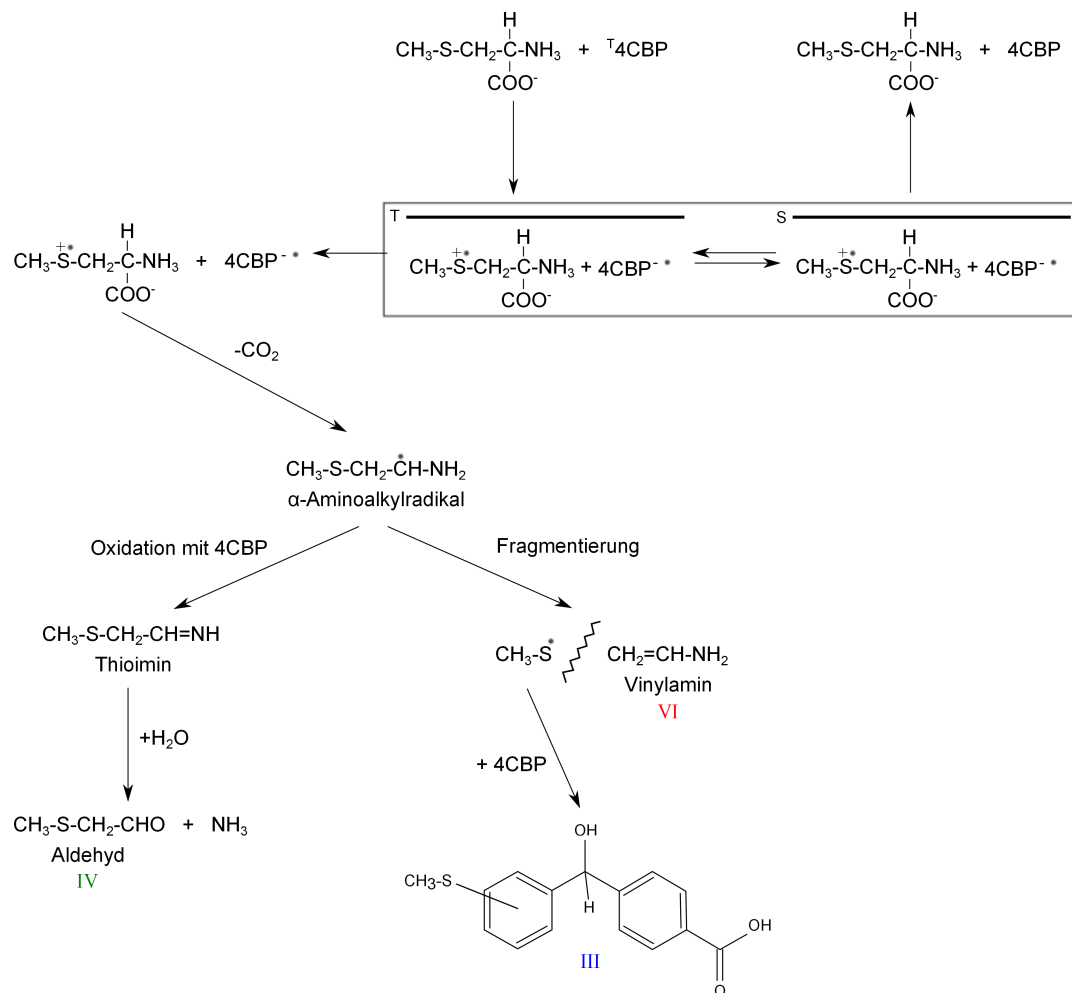


Abbildung 5.12: Verlauf der Radikalpaar- und Folgereaktion von *Cys(Me)* mit *4CBP* bei pH 7. Im Kasten ist die primäre Radikalpaarreaktion gezeigt. Das nicht zurückreagierte *Cys(Me)*^{•+} decarboxyliert zum α -Aminoalkylradikal. Letzteres reagiert durch Oxidation mit dem Grundzustandsmolekül *4CBP* erst zum Thioimin und dann zum Aldehyd oder fragmentiert zu Vinylamin und $\text{CH}_3\text{-S}^\bullet$, welches mit dem diamagnetischen *4CBP* ein Kombinationsprodukt bildet.

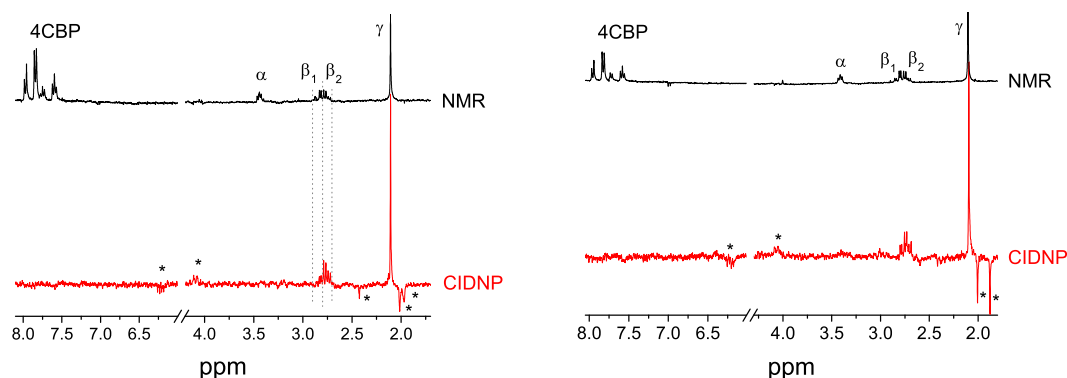


Abbildung 5.13: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum (rot) von 4 mM Cys(Me) und 5 mM 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 11,8 (links) und pH 13,5 (rechts) (40 Akkumulatio-
nen). Die Messungen wurden bei einer Wartezeit von $\tau = 0 \mu\text{s}$ mit einem $\pi/2$ -Puls durchgeführt. Das Symbol „*“ markiert die in Seitenreaktionen entstandenen Nebenprodukte.

stattfinden. Damit ergibt sich folgende Reaktionsrate für die Decarboxylierung:

$$k_{-\text{CO}_2} \sim 10^6 - 10^8 \text{ s}^{-1}$$

Diese Rate liegt somit in der gleichen Größenordnung wie die für Methionin bestimmte von $k_{\text{CO}_2}^{\text{Met}} = 3,2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ [92].

5.1.2 CIDNP-Messung an S-Methyl-L-Cystein in basischer Lösung

Weitere Messungen von Cys(Me) und 4CBP (Strukturen siehe Abbildungen 5.2 und 5.3) wurden in basischer Lösung (pH-Bereich: pH 11,8 - pH 13,5) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen liegt Cys(Me) in seiner anionischen Form vor und 4CBP ist an seiner Carboxygruppe einfach negativ geladen.

Struktur des Radikals von S-Methyl-L-Cystein

In Abbildung 5.13 sind die CIDNP-Spektren für zwei pH-Werte und das jeweils dazugehörige NMR-Spektrum dargestellt. CIDNP-Signale sind für die γ - und β -Protonen von Cys(Me) sowie für einige Nebenprodukte aus Seitenreaktionen zu erkennen. Die CIDNP-Signale des Cys(Me) zeigen das gleiche Polarisationsmuster wie in neutraler Lösung, wobei nur die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen polarisiert sind. Bei genauer Betrachtung der Abbildung 5.13 erkennt man, dass die beiden β -Protonen wieder unterschiedlich stark polarisiert sind. Da dieselben Argumente wie in neutraler Lösung gelten, besitzen β -Protonen auch unter basischen Bedingungen eine unterschiedliche Hyperfeinkopplung. Anders als im letzten Abschnitt ist jedoch keine Polarisation auf den

Farbstofflinien zu erkennen. Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, wird im Verlauf der gesamten Reaktion ein weiteres Radikalpaar gebildet, welches das Polarisationsmuster des Farbstoffes auf Grund des kleineren g -Faktors des Partnerradikals [93] umkehrt. Da sich das CIDNP-Spektrum aus der Summe beider Effekte zusammensetzt, kann damit das Verschwinden der Polarisation auf dem Farbstoff erklärt werden. Aus diesem Grund und wegen der bereits auftauchenden Nebenprodukte lassen sich wiederum keine absoluten, sondern nur die relativen Hyperfeinkopplungen (auf die Hyperfeinkopplung der γ -Protonen normiert) für das $\text{Cys}(\text{Me})^{\bullet+}$ bestimmen:

$$a_{\beta_1}^{\text{rel}} = 0,55 \pm 0,12 \quad a_{\beta_2}^{\text{rel}} = 1,29 \pm 0,11 \quad a_{\gamma}^{\text{rel}} = 1,00 \pm 0,02$$

Durch die Deprotonierung der Ammoniumionengruppe ($\text{pK}_s(\text{NH}_3) = 9,2$ [54]) besitzt der Stickstoff in basischer Lösung ein freies Elektronenpaar. Dadurch kann einerseits in der Photoreaktion ein stickstoffzentriertes Kationradikal (lineares $\text{N}^{\bullet+}$ -Radikal) gebildet werden und andererseits kann ein in der Photoreaktion entstandenes vollständig auf dem Schwefel zentriertes Kationradikal eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffes (zyklisches $\text{S}:\text{N}$ -Radikal) eingehen. In beiden Fällen müsste Polarisation auf dem α -Proton des $\text{Cys}(\text{Me})$ entstehen, wie es für Methionin in basischen Lösungen beobachtet wurde [73, 24]. Da bei $\text{Cys}(\text{Me})$ bis zu einem pH-Wert von 13,5 keine Polarisation auf den α -Protonen gefunden wird, kann ein vollständiges oder teilweises am Stickstoff zentriertes Radikal für $\text{Cys}(\text{Me})$ in basischen Lösungen ausgeschlossen werden. Außerdem wäre die Bildung eines zyklischen $\text{S}:\text{N}$ -Radikals ohnehin sehr unwahrscheinlich, da eine solche Bindung eine aus sterischen Gründen ungünstige Konformation eines Viererrings erfordern würde.

Wie schon in den neutralen Lösungen beobachtet wurde, sind die CIDNP-Intensitäten der $\text{Cys}(\text{Me})$ -Linien auch hier unabhängig von der Wartezeit zwischen Laserpuls und Detektion. Das bedeutet, dass nur die frühen Radikalrekombinationen zur Bildung der ursprünglichen Moleküle führen. Danach finden Seitenreaktionen statt, deren resultierende CIDNP-Signale bei anderen Frequenzen auftauchen und somit das Signal der Käfigprodukte ($\text{Cys}(\text{Me})$ -Linien) nicht schwächen. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass zumindest Teile der auftauchenden Nebenprodukte durch Weiterreaktion des Kationradikals $\text{Cys}(\text{Me})^{\bullet+}$ entstanden sind.

In Abbildung 5.14 ist links die Magnetfeldabhängigkeit der γ -Protonen des $\text{Cys}(\text{Me})$ und mit der durchgezogenen Linie die entsprechende Simulation dargestellt. Rechts sind beispielhaft die Feldabhängigkeiten für zwei der Nebenprodukte aufgetragen. Das Maximum der Feldabhängigkeit befindet sich für alle Kurven beim gleichen Magnetfeld B_{max} , woraus geschlossen werden kann, dass diese Produkte alle aus demselben Radikalpaar stammen. Bei genauerer Betrachtung fällt allerdings auf, dass die Linie IV- β für große Felder vom erwarteten Verlauf abweicht und sogar das Vorzeichen wechselt. Die einzig mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass zumindest einige Teile dieses Nebenproduktes aus einer zweiten Radikalpaarreaktion stammen.

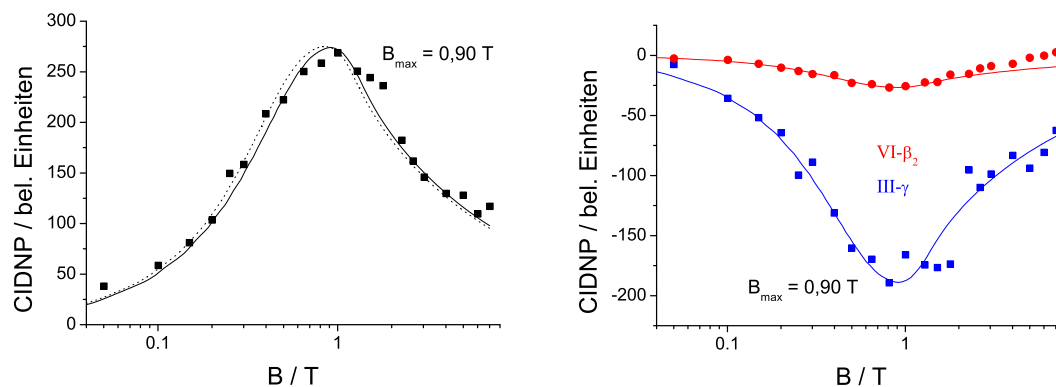


Abbildung 5.14: Abhängigkeit der CIDNP-Intensität vom Magnetfeld bei pH 11,9, links für Cys(Me) (γ -Protonen) und rechts für zwei Nebenprodukte (Nummerierung vergleiche Tabelle 5.4 und Abbildung 5.15). Die maximale CIDNP-Intensität wird bei einem Magnetfeld $B_{\max} = 0,9\text{ T}$ erreicht. Die durchgezogenen Linien zeigen die Simulation bei pH 11,9 und die gestrichelte Linie im linken Graphen die Simulation der Feldabhängigkeit bei pH 6,8 (vgl. Abbildung 5.8).

Vergleicht man die Ergebnisse in neutraler und basischer Lösung, sind die relativen Hyperfeinkopplungen im Rahmen der Fehlertoleranz in beiden pH-Bereichen gleich. Die Magnetfeldabhängigkeit der CIDNP-Intensität bei hohen pH-Werten sieht zunächst derjenigen in neutraler Lösung ähnlich. Die maximale CIDNP-Intensität bei $B_{\max} = 0,9\text{ T}$ ist im Vergleich zu neutraler Lösung allerdings zu einem etwas höheren Feld verschoben. Zur Verdeutlichung dieser Beobachtung ist in Abbildung 5.14 im linken Graphen mit gestrichelter Linie die Magnetfeldabhängigkeit der Simulation der neutralen Lösung und mit durchgezogener Linie die Simulation der basischen Lösung eingezeichnet. Die Abweichung ist jedoch gering und im Rahmen der Fehlertoleranz erklärbar. Damit liegt nahe, dass in neutraler sowie in basischer Lösung das gleiche kationische Radikal Cys(Me) \bullet^+ in der primären Radikalpaarreaktion gebildet wird.

Folgereaktionen und deren Verlauf

Ebenso wie in neutraler Lösung entstehen unter basischen Bedingungen mehrere Nebenprodukte (vgl. Abbildung 5.15). Da von Göz *et al* [54] auch die Reaktion in basischer Lösung untersucht wurde, wurden die Nummerierung sowie die Zuordnung der Nebenprodukte erneut aus [54] übernommen und sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst. In Abbildung 5.15 ist links das Netto-CIDNP-Spektrum und rechts das Multiplett-CIDNP-Spektrum dargestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in neutralen Lösungen zeigen die Nebenprodukte VI- β , VI- α und VII- α nun auch Multipletteffekte. Da dieser Effekt nur bei kleinen Δg eine Rolle spielt (vgl. Abschnitt 2.1.3), ergibt sich hieraus ein Hinweis auf ein weiteres Radikalpaar (außer demjenigen der Primärreaktion: Cys(Me) \bullet^+ und 4CBP \bullet^-) als Ursprung der

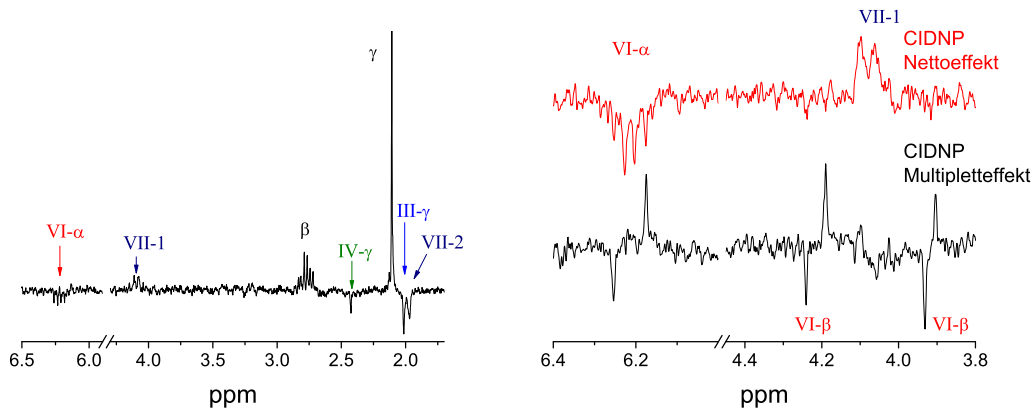


Abbildung 5.15: Netto-CIDNP-Effekt (links und rechts oben) und Multiplett-CIDNP-Effekt (rechts unten) der Reaktion von 4 mM Cys(Me) mit 5 mM 4CBP bei pH 11,9 (180 Akkumulationen)

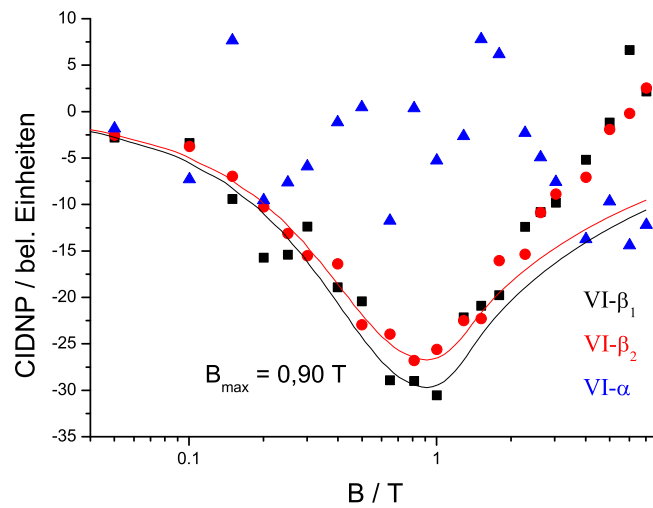


Abbildung 5.16: Abhängigkeit der CIDNP-Intensität vom Magnetfeld, nur für das Nebenprodukt VI (Vinylamin) (vgl. Abbildung 5.15).

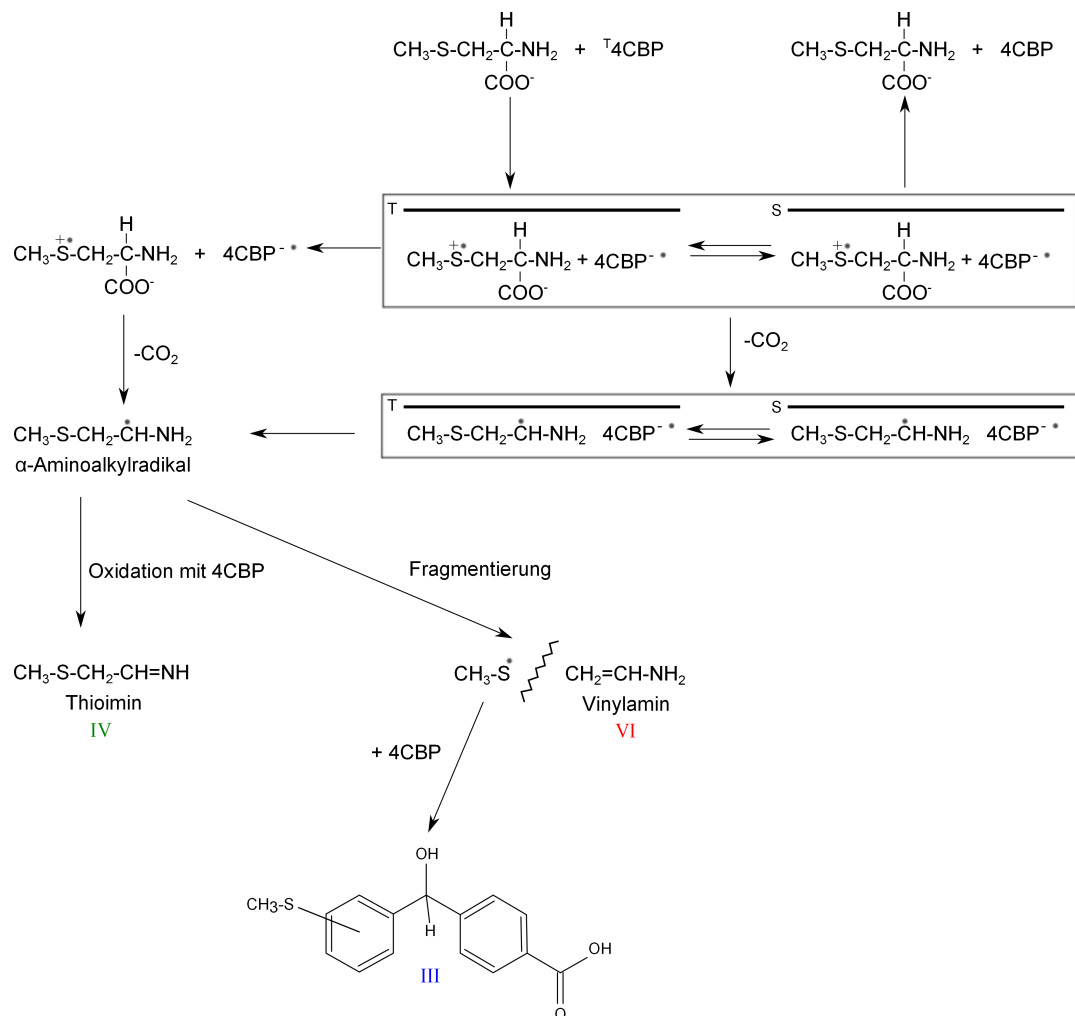


Abbildung 5.17: Verlauf der Radikalpaar- und Folgereaktion von Cys(Me) mit 4CBP bei pH 11,9.

In beiden Kästen sind die beiden stattfindenden Radikalpaarreaktionen gezeigt. Die obere ist die primäre Radikalpaarreaktion. Das nicht zurückreagierte Cys(Me)^{•+} decarboxyliert zum α-Aminoalkylradikal, welches mit 4CBP zusammen das zweite auftauchende Radikalpaar bildet. Letzteres reagiert durch Oxidation mit 4CBP zum Thioimin oder fragmentiert zu Vinylamin und CH₃-S[•], welches mit 4CBP ein Kombinationsprodukt bildet.

Struktur	Name	Nr.	Proton	δ /ppm
4CBP-S-CH ₃		III	γ (CH ₃)	2,050
CH ₃ -S-CH ₂ -CH=NH ₂ ⁺	Thioimin	IV	γ (CH ₃)	2,460
H ₂ C=CH-NH ₂	Vinylamin	VI	β_1 (CH ₂)	4,272
			β_2 (CH ₂)	3,970
			α (CH)	6,257
unbekannt	unbekannt	VII	1	4,132
unbekannt	unbekannt	VII	2	2,005

Tabelle 5.4: Nebenprodukte in basischer Lösung mit chemischer Verschiebung δ .

beobachteten CIDNP-Polarisation. Alle anderen sichtbaren Nebenproduktlinien stammen vermutlich von den γ -Protonen des Cys(Me) der primären Radikalreaktion ab. Da diese nicht mit anderen Kernspins koppeln, kann auch kein Multipletteffekt auftreten. Ein weiterer Hinweis auf eine zusätzliche Radikalpaarreaktion in dem gemessenen System ergibt sich aus den Feldabhängigkeiten der Nebenproduktlinien. Zur besseren Übersicht sind diese nur für die Linien des Nebenproduktes VI (VI- β und VI- α) erneut in Abbildung 5.16 dargestellt. Wie im letzten Abschnitt erläutert wurde, entstehen die Linien des VI- β als Folge zweier verschiedener Radikalpaarreaktionen. Einerseits werden sie als Folgeprodukt der Primärreaktion vom Cys(Me) mit 4CBP (emissive Linien mit etwa $B_{\max} = 0,9$ T) und andererseits als Folgeprodukt eines anderen Radikalpaares (absorptive Linien mit $B_{\max} > 7$ T) gebildet. Da bei etwa 6 T ein Vorzeichenwechsel in der CIDNP-Intensität der VI- β stattfindet, muss der Unterschied der g -Faktoren des nicht primären Radikalpaares sehr klein und der g -Faktor des neuen Radikals kleiner als derjenige seines Partners (vermutlich 4CBP) sein. Ersteres wird auch durch den beobachteten Multipletteffekt bestärkt. In Abbildung 5.16 ist weiterhin die Feldabhängigkeit der VI- α zu sehen. Trotz des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses kann man erkennen, dass für kleine Magnetfelder keine Magnetfeldabhängigkeit vorliegt und diese Linie erst ab etwa 5 T eindeutig emissiven Charakter besitzt. Damit liegt nahe, dass die VI- α -Linie in dem gleichen Radikalpaar wie der bei hohen Feldern wirksame Teil der VI- β -Linie gebildet wurde.

Es kann keine Feldabhängigkeit für die VII-1-Linie angegeben werden, da die Polarisation dieser Linie zu schwach ist. Alle anderen zu beobachtenden Linien der Nebenprodukte, deren Protonen vermutlich von den γ -Protonen des Cys(Me) der Primärreaktion abstammen, zeigen ausschließlich die Feldabhängigkeit der Primärreaktion, so dass folglich während der zweiten Radikalpaarreaktion keine Polarisation auf diesen Linien entsteht.

Da nur aliphatische Protonen die Auswirkungen eines zweiten Radikalpaares zeigen, wird letzteres vermutlich aus einem Folgeprodukt des Cys(Me) mit 4CBP gebildet. Die Beobachtungen aus den Feldabhängigkeiten und den Multiplett-CIDNP-Messungen lassen nur den Schluss zu, dass das zu identifizierende Radikal am α -Kohlenstoff zentriert ist. Vermutlich handelt es sich demnach um ein α -Aminoalkylradikal. Diese Spezies besitzt typischerweise g -Faktoren von etwa $g = 2,0032$ [93] (vgl. dazu auch [54]).

Mit Hilfe der Kapteinschen Regeln (siehe Kapitel 2.1.3) kann aus dem Multiplettmuster der VI- β -Linien (Emission/Absorption) abgeleitet werden, dass das Nebenprodukt VI (Vinylamin) zu den Escape-Paaren gehört.

Damit kann dem in [54] vorgeschlagenen Reaktionsverlauf bei basischen pH-Werten zugestimmt werden (siehe Abbildung 5.17). Er entspricht demjenigen in neutralen Lösungen (vgl. Abschnitt 5.1.1) bis auf die Tatsache, dass im Basischen auch das α -Aminoalkylradikal ein Radikalpaar mit 4CBP bildet und das Thioimin nicht weiter zum Aldehyd reagiert. Zu welchem Zeitpunkt das Nebenprodukt VII gebildet wird, ist unklar, da es nicht zugeordnet werden konnte. Vermutlich entsteht dieses Produkt aus einer Reaktion mit der Aminogruppe, da es erst bei $\text{pH} > \text{pK}_S(\text{NH}_3)$ auftaucht. Außerdem wächst die CIDNP-Polarisation der Linie des Nebenproduktes VII-2 mit steigendem pH-Wert der Lösung, während die Polarisation der Linie des Nebenproduktes IV abnimmt und bei pH 13,5 gar nicht mehr zu erkennen ist (vgl. Abbildung 5.13). Offenbar wird die Bildung des Thioimins (Nebenprodukt IV) zu Gunsten der Bildung des neuen Produktes VII verhindert. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hier vorgestellten Ergebnisse den in [54] vorgeschlagenen Reaktionsverlauf bestätigen.

5.1.3 Beurteilung und Diskussion der Ergebnisse

Um die Auswirkung einer Verkürzung der Seitenkette zu analysieren, werden zum Abschluss dieses Unterkapitels die Ergebnisse aus den Messungen mit S-Methyl-L-Cystein, Cys(Me), mit denen von Methionin, Met, verglichen (vgl. Strukturen Abbildung 5.3, Seite 72).

In den CIDNP-Spektren beider Aminosäuren in neutraler Lösung sind nur die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen polarisiert, womit ein zumindest teilweise auf dem Schwefel zentriertes Kationradikal ($\text{S}^{\bullet+}$ oder $(\text{S}:\text{O})^+$) gebildet worden sein muss (vgl. Abbildung 5.5 auf Seite 74 und [73, 24]). Die aus den Spektren bestimmten relativen Hyperfeinkopplungen sind in Tabelle 5.5 aufgelistet, wobei im Rahmen des Fehlers keine Unterschiede zwischen diesen zu erkennen sind. Beim Vergleich der Feldabhängigkeiten fällt auf, dass die Magnetfeldpositionen maximaler CIDNP-Polarisation für Met und Cys(Me) nicht identisch sind. Die Messungen an Met ergaben $B_{\text{max}} = 0,62 \text{ T}$ [88, 42], während die Messungen an Cys(Me) $B_{\text{max}} = 0,85 \text{ T}$ (siehe Abbildung 5.8 auf Seite 77) zeigen. Aus der Literatur [79, 80, 81] ist bekannt, dass sich bei Met in neutraler

Lösung ein vollständig auf dem Schwefel zentriertes Kationradikal ($S^{+\bullet}$) bildet⁷, welches einen g -Faktor von $g = 2,1012$ besitzt [42, 79]. Der Unterschied in den Feldabhängigkeiten kann daher durch höhere Hyperfeinkopplungen des Cys(Me) im Vergleich zum Met, durch einen kleineren g -Faktor des gebildeten Radikals von Cys(Me) oder durch eine Kombination dieser beiden Effekte erklärt werden.

Die einzige Möglichkeit für Cys(Me) zur intramolekularen Stabilisierung des Schwefels in neutraler Lösung besteht in einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit dem freien Elektronenpaar des Sauerstoffs (zyklisches $(S:\cdot O)^+$ -Radikal) unter Bildung eines Fünferings. Da ein $(S:\cdot O)^+$ -Radikal durch die verringerte Spinbahnkopplung einen kleineren g -Faktor als ein $S^{+\bullet}$ -Radikal (welches von Met gebildet wird) haben sollte, kann in diesem Fall der Unterschied in den Feldabhängigkeiten größtenteils durch den Unterschied der g -Faktoren erklärt werden. Die Idee der Bildung eines transienten $(S:\cdot O)^+$ -Radikals für Cys(Me) vor der Decarboxylierung wurde bereits zur Erklärung von ESR-Messungen vorgeschlagen [85]. Weiterhin konnte in optischen Messungen (durch Radikalpaarbildung mit Hilfe von OH^{\bullet} -Radikalen) eine gemessene Absorptionsbande dem $(S:\cdot O)^+$ -Radikal zugeordnet werden [92]. Für $pH > 3$ konnte der Effekt nicht beobachtet werden, da die Geschwindigkeit des Decarboxylierungsprozesses vermutlich höher als die experimentelle Zeitauflösung war [92]. In späteren optischen Messungen mit 4CBP, in denen das Radikalpaar durch die Löschung eines angeregten Farbstoffes gebildet wird, konnten die Absorptionsbande vermutlich auf Grund der starken Bande des $4CBP^{\bullet-}$ nicht erkannt werden [80, 81].

Insbesondere auf Grund des Unterschiedes in den Feldabhängigkeiten, wird für Cys(Me) die Bildung eines $(S:\cdot O)^+$ -Radikals postuliert. Diese These wird dabei stark durch Messungen am zyklischen Dipeptid Glycin-S-Methyl-Cystein im Abschnitt 5.2.2 gestützt. Durch den Einbau der Aminosäure in eine zyklische Struktur war es möglich, den Prozess der Decarboxylierung zu verhindern und damit das $(S:\cdot O)^+$ -Radikal nachzuweisen und zu charakterisieren. Durch den Vergleich der Ergebnisse von Aminosäure und Peptid (Abschnitt 5.2.2) ist es naheliegend, dass auch die freie Aminosäure vor der Decarboxylierung ein $(S:\cdot O)^+$ -Radikal ausbildet.

In basischer, ebenso wie in neutraler Lösung bildet Cys(Me) ein $(S:\cdot O)^+$ -Radikal aus, während für Met sowohl ein stickstoffzentriertes Kationradikal (lineares $N^{+\bullet}$ -Radikal) als auch eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zwischen dem Schwefel und dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs (zyklisches $S:\cdot N$ -Radikal) auftritt [73, 24]. Die angenommenen Radikalstrukturen für neutrale und basische pH-Werte sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst.

In beiden betrachteten Aminosäuren existiert mit der Decarboxylierung ein zusätzlicher Reaktionskanal, welcher zur Bildung von Nebenprodukten führt. Für Cys(Me) handelt es

⁷Dabei wurde in ESR-Messungen [79] und optischen Messungen [80, 81] die Bildung von Dimeren des $S^{+\bullet}$ -Radikals mit einem Grundzustandsmolekül nachgewiesen, während die bisherigen CIDNP-Messungen nur den Schluss einer Monomerbildung zulassen [42]

	$a_{\text{CH}_3}^{\text{rel}}$	$a_{\text{CH}_2}^{\text{rel}}$
Met	1,00	0,79
Cys(Me)	$1,00 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,08$

Tabelle 5.5: Vergleich der relativen Hyperfeinkopplungen von Met aus [79] und Cys(Me) in neutraler Lösung. Aufgelistet sind die Werte für die CH_3 -Protonen (δ -Protonen für Met und γ -Protonen für Cys(Me)) und die gemittelten Werte für die CH_2 -Protonen (γ -Protonen für Met und β -Protonen für Cys(Me)) in neutraler Lösung.

	neutrale Lösung	basische Lösung
Met	$\text{S}^{+\bullet}$ -Radikal	$\text{N}^{+\bullet}$ -Radikal und $(\text{S}:\text{N})^+$ -Radikal
Cys(Me)	$(\text{S}:\text{O})^+$ -Radikal	$(\text{S}:\text{O})^+$ -Radikal

Tabelle 5.6: Vergleich der Radikalstrukturen für Met und Cys(Me).

sich dabei um die in neutralen und basischen Lösungen dominierende Seitenreaktion [54], während dies für Met nur für hohe pH-Werte der Fall ist [73, 94].

5.2 Einfluss des Peptidrückgrates: Zyklische Dipeptide mit einer Thioethergruppe

Nach der ausführlichen Untersuchung der freien Aminosäuren Methionin und S-Methyl-L-Cystein (vgl. das vorausgegangene Unterkapitel 5.1) wird nun erforscht, welche Reaktionen mit dem Peptidrückgrat stattfinden können. Um den Einfluss der Endgruppen auszuschalten, wird mit zyklischen Dipeptiden gearbeitet (vgl. Abbildung 5.1 auf Seite 69). Durch die Abwesenheit der Endgruppen können die zyklischen Dipeptide als einfaches Modellsystem für Aminosäuren innerhalb einer Proteinkette dienen. Um auch Wechselwirkungen mit anderen Seitenketten zu verhindern, wurde bei den in diesem Unterkapitel beschriebenen Experimenten nur mit solchen Dipeptiden gearbeitet, die neben der entsprechenden thioetherhaltigen Aminosäure ein Glycin enthalten. Zunächst werden die Untersuchungen am zyklischen Glycin-Methionin und danach am zyklischen Glycin-S-Methylcystein vorgestellt. In beiden Abschnitten erfolgt am Ende ein Vergleich mit der freien Aminosäure sowie gegebenenfalls Vergleiche mit linearen Dipeptiden. Als letzter Punkt dieses Unterkapitels erfolgt ein Vergleich beider untersuchten zyklischen Dipeptide miteinander, um auch für diese die Auswirkung der Verkürzung der Seitenkette zu analysieren.

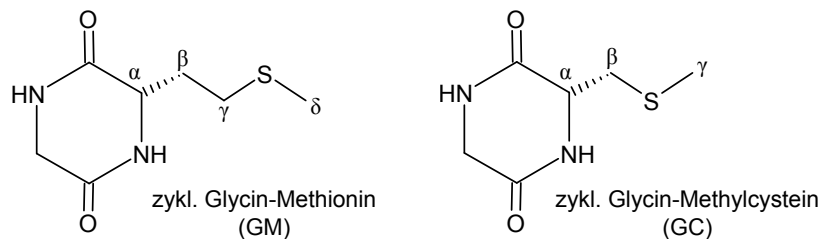


Abbildung 5.18: Struktur des zyklischen Dipeptides Glycin-Methionin (links) und des zyklischen Dipeptides Glycin-S-Methylcystein (rechts).

5.2.1 Zyklisches Glycin-Methionin (GM)

Zunächst werden die CIDNP-Untersuchungen bei neutralem pH-Wert vorgestellt, danach die pH-Abhängigkeit der CIDNP-Signale gezeigt und diskutiert und am Ende die Ergebnisse mit denen der freien Aminosäure sowie den Ergebnissen von linearen Dipeptiden verglichen.

Für die Untersuchungen in diesem Abschnitt wurden die Farbstoffe 4-Carboxybenzophenon (4CBP) und Anthrachinonsulfonsäure (AQS) verwendet.

CIDNP-Messung in Lösungen bei neutralem pH-Wert

In diesem Abschnitt wurden die Systeme zyklisches Glycin-Methionin (GM) (Struktur Abbildung 5.18 links) mit 4-Carboxybenzophenon (4CBP) (Struktur Abbildung 5.2 rechts) sowie mit Anthrachinonsulfonsäure (AQS) (Struktur Abbildung 5.2 links) in neutraler Lösung untersucht. Unter diesen Bedingungen ist 4CBP an seiner Carboxygruppe einfach negativ geladen und AQS ist an der Sulfongruppe ebenfalls einfach negativ geladen. GM liegt dabei unter allen Bedingungen in ungeladener Form vor.

Das NMR-Spektrum von GM zusammen mit seiner Simulation ist in Abbildung 5.19 dargestellt. Aus der Simulation kann die chemische Verschiebung δ der einzelnen Liniengruppen und die skalare j -Kopplung der Kerne untereinander bestimmt werden. Die Resultate sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst. Da das Multiplett der β - und γ -Protonen sehr stark aufgespalten ist und die Linie der δ -Protonen mit denen der β -Protonen überlappt, ist nicht auszuschließen, dass andere Parametersätze das Spektrum ebenfalls nachbilden können.

Struktur des Radikals des GM

In Abbildung 5.20 sind die CIDNP-Spektren der Geminat-Paare und die dazugehörigen NMR-Spektren der Systeme GM mit AQS (links) und 4CBP (rechts) dargestellt. In beiden Spektren sind CIDNP-Signale für die γ - und δ -Protonen und damit für die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen von GM zu erkennen. Damit zeigt GM

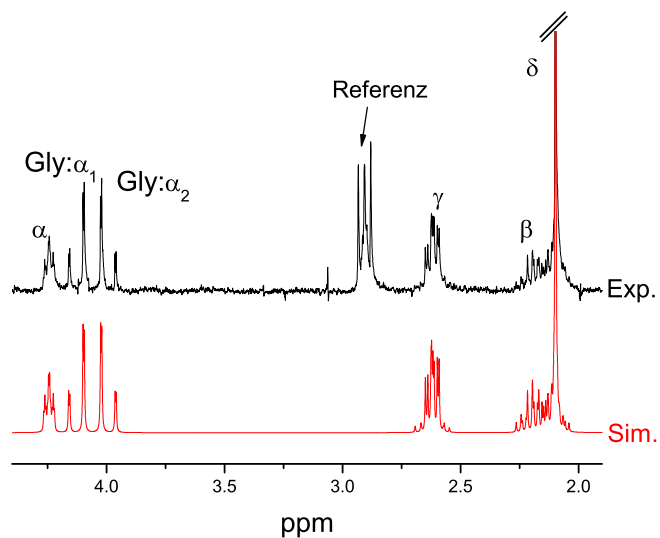


Abbildung 5.19: NMR-Spektrum (schwarz) und Simulation (rot) von 8 mM GM in deuteriertem Wasser bei pH 7,0.

Proton	δ /ppm		j -Kopplung/Hz
		$j_{\alpha_1^{\text{Gly}}, \alpha_2^{\text{Gly}}}$	$18,4 \pm 0,3$
Gly: α_1	$4,120 \pm 0,001$	$j_{\alpha_1^{\text{Gly}}, \alpha}$	$6,0 \pm 0,3$
Gly: α_2	$3,999 \pm 0,001$	$j_{\alpha_2^{\text{Gly}}, \alpha}$	$4,7 \pm 0,3$
α	$4,243 \pm 0,001$	j_{α, β_1}	$4,3 \pm 0,3$
β_1	$2,201 \pm 0,001$	j_{α, β_2}	$4,0 \pm 0,3$
β_2	$2,104 \pm 0,001$	j_{β_1, β_2}	$14,5 \pm 0,3$
γ_1	$2,633 \pm 0,001$	j_{γ_1, β_1}	$8,9 \pm 0,3$
γ_2	$2,604 \pm 0,001$	j_{γ_1, β_2}	$7,1 \pm 0,3$
δ	$2,098 \pm 0,001$	j_{γ_2, β_1}	$5,3 \pm 0,3$
		j_{γ_2, β_2}	$8,2 \pm 0,3$
		j_{γ_1, γ_2}	$13,0 \pm 0,3$

Tabelle 5.7: Chemische Verschiebung δ und j -Kopplung von Glycin-Methionin bei pH 7,0.

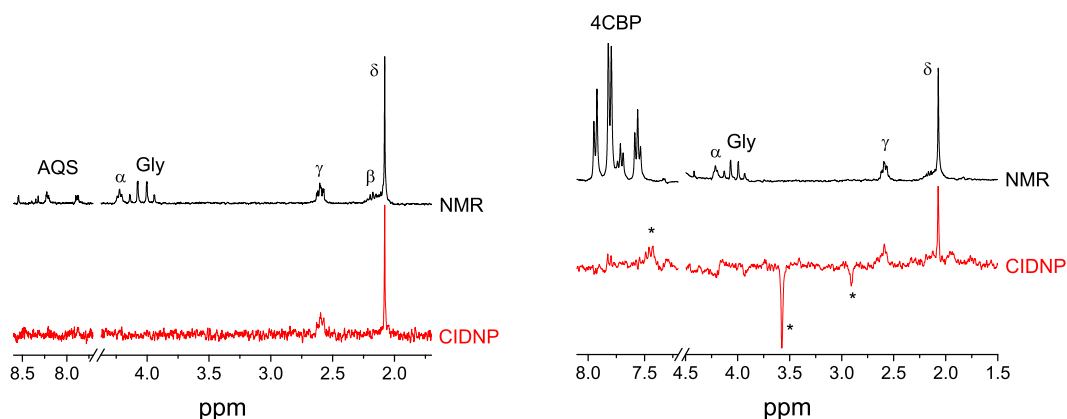


Abbildung 5.20: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum bei $t = 0,5 \mu\text{s}$ (rot) von 2 mM GM links mit 0,6 mM AQS (80 Akkumulationen) und rechts mit 5 mM 4CBP (1200 Akkumulationen) in deuteriertem Wasser bei pH 7,1. Das Symbol „*“ markiert die in Seitenreaktionen entstandenen Nebenprodukte.

das Polarisationsmuster, wie es auch für die freie Aminosäure beobachtet wurde. Weiterhin sind in den Ergebnissen mit 4CBP für das Multiplett der 2,6,2',6'-Protonen, welches für 4CBP^{\bullet} die stärkste Polarisation zeigt (siehe Abschnitt 4.2.3), ein eindeutiges CIDNP-Signal sowie einige Nebenprodukte zu erkennen. Bei der Messung mit AQS sind außer den zu GM zugehörigen keine weiteren Linien polarisiert, so dass die Hyperfeinkopplungen der Protonen des AQS sehr klein angenommen werden müssen. Dies ist in Übereinstimmung mit [79]. Weil bei der Messung mit AQS keine Polarisation auf den Farbstofflinien sichtbar ist und bei der Messung mit 4CBP bereits Nebenprodukte im CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare auftauchen, ist es nicht möglich, absolute Hyperfeinkopplungswerte durch einen Vergleich mit den CIDNP-Signalen des jeweiligen Farbstoffes zu erhalten (wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben). Allerdings können für beide Messungen relative Hyperfeinkopplungen (auf die Kopplungswerte der δ -Protonen normiert) für das GM^{\bullet} -Radikal, welches in der zyklischen Radikalpaarreaktion gebildet wird, bestimmt werden. Diese sind in Tabelle 5.8 aufgelistet und für beide Systeme innerhalb der Fehlertoleranz gleich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in beiden Reaktionen dasselbe Radikal gebildet wird.

Weil das ungepaarte Elektron mindestens teilweise auf dem Schwefelatom des GM-Radikals zentriert ist und damit durch die erhöhte Spinbahnkopplung einen verhältnismäßig hohen g -Faktor von $g > 2,007$ (vgl. [79] und Abschnitt 5.2.2) besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass der isotrope g -Wert des GM-Radikals größer als derjenige des 4CBP-Radikals ist. Unter dieser Voraussetzung und der Annahme, dass der Einfluss der Seitenreaktionen auf die Farbstoffamplituden geringer ist als der Einfluss der primären Radikalreaktion, folgt aus der CIDNP-Phase der Farbstofflinien in Abbildung 5.20, dass die

Protonen	$a_i^{\text{rel}} = \frac{a_i}{a_\delta}$ (Messung mit AQS)	$a_i^{\text{rel}} = \frac{a_i}{a_\delta}$ (Messung mit 4CBP)
δ	$1,00 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,04$
γ	$1,08 \pm 0,13$	$1,09 \pm 0,13$

Tabelle 5.8: Relative Hyperfeinkopplungskonstanten des Radikals von Glycin-Methionin (GM^{\bullet}) aus der Messung mit AQS und 4CBP

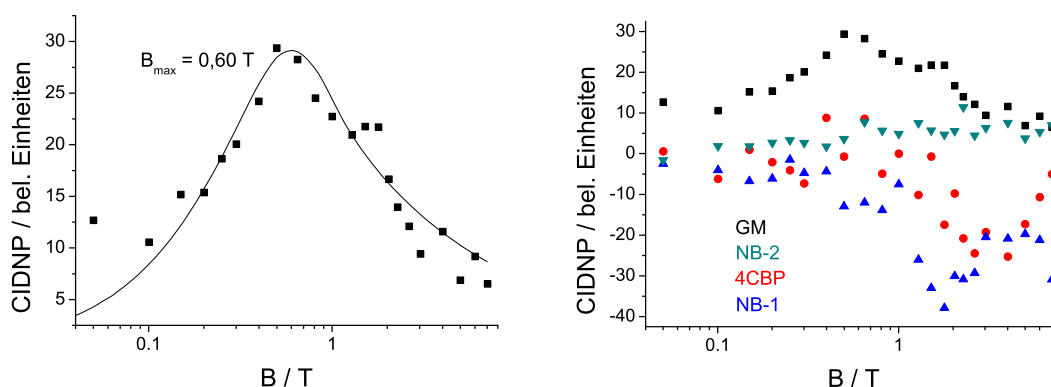


Abbildung 5.21: Abhängigkeit der CIDNP-Intensität vom Magnetfeld, links für GM (δ -Protonen) und rechts der Vergleich mit der Feldabhängigkeit für 4CBP ($H_{2,6,2',6'}$) und zwei Nebenprodukten (zur Nummerierung vergleiche Abbildung 5.25 links, Seite 99) aus der Messung von 1 mM GM und 0,6 mM 4CBP in deuteriertem Wasser (pH 7,1).

Hyperfeinkopplungen des GM-Radikals positives Vorzeichen haben (laut der Kapteinschen Regeln; siehe Abschnitt 2.1.3). Dies entspricht dem Fall der freien Aminosäure Methionin und der linearen Dipeptiden Glycin-Methionin und Methionin-Glycin.

Die einzigen Möglichkeiten zur intramolekularen Stabilisierung des Schwefels bestehen in einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit dem ungebundenen Elektronenpaar des Stickstoffs (zyklisches $(S \cdot N)^+$ -Radikal) unter Bildung eines Fünfrings oder mit dem ungebundenen Elektronenpaar des Sauerstoffs (zyklisches $(S \cdot O)^+$ -Radikal) unter Bildung eines Sechserings. Da keine Polarisierung auf dem α -Proton in den CIDNP-Spektren in Abbildung 5.20 sichtbar ist, kann ersteres jedoch ausgeschlossen werden.

Das Magnetfeld mit maximaler CIDNP-Intensität B_{max} hängt von dem Unterschied der g -Faktoren der beiden beteiligten Radikale Δg und ihren Hyperfeinkopplungen ab (vgl. Kapitel 2.1.4). Da in der Feldabhängigkeit der δ -Protonen von GM in Abbildung 5.21 $B_{\text{max}} \approx 0,60$ T relativ klein ist, muss wie bei S-Methyl-Cystein Δg groß sein oder

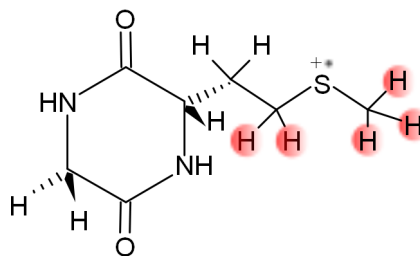


Abbildung 5.22: Radikalstruktur von $GM^{+\bullet}$. Die Stärke der Hyperfeinkopplung der einzelnen Protonen wird durch die Fläche des eingezeichneten Kreises und das positive Vorzeichen der Hyperfeinkopplung durch die rote Farbe veranschaulicht.

die Hyperfeinkopplungskonstante der GM-Linie sehr klein. Da (teilweise oder vollständig) auf dem Schwefel zentrierte Radikale im Vergleich zum Farbstoff (vgl. Kapitel 4.2.3 und 4.2.4) einen relativ hohen g -Wert besitzen (vgl. [79] und Abschnitt 5.2.2), wird der erste Fall angenommen. Weil zusätzlich der Verlauf der Feldabhängigkeiten sehr ähnlich dem der freien Aminosäure ($B_{\max} = 0,62 \text{ T}$ bei Benutzung desselben Farbstoffes [88, 42]) ist, kann davon ausgegangen werden, dass keine intramolekulare Stabilisierung stattfindet und auch im zyklischen Dipeptid ein nur am Schwefel zentriertes Kationradikal ($S^{+\bullet}$) gebildet wird. In Abbildung 5.22 ist die Radikalstruktur des $GM^{+\bullet}$ dargestellt. Dabei sind Kreise um diejenigen Protonen eingezeichnet, die eine nicht verschwindende Hyperfeinkopplung zum Elektron besitzen (vgl. Tabelle 5.8).

Radikalpaarreaktion

Um Aussagen über den Reaktionsmechanismus und -weg treffen zu können, wurde die CIDNP-Kinetik jeweils für GM mit AQS und mit 4CBP vermessen. In Abbildung 5.23 werden die CIDNP-Spektren für eine Wartezeit von $0,5 \mu\text{s}$ und $100 \mu\text{s}$ nach der Laseranregung gezeigt. Dabei ist die Polarisierung der GM-Linien nach $100 \mu\text{s}$ nahezu restlos verschwunden. Die vollständige CIDNP-Kinetik für die δ -Protonen von GM ist für zwei verschiedene Konzentrationen (1 mM und 2 mM) in Abbildung 5.24 links für die Messung mit AQS und rechts für die Messung mit 4CBP dargestellt. Der beobachtete schnelle Abfall der CIDNP-Polarisation sowie die Abhängigkeit der Kinetik von der Konzentration des GM sind typische Charakteristika für degenerierten Elektronenaustausch (vgl. Abschnitt 2.1.6). Dieser Prozess kann nur stattfinden, wenn sich das gebildete Radikal nur durch ein Elektron vom diamagnetischen Grundzustandsmolekül (hier: GM) unterscheidet (vgl. Kapitel 2.1.6), so dass folgende Reaktionsmechanismen zwischen den Radikalpartnern angenommen werden können:

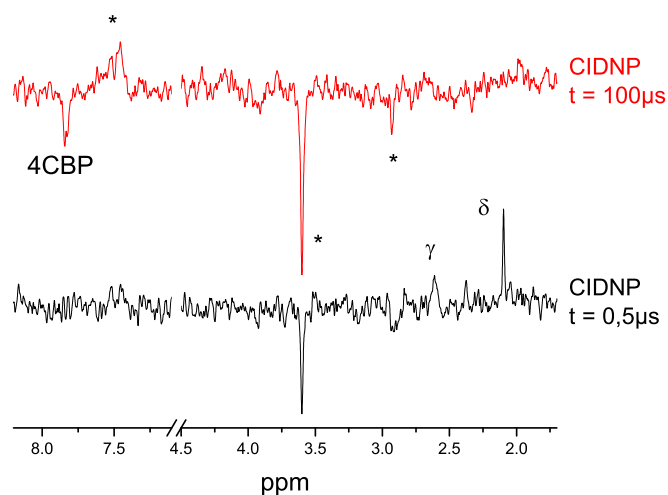


Abbildung 5.23: CIDNP-Spektrum $0,5 \mu\text{s}$ (schwarz) und $100 \mu\text{s}$ (rot) nach der Laseranregung von 1 mM GM und 5 mM 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 7,4 (jeweils 120 Akkumulationen). Die Messung wurde mit einem $1 \mu\text{s}$ RF-Puls durchgeführt. Das Symbol „*“ markiert die Nebenprodukte.

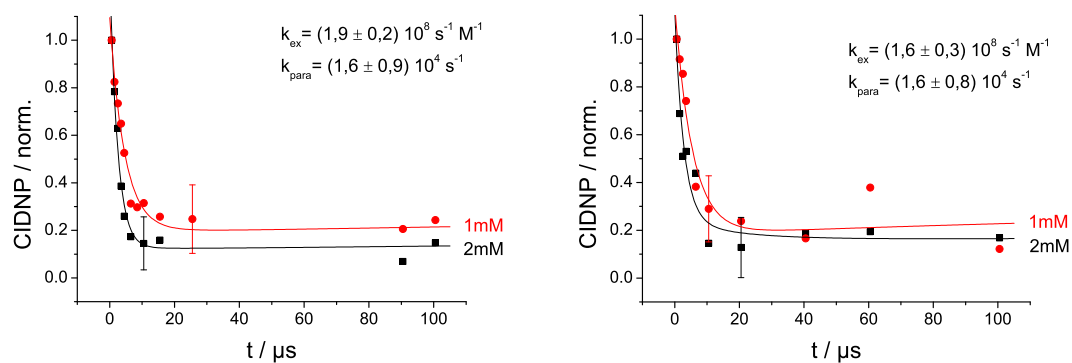
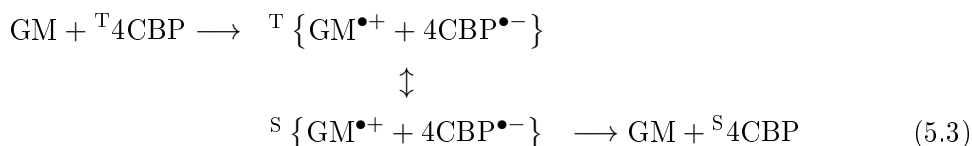
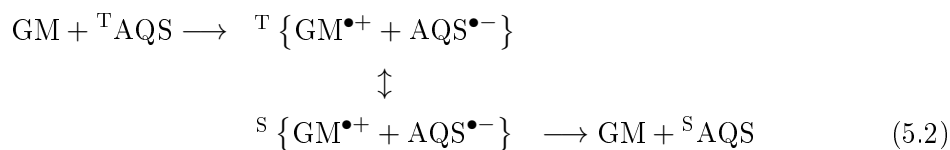


Abbildung 5.24: CIDNP-Kinetiken der δ -Protonen von GM aus der Messung von verschiedenen Konzentration des GM mit $0,6 \text{ mM}$ AQS (links) bzw. 5 mM 4CBP (rechts) in neutraler Lösung.



Die Anpassungen des in Abschnitt 2.1.6 vorgestellten Gleichungssystems 2.29 und 2.30 auf Seite 24 an die Daten sind als durchgezogene Linien in Abbildung 5.24 eingezeichnet. Die ermittelte Rate des degenerierten Elektronenaustausches $k_{\text{ex}} = 1,6 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ sowie die longitudinale Relaxationsrate der Kernspins der γ -Protonen im radikalischen Zustand $k_{\text{para}} = 1,6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ sind für beide vermessenen Systeme innerhalb der Fehlergrenzen gleich und liegen dabei in der Größenordnung der für andere Protonen in Aminosäuren oder Dipeptiden ermittelten Raten ($k_{\text{ex}} \sim 10^8 - 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ [72, 60, 25, 26] und $k_{\text{para}} \sim 10^3 - 10^6 \text{ s}^{-1}$ [74, 60, 25]).

Da bei der Messung mit AQS keine Nebenprodukte auftauchen, kann das Gleichungssystem so zur Anpassung an die Daten verwendet werden, wie es in Abschnitt 2.1.6 vorgestellt wurde. Trotz der auftauchenden Nebenprodukte ist es bei der Untersuchung mit 4CBP möglich, genauso zu verfahren, da die mit dem in Abschnitt 2.1.6 vorgestellten Gleichungssystem bestimmten Raten in den Messungen mit beiden Farbstoffen im Rahmen der Messgenauigkeit gleich sind. Im Allgemeinen besteht bei dem Auftauchen von Seitenreaktionen dagegen die Möglichkeit, dass das in der primären Reaktion erzeugte Radikal zu einem Folgeradikal weiterreagiert⁸ und später die beobachteten Nebenprodukte bildet. In diesem Fall müssten die Gleichungen angepasst werden, da ein Teil der Radikale über nicht im Gleichungssystem berücksichtigte Reaktionen in den Grundzustand zurückreagieren würden. Dies ist aber offensichtlich für $\text{GM}^{\bullet+}$ nicht der Fall. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass $\text{GM}^{\bullet+}$ an keiner nicht berücksichtigten Folgereaktion teilnimmt bzw. dass der Einfluss einer Weiterreaktion des $\text{GM}^{\bullet+}$ zu einem anderen Radikal gering sein muss.

Seitenreaktion und Folgeprodukte

Bereits in den CIDNP-Spektren der Messung mit 4CBP wird offensichtlich, dass neben der zyklischen Reaktion noch mindestens eine Seitenreaktion stattfindet, deren Produkte

⁸Beispielsweise wie dies bei $\text{Cys}(\text{Me})^{\bullet+}$ im letzten Unterkapitel 5.1.1 durch Decarboxylierung der Fall war.

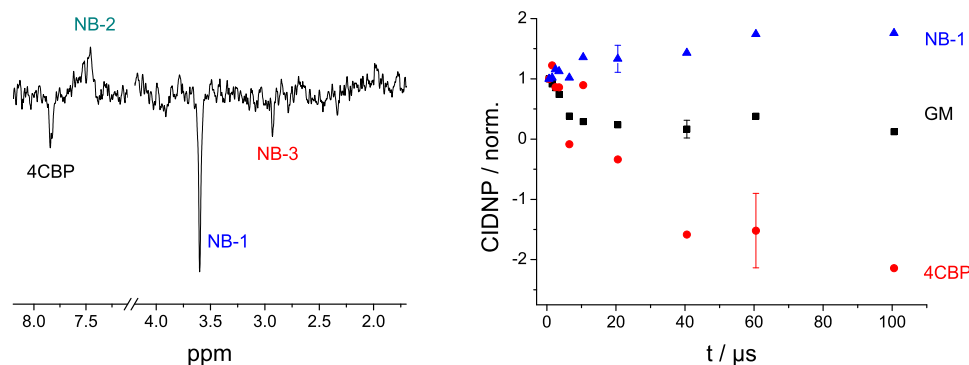


Abbildung 5.25: Links: CIDNP-Spektrum 100 μs nach Laseranregung von 1 mM GM und 5 mM 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 7,4 (120 Akkumulationen) mit Zuordnung der Nebenprodukte. rechts: Vergleich der CIDNP-Kinetiken für GM (δ -Protonen) 4CBP ($H_{2,6,2',6'}$) und ein Nebenprodukt NB-1.

auch Polarisation zeigen (vgl. Abbildung 5.23). Die in Abbildung 5.25 (links) benannten Liniengruppen der Nebenprodukte NB besitzen folgende chemische Verschiebung δ :

$$\text{NB-1: } \delta = 3,60$$

$$\text{NB-2: } \delta = 7,49$$

$$\text{NB-3: } \delta = 2,93$$

Dabei befinden sich die Liniengruppen der Seitenreaktionen bei der Messung mit Methionin, linearem Glycin-Methionin und linearem Methionin-Glycin mit dem Farbstoff 4CBP in neutralen Lösungen an ähnlicher Position, so dass jeweils die Bildung derselben Nebenprodukte wahrscheinlich ist [42, 24, 83, 94]. In [94] wurde vermutet, dass die Nebenprodukte durch Protonentransfer im Radikalpaar und anschließende Bildung von Kombinationsprodukten der beiden beteiligten Radikalpartner entstehen.

In Abbildung 5.21 (rechts) auf Seite 95 ist die Feldabhängigkeit für die δ -Linie des GM, zwei Nebenproduktlinien und die Farbstofflinie aufgetragen. Deutlich ist zu erkennen, dass GM und NB-1 unterschiedliche Feldabhängigkeiten zeigen. Für NB-1 ist das Maximum zu deutlich höheren Magnetfeldstärken verschoben (2 T gegenüber 0,60 T). Daher muss eine weitere Radikalpaarreaktion mit einem kleineren Unterschied der g -Faktoren der beteiligten Radikale als in der primären Reaktion stattfinden ($\Delta g < 0,0066$). Auch für NB-2 kann trotz des deutlich schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses eine zu höheren Feldern verschobene Feldabhängigkeit erkannt werden, welche im Rahmen der Messgenauigkeit denselben Verlauf wie für NB-1 hat und daher der gleichen Radikalpaarreaktion zugeordnet werden kann. Betrachtet man den Verlauf der Farbstofflinie, so hat es zunächst

den Anschein, als ob die maximale CIDNP-Polarisation bei etwa 3,5 T vorliegen würde. Da jedoch diese Linie im Verlauf der zyklischen Reaktion polarisiert werden kann (mit einem $B_{\max} = 0,62$ T), ist diese Feldabhängigkeit eine Überlagerung zweier Prozesse: Eine positive Polarisation mit dem Maximum bei $B_{\max} = 0,62$ T und eine negative mit dem Maximum bei $B_{\max} \sim 2$ T. Wenn diese Interpretation zutrifft, so bedeutet das, dass 4CBP an beiden vorhandenen Radikalpaarreaktionen teilnimmt. Gestützt wird diese Vermutung ebenfalls durch die CIDNP-Kinetik von 4CBP (rote Punkte in Abbildung 5.25 rechts). Dort ist ein deutlicher Vorzeichenwechsel für die Liniengruppe des 4CBP zu erkennen, der nur durch die Beteiligung der 4CBP-Radikale an zwei Radikalpaarreaktionen erklärt werden kann. Da die Polarisation der H2,6,2',6'-Protonen des 4CBP aus der Primärreaktion unter Bildung des $4\text{CBP}^{\bullet-}$ positiv ist, muss in der zweiten Radikalpaarreaktion das Vorzeichen der Polarisation des entsprechenden Multipletts negativ sein, um den beobachteten Vorzeichenwechsel zu verursachen. Die in Abbildung 5.25 rechts dargestellte Kinetik der Nebenproduktlinie NB-1 ist im Rahmen der Fehlertoleranz unabhängig von der Konzentration von GM. Daraus folgt, dass die Aufspaltung in zwei Reaktionskanäle nach 1 μs bereits abgeschlossen sein muss, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sich die beiden Pfade vermutlich bereits im Reaktionskäfig trennen.

Aus Pulsradiolysemessungen wurde geschlussfolgert, dass das kationische, auf dem Schwefel zentrierte GM-Radikal durch Deprotonierung am γ - oder δ -Kohlenstoff unter Bildung eines α -(Alkylthio)alkylradikals weiterreagiert [77, 78]. Diese Möglichkeit kann allerdings auf Grund der im Rahmen der Fehlergrenzen konstanten CIDNP-Kinetik der Seitenprodukte sowie auf Grund des gleichen Verlaufs der CIDNP-Kinetik der δ -Protonen bei der Messung mit AQS und 4CBP ausgeschlossen werden.

Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass im Reaktionskäfig von 4CBP und Methionin nach dem Elektronentransfer ein Protonentransfer folgen kann, wobei das Ketylradikal von 4CBP (4CBP^{\bullet}) und ein α -(Alkylthio)-Alkylradikal, welches ein Proton an der γ - oder δ -Position verloren hat, entsteht [80]. Die Bildung des Ketylradikals des 4CBP nach dem Zerfall des Tripletzustandes konnte auch in optischen Messungen, die unter ähnlichen Bedingungen wie die hier gezeigten CIDNP-Messungen aufgenommen wurden⁹, nachgewiesen werden. Dabei ist zu beachten, dass das anionische $4\text{CBP}^{\bullet-}$ -Radikal einen pK_S -Wert von 8,2 [89] hat. Die zu erwartende Protonierung des $4\text{CBP}^{\bullet-}$ -Radikals durch das Lösungsmittel ($k_{\text{prot}} \sim 2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ [90]) kann allerdings auf der in dieser Arbeit und in den optischen Messungen verwendeten Zeitskala keine Rolle spielen. Weitere Hinweise auf einen stattfindenden Wasserstofftransfer finden sich in der Literatur bei Messungen an Peptiden mit eingebauten 4CBP-Gruppen [95, 96]. Dort konnte nach der Belichtung der Probe eine Bindung zwischen der CO-Gruppe des Farbstoffes und dem δ - oder γ -Kohlenstoff der Methion-

⁹Durchführung von G. Hörner (Adam Mickiewicz University Poznan) mit folgenden Messparametern: 0,2 mM bis 2 mM GM mit 2 mM 4CBP bei pH 7; Anregungswellenlänge $\lambda = 355$ nm; persönliche Mitteilung

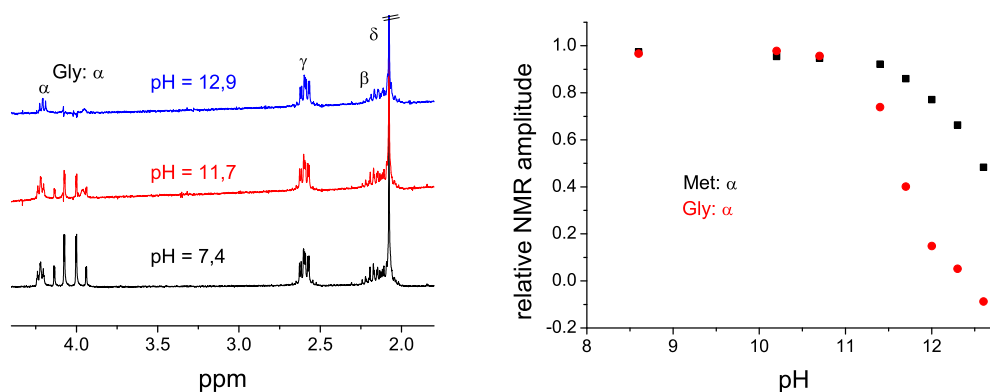


Abbildung 5.26: NMR-Spektren von 8 mM GM bei unterschiedlichen pH-Werten (links). Abhängigkeit des normierten NMR-Signals der α -Protonen vom pH-Wert (rechts).

inseitenkette gefunden werden. Diese Bindung kann nur durch vorherige Bildung des Ketylradikals des Benzophenones und des α -(Alkylthio)-Alkylradikals entstehen. Die in einem anderen Lösungsmittel aufgenommenen NMR-Spektren der gebildeten Produkte zeigen die ehemaligen δ und γ -Protonen der Met-Seitenkette dabei im ähnlichen Frequenzbereich wie die gefunden Nebenprodukte. Die α -(Alkylthio)-Alkylradikale besitzen einen bekannten g -Faktor von $g = 2,0048$ ($\bullet\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHCO}_2^-\text{NH}_3^+$) und $g = 2,0046$ ($\text{CH}_3\text{-S-}\bullet\text{CH}_1\text{-CH}_2\text{-CHCO}_2^-\text{NH}_3^+$) [85]. Der in Abschnitt 4.2.4 abgeschätzte g -Faktor des Ketylradikals ($g_{4\text{CBPH}\bullet} < 2,0041$), ist somit kleiner als derjenige der α -(Alkylthio)-Alkylradikale. Wenn diese Radikalpaarreaktion im Reaktionskäfig stattfindet, müsste die CIDNP-Polarisation des Multipletts des 4CBP absorptiv sein. Die Tatsache, dass diese aber emissiv beobachtet wird, widerspricht der obigen Annahme eines Protonentransfers von GM zu 4CBP im zweiten Reaktionskanal.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass in dem vermessen System GM mit 4CBP mindestens zwei Radikalpaarreaktionen auftreten. Dabei kann ausgeschlossen werden, dass ein durch Weiterreaktion entstandenes Folgeprodukt des in der Primärreaktion entstandenen $\text{GM}^+\bullet$ an der zweiten Radikalpaarreaktion teilnimmt, so dass die beiden Reaktionspfade vermutlich schon im Reaktionskäfig getrennt werden. Eine denkbare Seitenreaktion besteht dabei in einem dem Elektronentransfer nachgelagerten Protonentransfer. Allerdings existieren in dieser Fragestellung widersprüchliche Aussagen in der Literatur.

Abhängigkeit vom pH-Wert

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit (im Bereich pH 2,2 bis pH 12,6) der CIDNP-Signale wurde der Farbstoff Anthrachinonsulfonsäure (AQS) verwendet, da dieser im Gegensatz zu 4CBP im gesamten pH-Bereich löslich ist.

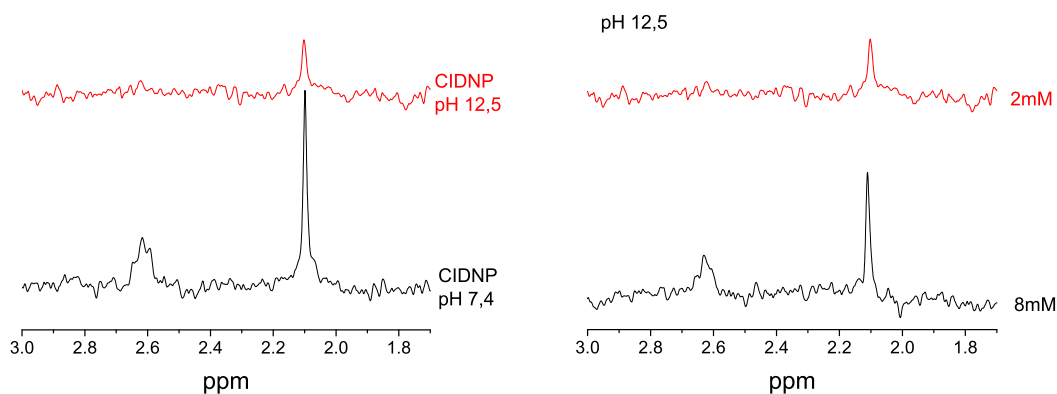


Abbildung 5.27: CIDNP-Spektren von 2 mM GM mit 0,6 mM AQS bei unterschiedlichen pH-Werten (links) und von 8 mM GM mit 0,6 mM AQS bei pH 12,5 (rechts) 0,5 μ s nach der Laseranregung (jeweils 80 Akkumulationen).

Bevor die CIDNP-Ergebnisse diskutiert werden, wird zunächst das NMR-Spektrum von GM betrachtet. Weil das zyklische Dipeptid GM weder im Rückgrat noch in den Seitenketten titrierbare Gruppen besitzt, wird keine pH-Abhängigkeit des NMR-Spektrums erwartet. Der experimentelle Befund widerspricht dieser Annahme, da bei hohen pH-Werten die Signale der Multipletts der α -Protonen zunächst schwächer werden und schließlich fast komplett verschwinden (siehe Abbildung 5.26 links). Dieser basenkatalysierte Effekt, der typisch für die zyklischen Peptide ist, nennt sich Epimerisation [97]. Dabei werden die α -Protonen in zwei Stufen durch Deuteronen des Lösungsmittels ausgetauscht, wobei die ursprüngliche Konformation der Seitenketten zueinander verloren gehen kann. Im ersten Schritt wird das Dipeptid am α -Kohlenstoff durch die vorhandene Base deprotoniert. Im zweiten Schritt nimmt das so entstandene Carbanion ein Proton aus dem Lösungsmittel auf. Da die Messungen in D_2O durchgeführt wurden, findet hierbei eine Deuterierung statt und die Linie der α -Protonen im NMR-Spektrum verschwindet. Da das intermediäre Carbanion planar ist, gibt es keine Vorzugsrichtung bei der Protonierung. Dies hat zur Folge, dass ein System, bei dem die Seitenketten in cis-Konformation standen, bei der Protonierung in die trans-Konformation umgewandelt werden kann und umgekehrt. Am Ende entsteht so immer ein Gemisch aus cis- und trans-Konformation. Bei GM geht dabei keine Information verloren, da die Seitenkette des Glycin aus zwei Wasserstoffen besteht. Im Allgemeinen darf jedoch nicht im Basischen gemessen werden, wenn die Abhängigkeit des CIDNP-Signals von unterschiedlichen Konformationen untersucht werden soll (vgl. Unterkapitel 5.3). In Abbildung 5.26 (rechts) ist sehr gut zu sehen, dass die Stärke des Effektes der Epimerisation von der Seitenkette abhängt, da die α -Protonen des Glycin bereits bei niedrigerem pH-Wert als die des Methionin ausgetauscht werden.

In Abbildung 5.27 sind die CIDNP-Spektren 0,6 μ s nach dem Laserblitz für unterschied-

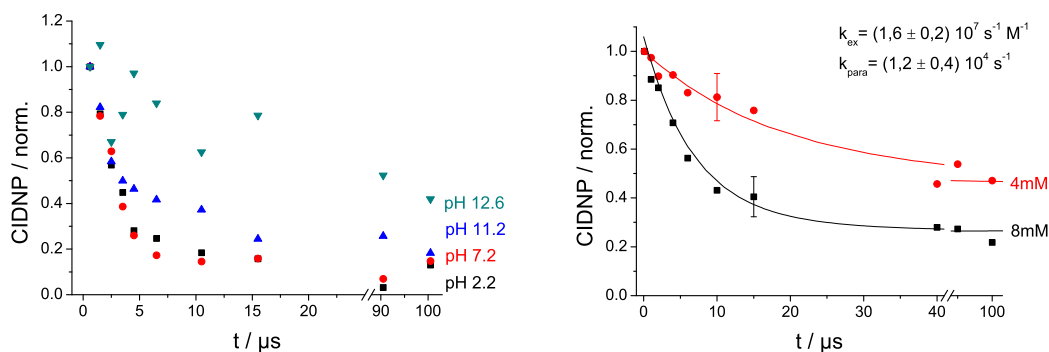


Abbildung 5.28: CIDNP-Kinetik der δ -Protonen von GM aus der Messung von 2 mM GM mit 0,6 mM AQS bei unterschiedlichen pH-Werten (links) und CIDNP-Kinetiken der δ -Protonen von GM aus der Messung von verschiedenen Konzentration des GM (4 mM und 8 mM AQS bei pH 12,5 (rechts).

liche pH-Bereiche gezeigt. Die Messungen weisen für alle pH-Werte (zwischen pH 2,2 und pH 12,5) das gleiche Polarisationsmuster wie bei der Messung mit GM auf, da nur δ - und γ -Protonen polarisiert sind. Weil sich die relativen Hyperfeinkopplungskonstanten des GM-Radikals (vgl. Tabelle 5.8 auf Seite 95) im Rahmen der Messgenauigkeit nicht ändern, kann davon ausgegangen werden, dass im ganzen pH-Bereich dasselbe $\text{GM}^{\bullet+}$ -Radikal, ein nur am Schwefel zentriertes Kationradikal ($\text{S}^{+\bullet}$), gebildet wird. Ein weiterer Hinweis dafür ergibt sich aus den CIDNP-Kinetikmessungen der δ -Protonen, da die longitudinale Relaxationszeit des Kerns im radikalischen Zustand k_{para} bei allen pH-Werten im Rahmen der Fehlertoleranz gleich ist. Die Bildung eines schwefelzentrierten Kationradikals ($\text{S}^{+\bullet}$) ist demnach offenbar unabhängig vom Protonierungszustand des $\text{AQS}^{\bullet-}$ ($\text{pK}_S(\text{AQS}) = 3,9$ [79]).

Die initiale Polarisation von GM ist für alle pH-Werte kleiner 11 etwa gleich, für höhere pH-Werte nimmt sie drastisch ab, wie in Abbildung 5.27 links zu sehen ist. Durch eine Erhöhung der Löscherkonzentration (Abbildung 5.27 rechts) kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des CIDNP-Signals allerdings wieder verbessert werden. Anscheinend wird die effektive Löschrates des Triplettzustandes des AQS mit GM mit steigendem pH-Wert erniedrigt. Dieser Effekt hat seine Ursache vermutlich in einer auftauchenden Parallelreaktion, nämlich der Löschung des Triplettzustandes durch OH^- -Ionen mit einer Rate von etwa $k \approx 3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ [98].

In Abbildung 5.28 links sind die CIDNP-Kinetiken der δ -Protonen aus der Messung von 2 mM GM und 0,6 mM AQS bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Wie schon bei den absoluten CIDNP-Signalstärken ist auch bei den Kinetiken keine Veränderung für pH-Werte kleiner 11 zu sehen. Für höhere pH-Werte reduziert sich die Zeitkonstante für den Signalabfall deutlich, da der degenerierte Elektronenaustausch an Einfluss verliert. Zur

quantitativen Analyse wurde die CIDNP-Kinetik für zwei Konzentrationen (4 mM und 8 mM) bei pH 12,5 vermessen (Abbildung 5.28 rechts). Auch bei diesem pH-Wert nimmt das $\text{GM}^{\bullet+}$ am degenerierten Elektronenaustausch teil, allerdings ist die entsprechende Rate etwa eine Größenordnung kleiner als in neutraler Lösung (vgl. Abbildung 5.24 links auf Seite 97 und 5.28 rechts). Eine denkbare Ursache dafür könnte in einer teilweisen Deprotonierung des radikalischen Zustandes liegen. Hier bestehen die Möglichkeiten, dass ein Proton an der γ - oder δ -Position, wie dies bei der Reaktion mit 4CBP bei neutralem pH wahrscheinlich der Fall ist (vgl. Abschnitt auf Seite 98), oder an der α -Position, wie dies bereits im diamagnetischen Zustand durch die vorliegende Base stattfindet, abstrahiert wird. Ersteres kann ausgeschlossen werden, da keine Nebenprodukte im CIDNP-Spektrum auftauchen. Auf Grund der hohen Konzentration an OH^- -Ionen wird im Folgenden eine Deprotonierung an der α -Position ausgegangen, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit im paramagnetischen deutlich höher als im diamagnetischen Zustand sein muss. Unter dieser Annahme ist die Struktur einiger der Radikale derart verändert, dass sie nicht mehr am degenerierten Elektronenaustausch teilnehmen können und die beobachtete effektive Austauschrate deutlich verringert wird. Trotz der Protonenabstraktion ist keine Veränderung des Polarisationsmusters im CIDNP-Spektrum zu sehen, da nach der Rekombination der Radikale in den diamagnetischen Grundzustand diese sofort wieder durch das Lösungsmittel protoniert werden. Die Reaktion verläuft somit zyklisch, weshalb die vermutete Deprotonierung im transienten radikalischen Zustand nur aus der CIDNP-Kinetik ersichtlich ist.

Im gesamten vermessenen pH-Bereich (zwischen pH 2,2 und pH 12,5) bildet das zyklische Dipeptid GM demnach ein allein auf dem Schwefel zentriertes Kationradikal ($\text{S}^{\bullet+}$). Unter stark basischen Bedingungen tritt allerdings eine Epimerisation des diamagnetischen Peptides auf. Außerdem ist die Löschrates und damit auch die Polarisation auf Grund der Löschung des Triplettzustandes durch OH^- -Ionen sowie der Einfluss des degenerierten Elektronenaustausches (vermutlich auf Grund der transienten Deprotonierung im radikalischen Zustand) erheblich verringert.

Vergleich der Ergebnisse mit Methionin und den entsprechenden linearen Peptiden

Im Folgenden wird der Einfluss auf die Radikalstruktur und -reaktion beim Einbau der Aminosäure Methionin in ein Peptid diskutiert. Zu diesem Zweck werden die Resultate der freien Aminosäure Methionin (Met) mit denjenigen in Dipeptiden gegenübergestellt. Dabei ist die zweite Aminosäure in den Dipeptiden jeweils Glycin, um eine direkte Wechselwirkungen mit der Met-Seitenkette zu verhindern. Um zusätzlich den Einfluss der Endgruppen zu untersuchen, werden dafür sowohl die linearen Dipeptide Glycin-Methionin (Gly-Met) und Methionin-Glycin (Met-Gly), bei denen die Met-Seitenkette in direkter Nachbarschaft zum N- bzw. C-Terminus eingebaut ist, als auch das zyklische Dipeptid GM, in dem der Einfluss der Endgruppen ausgeschaltet ist, verglichen. Da bereits CIDNP-Untersuchungen an Met

	a_γ/a_δ	B_{\max} / T	$k_{\text{ex}} / \text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$	$k_{\text{para}} / \text{s}^{-1}$
GM	$a_\gamma^{\text{rel}} = 1,09 \pm 0,13$	0,60	$(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$(1,6 \pm 0,8) \cdot 10^4$
Met [42]	$a_\gamma^{\text{rel}} = 0,79$	0,62	$3,4 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^5$
lin. Peptide [42]	$a_\gamma^{\text{rel}} = 0,79$	0,68	$2,0 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^5$

Tabelle 5.9: Vergleich der Radikalparameter bei Bildung eines $S^{+\bullet}$ -Radikals in neutraler Lösung für das GM mit den entsprechenden linearen Dipeptiden (Gly-Met und Met-Gly) sowie mit der freien Aminosäure Met. Aufgetragen sind die relative Hyperfeinkopplung der γ -Protonen a_γ/a_δ , das Magnetfeld mit maximaler CIDNP-Polarisation B_{\max} , die Austauschrate des degenerierten Elektronenaustausches k_{ex} und die longitudinale Relaxationsrate des Kernspins der δ -Protonen im radikalischen Zustand k_{para} .

[73, 24, 87, 88, 42] sowie den linearen Peptiden Gly-Met und Met-Gly [83, 42] vorliegen, können die Ergebnisse denen in dieser Arbeit bestimmten Resultaten gegenübergestellt werden.

In neutraler Lösung zeigen GM, Met und lineares Gly-Met das gleiche Polarisationsmuster eines schwefelzentrierten Kationradikals, bei dem nur die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen polarisiert sind. Beim CIDNP-Spektrum des linearen Met-Gly ist dagegen auch noch Polarisation auf den α -Protonen sichtbar. Zunächst bildet dieses in neutralen Lösungen ebenfalls ein $S^{+\bullet}$ -Radikal, welches dann nach Deprotonierung der Ammoniumionengruppe zum $S\cdot\text{:N}$ -Radikal umgewandelt wird [83, 42]. Offenbar ist die Bildung einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zum Stickstoff nur dann möglich, wenn sich das Methionin am N-Terminus des Peptides befindet und die Deprotonierung der Ammoniumionengruppe durch die räumliche Separation der Säuregruppe bevorzugt wird. Für die weiteren Vergleiche der Strukturparameter werden nur die Einflüsse des primären Radikals ($S^{+\bullet}$) diskutiert. Vergleicht man die relativen Hyperfeinkopplungen (siehe Tabelle 5.9 erste Spalte), sind diese für Met und die linearen Peptide gleich, unterscheiden sich allerdings von GM, bei dem das Verhältnis a_γ/a_δ größer ist. Ein mögliche Ursache dafür könnte eine veränderte, durch die Ringstruktur des Dipeptides bedingte Lage der Protonen im Molekül und somit auch eine veränderte Wechselwirkung mit dem ungepaarten Elektron sein. Bei allen betrachteten Substanzen wurde für die Messung der CIDNP-Feldabhängigkeit der Farbstoff 4CBP benutzt [83, 88, 42], so dass der Verlauf direkt verglichen werden kann. Die Lage des Magnetfeldes mit maximaler CIDNP-Intensität variiert nur leicht zwischen $B_{\max} = 0,60 \text{ T}$ für das zyklische Dipeptid und $B_{\max} = 0,68 \text{ T}$ für das lineare Dipeptid. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass bei der Radikalpaarreaktion aller dieser Substanzen mit 4CBP ein $S^{+\bullet}$ -Radikal gebildet wird. Die vorkommenden Radikalstrukturen sind in Tabelle 5.10 für neutrale und basische Lösungen zusammengefasst. Dabei werden in

	neutrale Lösung	basische Lösung
GM	S ^{+•} -Radikal	S ^{+•} -Radikal
Met	S ^{+•} -Radikal	N ^{+•} -Radikal und S [•] :N-Radikal
lin. Gly-Met	S ^{+•} -Radikal	N ^{+•} -Radikal und S ^{+•} -Radikal
lin. Met-Gly	S ^{+•} -Radikal und S [•] :N-Radikal	N ^{+•} -Radikal und S [•] :N-Radikal

Tabelle 5.10: Vergleich der Radikalstrukturen in neutraler und basischer Lösung für das zyklische Glycin-Methionin mit den entsprechenden linearen Dipeptiden (Gly-Met und Met-Gly) sowie mit der freien Aminosäure Methionin. Dargestellt sind nur die „Grobstrukturen“, für kleinere Unterschiede siehe Text.

sauren Lösungen vermutlich wie für GM jeweils nur S^{+•}-Radikale für die freie Aminosäure und beide linearen Dipeptide gebildet [83, 42].

Beim Vergleich der Strukturen in basischer Lösung fällt auf, dass nur das zyklische Dipeptid kein N^{+•}-Radikal bildet, da es keine Aminogruppe besitzt. Weiterhin ist die Bildung eines S[•]:N-Radikals nur für die Substanzen möglich, bei denen sich die Met-Seitenkette direkt am N-Terminus bzw. in räumlicher Nähe zur Aminogruppe befindet. Daher tritt dieses Radikal nur bei Met und linearem Met-Gly auf. Durch die Abwesenheit von Endgruppen im zyklische Peptid kann dann auch im Basischen nur ein S^{+•}-Radikal gebildet werden. Das bedeutet, dass auch in Proteinen im gesamten pH-Bereich keine Wechselwirkung des Radikals der Met-Seitenkette zum Peptidgerüst (mit Ausnahme der Endgruppen) erwartet wird.

In Tabelle 5.9 sind zusätzlich zu den strukturbestimmenden Parametern die aus der Kinetik ermittelten Parameter bei der Bildung eines S^{+•}-Radikals in neutraler Lösung angegeben. Methionin, das zyklische Dipeptid, das lineare Met-Gly (nur zu Beginn der Reaktion) und das lineare Gly-Met zeigen alle degenerierten Elektronenaustausch, wobei die Austauschraten k_{ex} in derselben Größenordnung liegen (vgl. Tabelle 5.9 dritte Spalte). Während die Dipeptide fast identische Raten besitzen, ist der Wert für die freie Aminosäure etwa doppelt so groß. Dies hat seine Ursache vermutlich in der erhöhten Wahrscheinlichkeit einer dem Elektronentransfer begünstigenden Anordnung beim Zusammenstoß mit dem diamagnetischen Elternmolekül im Falle kleiner Substanzen. Die longitudinale Relaxationsrate des Kernspins im radikalischen Zustand k_{para} ist für die δ -Protonen in der vierten Spalte der Tabelle aufgetragen. Die Rate ist für das zyklische Dipeptid etwa eine Größenordnung kleiner als für die linearen Peptide oder die freie Aminosäure. Diese Tatsache ist bereits beim Vergleich der Kinetiken zu beobachten (Abbildung 5.24 auf Seite 97 und [24, 83]), da die Polarisation der letzten Punkte der CIDNP-Kinetik bei GM zu deut-

lich kleineren Werten abgefallen ist. Der Grund für eine kleinere Rate bzw. eine größere Relaxationszeit liegt entweder in einer Erhöhung der Beweglichkeit oder einer Verringerung der Wechselwirkung mit dem ungepaarten Elektronenspin durch Verringerung des anisotropen Anteils der Hyperfeinwechselwirkung der δ -Protonen (siehe Abschnitt 2.2).

Da die hier betrachteten Moleküle ein vollständig auf dem Schwefel zentriertes Radikal bilden, sollte sich die Geometrie im Verlauf der Radikalbildung kaum ändern. Die sehr ähnlichen diamagnetischen longitudinalen Relaxationszeiten von GM und Met sind ein Indiz dafür, dass der Unterschied der paramagnetischen Relaxationsraten nicht auf die dynamische Größe, sondern auf die Wechselwirkung mit dem ungepaarten Elektronenspin zurückzuführen ist. Theoretisch ist es möglich, dass sich eine hohe g -Faktor-Anisotropie durch Verringerung der Relaxationszeit des Elektrons auf die Kernspinrelaxationsrate im paramagnetischen Zustand auswirkt [99]. Obwohl L-Methionin eine für organische Moleküle hohe g -Faktor-Anisotropie aufweist [100, 101], konnte durch eine Abschätzung¹⁰ ermittelt werden, dass dieser Effekt hier vernachlässigbar ist [103]. Damit ist der Unterschied der Relaxationsraten ein Hinweis auf die Verringerung des anisotropen Anteils der Hyperfeinwechselwirkung der δ -Protonen bei GM.

5.2.2 Zyklisches Glycin-S-Methylcystein (GC)

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Messungen an zyklischem Glycin-S-Methylcystein (GC) (Struktur Abbildung 5.18 rechts, Seite 92) vorgestellt, welches sich vom im letzten Abschnitt vorgestellten GM nur durch den Austausch der Seitenkette Methionin mit S-Methylcystein und somit durch eine um eine CH_2 -Gruppe verkürzte Seitenkette zwischen Peptidgerüst und Schwefel unterscheidet. Als Farbstoff wurde 4CBP benutzt (Struktur Abbildung 5.2 rechts, Seite 71) und alle Messungen wurden nur in neutraler Lösung durchgeführt, da die auf Seite 101 dargelegten Einflüsse des pH-Wertes bei GM äquivalent auch für GC gelten. Unter diesen Bedingungen liegt GC in ungeladener Form vor und 4CBP ist an seiner Carboxygruppe einfach negativ geladen.

Das NMR-Spektrum von GC sowie die entsprechende Simulation ist in Abbildung 5.29 dargestellt. Die daraus ermittelten Werte für die chemische Verschiebung δ der einzelnen Linien und die skalare j -Kopplung der Kerne untereinander sind in Tabelle 5.11 zusammengefasst.

¹⁰Die Abhängigkeit der Kernspinrelaxationsrate im paramagnetischen Zustand von der Relaxationszeit des ungepaarten Elektrons wurde mit Gleichung 127 aus [99] und die Relaxationszeit des Elektrons (wenn die Anisotropie der Hyperfeinkopplung vernachlässigt werden kann) mit Gleichung 137 aus [102] abgeschätzt. Dabei wurden die Werte für die g -Faktor-Anisotropie für L-Methionin aus [100] übernommen und die Hyperfeinkopplungskonstante mit 1 mT abgeschätzt. Weiterhin wurde zur Abschätzung der Korrelationszeit der hydrodynamische Radius des Moleküls GM mit 0,4 nm, die Viskosität mit 1 mPa s und die Temperatur mit 300 K angenommen.

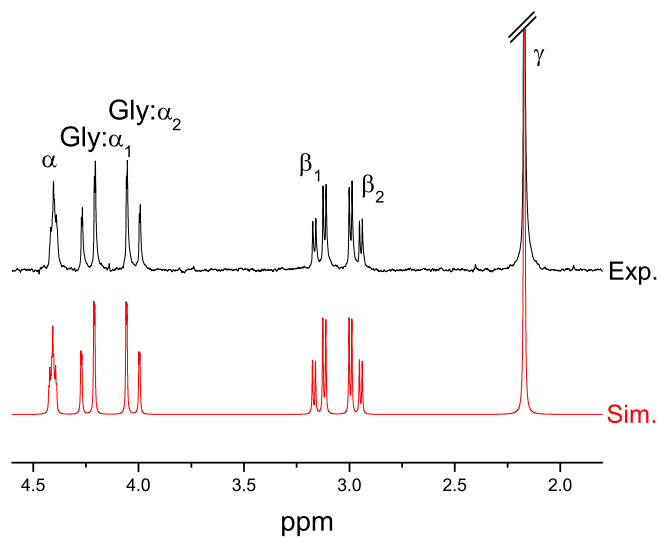


Abbildung 5.29: NMR-Spektrum (schwarz) und Simulation (rot) von 15 mM GC in deuteriertem Wasser bei pH 7.

Proton	δ/ppm		$j\text{-Kopplung/Hz}$
Gly: α_1	$4,236 \pm 0,001$	$j_{\alpha_1^{\text{Gly}}, \alpha_2^{\text{Gly}}}$	$18,4 \pm 0,3$
Gly: α_2	$4,031 \pm 0,001$	$j_{\alpha_1^{\text{Gly}}, \alpha}$	$1,4 \pm 0,3$
α	$4,407 \pm 0,001$	$j_{\alpha_2^{\text{Gly}}, \alpha}$	$1,4 \pm 0,3$
β_1	$3,140 \pm 0,001$	j_{α, β_1}	$4,3 \pm 0,3$
β_2	$2,974 \pm 0,001$	j_{α, β_2}	$4,0 \pm 0,3$
γ	$2,171 \pm 0,001$	j_{β_1, β_2}	$14,7 \pm 0,3$

Tabelle 5.11: Chemische Verschiebung δ und j -Kopplung von Glycin-S-Methylcystein (GC) bei pH 7,0.

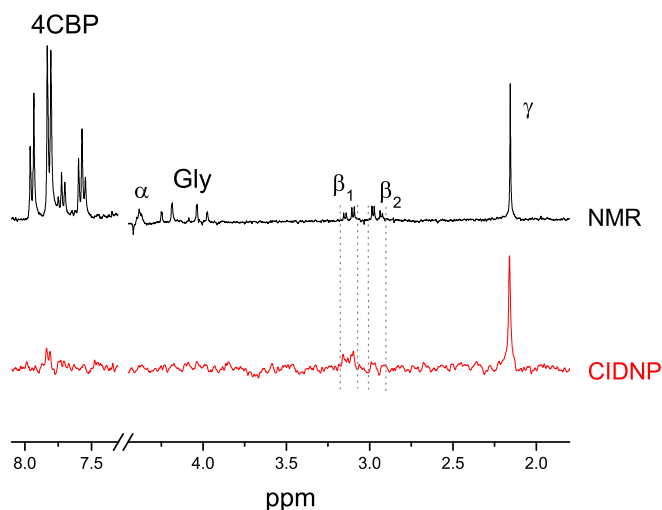


Abbildung 5.30: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum bei $t = 0,5 \mu\text{s}$ (rot) von 2 mM GC und 5 mM 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 7,1 (120 Akkumulationen).

Struktur des Radikals des GC

In Abbildung 5.30 ist das CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare und das dazugehörige NMR-Spektrum gezeigt. Das dargestellte Polarisationsmuster der CIDNP-Signale des GC (γ - und β -Protonen) ist ebenso wie bei GM und Cys(Me) typisch für ein zumindest teilweise am Schwefel zentriertes Kationradikal (vgl. Abschnitt 5.2.1 und 5.1.1). Bei genauer Betrachtung der β -Protonen fällt jedoch auf, dass nur Polarisation auf dem β_1 -Proton sichtbar ist. β_2 scheint gar nicht oder zumindest sehr viel geringer polarisiert zu sein. Wie bei Cys(Me) kann dieser Effekt mehrere mögliche Ursachen haben. Neben einer unterschiedlichen isotropen Hyperfeinkopplung der beiden Protonen könnte auch ein auftretender Multipletteffekt oder überlagernde emissive Linien eines Nebenproduktes vorliegen. Da hier dieselben Argumente wie bei Cys(Me) gelten, wird für diese auf Abschnitt 5.1.1 auf Seite 74 verwiesen. Zusammenfassend lässt sich auch hier feststellen, dass die Differenzen der CIDNP-Signale der β -Protonen in unterschiedlichen Hyperfeinkopplungen begründet sind.

Wie im Abschnitt 3.1.3 beschrieben und in Kapitel 4 mehrmals angewandt wurde, kann das CIDNP-Signal von 4CBP als Referenz benutzt werden, um so die CIDNP-Intensitäten für das GC-Radikal zu kalibrieren. Dabei wurden die in Abschnitt 4.2.3 bestimmten Hyperfeinkopplungen verwendet. Man erhält die folgenden absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten:

$$a_{\beta_1} = 1,4 \pm 0,3 \text{ mT} \quad a_{\beta_2} = 0,2 \pm 0,2 \text{ mT} \quad a_{\gamma} = 1,11 \pm 0,18 \text{ mT}$$

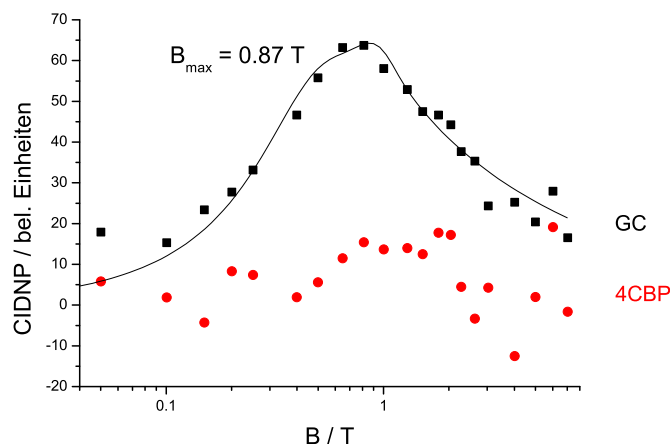


Abbildung 5.31: Abhängigkeit der CIDNP-Intensität vom Magnetfeld für die γ -Protonen von GC (schwarz) und für das Multipllett der H_{2,6,2',6'} von 4CBP (rot) aus der Radikalpaarreaktion von 1 mM GC mit 0,6 mM 4CBP bei pH 7,2. Die durchgezogene Linie repräsentiert die Simulation.

In Abbildung 5.31 ist die CIDNP-Feldabhängigkeit der γ -Protonen von GC dargestellt. Die maximale CIDNP-Intensität wird bei einem Magnetfeld B_{\max} von 0,87 T erreicht. Mit diesem Maximum bei verhältnismäßig kleinen Magnetfeldern im Vergleich zu anderen Aminosäuren-Farbstoff-Paaren [41, 104] und dem damit verbundenen großen Unterschied in den g -Faktoren der beiden beteiligten Radikale zeigt die Feldabhängigkeit den typischen Verlauf eines am Schwefel (vollständig oder teilweise) zentrierten Kationradikals. Mit Hilfe der absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten kann über die Anpassung der Simulation mit Hilfe des im Abschnitt 2.1.4 vorgestellten Adrianmodells folgender g -Faktor bestimmt werden¹¹

$$g_{\text{GC}\cdot+} = 2,0086 \pm 0,0011$$

Dieser ist kleiner als der g -Faktor für vollständig auf dem Schwefel zentrierte Kationradikale ($\text{S}^{\cdot+}$) mit $g = 2,01012$ [79]. Da eine Stabilisierung des Schwefels durch eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit dem ungebundenen Elektronenpaar eines Heteroatoms auf Grund der niedrigeren Spinbahnkopplung einen kleineren g -Faktor als ein $\text{S}^{\cdot+}$ -Radikal zur Folge hat, kann für das GC-Radikal daher eine solche Bindung festgestellt werden. Als mögliche intramolekulare Bindungspartner stehen dafür nur der Sauerstoff und der Stickstoff zur Verfügung. Letzterer kann ausgeschlossen werden, da genauso wie bei Cys(Me) (vgl. Abschnitt 5.1.1) keine Polarisierung auf den α -Protonen sichtbar ist. Damit muss das GC ein zyklisches ($\text{S}:\text{O})^{\cdot+}$ -Radikal bilden. Dieses Ergebnis wird durch dichtefunktionaltheoretische Berechnungen von D. Pogocki (Institute of Chemistry and Nuclear Technology,

¹¹Im Allgemeinen müssen dafür die Hyperfeinkopplungen aller Kerne mit nicht verschwindender Spindichte berücksichtigt werden. Da die natürliche Häufigkeit der spintragenden Isotope ^{13}C und ^{33}S jedoch bei $\leq 1\%$ liegt, genügt es hier, die Protonen zu betrachten.

	experimentell bestimmt	DFT mit	
		$r_{\text{SO}} = 2,449 \text{ \AA}$	$r_{\text{SO}} = 2,480 \text{ \AA}$
a_{β_1}/mT	$1,4 \pm 0,3$	1,7	1,6
a_{β_2}/mT	$< 0,4$	$< 0,1$	$< 0,1$
a_{γ}/mT	$1,11 \pm 0,18$	1,25	1,17

Tabelle 5.12: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten absoluten Hyperfeinkopplungen des $\text{GC}^{+\bullet}$ -Radikals mit den aus DFT-Berechnungen (siehe Kapitel 3.3) bestimmten Werten eines $(\text{S} \cdot \text{O})^+$ -Radikals von GC für unterschiedliche Abstände r_{SO} , zwischen dem Schwefel- und Sauerstoffatom.

Warschau) bestätigt (siehe Kapitel 3.3). Dabei wurde die Struktur für ein GC-Radikal energetisch optimiert. Für eine $(\text{S} \cdot \text{O})^+$ -Bindung im GC-Radikal werden dann deutlich unterschiedliche Hyperfeinkopplungen für die β -Protonen ermittelt, wobei eines der beiden Protonen fast keine Hyperfeinkopplung besitzt. In Tabelle 5.12 sind die experimentell ermittelten Werte mit denen aus DFT-Berechnungen bestimmten für zwei unterschiedliche Abstände zwischen dem Schwefel- und Sauerstoffatom verglichen. Insbesondere für einen Abstand von $r_{\text{SO}} = 2,480 \text{ \AA}$ stimmen die berechneten und gemessenen Ergebnisse sehr gut überein. In Abbildung 5.32 ist die Radikalstruktur schematisch mit als Kreisen eingetragenen relativen Hyperfeinkopplungen des $\text{GC}^{+\bullet}$ und die aus DFT-Berechnungen ermittelte 3D-Struktur dargestellt.

Radikalpaarreaktion und Folgeprodukte

In Abbildung 5.33 links ist das CIDNP-Spektrum für $0,5 \mu\text{s}$ (schwarz) und für $100 \mu\text{s}$ (rot) nach der Laseranregung gezeigt. Man erkennt deutlich, dass sich die Polarisation auf den Liniengruppen des GC sowie des Farbstoffes nach $100 \mu\text{s}$ signifikant verringert hat. Rechts in der Abbildung ist der zeitliche Verlauf der Polarisation (CIDNP-Kinetik) für die γ -Protonen des GC aufgetragen. Man erkennt den für degenerierten Elektronenaustausch typischen schnellen Zerfall der Polarisation sowie die Abhängigkeit des Verlaufs der Kinetik von der Konzentration des GC (vgl. Kapitel 2.1.6). Aus diesem Grund kann sich das Radikal des GC nur durch ein Elektron vom diamagnetischen Grundzustandsmolekül GC unterscheiden, so dass folgender Reaktionsmechanismus zwischen den Radikalpartnern vorgeschlagen wird:

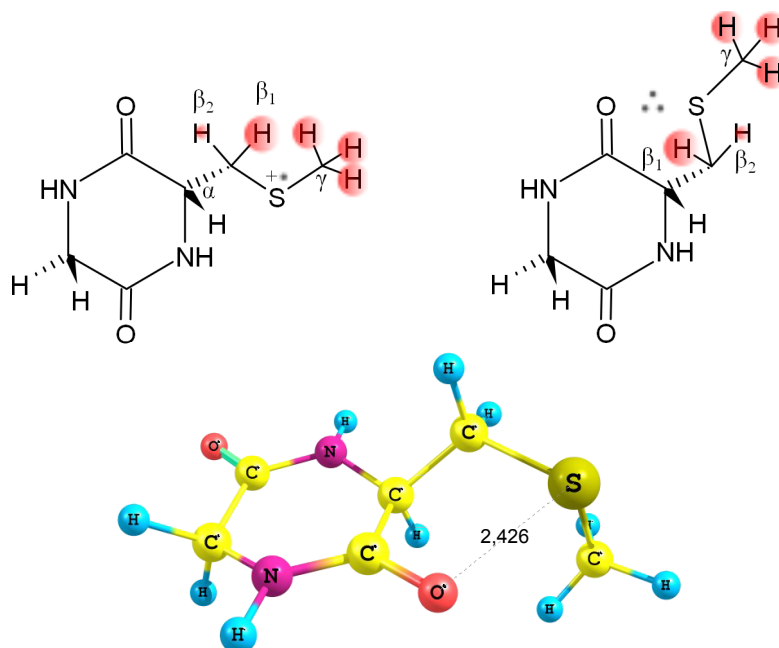
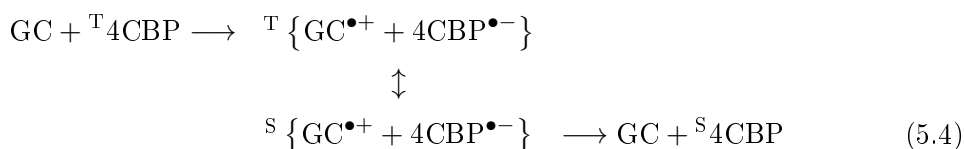


Abbildung 5.32: Radikalstruktur von $GC^{\bullet+}$ (links), schematische Darstellung der $(S:O)^+$ -Bindung (rechts) und die für die DFT-Berechnungen ermittelte Struktur (entnommen aus [44]) (unten). Die Stärke der Hyperfeinkopplung der einzelnen Protonen (vgl. Tabelle 5.8) wird durch die Fläche eines Kreises und das positive Vorzeichen durch die rote Farbe dargestellt.



Durch die Anpassung (durchgezogene Linien in Abbildung 5.33 rechts) des in Abschnitt 2.1.6 vorgestellten Gleichungssystems an die Datenpunkte wurde die Rate des degenerierten Elektronenaustausches $k_{\text{ex}} = (2,9 \pm 0,5) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und die longitudinale Relaxationsrate der Kernspins der γ -Protonen im radikalischen Zustand $k_{\text{para}} = (3,1 \pm 0,9) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Beide ermittelten Raten liegen in der gleichen Größenordnung wie die für GM ermittelten.

Bei dem CIDNP-Spektrum 100 μs nach der Laseranregung (Abbildung 5.33 links rot) ist deutlich Polarisation auf zwei Liniengruppen (NB-1 und NB-2) zu erkennen, die zu Nebenprodukten aus Seitenreaktion gehören müssen. Die chemische Verschiebung (NB-1: $\delta=3,69$ ppm und NB-2: $\delta=7,46$ ppm) ist dabei sehr ähnlich der chemischen Verschiebung der Multipletts NB-1 und NB-2 (NB-1(GM): $\delta=3,60$ ppm und NB-2(GM): $\delta=7,49$ ppm) aus der Messung mit GM (vgl. Abbildung 5.25 in Abschnitt 5.2.1). Dies legt die Vermutung nahe, dass in beiden Prozessen analoge Folgeprodukte gebildet werden. Diese An-

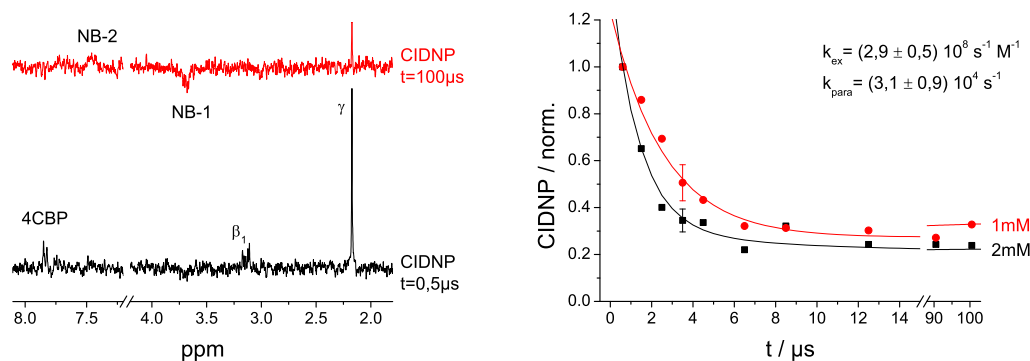


Abbildung 5.33: CIDNP-Spektrum $0,5\ \mu\text{s}$ (schwarz) und $100\ \mu\text{s}$ (rot) nach der Laseranregung von $1\ \text{mM}$ GC und $5\ \text{mM}$ 4CBP in deuteriertem Wasser bei pH 7,1 (jeweils 120 Akkumulationen) (links). CIDNP-Kinetik der γ -Protonen von GC für verschiedene Konzentrationen ($1\ \text{mM}$ und $2\ \text{mM}$) mit jeweils $5\ \text{mM}$ 4CBP bei pH 7,1 (rechts).

nahme wird durch den im Rahmen der Fehlergrenzen gleichen Verlauf der Kinetik der NB-2-Liniengruppe sowie aus dem Verlauf der Feldabhängigkeit des Farbstoffes (siehe Abbildung 5.31 rote Datenpunkte) gestützt. Letztere zeigt im Rahmen der Fehlertoleranz ein positives Maximum bei etwa 0,9 T und dann auch ein emissives Maximum bei hohem Feld, bei etwa 4 T. Die leichte Verschiebung des Maximums zu höherem Feld im Vergleich zur Messung mit GM (etwa 3,5 T; vgl. Abbildung 5.21 rechts, rote Datenpunkte) resultiert aus dem größeren Reaktionsverhältnis von zyklischer Reaktion zu Seitenreaktion. Die Verschiebung des Reaktionsverhältnisses zu Ungunsten der Seitenreaktion ist auch beim Vergleich der CIDNP-Spektren $100\ \mu\text{s}$ nach der Laseranregung zu beobachten, da die CIDNP-Intensitäten der Liniengruppen aus den Seitenreaktionen für die Messung mit GC deutlich kleiner sind und die analoge Linie zu NB-3(GM) vermutlich deshalb auch nicht im Spektrum des GC sichtbar ist. Die Veränderung des Reaktionsverhältnisses konnte auch in optischen Messungen, die unter ähnlichen Bedingungen wie die CIDNP-Messungen aufgenommen wurden¹², durch eine geringere Bildung des Ketylradikals des 4CBP nach dem Zerfall des Triplettzustandes beobachtet werden. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass bei der Messung mit GC die entsprechenden Seitenreaktion wie bei GM mit den analogen Folgeprodukten auftauchen (vgl. Abschnitt 5.2.1 auf Seite 98).

Vergleich mit der freien Aminosäure S-Methyl-L-Cystein (Cys(Me))

Beim Vergleich der NMR-Spektren von Cys(Me) und der Methylcysteinseitenkette von GC (siehe Abbildung 5.4 auf Seite 73 und Abbildung 5.29 auf Seite 108) wird sichtbar, dass

¹²Durchführung von G. Hörner (Adam Mickiewicz University Poznan) mit folgenden Messparametern: $0,2\ \text{mM}$ bis $2\ \text{mM}$ GC mit $2\ \text{mM}$ 4CBP bei pH 7; Anregungswellenlänge $\lambda = 355\ \text{nm}$; persönliche Mitteilung

	a_{γ}^{rel}	$a_{\beta_1}^{\text{rel}}$	$a_{\beta_2}^{\text{rel}}$
GC	$1,00 \pm 0,04$	$1,25 \pm 0,19$	$0,19 \pm 0,19$
Cys(Me)	$1,00 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,08$	$1,21 \pm 0,08$

Tabelle 5.13: Vergleich der relativen Hyperfeinkopplungen von GC und Cys(Me).

die j -Kopplungen der beiden β -Protonen zu dem α -Proton für Cys(Me) signifikante Unterschiede zeigen, während sie im Fall von GC nahezu gleich sind. Weiterhin ist die Differenz der chemischen Verschiebung der beiden β -Protonen für Cys(Me) kleiner als für GC. Diese Effekte konnten bei anderen Aminosäuren durch eine veränderte Vorzugskonformation erklärt werden [105, 106, 107, 108, 109]. Aus Äquivalentüberlegungen würde sich damit für GC eine Orientierung, in der das Schwefelatom über den Ring gefaltet ist, ergeben, während Cys(Me) eine Stellung bevorzugt, in der das Schwefelatom zum Stickstoff ausgerichtet ist.

GC und Cys(Me) zeigen beide das typische Polarisationsmuster eines zumindest teilweise am Schwefel zentrierten Kationradikals (nur die angebondenen Protonen der zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatome sind polarisiert). In beiden Radikalen besitzen die β -Protonen ein unterschiedlich starkes CIDNP-Signal (siehe Abbildung 5.30 auf Seite 109 und Abbildung 5.5 auf Seite 74). Allerdings dreht sich das Polarisationsmuster um, bei Cys(Me) ist das β_2 -Proton und bei GC das β_1 -Proton stärker polarisiert (vgl. Tabelle 5.13). Der Grund für diese Änderung des Polarisationsmusters im Dipeptid gegenüber der freien Aminosäure liegt wahrscheinlich nicht an einer veränderten Radikalstruktur, sondern an den unterschiedlichen Vorzugskonformationen im diamagnetischen Zustand. Diese könnten die Ursache dafür sein, dass im NMR-Spektrum die Linienpositionen und damit die Zuordnung der beiden β -Protonen für GC im Vergleich zu Cys(Me) vertauscht sind. In Tabelle 5.13 sind die relativen Hyperfeinkopplungskonstanten von GC und Cys(Me) verglichen. Vertauscht man bei einer Substanz die Zuordnung der beiden β -Protonen, sind die Hyperfeinkopplungskonstanten für beide Moleküle fast identisch, was die obige Annahme stützt.

Da die CIDNP-Feldabhängigkeiten alle mit dem gleichen Farbstoff vermessen wurden, können sie direkt verglichen werden (siehe Abbildung 5.31 auf Seite 110 und Abbildung 5.8 links auf Seite 77). Die Lage des Magnetfeldes mit maximaler CIDNP-Intensität der Protonen des GC bzw. Cys(Me) ist im Rahmen der Messgenauigkeit gleich ($B_{\text{max}}^{\text{GC}} = 0,87 \text{ T}$ und $B_{\text{max}}^{\text{Cys(Me)}} = 0,85 \text{ T}$). Deshalb ist davon auszugehen, dass in beiden vorgestellten zyklischen Radikalpaarreaktion ein $(\text{S} \cdot \text{O})^+$ -Radikal gebildet wird.

Die auftretenden Seitenreaktionen sind allerdings sehr unterschiedlich. Während der wichtigste Seitenkanal bei Cys(Me) die Decarboxylierung des $\text{Cys(Me)}^{\bullet+}$ mit den daraus

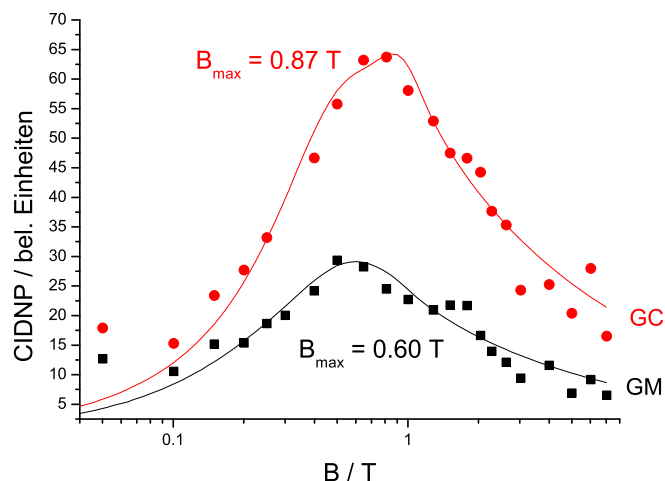


Abbildung 5.34: Abhängigkeit der CIDNP-Intensität vom Magnetfeld für die CH_3 -Protonen von 1 mM GM (schwarz) und 1 mM GC (rot) aus der jeweiligen Radikalpaarreaktion mit 0,6 mM 4CBP in neutraler Lösung.

entstehenden Folgeprodukten ist (vgl. Abschnitt 5.1.1 und insbesondere Abbildung 5.12 auf Seite 82), findet bei GC vermutlich ein auf den Elektronentransfer folgender Protonentransfer aus der γ - oder β -Position des Peptides zum Farbstoffradikal statt.

5.2.3 Vergleich der zyklischen Dipeptide Glycin-Methionin und Glycin-S-Methylcystein

Zum Abschluss dieses Unterkapitels werden nun die Ergebnisse der beiden zyklischen Dipeptide Glycin-Methionin (GM) und Glycin-S-Methylcystein (GC) (Strukturen siehe Abbildung 5.18) miteinander verglichen.

Da in Photoreaktionen beider Peptide nur die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen polarisiert sind, wird in diesen ein mindestens teilweise auf dem Schwefel zentriertes Radikal gebildet. Allerdings unterscheiden sich die CIDNP-Feldabhängigkeiten, die in Abbildung 5.34 jeweils für die CH_3 -Protonen (δ -Protonen für GM und γ -Protonen für GC) dargestellt sind. Das Magnetfeld bei dem die maximale CIDNP-Intensität gebildet wird, ist für GC zu signifikant höheren Werten verschoben ($B_{\text{max}}^{\text{GM}} = 0,60 \text{ T}$ und $B_{\text{max}}^{\text{GC}} = 0,87 \text{ T}$). Der Unterschied lässt sich hauptsächlich durch die unterschiedlichen g -Faktoren ($g_{\text{GC}^{\bullet+}} = 2,0086 \pm 0,0011$ und $g_{\text{GM}^{\bullet+}} = 2,01012$) erklären. Diese resultieren aus unterschiedlichen Radikalstrukturen. $\text{GM}^{\bullet+}$ bildet ein vollständig auf dem Schwefel zentriertes $\text{S}^{\bullet+}$ -Radikal, während $\text{GC}^{\bullet+}$ ein zyklisches $(\text{S} \cdot \text{O})^+$ -Radikal bildet.

Die primäre Radikalpaarreaktion für beide Peptide ist der Elektronentransfer von der

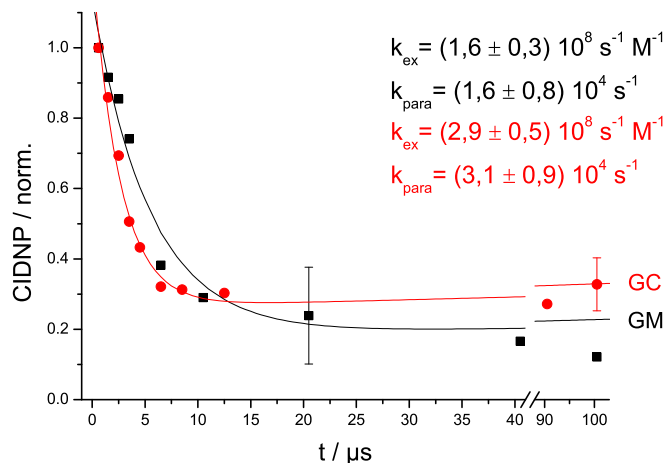


Abbildung 5.35: CIDNP-Kinetik der CH_3 -Protonen aus der Messung von 1 mM GM (schwarz) und 1 mM GC (rot) mit 5 mM 4CBP in neutraler Lösung.

Schwefel enthaltenden Seitenkette des Peptides zum im elektronischen Tripletzustand angeregten Farbstoffmolekül. Da sich das auf diese Weise jeweils entstehende Radikal daher nur durch ein Elektron vom diamagnetischen Molekül unterscheidet, nehmen beide Radikale als Folgereaktion am degenerierten Elektronenaustausch mit den Grundzustandsmolekülen aus der Lösung teil (vgl. Kapitel 2.1.6). Weil der Verlauf der CIDNP-Kinetiken der CH_3 -Protonen (δ -Protonen für GM und γ -Protonen für GC) von dieser Folgereaktion dominiert wird, sehen diese ähnlich aus (siehe Abbildung 5.35). Allerdings sind bei genauer Betrachtung Unterschiede sichtbar. Wie gut am anfänglichen Zerfall der Polarisation zu erkennen ist, ist der degenerierte Elektronenaustausch für GC effektiver als für GM ($k_{\text{ex}}^{\text{GC}} > k_{\text{ex}}^{\text{GM}}$). Ursache dafür ist vermutlich die erhöhte Wahrscheinlichkeit einer am Elektronentransfer begünstigenden Anordnung der beiden Partner zueinander bei dem kleineren Molekül GC. Wie bei den letzten Punkten der Kinetiken deutlich wird, ist die longitudinale Relaxationsrate der Kernspins im radikalischen Zustand für GC etwas größer als für GM ($k_{\text{para}}^{\text{GC}} > k_{\text{para}}^{\text{GM}}$). Der Grund für eine größere Rate bzw. eine kleinere Relaxationszeit ist entweder die Verringerung der Beweglichkeit der CH_3 -Protonen oder die Erhöhung der Wechselwirkung mit dem ungepaarten Elektronenspin und damit wahrscheinlich die Erhöhung des anisotropen Anteils der Hyperfeinkopplung für die δ -Protonen. Beide Veränderungen könnten auf Grund der unterschiedlichen Radikalstruktur auftreten.

Auch die nichtzyklischen Seitenreaktionen sind bei der Messung mit 4CBP für beide Substanzen gleich.

Insgesamt hat die Verkürzung der Seitenkette einen großen Einfluss, da trotz der großen Ähnlichkeit beide Peptide unterschiedliche Radikalstrukturen bilden. Weiterhin bleibt die

Struktur beim Einbau der entsprechenden Aminosäure in ein zyklisches Dipeptid in neutralen Lösungen nahezu gleich, wobei im Gegensatz zur freien Aminosäure die Met-Seitenkette im Peptid keine pH-Abhängigkeit aufweist. Ferner führt der Einbau von Met in ein zyklisches Peptid zu einer signifikant verringerten longitudinalen Relaxationsrate der Kernspins der δ -Protonen im radikalischen Zustand.

5.3 Wechselwirkung benachbarter CIDNP-aktiver Seitenketten: Zyklische Dipeptide mit zwei Thioethergruppen

Im Folgenden werden die Wechselwirkungen verschiedener Seitenketten eines Peptides miteinander untersucht. Um den Einfluss der Endgruppen auszuschalten, wird erneut mit zyklischen Dipeptiden (vgl. Abbildung 5.1 auf Seite 69) gearbeitet. Dabei werden nur Dipeptide mit zwei thioetherhaltigen Aminosäuren betrachtet, da es insbesondere um die Fragestellung geht, ob bei diesen Substanzen eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit dem Schwefelatom der jeweils anderen Seitenkette beobachtet und die entsprechende Radikalstruktur bestimmt werden kann. Dafür werden cis- und trans-Konformere untersucht, die sich auf Grund ihrer sterischen Konfiguration in der Fähigkeit, eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zu bilden, unterscheiden [77, 78]. Die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung der beiden Seitenketten müsste für die cis-Konformation, bei der beide Seitenketten auf derselben Seite des Rings liegen, sehr viel höher als für die trans-Konformation sein. Dies soll im Folgenden überprüft werden. Als Seitenketten werden verschiedene Kombinationen der Aminosäuren Methionin und S-Methyl-L-Cystein verwendet.

Zuerst werden Peptide in trans-Konformation und im Anschluss in cis-Konformation untersucht. Am Ende des Abschnittes erfolgt ein Vergleich der Ergebnisse beider Konformere.

Alle Messungen wurden in neutraler Lösung durchgeführt, um Epimerisation (vgl. Unterabschnitt 5.2.1 auf Seite 101) zu verhindern und damit mit reinen trans- oder cis-Konformeren arbeiten zu können. Ansonsten sind keine anderen Einflüsse des pH-Wertes als die auf Seite 101 beschriebenen zu erwarten. Als Farbstoff wurde in allen Messungen 4-Carboxybenzophenon (4CBP) (Struktur Abbildung 5.2) benutzt, da auch die zyklischen Dipeptide Glycin-Methionin (GM) und Glycin-S-Methylcystein (GC) (siehe Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2) mit diesem vermessen wurden. In neutralen Lösungen ist 4CBP an seiner Carboxygruppe einfach negativ geladen.

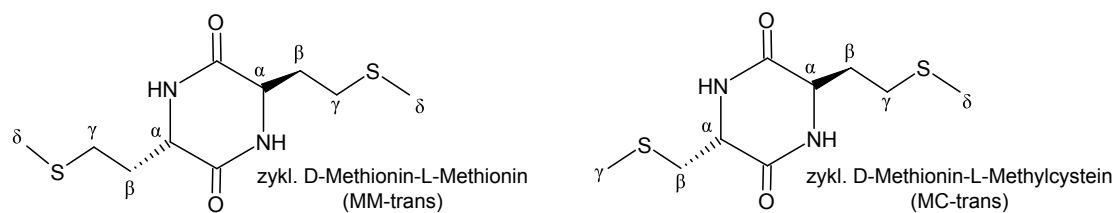


Abbildung 5.36: Struktur des zyklischen Dipeptides *D*-Methionin-*L*-Methionin (links) und des zyklischen Dipeptides *D*-Methionin-*L*-Methylcystein (rechts).

5.3.1 Zyklische Peptide in trans-Konformation

In diesem Abschnitt werden die beiden zyklischen, in trans-Konformation vorliegenden Dipeptide *D*-Methionin-*L*-Methionin (MM-trans) (Struktur Abbildung 5.36 links) und *D*-Methionin-*L*-Methylcystein (MC-trans) (Struktur Abbildung 5.36 rechts) untersucht. Bei neutralem pH liegen beide Peptide in ungeladener Form vor. Die NMR-Spektren sowie deren Simulationen sind in Abbildung 5.37 dargestellt. Die aus den Simulationen bestimmten chemischen Verschiebungen δ der einzelnen Linien und die skalare j -Kopplung der Kerne untereinander sind in Tabelle 5.14 zusammengefasst. Bei MM-trans sind die Liniengruppen der beiden Seitenketten äquivalent und nicht unterscheidbar, während dies bei MC-trans nicht der Fall ist. In Abbildung 5.37 rechts sind die zu Methionin zugehörigen Liniengruppen mit M und die zu S-Methylcystein gehörigen mit C indiziert.

Werden die NMR-Spektren sowie die Resultate der Simulationen mit denen von Glycin-Methionin (vgl. Abbildung 5.19 auf Seite 93) und Glycin-Methylcystein (vgl. Abbildung 5.29 auf Seite 108) verglichen, sind keine deutlichen Unterschiede sichtbar, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die jeweilige Seitenkette eine ähnliche Konformation wie diejenige aus dem jeweiligen Dipeptid mit Glycin als zweiter Aminosäure einnimmt.

Radikalstruktur

In Abbildung 5.38 oben links ist das CIDNP-Spektrum der Geminate-Paare und das dazugehörige NMR-Spektrum des Systems MM-trans mit 4CBP dargestellt. CIDNP-Signale sind für die δ - und γ -Protonen des Peptids zu erkennen. Damit zeigen die CIDNP-Signale das gleiche Polarisationsmuster wie für GM (vgl. Abbildung 5.20 auf Seite 94), so dass vermutlich auch ein vollständig auf dem Schwefel zentriertes Radikal gebildet wird. Weiterhin tragen einige Nebenprodukte sowie das am stärksten polarisierte Multiplett der H_{2,6,2',6'}-Protonen (siehe Abschnitt 4.2.3) Polarisation. Da bereits im CIDNP-Spektrum der Geminate-Paare Nebenprodukte auftauchen, ist es nicht möglich, absolute Hyperfeinkopplungswerte durch einen Vergleich mit den CIDNP-Signalen des Farbstoffes zu erhalten. Allerdings können relative Hyperfeinkopplungen (auf die Kopplungswerte der δ -Protonen normiert) für das in der zyklischen Radikalpaarreaktion gebildete MM-trans^{+•}-Radikal

MM-trans			
δ/ppm :	$\delta(\alpha) = 4,303 \pm 0,001$	$\delta(\beta_1) = 2,205 \pm 0,001$	$\delta(\beta_2) = 2,105 \pm 0,001$
	$\delta(\gamma_1) = 2,628 \pm 0,001$	$\delta(\gamma_2) = 2,572 \pm 0,001$	$\delta(\delta) = 2,096 \pm 0,001$
j/Hz :	$j_{\alpha,\beta_1} = 5,2 \pm 0,3$	$j_{\alpha,\beta_2} = 4,5 \pm 0,3$	$j_{\beta_1,\beta_2} = 15,2 \pm 0,3$
	$j_{\gamma_1,\beta_1} = 7,7 \pm 0,3$	$j_{\gamma_1,\beta_2} = 6,2 \pm 0,3$	$j_{\gamma_2,\beta_1} = 5,9 \pm 0,3$
	$j_{\gamma_2,\beta_2} = 8,1 \pm 0,3$	$j_{\gamma_1,\gamma_2} = 13,8 \pm 0,3$	
MC-trans			
δ/ppm :	$\delta(\alpha^C) = 4,483 \pm 0,001$	$\delta(\beta_1^C) = 3,147 \pm 0,001$	$\delta(\beta_2^C) = 2,976 \pm 0,001$
	$\delta(\gamma^C) = 2,165 \pm 0,001$		
	$\delta(\alpha^M) = 4,456 \pm 0,001$	$\delta(\beta_1^M) = 2,254 \pm 0,001$	$\delta(\beta_2^M) = 2,115 \pm 0,001$
	$\delta(\gamma_1^M) = 2,637 \pm 0,001$	$\delta(\gamma_2^M) = 2,565 \pm 0,001$	$\delta(\delta^M) = 2,098 \pm 0,001$
j/Hz :	$j_{\alpha^C,\beta_1^C} = 4,1 \pm 0,3$	$j_{\alpha^C,\beta_2^C} = 3,9 \pm 0,3$	$j_{\beta_1^C,\beta_2^C} = 14,7 \pm 0,3$
	$j_{\alpha^C,\alpha^M} = 1,4 \pm 0,3$		
	$j_{\alpha^M,\beta_1^M} = 4,8 \pm 0,3$	$j_{\alpha^M,\beta_2^M} = 4,8 \pm 0,3$	$j_{\beta_1^M,\beta_2^M} = 14,5 \pm 0,3$
	$j_{\gamma_1^M,\beta_1^M} = 6,1 \pm 0,3$	$j_{\gamma_1^M,\beta_2^M} = 9,0 \pm 0,3$	$j_{\gamma_2^M,\beta_1^M} = 9,6 \pm 0,3$
	$j_{\gamma_2^M,\beta_2^M} = 6,0 \pm 0,3$	$j_{\gamma_1^M,\gamma_2^M} = 13,5 \pm 0,3$	

Tabelle 5.14: Chemische Verschiebung δ und j -Kopplung j von MM-trans und MC-trans in neutraler Lösung (etwa pH 7). Dabei sind die Liniengruppen des Met-Residuums mit dem Index M und die des Cys(Me)-Residuums mit dem Index C gekennzeichnet (vgl. Abbildung 5.37 rechts).

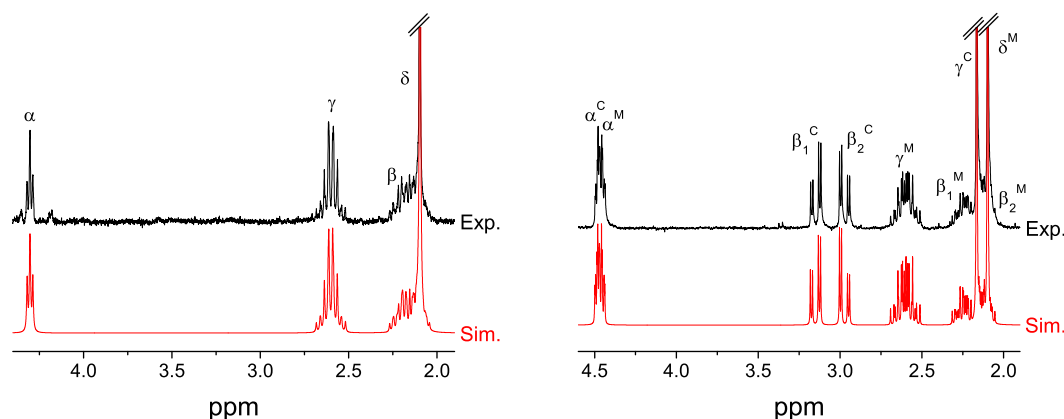


Abbildung 5.37: NMR-Spektrum (schwarz) und Simulation (rot) von 3 mM MM-trans (links) und 8 mM MC-trans (rechts) in deuteriertem Wasser bei pH 7. Rechts sind die Liniengruppen mit einem Index M für die Methioninseitenkette (Met-Seitenkette) und mit einem Index C für die Methylcysteinseitenkette (Cys(Me)-Seitenkette) gekennzeichnet.

bestimmt werden:

$$a_{\gamma}^{\text{rel}} = 1,17 \pm 0,13 \quad a_{\delta}^{\text{rel}} = 1,00 \pm 0,04$$

Die relativen Hyperfeinkopplungskonstanten sind innerhalb der Fehlergrenzen identisch mit denen für das im letzten Unterkapitel untersuchte Kationradikal des zyklischen Glycin-Methionin-Radikals ($\text{GM}^{+\bullet}$) (vgl. Tabelle 5.8 auf Seite 95). Insbesondere, weil auch die Feldabhängigkeit der δ -Protonen von MM-trans (siehe Abbildung 5.38 rechts oben) einen ähnlichen Verlauf wie die Feldabhängigkeit von GM (vgl. Abbildung 5.21 links auf Seite 95) zeigt, wird sehr wahrscheinlich dasselbe Radikal gebildet.

Da bei MM-trans nicht zwischen den Seitenketten unterschieden werden kann, wurden noch Messungen an MC-trans durchgeführt, bei dem eine der beiden Methioninseitenketten (Met-Seitenkette) durch S-Methyl-Cystein (Cys(Me)) ersetzt wurde. Wie bereits im NMR-Spektrum (siehe Abbildung 5.37 rechts) zu erkennen ist, können die Protonen der beiden Residuen deutlich von einander getrennt werden. Abbildung 5.38 links unten zeigt das CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare für MC-trans mit dem dazugehörigen NMR-Spektrum. Da für die CH_3 -Gruppen beider Residuen (δ -Protonen für Met-Seitenkette und γ -Proton für Cys(Me)-Seitenkette) CIDNP erzeugt wird, müssen beide Residuen polarisiert sein. Weiterhin sind noch deutliche CIDNP-Signale für ein Multiplett des 4CBP (H2,6,2',6'-Protonen) und für Nebenprodukte zu erkennen. Auf Grund des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses lässt sich die Polarisation auf den γ -Protonen des Met-Residuums und auf den β -Protonen des Cys(Me)-Residuums nur erahnen. Trotzdem wird vermutlich für beide Residuen ein zumindest teilweise auf dem Schwefel zentriertes Ra-

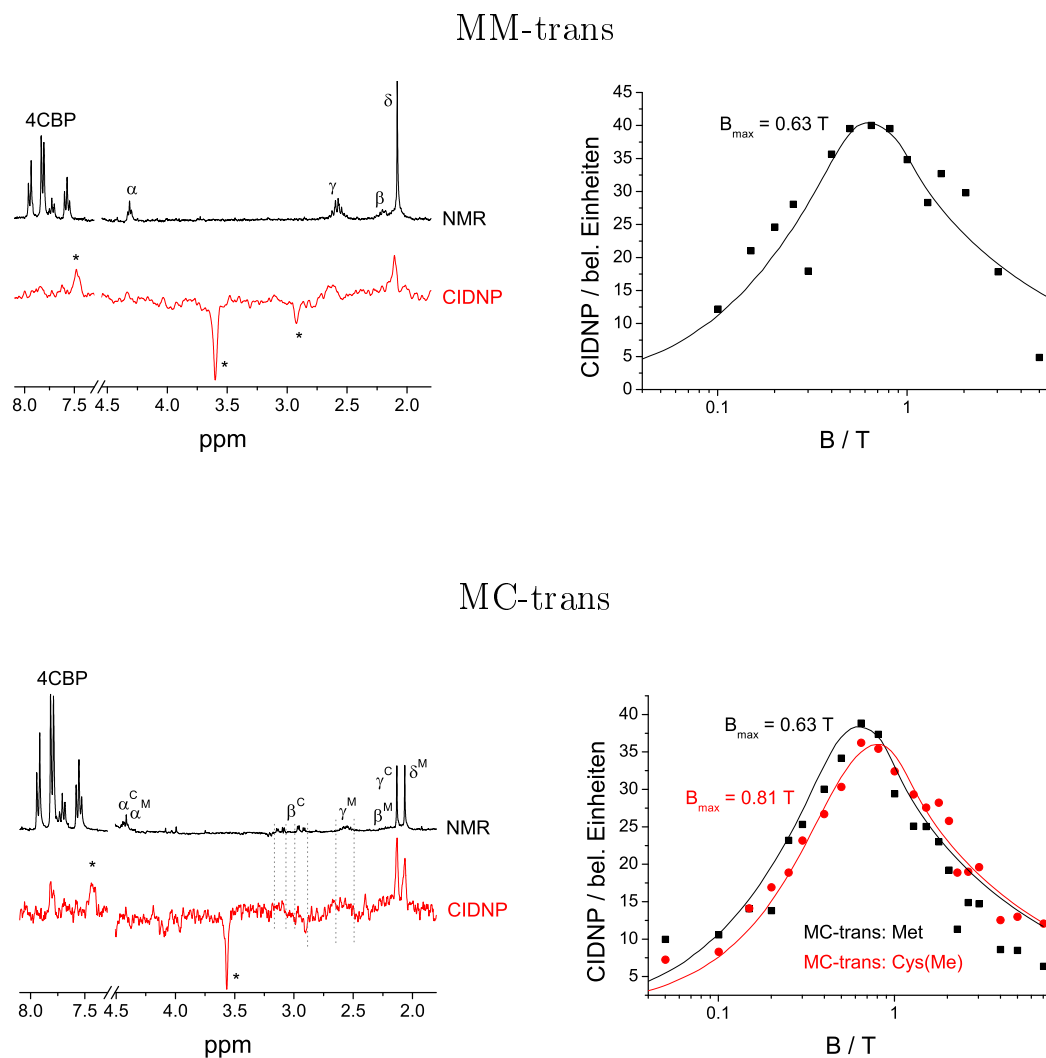


Abbildung 5.38: Links: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum (rot) $0,5\mu\text{s}$ nach der Laseranregung von 1 mM Peptid mit 5 mM 4CBP. Das Symbol „*“ markiert die Nebenprodukte; rechts: Magnetfeldabhängigkeit der CH_3 -Protonen von 1 mM Peptid mit $0,6\text{ mM}$ 4CBP; jeweils für das Peptid MM-trans (oben) und MC-trans (unten) in neutraler Lösung.

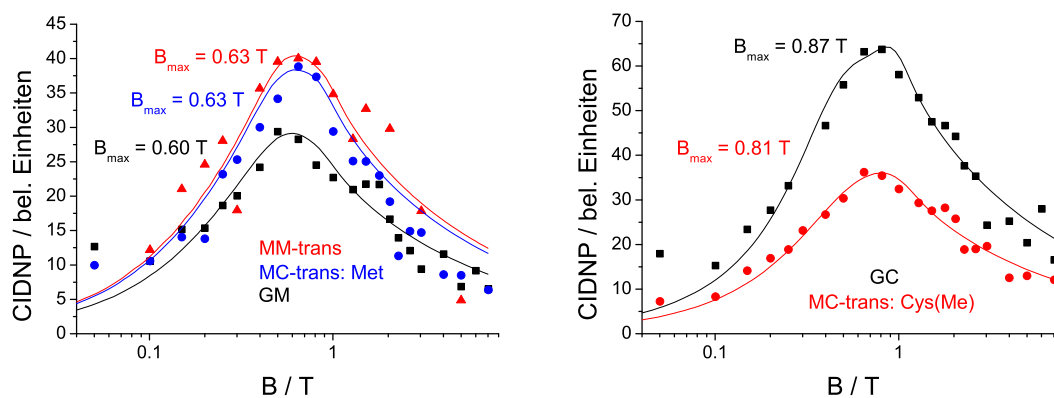


Abbildung 5.39: Vergleich der Magnetfeldabhängigkeit der δ -Protonen der Met-Seitenkette von GM (schwarz), MM-trans (rot) und MC-trans (blau) (links) und der γ -Protonen der Cys(Me)-Seitenkette von GC (schwarz) und MC-trans (rot) (rechts).

dikal gebildet, da die jeweiligen CH_3 -Gruppen polarisiert sind. Zur Überprüfung sind die relativen Hyperfeinkopplungen bestimmt worden:

$$a_{\gamma^{\text{M}}}^{\text{rel}} = 1,0 \pm 0,5 \quad a_{\delta^{\text{M}}}^{\text{rel}} = 1,00 \pm 0,07$$

$$a_{\beta_1^{\text{C}}}^{\text{rel}} = 0,91 \pm 0,45 \quad a_{\beta_2^{\text{C}}}^{\text{rel}} < 0,6 \quad a_{\gamma^{\text{C}}}^{\text{rel}} = 1,15 \pm 0,07$$

Die Liniengruppen sind dabei mit einem Index M für die Met-Seitenkette und mit einem Index C für die Cys(Me)-Seitenkette gekennzeichnet. Da die relativen Hyperfeinkopplungen im Rahmen der Messungenauigkeiten mit denen der untersuchten Radikale des zyklischen Glycin-Methionins (GM) (vgl. Tabelle 5.8 auf Seite 95) sowie des zyklischen Glycin-Methylcysteins (GC) identisch sind (vgl. Tabelle 5.13 auf Seite 114), wird auch hier die Zuordnung eines vollständig auf dem Schwefel zentrierten Radikals für die Met-Seitenkette sowie eines stabilisierten schwefelzentrierten Radikals für die Cys(Me)-Seitenkette unterstützt.

Um endgültige Klarheit über die Natur des vorliegenden Radikalzustandes zu erhalten, wurden CIDNP-Feldabhängigkeiten vermessen. Der erhaltene Signalverlauf für die CH_3 -Protonen von MC-trans ist in Abbildung 5.38 rechts unten dargestellt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Feldabhängigkeiten für die δ^{M} -Protonen und die γ^{C} -Protonen unterschiedlich sind. Daher muss die Polarisation aus verschiedenen Radikalpaarreaktionen stammen. Dies bedeutet, dass beide Seitenketten unabhängig voneinander polarisiert werden. Damit kann die in [77, 78] postulierte Annahme einer vernachlässigbaren Wechselwirkung zwischen den beiden Seitenketten bestätigt und eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zwischen den Schwefelatomen beider Residuen ausgeschlossen werden.

Das Magnetfeld mit maximaler CIDNP-Intensität B_{\max} ist für die γ^{C} -Protonen im Ver-

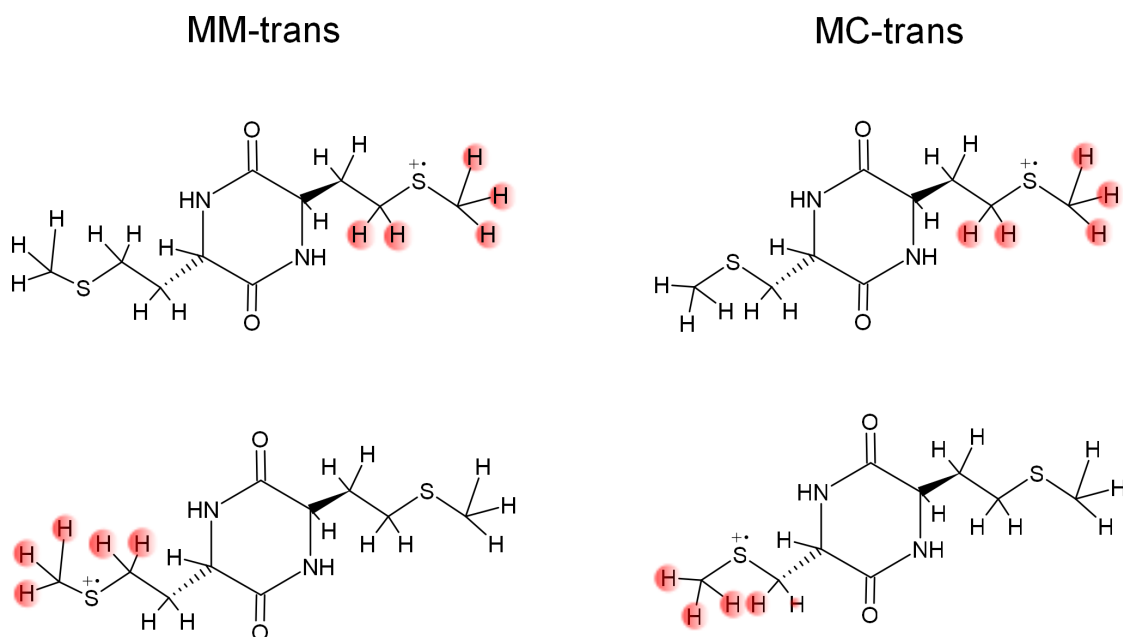


Abbildung 5.40: Mögliche Radikalstrukturen von $MM\text{-trans}^{+\bullet}$ (links) und $MC\text{-trans}^{+\bullet}$ (rechts), wobei beide Seitenketten unabhängig voneinander polarisiert werden können. Die Stärke der Hyperfeinkopplung der einzelnen Protonen wird durch die Fläche eines Kreises dargestellt. Alle eingezeichneten Hyperfeinkopplungen sind positiv.

gleich zu den δ^M -Protonen zu größeren Magnetfeldern hin verschoben. Dagegen stimmt der gefundene CIDNP-Feldverlauf für die δ^M -Protonen aus MC-trans mit demjenigen für die δ -Protonen aus MM-trans und aus GM überein und zeigt maximale CIDNP-Intensität bei $B_{\max} = 0,63 \text{ T}$ (siehe Abbildung 5.39 links). Abbildung 5.39 rechts zeigt die Feldabhängigkeiten der γ -Protonen der Cys(Me)-Residuen aus MC-trans und aus GC. Auch diese Verläufe unterscheiden sich im Rahmen der Fehlertoleranz nicht. Da zudem auch die relativen Hyperfeinkopplungen im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede zwischen MM-trans und GM sowie zwischen MC-trans und GM bzw. GC gezeigt haben, muss davon ausgegangen werden, dass auch im Falle der Transpeptide dieselben Radikale wie bei GM und GC auftreten. Die Met-Seitenkette bildet bei der Reaktion mit 4CBP ein nur am Schwefel zentriertes Kationradikal ($S^{+\bullet}$) und die Cys(Me)-Seitenkette bei der entsprechenden Reaktion eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zwischen dem Schwefel und einem Sauerstoff aus dem Ringgerüst ($(S \cdots O)^{+\bullet}$ -Bindung). Die möglichen Strukturen der Radikale sind in Abbildung 5.40 für MM-trans (links) und für MC-trans (rechts) dargestellt.

Radikalpaarreaktion und Folgeprodukte

In Abbildung 5.41 ist die CIDNP-Kinetik für die δ -Protonen des MM-trans für zwei verschiedene Konzentration aufgetragen. Man erkennt den für degenerierten Elektronenaus-

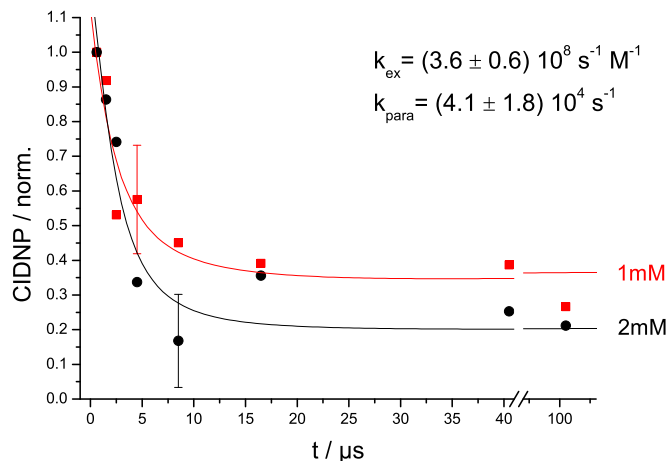
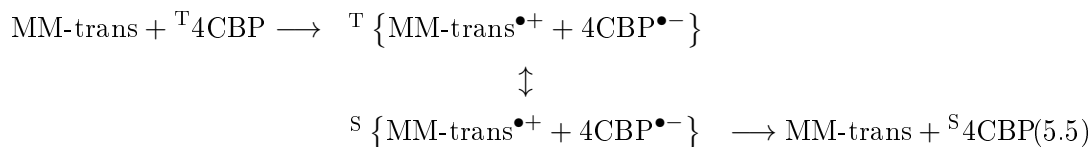


Abbildung 5.41: CIDNP-Kinetiken der δ -Protonen von GM aus der Messung von 1 mM (rot) und 2 mM (schwarz) MM-trans mit 5 mM 4CBP bei pH 6,8.

tausch typischen schnellen Zerfall der Polarisation sowie die Abhängigkeit des Verlaufs der Kinetik von der Konzentration des MM-trans (vgl. Kapitel 2.1.6). Aus diesem Grund kann sich das Radikal des MM-trans nur durch ein Elektron vom diamagnetischen Grundzustandsmolekül MM-trans unterscheiden, so dass folgender Reaktionsmechanismus zwischen den Radikalpartnern vorgeschlagen wird:



Durch die Anpassung (durchgezogene Linien in Abbildung 5.41) des in Abschnitt 2.1.6 vorgestellten Gleichungssystems 2.29 und 2.30 an die Datenpunkte wurden die Austauschrate des degenerierten Elektronenaustausches $k_{\text{ex}} = (3,6 \pm 0,6) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und die longitudinale Relaxationsrate der Kernspins der δ -Protonen im radikalischen Zustand $k_{\text{para}} = (4,1 \pm 1,8) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Beim Vergleich der Kinetik der δ -Protonen von MM-trans (Abbildung 5.41) mit derjenigen des GM (Abbildung 5.24 rechts auf Seite 97) fällt auf, dass der degenerierte Elektronenaustausch für MM-trans effektiver ist. Die Rate ist etwa doppelt so groß wie diejenige für GM ($k_{\text{ex}}^{\text{MM-trans}} = (3,6 \pm 0,6) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \approx 2 \cdot k_{\text{ex}}^{\text{GM}} = (1,6 \pm 0,3) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Dies entspricht den Erwartungen, da bei gleicher Konzentration des Peptids bei MM-trans doppelt so viele Met-Residuen vorliegen wie bei GM. Weiterhin ist die paramagnetische Relaxationsrate für MM-trans größer als diejenige für GM ($k_{\text{para}}^{\text{MM-trans}} = (4,1 \pm 1,8) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} > k_{\text{para}}^{\text{GM}} = (1,6 \pm 0,8) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$).

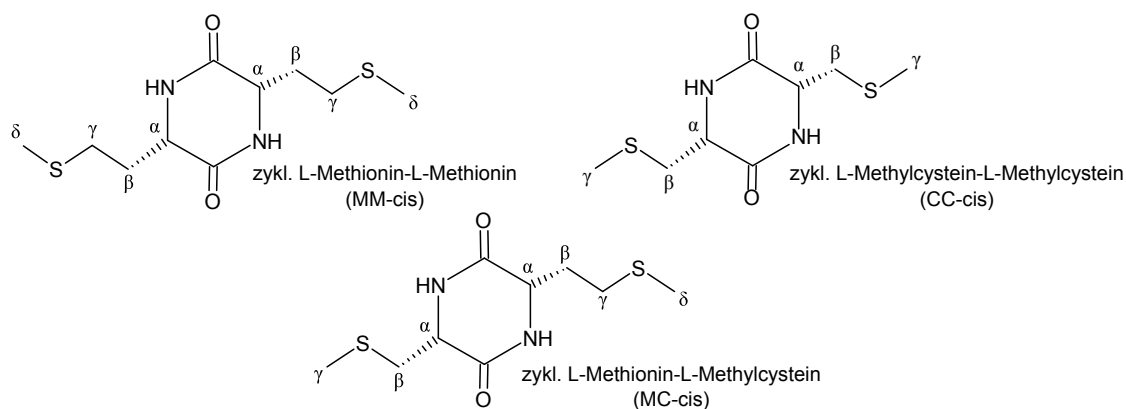


Abbildung 5.42: Struktur der zyklischen Dipeptide *L*-Methionin-*L*-Methionin (*MM-cis*, oben links), *L*-Methylcystein-*L*-Methylcystein (*CC-cis*, oben rechts) und *L*-Methionin-*L*-Methylcystein (*MC-cis*, unten).

In Abbildung 5.38 sind in den CIDNP-Spektren für *MM-trans* und *MC-trans* deutlich Nebenprodukte zu erkennen. Auf Grund der gleichen spektralen Position der zugeordneten Nebenproduktlinien, sowie des identischen Verlaufs der mit diesen Linien verknüpften Feldabhängigkeiten und Kinetiken im Vergleich zum GM kann von denselben Seitenreaktionen wie bei der Messung mit GM ausgegangen werden (vgl. Abschnitt 5.2.1).

Aus den soeben vorgestellten Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Radikalstruktur und -reaktion in zyklischen Dipeptiden mit thioetherenthaltenden Aminosäuren unabhängig von Art und Größe des zweiten Residuums ist, solange sich die beiden Seitenketten in *trans*-Konformation befinden.

5.3.2 Zyklische Peptide in *cis*-Konformation

Nach der im letzten Abschnitt erfolgten Diskussion der Stereoisomere in *trans*-Konformation werden nun zyklische Dipeptide betrachtet, deren Seitenketten zur selben Seite des Ringes ausgerichtet sind (*cis*-Konformation). Da die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung der Seitenketten miteinander bei diesen Peptiden deutlich erhöht ist [77], ist es von besonderem Interesse zu ermitteln, ob eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zwischen den Schwefelatomen beider Seitenketten beobachtet werden kann. Dafür wurden die Peptide *L*-Methionin-*L*-Methionin (*MM-cis*) und *L*-Methylcystein-*L*-Methylcystein (*CC-cis*) und *L*-Methionin-*L*-Methylcystein (*MC-cis*) (Strukturen siehe Abbildung 5.42) untersucht. *MM-cis* wurde ausgewählt, weil Methionin physiologisch relevant ist, *CC-cis*, um zu prüfen, ob eine Verkürzung der Seitenkette noch zu einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung beider Schwefelatome führen kann, und *MC-cis*, um zwischen den Seitenketten unterscheiden zu können. In neutraler Lösung liegen alle drei Peptide in ungeladener Form vor.

Die NMR-Spektren sowie ihre Simulationen sind in Abbildung 5.43 dargestellt. Die

aus den Simulationen bestimmten chemischen Verschiebungen δ der einzelnen Linien und die skalare j -Kopplung der Kerne untereinander sind in Tabelle 5.15 zusammengefasst. Zunächst fällt auf, dass die Liniengruppen der beiden Seitenketten der MM-cis und CC-cis äquivalent und nicht unterscheidbar sind, wohingegen die Liniengruppen der einzelnen Protonen der unterschiedlichen Seitenketten bei MC-cis gut voneinander zu trennen sind.

Beim Vergleich der NMR-Spektren von CC-cis und GC, erkennt man, dass bei CC-cis die j -Kopplung der β -Protonen zu dem α -Proton (j_{α,β_1} und j_{α,β_2}) signifikant unterschiedlich ist, während diese bei GC nahezu gleich sind (vgl. Abbildung 5.29 auf Seite 108). Außerdem hat sich der Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen beiden β -Protonen verkleinert. Dies lässt sich nur erklären, wenn sich die Vorzugskonformation (welche bei GC eine Faltung der Cys(Me)-Seitenkette über den Ring darstellt, vgl. Abschnitt 5.2.2 auf Seite 113) geändert hat. Offenbar ist es energetisch nicht mehr vorteilhaft, wenn beide Residuen das Schwefelatom über den Ring ausgerichtet haben. Für MC-cis ist die gleiche Tendenz in geringerem Ausmaß zu erkennen. Anscheinend ist es für die unterschiedlich langen Seitenketten im Wesentlichen möglich, beide über den Ring zu falten, ohne dass eine zu starke sterische Behinderung auftritt.

Radikalstruktur

In Abbildung 5.44 links oben ist das CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare und das dazugehörige NMR-Spektrum des Systems MM-cis mit 4CBP dargestellt. Das Polarisationsmuster der MM-cis Liniengruppen ist ebenso wie bei GM typisch für ein zumindest teilweise auf dem Schwefel zentriertes Kationradikal, da nur die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen polarisiert sind (δ - und γ -Protonen). Weiterhin tragen ebenso wie bei GM einige Nebenprodukte sowie das Multipllett der H2,6,2',6'-Protonen von 4CBP Polarisation. Da bereits im CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare Nebenprodukte auftauchen, können nur relative Hyperfeinkopplungen (auf die Kopplungswerte der δ -Protonen normiert) für das in der zyklischen Radikalpaarreaktion gebildete MM-cis⁺•-Radikal bestimmt werden:

$$a_{\gamma}^{\text{rel}} = 1,33 \pm 0,08 \quad a_{\delta}^{\text{rel}} = 1,00 \pm 0,04$$

Dabei ist die relative Polarisation auf den γ -Protonen im Vergleich zum GM erhöht. Dies ist ein erster Hinweis für die Bildung unterschiedlicher Radikale in beiden Reaktionen. Ein weiteres Indiz erhält man aus der Feldabhängigkeit (Abbildung 5.44 rechts oben), da das maximale CIDNP-Signal im Vergleich zu den Messungen an GM zu kleineren Feldern verschoben ist ($B_{\text{max}}^{\text{MM-cis}} = 0,46 \text{ T} < B_{\text{max}}^{\text{GM}} = 0,60 \text{ T}$). Diese Verschiebung könnte durch eine mögliche „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zwischen den Schwefelatomen beider Seitenketten ((S...S)⁺-Radikal) erklärt werden.

Um zu überprüfen, ob sich das Radikal über beide Residuen gleichzeitig erstreckt, wurde das Molekül MC-cis untersucht, bei dem eines der Met-Residuen durch ein Cys(Me)-

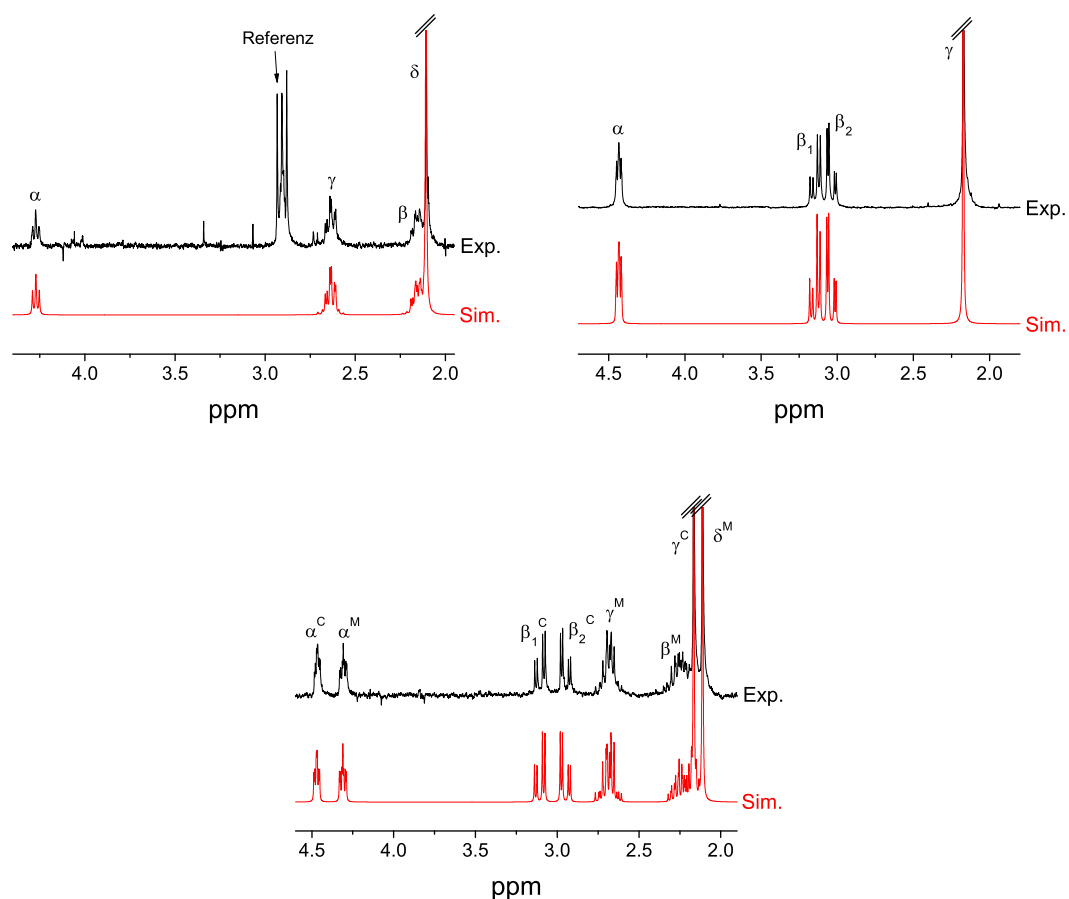
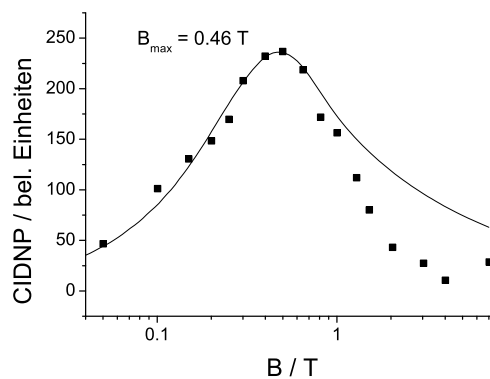
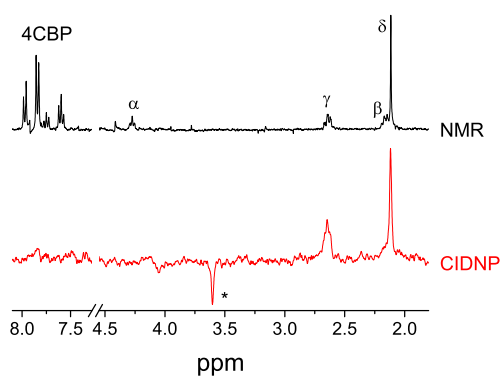


Abbildung 5.43: NMR-Spektrum (schwarz) und Simulation (rot) von 3 mM MM-cis (oben links), 12 mM CC-cis (oben rechts) und 8 mM MC-cis (unten) in deuteriertem Wasser bei etwa pH 7. Um zwischen den Liniengruppen der beiden Seitenketten von MC-cis zu unterscheiden, sind diese mit einem Index M für die Met-Seitenkette und mit einem Index C für die Cys(Me)-Seitenkette gekennzeichnet.

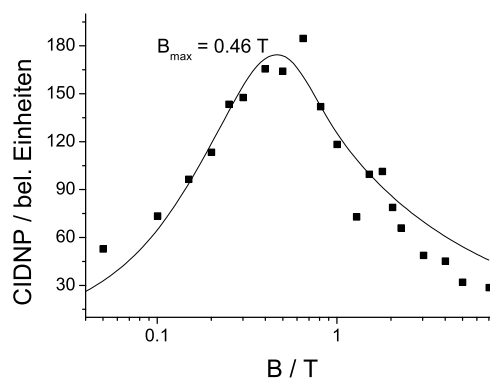
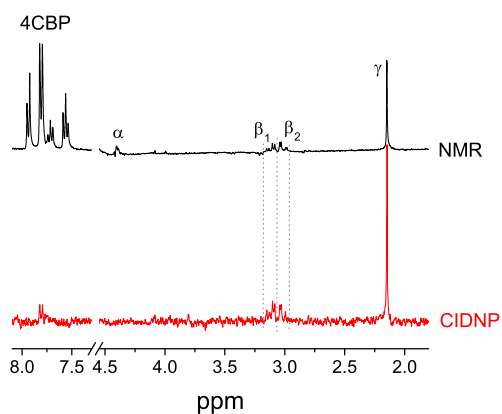
MM-cis			
δ/ppm :	$\delta(\alpha) = 4,272 \pm 0,001$	$\delta(\beta_1) = 2,167 \pm 0,001$	$\delta(\beta_2) = 2,137 \pm 0,001$
	$\delta(\gamma_1) = 2,650 \pm 0,001$	$\delta(\gamma_2) = 2,622 \pm 0,001$	$\delta(\delta) = 2,107 \pm 0,001$
j/Hz :	$j_{\alpha,\beta_1} = 6,3 \pm 0,3$	$j_{\alpha,\beta_2} = 5,0 \pm 0,3$	$j_{\beta_1,\beta_2} = 14,0 \pm 0,3$
	$j_{\gamma_1,\beta_1} = 8,3 \pm 0,3$	$j_{\gamma_1,\beta_2} = 8,2 \pm 0,3$	$j_{\gamma_2,\beta_1} = 6,1 \pm 0,3$
	$j_{\gamma_2,\beta_2} = 7,1 \pm 0,3$	$j_{\gamma_1,\gamma_2} = 12,4 \pm 0,3$	
CC-cis			
δ/ppm :	$\delta(\alpha) = 4,434 \pm 0,001$	$\delta(\beta_1) = 3,141 \pm 0,001$	$\delta(\beta_2) = 3,044 \pm 0,001$
	$\delta(\gamma) = 2,173 \pm 0,001$		
j/Hz :	$j_{\alpha,\beta_1} = 6,1 \pm 0,3$	$j_{\alpha,\beta_2} = 3,8 \pm 0,3$	$j_{\beta_1,\beta_2} = 14,5 \pm 0,3$
MC-cis			
δ/ppm :	$\delta(\alpha^C) = 4,470 \pm 0,001$	$\delta(\beta_1^C) = 3,103 \pm 0,001$	$\delta(\beta_2^C) = 2,954 \pm 0,001$
	$\delta(\gamma^C) = 2,166 \pm 0,001$		
	$\delta(\alpha^M) = 4,310 \pm 0,001$	$\delta(\beta_1^M) = 2,264 \pm 0,001$	$\delta(\beta_2^M) = 2,170 \pm 0,001$
	$\delta(\gamma_1^M) = 2,710 \pm 0,001$	$\delta(\gamma_2^M) = 2,660 \pm 0,001$	$\delta(\delta^M) = 2,112 \pm 0,001$
j/Hz :	$j_{\alpha^C,\beta_1^C} = 4,8 \pm 0,3$	$j_{\alpha^C,\beta_2^C} = 4,1 \pm 0,3$	$j_{\beta_1^C,\beta_2^C} = 14,6 \pm 0,3$
	$j_{\alpha^C,\alpha^M} = 1,7 \pm 0,3$		
	$j_{\alpha^M,\beta_1^M} = 6,6 \pm 0,3$	$j_{\alpha^M,\beta_2^M} = 4,6 \pm 0,3$	$j_{\beta_1^M,\beta_2^M} = 13,7 \pm 0,3$
	$j_{\gamma_1^M,\beta_1^M} = 6,5 \pm 0,3$	$j_{\gamma_1^M,\beta_2^M} = 9,3 \pm 0,3$	$j_{\gamma_2^M,\beta_1^M} = 4,3 \pm 0,3$
	$j_{\gamma_2^M,\beta_2^M} = 8,3 \pm 0,3$	$j_{\gamma_1^M,\gamma_2^M} = 13,4 \pm 0,3$	

Tabelle 5.15: Chemische Verschiebung δ und j -Kopplung von MM-cis, CC-cis und MC-cis in neutraler Lösung. Dabei sind bei den Werten für MC-cis die Liniengruppen des Met-Residuums mit dem Index M und die des Cys(Me)-Residuums mit dem Index C gekennzeichnet (vgl. Abbildung 5.43 unten).

MM-cis



CC-cis



MC-cis

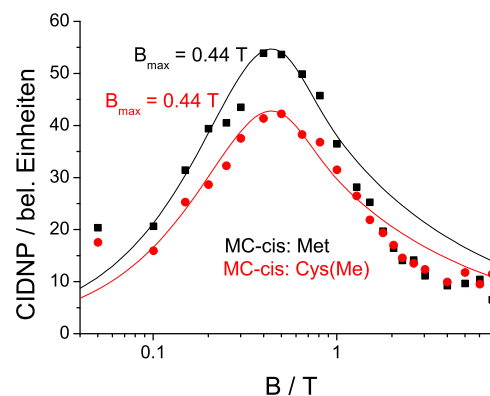
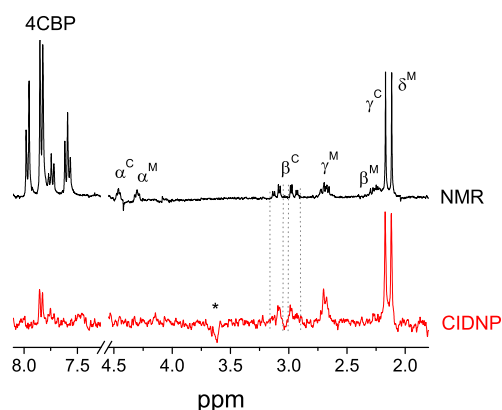


Abbildung 5.44: Links: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum (rot) 0,5 μs nach der Laseranregung von 1 mM Peptid mit 5 mM 4CBP. Das Symbol „*“ markiert die Nebenprodukte; rechts: Magnetfeldabhängigkeit der CH_3 -Protonen von 1 mM Peptid mit 0,6 mM 4CBP; jeweils für das Peptid MM-cis (oben), CC-cis (mitte) und MC-cis (unten) in neutraler Lösung.

Residuum ersetzt wurde. Im CIDNP-Spektrum der Geminate-Paare (Abbildung 5.44 links unten) erkennt man deutlich, dass beide Seitenketten ein CIDNP-Signal zeigen und jeweils die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen polarisiert sind, so dass an beiden Residuen ein zumindest teilweise schwefelzentriertes Radikal gebildet wird. Auffällig ist, dass beide β -Protonen der Cys(Me)-Seitenkette ähnlich polarisiert sind, so dass wahrscheinlich kein $(S \cdot O)^+$ -Radikal in dieser Seitenkette gebildet wird (wie dies beim GC (vgl. Abschnitt 5.2.2 und insbesondere Abbildung 5.30) und MC-trans der Fall war (Abschnitt 5.3.1)). Einen eindeutigen Hinweis für eine intramolekulare $(S \cdot S)^+$ -Bindung liefern die Feldabhängigkeiten (Abbildung 5.44 rechts unten) der δ^M -Protonen des Met-Residuums sowie der γ^C -Protonen des Cys(Me)-Residuums. Da beide CH_3 -Protonen den gleichen Feldverlauf zeigen (vgl. Abbildung 5.47 auf Seite 136), werden sie sicherlich aus einer Radikalpaarreaktion stammen. Dies ist ein klarer Unterschied im Vergleich zu den Ergebnissen an MC-trans, bei denen das maximale CIDNP-Signal beider Residuen bei unterschiedlichen Magnetfeldern erreicht wurde und für beide Residuen zu größeren Magnetfeldern verschoben ist (vgl. Abbildung 5.38 rechts unten auf Seite 121). Eine mögliche Polarisation auf beiden Seitenketten aus derselben Radikalpaarreaktion ist nur durch eine Bindung zwischen diesen zu erklären. Bei dem betrachteten Molekül besteht die einzige Möglichkeit dafür in einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zwischen den Schwefelatomen beider Seitenketten. Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist es naheliegend, auch im Falle von MM-cis vom Vorliegen einer $(S \cdot S)^+$ -Bindung auszugehen, insbesondere da der Verlauf der Feldabhängigkeiten fast identisch ist.

Da auch bei MC-cis im CIDNP-Spektrum der Geminate-Paare schon Nebenprodukte auftauchen, können nur die relativen Hyperfeinkopplungen für MC-cis^{+•} bestimmt werden:

$$a_{\gamma^M}^{\text{rel}} = 1,64 \pm 0,16 \quad a_{\delta^M}^{\text{rel}} = 1,00 \pm 0,03$$

$$a_{\beta_1^C}^{\text{rel}} = 0,94 \pm 0,27 \quad a_{\beta_2^C}^{\text{rel}} = 0,76 \pm 0,27 \quad a_{\gamma^C}^{\text{rel}} = 1,02 \pm 0,03$$

Um zu überprüfen, ob bei einer Verkürzung der Seitenkette noch eine Bildung eines $(S \cdot S)^+$ -Radikals möglich ist, wurden abschließend noch Messungen an CC-cis durchgeführt. In Abbildung 5.44 (mitte links) ist das CIDNP-Spektrum der Geminate-Paare dargestellt. Dies zeigt die typische Polarisation für zumindest teilweise auf dem Schwefel zentrierte Kationradikale, da die β - und γ -Protonen ein CIDNP-Signal zeigen. Wie dies bereits bei MC-cis zu sehen war, sind die beiden β -Protonen etwa gleich polarisiert, was eine $(S \cdot O)^+$ -Bindung im entstandenen Radikal ausschließt. Dieses Ergebnis wird durch dichtefunktionaltheorietische Berechnungen von D. Pogocki (Institute of Chemistry and Nuclear Technology, Warschau) bestätigt (siehe Kapitel 3.3). Eine $(S \cdot O)^+$ -Bindung in CC-cis führt dabei zu sehr unterschiedlichen Hyperfeinkopplungen auf den β -Protonen, während eine $(S \cdot S)^+$ -Bindung zu nahezu gleichen Hyperfeinkopplungen auf den β -Protonen führt (vgl. Tabelle 5.16). Einen weiteren Hinweis für eine $(S \cdot S)^+$ -Bindung erhält man aus der Feldabhängigkeit (rechts). Die maximale CIDNP-Intensität ist zu deutlich kleineren Feldern im

Vergleich zur Messung mit GC hin verschoben ($B_{\max}^{\text{MM-cis}} = 0,46 \text{ T} < B_{\max}^{\text{GC}} = 0,85 \text{ T}$). Da der Verlauf der Feldabhängigkeit von CC-cis dem der anderen Moleküle in cis-Konformation entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass dasselbe Radikal, ein $(\text{S} \cdot \cdot \text{S})^+$ -Radikal, gebildet wird.

Da keine Nebenprodukte im CIDNP-Spektrum der Geminate-Paare sichtbar sind, kann das CIDNP-Signals von 4CBP als Referenz benutzt werden, um so die CIDNP-Intensitäten für das CC-cis-Radikal zu kalibrieren (wie im Abschnitt 3.1.3 beschrieben und in Kapitel 4 mehrmals angewandt). Dabei wurden die in Abschnitt 4.2.3 bestimmten Hyperfeinkopplungen verwendet. Dadurch erhält man folgende absolute Hyperfeinkopplungskonstanten für CC-cis⁺•:

$$a_{\beta_1} = 1,0 \pm 0,3 \text{ mT} \quad a_{\beta_2} = 0,7 \pm 0,2 \text{ mT} \quad a_{\gamma} = 0,76 \pm 0,14 \text{ mT}$$

Die experimentell ermittelten Hyperfeinkopplungen stimmen gut mit den aus DFT-Berechnungen (siehe Kapitel 3.3) bestimmten Hyperfeinkopplungen überein (vgl. Tabelle 5.16). Mit Hilfe der absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten kann mit der Simulation der Feldabhängigkeit (rechts) nach dem im Abschnitt 2.1.4 vorgestellten Adrianmodell folgender g -Faktor bestimmt werden:

$$g_{\text{CC}^{\bullet+}\text{cis}} = 2,013 \pm 0,002$$

Dieser ist etwas größer als der g -Faktor für $(\text{S} \cdot \cdot \text{S})^+$ -Bindung bei intermolekularer Dimerbildung mit $g=2,01012$ [79, 110].

Die für CC-cis bestimmten Strukturparameter lassen sich nicht komplett auf die beiden anderen Systeme MM-cis und MC-cis übertragen, obwohl alle ein $(\text{S} \cdot \cdot \text{S})^+$ -Radikal bilden. Die Spindichteverteilung des Elektrons und damit die Hyperfeinkopplung sind sicherlich auf Grund der verschiedenen Längen der Seitenketten¹³ unterschiedlich, was schon beim Vergleich der relativen Hyperfeinkopplungen zu erkennen ist (vgl. in Tabelle 5.19 auf Seite 152). Es ist aber zu erwarten, dass diese in derselben Größenordnung liegen. Allerdings sollte der für CC-cis ermittelte g -Faktor für MC-cis und MM-cis sehr ähnlich sein.

Die Strukturen der Radikale sind für MM-cis, CC-cis und MC-cis in Abbildung 5.45 dargestellt.

Radikalpaarreaktion und Folgeprodukte

In Abbildung 5.46 ist die CIDNP-Kinetik der jeweiligen CH_3 -Protonen (δ -Protonen für Met-Seitenketten und γ -Protonen für Cys(Me)-Seitenketten) der zyklischen Peptide in cis-Konfiguration (links oben MM-cis, rechts oben CC-cis und unten MC-cis) für zwei verschiedene Konzentration aufgetragen. Alle Substanzen zeigen die typischen Charakteristika des

¹³Die unterschiedlichen Seitenketten in MC-cis können als einfaches Modellsystem für zwei Met-Residuen in einem Protein dienen, welche keine symmetrische $(\text{S} \cdot \cdot \text{S})^+$ -Bindung ausbilden können, z.B. in einer α -Helix

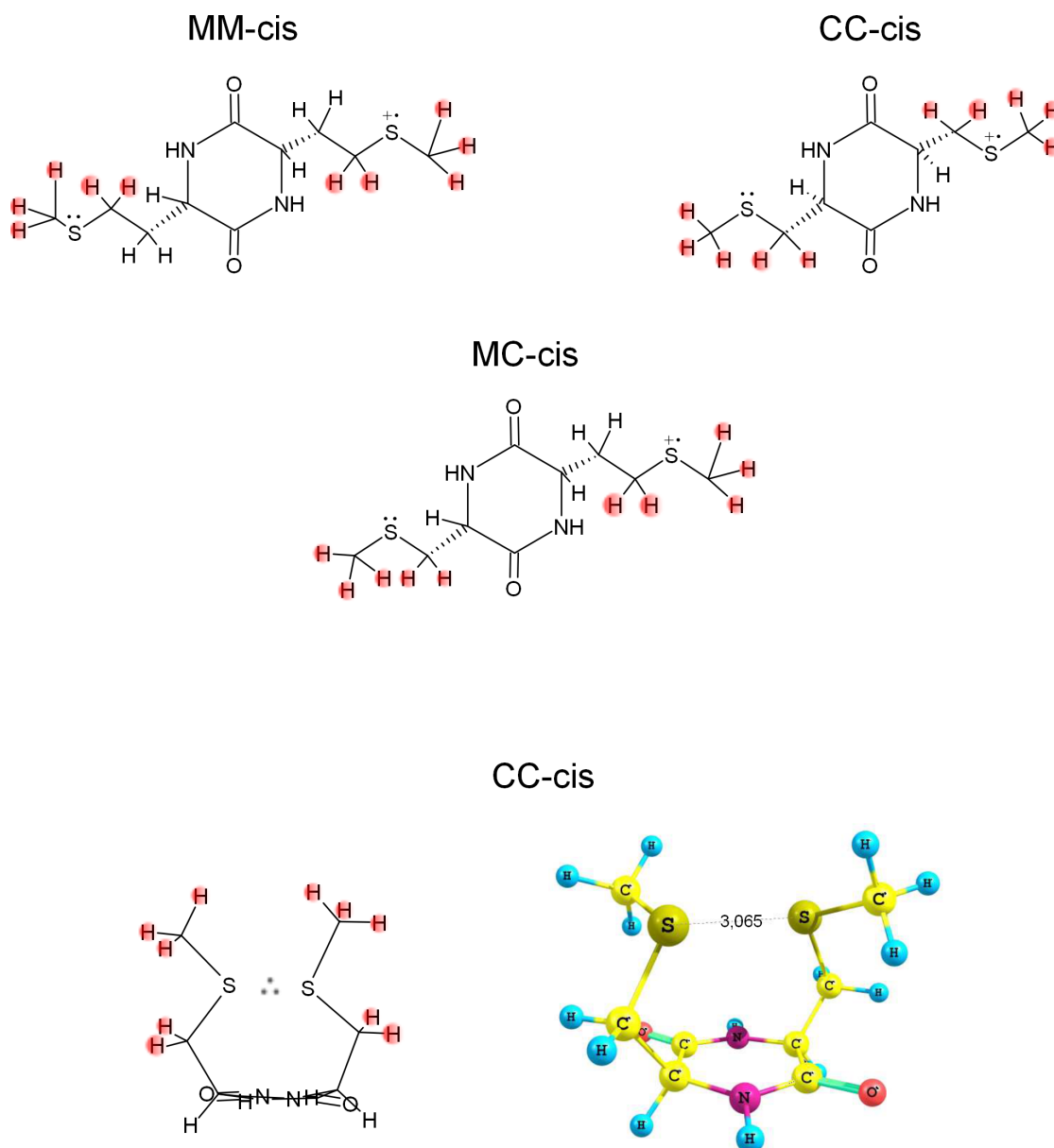


Abbildung 5.45: Radikalstrukturen von $MM\text{-cis}^{+\bullet}$ (oben links), $CC\text{-cis}^{+\bullet}$ (oben rechts) und $MC\text{-cis}^{+\bullet}$ (mitte) sowie beispielhaft die schematische (unten links) und die für die DFT-Berechnungen ermittelte (entnommen aus [44]) (unten rechts) 3D-Struktur von $CC\text{-cis}^{+\bullet}$. Dabei bilden alle Radikale eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zwischen den Schwefelatomen beider Seitenketten ($(S \cdots S)^+$ -Radikal). Die Stärke der Hyperfeinkopplung der einzelnen Protonen wird durch die Fläche eines Kreises dargestellt. Alle eingezeichneten Hyperfeinkopplungen haben positives Vorzeichen.

	experimentell bestimmt	DFT mit	
		$r_{SS} = 2,990 \text{ \AA}$	$r_{SS} = 3,065 \text{ \AA}$
a_{β_1}/mT	$1,0 \pm 0,3$	0,6	0,6
a_{β_2}/mT	$0,7 \pm 0,2$	0,6	0,5
a_{γ}/mT	$0,76 \pm 0,14$	0,75	0,85

Tabelle 5.16: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten absoluten Hyperfeinkopplungen des $CC\text{-cis}^{+\bullet}$ -Radikals mit den aus DFT-Berechnungen (siehe Kapitel 3.3) bestimmten Werten eines $(S\text{:}S)^+$ -Radikals von $CC\text{-cis}$ für unterschiedliche Abstände zwischen den Schwefelatomen r_{SS} .

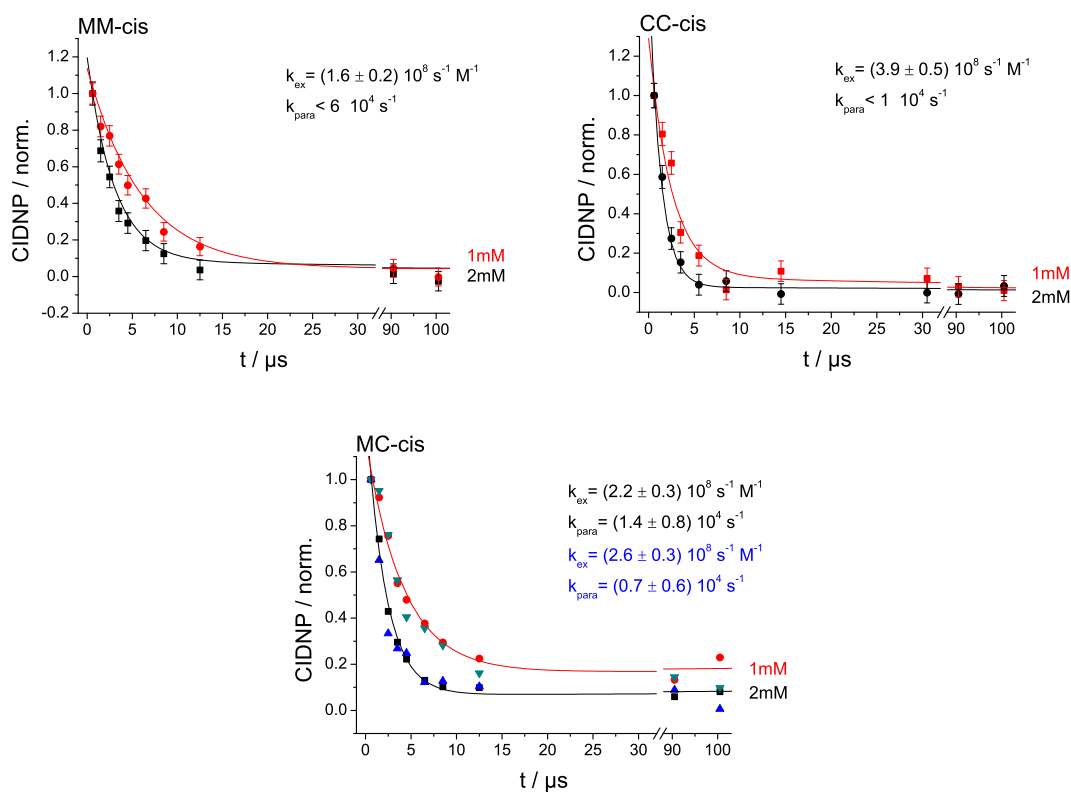
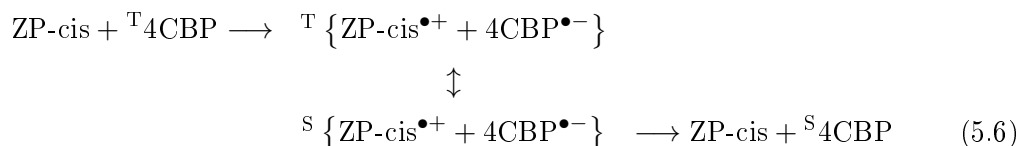


Abbildung 5.46: CIDNP-Kinetiken der δ -Protonen von $MM\text{-cis}$ (links oben), der γ -Protonen von $CC\text{-cis}$ (rechts oben) und der δ^M (schwarze Quadrate und rote Kreise) sowie γ^C (blaue und zyanfarbende Dreiecke) vom $MC\text{-cis}$ (unten). Alle Messungen wurden mit zwei Löscherkonzentrationen 1 mM (rot bzw. dunkles zyan) und 2 mM (schwarz bzw. blau) und 5 mM 4CBP in neutraler Lösung durchgeführt.

degenerierten Elektronenaustausches (vgl. Kapitel 2.1.6). Aus diesem Grund können sich die entsprechenden Radikale nur durch ein Elektron vom entsprechenden diamagnetischen Grundzustandsmolekül ZP-cis¹⁴ unterscheiden, so dass als Reaktionsmechanismus für alle Substanzen Elektronentransfer zwischen den Radikalpartnern angenommen werden kann:



Durch die Anpassung (durchgezogene Linien in Abbildung 5.46) des in Abschnitt 2.1.6 vorgestellten Gleichungssystems 2.29 und 2.30 an die CIDNP-Kinetiken wurde die Austauschrate des degenerierten Elektronenaustausches k_{ex} und die longitudinale Relaxationsrate der Kernspins der CH₃-Protonen im radikalischen Zustand k_{para} bestimmt. Bei der Reaktion mit MC-cis zeigen die CH₃-Protonen beider Residuen nahezu dieselbe Kinetik, so dass nur eine Anpassung für jede Konzentration eingezeichnet wurde.

Die so bestimmten Austauschraten k_{ex} befinden sich in derselben Größenordnung wie die für andere zyklische Peptide bestimmten Raten. Werden die Austauschraten k_{ex} der verschiedenen Moleküle in cis-Konformation verglichen, so fällt auf, dass der degenerierte Elektronenaustausch für CC-cis effektiver als für MM-cis ist. Die Rate für MC-cis ist für beide Residuen innerhalb der Fehlergrenzen gleich und ihr Wert befindet sich zwischen dem Wert der beiden anderen Raten ($k_{\text{ex}}^{\text{CC-cis}} > k_{\text{ex}}^{\text{MC-cis}} > k_{\text{ex}}^{\text{MM-cis}}$). Diese Unterschiede haben ihre Ursache vermutlich in der erhöhten Wahrscheinlichkeit einer den Elektronentransfer begünstigenden Anordnung beim Zusammenstoß mit dem diamagnetischen Grundzustandsmolekül im Falle kleiner Substanzen, was zu einer größeren Rate führt (vgl. Kapitel 2.1.6).

Da die Kinetiken nahezu auf Null abfallen, können für die Relaxationsraten k_{para} der CH₃-Protonen für CC-cis und MM-cis nur obere Grenzen angegeben werden. Es ist jedoch klar, dass diese deutlich kleiner als die bisher bestimmten Raten für die zyklischen Peptide sein müssen (z. B. $k_{\text{para}}^{\text{GC}} = (3,1 \pm 0,9) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{para}}^{\text{GM}} = (1,6 \pm 0,8) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$). Auf Grund der ähnlichen Größe der betrachteten Moleküle sollte die Korrelationszeit (vgl. Kapitel 2.2) und damit der Einfluss der Bewegung auf die Relaxationsrate der Moleküle in cis-Konformation sich kaum von den anderen zyklischen Dipeptiden unterscheiden. Eine in den cis-Konformeren auftauchende Bindung zwischen den Schwefelatomen beider Residuen führt höchstens zu einer Verringerung der Seitenkettenbeweglichkeit, was seinerseits eine Erhöhung der Rate verursachen müsste. Die experimentelle beobachtete Verringerung von k_{para} kann ihre Ursache daher nur in einer Verringerung des anisotropen Anteils der Hyperfeinkopplung für die CH₃-Protonen haben. Für MC-cis ist kein signifikanter Unterschied

¹⁴ZP: Abkürzung für zyklisches Dipeptid; steht für MM, CC oder MC

zwischen den Seitenketten festzustellen. Die CH_3 -Protonen beider Residuen verhalten sich ähnlich, wobei der Wert für die γ^{C} -Protonen dabei deutlich kleiner als der entsprechende in GC ist ($k_{\text{para}}^{\text{MM-cis}} = (7 \pm 6) \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} < k_{\text{para}}^{\text{GC}} = (3,1 \pm 0,9) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$), während die Rate der δ^{M} -Protonen etwa derjenigen in GM entspricht ($k_{\text{para}}^{\text{MC-cis}} = (1,4 \pm 0,8) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \approx k_{\text{para}}^{\text{GM}} = (1,6 \pm 0,8) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$).

Für MM-cis sowie für MC-cis sind im Spektrum der Geminat-Paare und für CC-cis in den CIDNP-Spektren mit längeren Wartezeiten (nicht gezeigt) deutlich auftretende Nebenproduktlinien zu erkennen. Diese befinden sich an der gleichen relativen Position wie bei der Reaktion mit GM. Da auch der Verlauf der Feldabhängigkeiten und Kinetiken der Liniengruppen des Farbstoffes und der Nebenprodukte sehr ähnlich demjenigen des GM ist, kann von den gleichen Seitenreaktionen und Folgeprodukten wie bei der Messung mit GM ausgegangen werden (vgl. Abschnitt 5.2.1).

Vergleich mit den Konformeren in trans-Konfiguration

Als wichtigster Unterschied in den CIDNP-Messungen fällt auf, dass abhängig von der Konfiguration unterschiedliche Radikale entstehen. Während bei den trans-Peptiden jede Seitenkette unabhängig voneinander ein Radikal bildet, bei einer Met-Seitenkette ein $\text{S}^{+\bullet}$ -Radikal und bei einer Cys(Me)-Seitenkette ein $(\text{S}:\text{O})^+$ -Radikal, bilden die cis-Peptide ein gemeinsames Radikal über beide Seitenketten, wobei die Schwefelatome beider Residuen eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung unter Entstehung eines $(\text{S}:\text{S})^+$ -Radikals eingehen. Da die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen in allen Fällen polarisiert sind, ist die Bildung der unterschiedlichen Radikale am besten in den Feldabhängigkeiten zu erkennen. In Abbildung 5.47 sind die Feldabhängigkeiten der CH_3 -Protonen von MC-cis und MC-trans zusammengefasst. Für alle drei auftretende Radikale sind dabei unterschiedliche Verläufe zu erkennen. Dabei zeigen die beiden Residuen von MC-cis dieselbe Feldabhängigkeit, da sie aus einer Radikalpaarreaktion stammen.

In der primären Radikalpaarreaktion findet bei allen Substanzen ein Elektronentransfer von einem Schwefelatome aus einer der Seitenketten hin zum im elektronischen Triplettzustand angeregten Farbstoffmolekül statt. Danach bilden sich abhängig von der vorliegenden Konfiguration und der reagierenden Seitenkette unterschiedliche Radikale (vgl. letzter Absatz).

Die Folgereaktionen sind dann wieder für alle Substanzen identisch. Erstens nehmen alle gebildeten Radikale am degenerierten Elektronenaustausch teil und zweitens finden bei allen Substanzen die gleichen Seitenreaktionen statt (vgl. Abschnitt 5.2.1). Allerdings ergeben sich Unterschiede in den beobachteten Raten. Aus der CIDNP-Kinetik der δ -Protonen (Abbildung 5.48) von MM-cis und MM-trans lässt sich ableiten, dass der degenerierte Elektronenaustausch für die cis-Konfiguration nicht mehr so effektiv wie für die trans-Konfiguration ist ($k_{\text{ex}}^{\text{MM-trans}} = (3,6 \pm 0,6) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} > k_{\text{ex}}^{\text{MM-cis}} = (1,6 \pm$

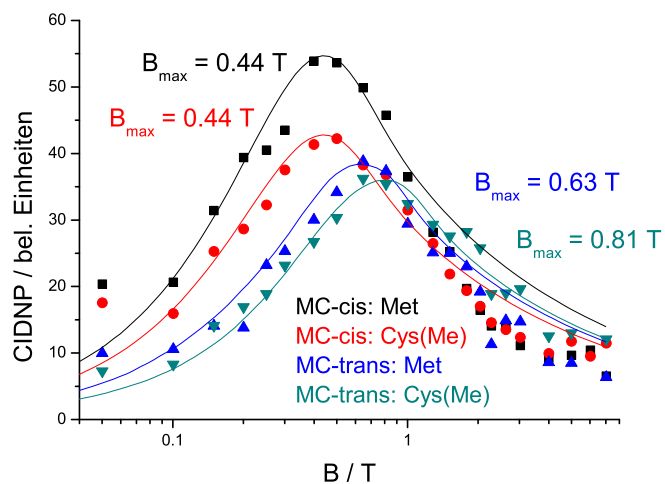


Abbildung 5.47: Abhängigkeit der CIDNP-Intensität vom Magnetfeld für die CH_3 -Protonen von 1 mM MM-cis (δ^M in schwarz und γ^C in rot) und 1 mM MM-trans (δ^M in blau und γ^C in dunklem Zyan) aus der jeweiligen Radikalpaarreaktion mit 0,6 mM 4CBP in neutraler Lösung.

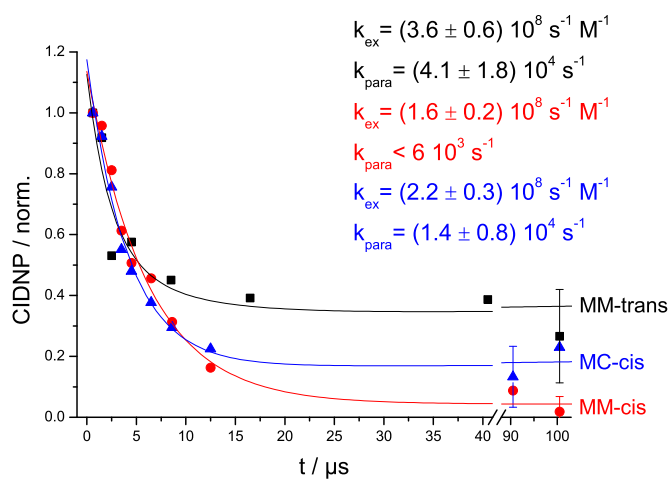


Abbildung 5.48: CIDNP-Kinetik der δ -Protonen aus der Messung von 1 mM MM-trans (schwarz), 1 mM MM-cis (rot) und 1 mM MC-cis (blau) mit 5 mM 4CBP in neutraler Lösung.

$0,2) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Offenbar nehmen nicht mehr alle Moleküle am degenerierten Elektronenaustausch teil, da zunächst die Bindung zwischen den Schwefelatomen aufgebrochen werden muss, wodurch die Rate des Prozesses reduziert wird. Auch der Vergleich der longitudinalen Relaxationszeit der Kernspins im radikalischen Zustand k_{para} weist deutliche Unterschiede auf. Die trans-Konformation zeigt hier eine signifikant höhere Rate als die cis-Konformation ($k_{\text{para}}^{\text{MM-trans}} = (4,1 \pm 1,8) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} > k_{\text{para}}^{\text{MM-cis}} < 6 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$). Diese Differenz hat ihre Ursache vermutlich in einer Verringerung des anisotropen Anteils der Hyperfeinkopplung für die δ -Protonen im cis-Konformer. Auch in MC-cis besitzt die CH_3 -Gruppe der Met-Seitenkette eine kleinere Rate als in MM-trans. Allerdings ist der beobachtete Unterschied dann kleiner, was vermutlich in der nicht symmetrischen Bindung begründet ist.

5.4 CIDNP-Intensitäten als Funktion struktureller Parameter

Zum Abschluss des Kapitels wird nun überprüft, welche strukturellen Eigenschaften eines Systems einen Einfluss auf die Intensitäten der auftretenden CIDNP-Übergänge haben. Insbesondere interessiert hierbei, ob und wie die Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Seitenketten die Stärke des beobachteten Signals beeinflusst. Zu diesem Zweck werden die Spektren einer CIDNP-aktiven Seitenkette (Methionin oder S-Methyl-L-Cystein) in verschiedenen Peptiden verglichen, welche sich durch die Art der benachbarten Residuen sowie die Distanz dieser voneinander unterscheiden. Dafür werden die in den letzten zwei Unterkapiteln vorgestellten zyklischen Dipeptide verwendet, wobei die Radikalpaarreaktionen und die Radikalstrukturen dort bereits ausführlich diskutiert wurden. Die Strukturen sind in Abbildung 5.18 auf Seite 92 (GM und GC), in Abbildung 5.36 auf Seite 118 (MM-trans und MC-trans) und in Abbildung 5.42 auf Seite 125 (MM-cis, CC-cis und MC-cis) dargestellt.

In Abbildung 5.49 sind die CIDNP-Spektren der Geminate-Paare der vermessenen zyklischen Peptide aufgetragen, wobei zur besseren Übersicht nur der Bereich der CH_3 -Linien dargestellt ist. Alle im Folgenden diskutierten Unterschiede beziehen sich immer auf diese Signale der CH_3 -Protonen, welche ausgewählt wurden, da sie das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen und alle wichtigen Prozesse widerspiegeln. In den Signalstärken sind deutliche Unterschiede bis zu einem Faktor fünf zu erkennen. Diese Differenzen lassen sich klar nicht mehr allein über Schwankungen in den Belichtungsbedingungen und damit im experimentellen Aufbau (vgl. Kapitel 3.1) erklären.

Zuerst wird nun diskutiert, von welchen Parametern bereits bekannt ist, dass sie einen Einfluss auf die CIDNP-Intensität haben, und wie diese Effekte minimiert wurden. Danach werden die Ergebnisse von Molekülen mit gleicher Radikalstruktur verglichen, bevor analysiert wird, welcher Einfluss auf die Polarisation durch eine Verkürzung der Seitenkette oder eine Konformationsänderung (bei unterschiedlichen Radikalstrukturen) beobachtet werden

kann. Abschließend erfolgt eine Zusammenfassung der wichtigsten Resultate.

5.4.1 Diskussion bekannter Einflüsse auf die CIDNP-Intensität

Bevor die experimentellen Ergebnisse diskutiert werden, ist es notwendig zusammenzufassen, von welchen Parametern die CIDNP-Intensität nach bisherigem Kenntnisstand abhängt. Dabei lassen sich vier Gruppen von Einflüssen unterscheiden.

1. Die CIDNP-Polarisation hängt von der Differenz der S-T₀-Übergangsraten (ω_{ab}) der Elektronen der beiden Radikale, welche ihrerseits eine Funktion der auftretenden Kernspinzustände (a und b) ist, ab (vgl. Gleichung 2.14 und 2.15 aus Kapitel 2.1.2). Darüber hinaus wird ω_{ab} durch die *g*-Faktoren und Hyperfeinkopplungen der beiden Radikale (Radikalstrukturparameter) sowie das äußere Magnetfeld bestimmt (vgl. Gleichung 2.11 auf Seite 11).
2. Die Konzentration der gebildeten Radikalpaare beeinflusst die CIDNP-Polarisation und hängt direkt von der Menge der gebildeten Triplettzustände des Farbstoffes (und damit den Belichtungsparametern) ab. Außerdem verändert die Löschrates, die für unterschiedliche Löscher anders sein kann, die Radikalpaarkonzentration.
3. Die Polarisation kann durch mögliche konkurrierende Seitenkanäle, die das Radikalpaar ebenfalls in den Grundzustand überführen (z.B. direkter Rückelektronentransfer in die diamagnetischen Produkte ohne Beteiligung der Hyperfeinwechselwirkung oder Bildung anderer Radikalpaare im Reaktionskäfig, die zu Seitenreaktionen führen), geschwächt werden.
4. Schließlich hängt die Polarisation ebenfalls von den auftretenden Folgeprozessen, wie z.B. degeneriertem Elektronenaustausch oder intramolekularem Elektronentransfer, ab (vgl. Kapitel 2.1.6).

Um den Parameterraum einzuschränken, wurden alle Messungen am zeitauflösenden Spektrometer unter denselben Bedingungen (Magnetfeld, Belichtung und Probenpräparation) durchgeführt. Die Experimente waren allerdings über etwa ein Jahr verteilt. In dieser Zeitspanne kann der hauptsächliche Fehler der Belichtung durch die Verringerung der Laserintensität auf etwa 20% abgeschätzt werden. Alle vermessenen Lösungen wurden mit denselben Konzentrationen des Peptids (1 mM) und des Farbstoff (5 mM 4CBP) bei etwa gleichem pH-Wert hergestellt, um keine Abhängigkeit der Löschung des Triplettzustandes durch unterschiedliche Konzentrationen oder pH-Werte zu erhalten. Dabei wurden die Konzentration so gewählt, dass fast alle im Triplett befindlichen Moleküle durch das jeweilige Peptid gelöscht werden. Die Unterschiede in den Löschraten der verschiedenen Substanzen (maximal Faktor zwei) sind dabei so gering, dass im Rahmen der Fehlertoleranz der Belichtung für alle verwendeten Proben dieselbe Radikalpaarkonzentration gebildet wird. Damit können Unterschiede aus Punkt 2 (Differenzen in den Triplettkonzentrationen) nur Variationen der CIDNP-Signalstärke kleiner als 30% erklären.

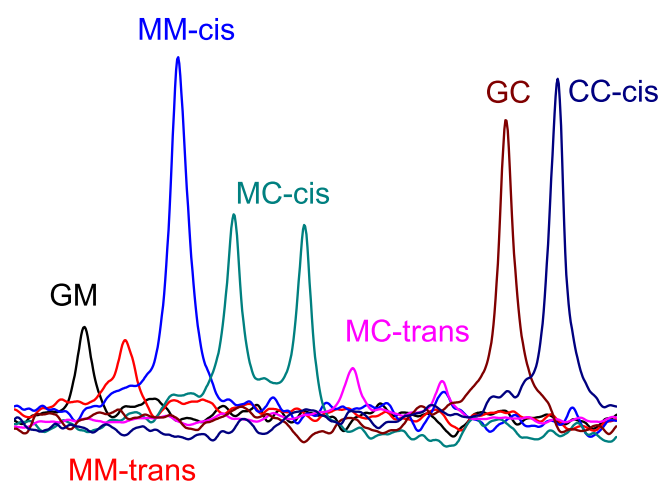
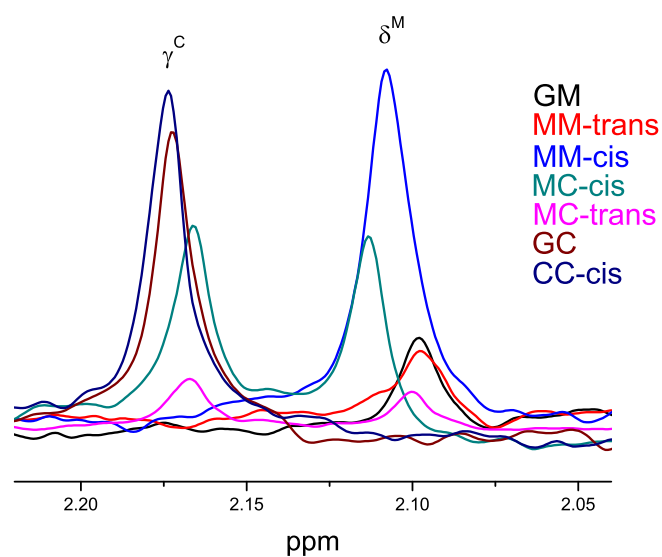


Abbildung 5.49: CIDNP-Spektren $0,5\ \mu\text{s}$ nach der Laseranregung für GM (schwarz), MM-trans (rot), MM-cis (blau), MC-cis (dunkles Zyan), MC-trans (rosa), GC (braun) und CC-cis (marineblau) (jeweils auf 120 Akkumulationen normiert). Die Messungen wurden mit 1 mM Dipeptid und 5 mM 4CBP in neutraler Lösung durchgeführt. Der Ausschnitt zeigt zum besseren Vergleich der absoluten CIDNP-Intensitäten nur die CH_3 -Linien. Im unteren Bild sind diese Linien der besseren Übersicht halber aufgefächert dargestellt.

Desweiteren werden nur die CIDNP-Spektren direkt nach dem Laserblitz untersucht, weshalb der Einfluss der Folgeprozesse des degenerierten Elektronenaustausches und der Kernspinpolarisation im paramagnetischen Zustand vernachlässigbar ist (Punkt 4).

Unter Beachtung dieser Ausführungen können unterschiedliche Intensitäten somit nur durch den Wettbewerb mit anderen Reaktionen, die ebenfalls in den Grundzustand führen (z.B. direkte Rückreaktion in die diamagnetischen Produkte ohne Ausbildung von Polarisation), unterschiedliche Hyperfeinkopplungskonstanten und g -Faktoren sowie ein verändertes Verzweigungsverhältnis zwischen primärer Reaktion und auftauchenden Seitenreaktionen verursacht werden.

5.4.2 Ergebnisse für Substanzen mit gleicher Radikalstruktur

Zuerst werden nun die Signalstärken von Proben mit gleicher Radikalstruktur verglichen. Dabei wird erwartet, dass sich gleiche Radikalstrukturen (g -Faktor und Hyperfeinkopplungen) in gleichen CIDNP-Intensitäten widerspiegeln. Auch wenn nicht alle Strukturparameter bestimmt werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass ähnliche (normierte) Magnetfeldabhängigkeiten zu ähnlichen Strukturparametern gehören. Sofern keine anderen Einflüsse die Polarisation ändern, sollten sich die CIDNP-Intensitäten im Rahmen der Messgenauigkeit nicht um mehr als 40% unterscheiden.

Glycin-Methionin und Methionin-Methionin (trans)

Neben dem sehr ähnlichen Verlauf der Magnetfeldabhängigkeiten (siehe Abschnitt 5.3.1), ist auch die Polarisation auf der Nebenproduktlinie NB-1 (vgl. Abbildung 5.25 links auf Seite 99) für GM und MM-trans gleich. Daher hat sich das Verzweigungsverhältnis von Primär- zu Seitenreaktion nicht verändert. Obwohl MM-trans doppelt so viele Met-Residuen wie GM besitzt, wird die gleiche Signalstärke gemessen, da die Polarisation nur von der erzeugten Radikalkonzentration, die hauptsächlich durch die Laserintensität bestimmt wird, abhängt.

Glycin-Methionin bzw. Glycin-Methylcystein und Methionin-Methylcystein (trans)

Da in Abschnitt 5.3.1 gezeigt wurde, dass die Radikalstruktur der beiden Seitenketten von MC-trans gleich derjenigen von GM (Met-Seitenkette: $S^{+\bullet}$ -Radikal) bzw. GC (Cys(Me)-Seitenkette: $(S\cdot O)^+$ -Radikal) ist, werden sich die Strukturparameter des Met-Residuums in MC-trans nicht stark von denen in GM oder MM-trans bzw. des Cys(Me)-Residuums von denen in GC unterscheiden. Allerdings zeigen die δ -Protonen der Met-Seitenkette (δ^M) von MC-trans ein um etwa einen Faktor zwei kleineres CIDNP-Signal als diejenigen des MM-trans bzw. GM. Ursache dafür ist, dass sich die Polarisation bei MC trans auf zwei unterschiedliche Seitenketten aufteilt, die beide unabhängig voneinander polarisiert werden

können. Die beobachteten Intensitäten verringern sich daher, weil der Triplettzustand des Farbstoffes durch zwei konkurrierende Reaktionen gelöscht wird. Aus dem beobachteten Unterschied kann nun auf eine annähernd gleiche Reaktionswahrscheinlichkeit des Farbstoffes mit dem Met- bzw. Cys(Me)-Residuum geschlossen werden. Da nur GM im Gegensatz zu GC Nebenprodukte zeigt (vgl. Abbildung 5.20 auf Seite 94 und Abbildung 5.30 auf Seite 109), stützt die Halbierung der Polarisierung der Nebenprodukte von MC-trans im Vergleich zu GM diese Annahme weiter.

Der gleiche Effekt wird auch für die CIDNP-Signalstärken der γ^{C} -Protonen des MC-trans erwartet, tatsächlich erfolgt aber eine Verringerung der Signalstärke um einen Faktor 7. Dieser Unterschied kann weder durch eine veränderte Radikalstruktur (da gleiche Feldabhängigkeiten) noch ein anderes Verzweigungsverhältnis von Primär- zu Seitenreaktion (da keine entsprechend verstärkten Nebenproduktlinien sichtbar) vollständig erklärt werden. Da beide Residuen gute Elektronendonatoren und prinzipiell in der Lage sind, Polarisierung zu erzeugen, sind Wechselwirkungen ungepaarter Elektronen eines durch Kontakt mit zwei Farbstoffmolekülen entstandenen Biradikals oder ein schneller intramolekularer Elektronentransfer zwischen den Residuen denkbar. Der erste Effekt ist jedoch nur möglich, wenn beide Seitenketten in getrennten Radikalpaarreaktion mit zwei unterschiedlichen Farbstoffmolekülen im Triplettzustand reagieren. Da die Triplettkonzentration etwa 10^{-5} M und die Konzentration des Peptides etwa 10^{-3} M beträgt, ist dieser Fall auf der Zeitskala der Bildung der Geminate-Paare (vgl. Kapitel 2.1.6) im Rahmen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses vernachlässigbar.

Für einen angenommenen intramolekularen Elektronentransfer müsste der Übergang von der Met- zur Cys(Me)-Seitenkette stattfinden, da die Signalstärke für letztere geringer als erwartet ist. Dies würde bedeuten, dass die Escape-Paare des Cys(Me)-Residuums mit ihrer emissiven Kernspinpolarisation in den Grundzustand gebracht werden und damit das absorptive Signal der Geminate-Paare schwächen. Im Falle einer hohen Transferrate wird somit bereits das Spektrum der Geminate-Paare beeinflusst. Unter Beachtung der Dauer des Nachweispulses von $1 \mu\text{s}$ Länge ist dafür eine Rate $k_{\text{IET}} > 10^6 \text{ s}^{-1}$ notwendig (vergleiche auch [75]). Bei einer Rate von $k_{\text{IET}} = 1,2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ wird in [75] an dem System Tryptophan-Tyrosin ein mindestens um den Faktor drei vermindertes Signal beobachtet, wobei der Effekt für das untersuchte MC-trans in einer ähnlichen Größenordnung liegen sollte. Falls ein intramolekularer Elektronentransfer von Met zu Cys(Me) stattfindet, besitzt das neu entstandene Radikal der Met-Seitenkette keine bevorzugte Kernspinorientierung und damit kein CIDNP-Signal, da es an keiner Radikalpaarreaktion beteiligt war. In den bimolekularen Folgereaktionen des Radikals mit den verbleibenden Farbstoffradikalen wird allerdings durch Bildung der F-Paare auf der μs -Zeitskala wiederum Polarisierung erzeugt, welche für den stationären Zustand zu einer Erhöhung des CIDNP-Signals der Met-Linien führt. In dem hier vorliegenden Zeitbereich ist dieser Einfluss aber noch sehr gering, so dass keine zusätzliche Polarisierung auf dem Met zu erwarten ist. Daher könnte der beobachtete Un-

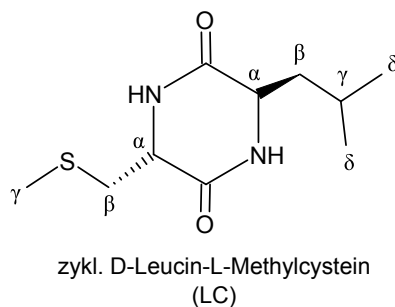


Abbildung 5.50: Struktur des zyklischen Dipeptides *D*-Leucin-*S*-Methylcystein.

terschied durch einen schnellen intramolekularen Elektronentransfer erklärt werden. Zur Verifikation dieser Hypothese müsste eine detaillierte Analyse der CIDNP-Kinetik erfolgen. Da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei einer Messung bei 7 T aber sehr schlecht ist, war dies mit den zur Verfügung stehenden Mitteln jedoch nicht möglich. Allerdings ist zu vermuten, dass auf Grund der Magnetfeldabhängigkeit (vgl. Abbildung 5.38 auf Seite 121) eine Messung bei einem kleineren Magnetfeld ein akzeptables Signal-zu-Rausch-Verhältnis liefern würde und eine Überprüfung dieser Theorie erlaubt.

Um trotz der experimentellen Einschränkungen abschätzen zu können, ob intramolekularer Elektronentransfer eine Rolle spielt oder allein das Volumen des zweiten Residuums den beobachteten Unterschied zwischen GC und MC-trans verursacht, wurden zusätzlich Untersuchungen mit *D*-Leucin-*S*-Methylcystein (LC) durchgeführt (siehe nächster Abschnitt). Die dabei gewonnenen Ergebnisse stützen die These eines intramolekularen Elektronentransfers.

CIDNP-Untersuchungen des zyklischen Dipeptids Leucin-*S*-Methylcystein (trans)

Bei *D*-Leucin-*S*-Methylcystein (LC) handelt es sich um ein zyklisches Dipeptid, dessen zweite Seitenkette (Leucin) keinerlei CIDNP-Aktivität zeigt, aber ein ähnliches Volumen wie das damit ersetzte Met aufweist. Nun kann die Polarisation auf der Cys(Me)-Seitenkette isoliert untersucht werden. Weil sich die NMR-Spektren der Cys(Me)-Seitenkette von GC und LC kaum unterscheiden, kann von derselben Vorzugskonformation im diamagnetischen Molekül, einer Faltung der Seitenkette über den Ring (siehe Abschnitt 5.2.2), ausgegangen werden. Das CIDNP-Spektrum der Geminat-Paare (Abbildung 5.51) zeigt das gleiche Polarisationsmuster wie bei GC (γ - und β_1 Protonen), so dass auch hier die Bildung eines $(S \cdot O)^+$ -Radikals höchstwahrscheinlich ist. Die aus dem CIDNP-Spektrum ermittelten absoluten Hyperfeinkopplungen ($a_{\beta_1} = (1,4 \pm 0,4)$ mT; $a_{\beta_2} = (0,2 \pm 0,2)$ mT; $a_\gamma = (0,9 \pm 0,2)$ mT) sind nur für die γ -Protonen etwas kleiner als bei GC ($a_\gamma^{GC} = (1,1 \pm 0,2)$ mT). Das heißt, dass sich durch die Konformationsänderung des Peptidgerüsts nur die Spindichteverteilung des ungepaarten Elektrons auf den γ -Protonen leicht ändert. Das stützt die obige Annahme ähnlicher Strukturparameter bei MC-trans.

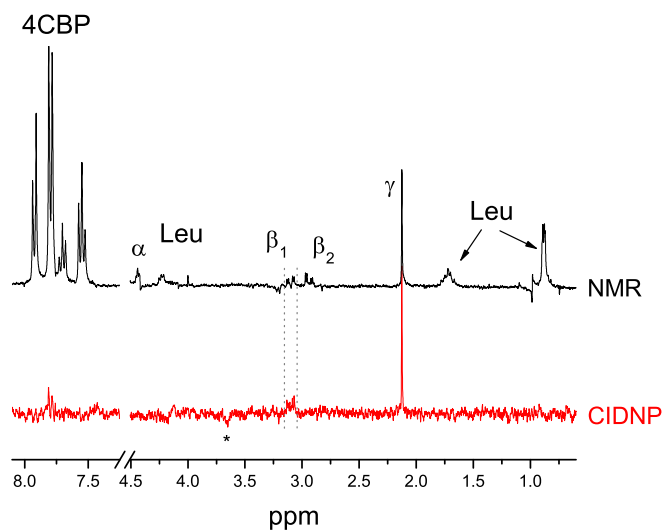


Abbildung 5.51: NMR-Spektrum (schwarz) und CIDNP-Spektrum bei $t = 0,5 \mu\text{s}$ (rot) von 1 mM LC mit 5 mM 4CBP (420 Akkumulationen) in deuteriertem Wasser bei pH 7,1. Das Symbol „*“ markiert die Nebenprodukte.

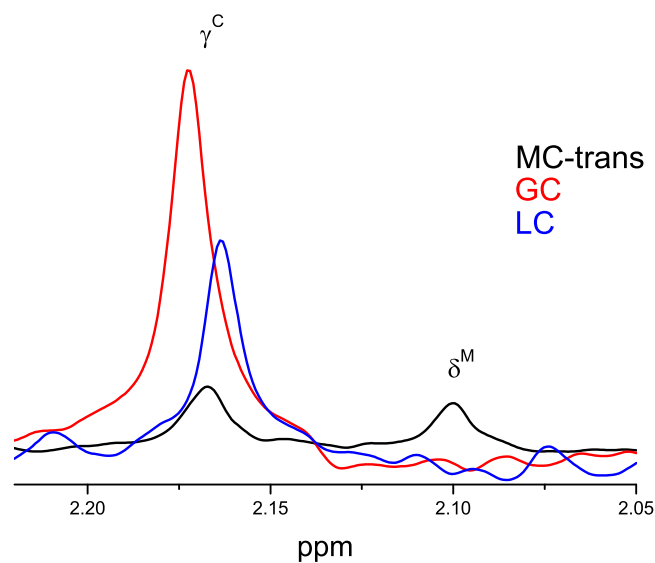


Abbildung 5.52: CIDNP-Spektren $t = 0,5 \mu\text{s}$ nach der Laseranregung für GC (rot), MC-trans (schwarz) und LC (blau) (jeweils auf 120 Akkumulationen normiert). Die Messungen wurde mit jeweils 1 mM Dipeptid und 5 mM 4CBP in neutraler Lösung durchgeführt. Der Ausschnitt zeigt zum besseren Vergleich der absoluten CIDNP-Intensitäten nur die CH_3 -Linien.

Die um einen Faktor 1,7 geringere Amplitude der γ -Protonen von LC gegenüber GC ist damit nicht allein durch die Verringerung der Hyperfeinkopplung auf der γ -Position erklärbar (vgl. Abbildung 5.52). Da aber im Falle des GC keine Polarisation auf Linien eines Nebenproduktes auftaucht, während für LC eine entsprechende Polarisation zu beobachten ist, wird auch das verringerte Verzweigungsverhältnis von Primär- zu Seitenreaktion die Signalstärke der LC-Linien leicht reduzieren. Im Zusammenspiel dieser beiden Effekte können die beobachteten Differenzen verstanden werden.

Beim Vergleich der aufgenommenen CIDNP-Spektren von LC und MC-trans fällt sofort das um einen Faktor vier größere Signal des LC auf. Weil die Volumina der Seitenketten Met und Leucin ähnlich sind, bedeutet dies, dass im Falle von MC-trans intramolekularer Elektronentransfer von der Met- zur Cys(Me)-Seitenkette sehr wahrscheinlich einen starken Einfluss auf die Verringerung der Polarisation γ^C -Protonen hat.

Dipeptide mit zwei thioetherenthaltenden Aminosäuren in cis-Konformation

Die drei untersuchten Dipeptide in cis-Konformation (MM-cis, MC-cis und CC-cis) bilden alle ein (S : S)⁺-Radikal, was zu einer vergleichbaren Polarisation der CH₃-Linien auf allen drei Peptiden führt. Dabei ist zu beachten, dass bei MC-cis die Summe der Polarisation auf beiden CH₃-Gruppen (δ^M - und γ^C -Protonen) berücksichtigt werden muss, da die Polarisation beider Seitenketten im Gegensatz zu den MM-cis und CC-cis nicht in einer Linie zusammenfällt. Die Ähnlichkeiten treten trotz des unterschiedlichen Verzweigungsverhältnisses von Primär- und Seitenreaktion auf, so dass der Einfluss letzterer im Rahmen der hier betrachteten Fehlertoleranz gering sein muss.

5.4.3 Ergebnisse bei unterschiedlicher Radikalstruktur

Dipeptide mit unterschiedlichen Seitenkettenlängen

Die Polarisation in GC ist etwa einen Faktor vier größer als in GM. Die Verkürzung der Seitenkette führt demnach zu einer signifikanten Erhöhung des Signals. Da beide Moleküle sowohl unterschiedliche Radikale bilden, als auch das Verzweigungsverhältnis von Primär- zu Seitenreaktion unterschiedlich ist, sind Differenzen nicht erstaunlich. Allerdings ist der Einfluss der Radikalstruktur vermutlich gering, da sich die absoluten Hyperfeinkopplungen bei einem erwarteten g -Faktor für GM von $g_{GM} \approx 2,010$ ($a_{\gamma}^{GM} = 1,1$ mT; $a_{\delta}^{GM} = 1,0$ mT; $a_{\gamma}^{GC} = 1,1 \pm 0,2$ mT; $a_{\beta}^{GC} = 0,8 \pm 0,3$ mT) nur wenig unterscheiden. Die dadurch verursachte Differenz in der Polarisation wird bei 7 T nur mit etwa 20% abgeschätzt. Einen Unterschied von einem Faktor vier in den Signalstärken bedeutet für GM eine Hyperfeinkopplung von $a_{\delta}^{GM} < 3,0$ mT oder einem g -Faktor kleiner 2,0060. Dies ist nicht zu erwarten, da bekannte g -Faktoren schwefelzentrierter Kationradikale im Bereich $g_{S\bullet+} \approx 2,010$ liegen [110, 111, 79]. Nachdem bereits bei den Peptiden in cis-Konformation festgestellt wurde, dass auftretende

Seitenreaktionen keinen ausreichenden Einfluss auf die CIDNP-Signalstärke haben, ist es auf Grund der chemischen Ähnlichkeit realistisch, dies auch für den hier vorliegenden Fall anzunehmen. Damit sollte der beobachtete Unterschied in der Signalstärke durch ein verändertes Verzweigungsverhältnis zwischen solchen Rückreaktionen in den diamagnetischen Grundzustand, welche von den Hyperfeinwechselwirkung abhängen, und solchen, bei denen dies nicht der Fall ist, verursacht werden. Eine weiterreichende Analyse dieses Effektes ist mit den Mitteln der hier verwendeten CIDNP-Spektroskopie nicht möglich, aber mittels anderer Methoden (z.B. Optik) könnten weitere Einsichten gewonnen werden.

Vergleich von cis- und trans-Stereoisomeren

Obwohl GC und CC-cis eine unterschiedliche Radikalstruktur $((S\cdot O)^+$ bzw. $(S\cdot S)^+$) aufweisen, ist die CIDNP-Intensität auf den γ -Protonen ähnlich (für GC etwas kleiner als für CC-cis). Dies lässt sich aus dem Vergleich der Simulation der Magnetfeldabhängigkeit (Abbildung 5.31 auf Seite 110 und Abbildung 5.44 mitte rechts auf Seite 129) verstehen. Da für beide Substanzen g -Faktoren und Hyperfeinkopplungen bestimmt werden konnten, lassen sich die Ergebnisse der Simulation bei 7 T direkt vergleichen. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass zur Polarisation der γ -Linie bei CC-cis 6 Protonen mit $a_{\gamma}^{CC-cis} = (0,76 \pm 0,16)$ mT und bei GC nur 3 Protonen mit $a_{\gamma}^{GC} = (1,1 \pm 0,2)$ mT beitragen. Die aus dem Adrianmodell vorausgesagten Polarisationen der CH_3 -Linien sind für beide Substanzen fast gleich, wodurch sich auch die fast gleichen CIDNP-Signale ergeben. Hier existieren offenbar keine weiteren Gesamteinflüsse auf die Polarisation.

Im Gegensatz zum Vergleich von GC und CC-cis hat sich die CIDNP-Stärke für MM-cis im Vergleich zu MM-trans oder GM fast verfünffacht. Da die Polarisation auf der Nebenproduktlinie NB-1 für GM, MM-trans und MM-cis gleich ist, kann davon ausgegangen werden, dass sich das Verzweigungsverhältnis von Primär- zu Seitenreaktion nicht verändert hat. In diesem Fall scheinen die unterschiedlichen radikalischen Strukturen ($S^{+\bullet}$ -Radikal des MM-trans bzw. GM zum $(S\cdot S)^+$ -Radikal des MM-cis) zu unterschiedlichen CIDNP-Intensitäten zu führen. Da die erwarteten g -Faktoren sehr ähnlich sind ($g_{S^{+\bullet}} = 2,01012$ [42, 79], $g_{S\cdot S} = 2,013 \pm 0,002$ siehe Abschnitt 5.3.2), können die Unterschiede in den Magnetfeldabhängigkeiten (Abbildung 5.38 und 5.44 jeweils oben rechts auf Seite 121 bzw. 129) und damit in den Strukturen aber keinen Faktor fünf in der CIDNP-Intensität erklären, so dass zusätzlich noch eine andere Ursache existieren muss.

Damit bleibt ebenso wie im Falle des Vergleichs von GM und GC als Erklärung des Unterschiedes nur ein verändertes Verzweigungsverhältnis der Rückreaktion in den diamagnetischen Grundzustand übrig, wobei im Rahmen dieser Arbeit keine genaueren Aussagen möglich sind.

5.4.4 Abschließende Bemerkungen

In Tabelle 5.17 ist eine Übersicht über den Vergleich der verschiedenen Radikale in ihrer Struktur, Menge der Seitenprodukte und der absoluten CIDNP-Intensität dargestellt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die vollständig auf dem Schwefel zentrierten Radikale ($S^{+\bullet}$ -Radikale) dazu neigen, ein schwaches CIDNP-Signal zu zeigen, während eine Verkürzung der Seitenkette oder eine $(S \cdot S)^+$ -Bindung zu höherer Polarisierung führt.

Weiterhin können auch kleine Änderungen in der Konformation des Peptidgerüsts Einfluss auf die Strukturparameter des Radikals haben, welche sich dann in den CIDNP-Intensitäten widerspiegeln. Allerdings können die Änderung in der Radikalstruktur nicht die großen Differenzen in den CIDNP-Signalstärken der Dipeptide erklären. Ursachen für diese Unterschiede sind intramolekularer Elektronentransfer zwischen Seitengruppen des Moleküls, wie er auch schon an den Systemen Tryptophan-Tyrosin [75] und Lysozym [51, 71] beobachtet wurde, sowie Änderung der Konformation (von der cis- zur trans-Form) der identischen Residuen. Damit hängen die absoluten CIDNP-Signalstärken von der Art der zweiten Aminosäure im Dipeptid sowie von der Konfiguration bzw. der Orientierung der beiden Seitenketten zueinander (cis- oder trans-Form) ab. Eine in einem Peptid verknüpfte Aminosäure kann sich sowohl in ihrer Radikalstruktur als auch in der Polarisationsbildung signifikant von der freien Aminosäure unterscheiden.

Obwohl hier nur Dipeptide untersucht wurden, können dieselben Einflüsse auch im Hinblick auf Proteine erwartet werden. Damit ist es nicht möglich, bei alleiniger Kenntnis der Radikalstruktur und Reaktionswahrscheinlichkeit der freien Aminosäure in Proteinen von der Signalstärke auf die quantitative Oberflächenlage der entsprechenden Seitenkette mit Hilfe der in der Einleitung dieses Kapitels vorgestellten Anwendung von CIDNP zu schließen, indem der Farbstoff als Sonde benutzt wird, um Informationen über Struktur der Oberfläche des Proteins zu erhalten. Änderungen der Umgebung einer Seitenkette, z.B. während Faltungsprozessen, können leicht fehlinterpretiert und fälschlicherweise einer Änderung der Oberflächenstruktur des Proteins zugeordnet werden. Insbesondere, wenn sich ein Schwefelradikal durch Bildung eines $(S \cdot S)^+$ -Radikals mit einem Schwefel aus seiner Nachbarschaft stabilisiert, ist diese Gefahr groß, da das Polarisationsmuster der CIDNP-Spektren sehr ähnlich ist.

Bevor die Methode für Met-Residuen an Proteinen angewendet werden kann, ist es daher notwendig, noch weitere systematische Studien an kleinen Peptiden durchzuführen, um weitere Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren, z.B. intramolekularen Elektronentransfer bei den CIDNP zeigenden Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Histidin, zu untersuchen.

Die Idee, quantitative Oberflächenlagen und damit Lösemittelerreichbarkeiten mittels der Analyse der Verhältnisse von CIDNP-Intensitäten zu ermitteln, erweist sich angesichts dieser Ergebnisse als schwierig umsetzbar. Trotzdem liefern die hier vorgestellten Studien

Vergleich der Radikale	Struktur	Seitenprodukte	Signalstärke
GM ^{+•} , MM-trans ^{+•}	+	+	+
GM ^{+•} , MC-trans ^{+•}	+	+	+
GC ^{+•} , MC-trans ^{+•}	+	+	-
GC ^{+•} , LC	+	+	+
cis-Peptide	+	-	+
GM ^{+•} , GC ^{+•}	-	-	-
GC ^{+•} , CC-cis ^{+•}	-	+	-
MM-cis ^{+•} , MM-trans ^{+•}	-	+	-

Tabelle 5.17: Vergleich der Radikalstruktur, Menge an Seitenprodukten und der absoluten CIDNP-Intensität. „+“ bedeutet, dass die jeweilige betrachtete Größe ähnlich ist, und „-“, dass ist signifikant unterschiedlich ist.

wertvolle Hinweise zur Radikalchemie und damit nicht zuletzt zu auftauchenden Strahlungsschäden in Proteinen.

5.5 Zusammenfassung

Ein generelles Ziel in der Biophysik ist es, Informationen über Proteinstrukturen und Radikalpaarreaktion von Biomolekülen zu erhalten. Dabei leisten CIDNP-Untersuchungen an frei diffundierenden Radikalpartnern (Farbstoff-Löscher-Radikalpaare) einen wertvollen Beitrag. Die Methode liefert dabei einerseits Informationen über Radikalreaktionen und Radikalstrukturen und andererseits Auskünfte über Oberflächenstrukturen. Letzteres basiert auf der Idee, dass die Lage des Residuums an der Oberfläche die Reaktionswahrscheinlichkeit mit dem Farbstoff beeinflusst, so dass die Signalstärke von der Geometrie der Oberfläche abhängt. Zunächst muss allerdings generell geprüft werden, welche anderen strukturellen Parameter in den Systemen einen Einfluss auf die Radikalpaarreaktionen und CIDNP-Intensität haben. Dafür ist es nötig, eine systematische Studie durchzuführen. Die generelle Idee ist, zunächst die freien Aminosäuren, dann Peptide, um den Einfluss der Wechselwirkung zwischen benachbarten Seitenketten zu erkunden, und schließlich langfristig Proteine, in denen die Polarisierung auch noch von der Oberflächenlage des Residuums abhängt, zu untersuchen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Studie auf sehr ähnliche Aminosäuren mit

Thioethergruppen und ihr Vorkommen in Dipeptiden eingeschränkt, um den Einfluss der Umgebung für schwefelzentrierte Radikale systematisch und im Detail zu untersuchen. Dabei erfolgte zuerst eine Analyse der Strukturen und Reaktionsverläufe kurzlebiger Radikale (Abschnitt 5.1, 5.2 und 5.3) und anschließend die Diskussion unterschiedlicher Einflüsse auf die absolute CIDNP-Signalstärke (Abschnitt 5.4). Insgesamt wurden dabei folgende Fragestellungen erörtert:

1. Welchen Einfluss hat die Veränderung der Kettenlänge zwischen Schwefelatom und Aminosäuregruppe bzw. Peptidgerüst?
2. Welche Veränderungen ergeben sich bei der Untersuchung dieser Aminosäuren in zyklischen Dipeptiden, wenn die zweite Aminosäure kein CIDNP-Signal zeigt?
3. Welchen Einfluss hat eine weitere thioetherhaltige Aminosäure im zyklischen Dipeptid in Abhängigkeit der Konformation der beiden Seitenketten zueinander?

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden Methionin und S-Methyl-L-Cystein, welche sich nur durch eine CH_2 -Gruppe zwischen Aminosäuregruppe und Schwefelatom unterscheiden (vgl. Struktur Abbildung 5.3 auf Seite 72), jeweils als freie Aminosäure sowie als Baustein im Dipeptid verglichen. Die dabei verwendeten zyklischen Dipeptide stellen auf Grund der fehlenden Endgruppen ein einfaches Modellsystem für zwei Aminosäuren innerhalb einer Proteinkette dar. Sie besitzen zusätzlich den Vorteil, dass eine direkte Wechselwirkung zwischen diesen möglich ist, wenn die Seitenketten in cis-Form vorliegen, während dies in trans-Form nicht realisierbar ist (Abschnitt 5.3).

In der primären Radikalpaarreaktion findet bei allen hier vermessenen Substanzen ein Elektronentransfer vom Schwefelatom aus einer der Seitenketten hin zum im elektronisch angeregten Triplettzustand vorliegenden Farbstoffmolekül statt. Da vollständig auf dem Schwefel zentrierte Kationradikale ($\text{S}^{\bullet+}$) allerdings dazu neigen, sich durch Bildung einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit Hilfe freier Elektronenpaare anderer Atome in ihrer Umgebung zu stabilisieren [82], bilden sich abhängig von der Nachbarschaft des Radikalzentrums unterschiedliche Radikale aus. Obwohl das Polarisationsmuster aller Substanzen sehr ähnlich aussieht, wobei immer nur die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen CIDNP zeigen, konnten drei verschiedene Radikaltypen beobachtet werden: $\text{S}^{\bullet+}$, $(\text{S} \cdot \text{O})^+$ und $(\text{S} \cdot \text{S})^+$.

Während sich Met in neutraler Lösung nicht intramolekular stabilisiert und das initial gebildete $\text{S}^{\bullet+}$ -Radikal beibehält, stabilisiert sich das Radikal in Cys(Me) durch eine $(\text{S} \cdot \text{O})^+$ -Bindung über die Bildung eines Fünferingsystems. Dies wird durch die Verkürzung der Seitenkette um eine CH_2 -Gruppe ermöglicht. In diesem Zusammenhang konnte erstmals gezeigt werden, dass eine signifikant unterschiedliche Polarisation der β -Protonen charakteristisch für das Vorliegen eines $(\text{S} \cdot \text{O})^+$ -Radikals ist. Dies hat seine Ursache in der unterschiedlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeit des ungepaarten Elektronenspins an den Kernorten der β -Protonen. Zudem war es möglich, den g -Faktor mit $g_{\text{S} \cdot \text{O}} = 2,0086 \pm 0,0011$

an dem System GC zu bestimmen, welcher damit kleiner als für vollständig auf dem Schwefel zentrierte Radikale ($g = 2,1012$ [42]) ist.

Auch in basischer Lösung führt die Verkürzung der Seitenkette zu unterschiedlichen Radikalen: Während bei der Reaktion mit Methionin sowohl ein stickstoffzentriertes Kationradikal (lineares $N^{\bullet+}$ -Radikal) als auch eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung des Schwefels mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs (zyklisches $(S \cdot N)^+$ -Radikal) gebildet wird [73, 24], liegt für Cys(Me) immer ein $(S \cdot O)^+$ -Radikal vor. Die verminderte Distanz des Schwefelatoms zur Aminogruppe führt offenbar dazu, dass nur der Schwefel als Elektrendonator dienen kann.

Einheitlich lässt sich feststellen, dass die Radikalstruktur der zyklischen Peptide nicht abhängig vom pH-Wert (im Bereich pH 2,2 bis pH 12,6) ist. Für eine Met- oder Cys(Me)-Seitenkette wird auch in zyklischer Anordnung jeweils dasselbe Radikal wie bei der entsprechenden freien Aminosäure in neutraler Lösung ($S^{\bullet+}$ bzw. $(S \cdot O)^+$ -Radikal) gebildet, solange die zweite Seitenkette nicht ebenfalls ein reaktives Schwefelatom enthält. Außerdem ist die Radikalstruktur von Met und Cys(Me) in zyklischen Dipeptiden ebenfalls unabhängig von Art und Volumen des zweiten Residuums, wenn sich die beiden Seitenketten in trans-Konformation befinden. Eine direkte Wechselwirkung mit eventuell vorhandenen Schwefelzentren der zweiten Aminosäure ist unter diesen Bedingungen sterisch nicht möglich.

Im Falle der cis-Form eines zyklischen Dipeptides, bei dem beide Seitenketten ein Schwefelatom enthalten, wird dagegen ein gemeinsames Radikal über beide Residuen durch Ausbildung einer $(S \cdot S)^+$ -Bindung beobachtet. Dies tritt auch auf, wenn die beiden Aminosäuren unterschiedliche Kettenlängen haben (Cys(Me), Met). Insgesamt bedeutet dies, dass eine Stabilisierung über ein zweites Schwefelatom energetisch günstiger als eine Stabilisierung durch die Bindung eines Sauerstoffatoms ist. Im Gegensatz zu einer $(S \cdot O)^+$ -Bindung besitzen die β -Protonen des Cys(Me)-Residuums im Falle einer $(S \cdot S)^+$ -Bindung ähnliche Hyperfeinkopplungen, weshalb sich die CIDNP-Spektren beider Radikale deutlich unterscheiden. Weiterhin führt die Ausbildung eines $(S \cdot S)^+$ -Radikals zu einer signifikanten Verringerung der Kernspinrelaxationsrate im radikalischen Zustand. Für $(S \cdot S)^+$ -Radikale konnte der g -Faktor an dem System CC-cis mit $g_{S \cdot S} = 2,013 \pm 0,002$ abgeschätzt werden. Dieser Wert ist etwas größer als für vollständig auf dem Schwefel zentrierte Radikale [42].

Der Vergleich des zyklischen Glycin-Methionin mit den entsprechenden linearen Peptiden Glycin-Methionin und Methionin-Glycin [42] zeigte, dass in neutraler Lösung alle ein $S^{\bullet+}$ -Radikal bilden. Allerdings konnte in basischer Lösung auf Grund der Protonierung der Endgruppe des Ammoniumions eine $S \cdot N$ -Bindung für Methionin und lineares Methionin-Glycin, bei denen sich die Methioninseitenkette direkt am N-Terminus befindet, beobachtet werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch kleine Änderungen in der Konformation des Peptidgerüsts einen Einfluss auf die Spindichteverteilung des ungepaarten Elektrons

haben, was zu unterschiedlichen Hyperfeinkopplungskonstanten führt (vgl. Tabelle 5.19). Zur besseren Übersicht sind die gebildeten Radikalstrukturen aller vermessenen Substanzen in neutraler Lösung sowie die strukturbestimmenden Parameter in Tabelle 5.18 und 5.19 dargestellt und die aus der Kinetik bestimmten Parameter in Tabelle 5.20 aufgelistet. Zusammenfassend kann festgehalten werden: Die Existenz und räumliche Erreichbarkeit möglicher Bindungspartner, für die eine direkte Wechselwirkung realisierbar ist, bestimmt die tatsächlich auftretende Form des Radikals.

Durch die Untersuchungen an Beispielsystemen einfacher Dipeptide konnte gezeigt werden, dass Konformationsänderungen, Konstitutionsänderung (von der cis- zur trans-Form) oder intramolekularer Elektronentransfer die CIDNP-Intensitäten verändern, so dass die nähere Umgebung des Radikals einen signifikanten Einfluss auf die beobachteten Signalstärken hat. Demnach genügt die alleinige Kenntnis der Radikalstruktur und Reaktionswahrscheinlichkeit der freien Aminosäure nicht, um aus der vermessenen Polarisation einer Aminosäure auf die Oberflächenlage innerhalb des Proteins schließen zu können. Dies gilt zumindest für Thioethergruppen enthaltende Aminosäuren. Für andere Aminosäuren, bei denen keine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung auftritt und intramolekularer Elektronentransfer auf der Mikrosekundenskala keine Rolle spielt, muss genauso in Studien geklärt werden, welche strukturellen Parameter die gebildete Polarisation beeinflussen. Vorerst sollte der Schwerpunkt der Methode deshalb auf die Untersuchung von Radikalstrukturen und -reaktion gelegt werden. Wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, ist es mit Hilfe von CIDNP möglich, Hyperfeinkopplungskonstanten und g -Faktoren kurzlebiger Radikalpaare zu bestimmen. Ferner hängen diese strukturellen Parameter von der Umgebung des gebildeten Radikals ab.

Radikal	Struktur	B_{\max}/T	g -Faktor	a/mT
Cys(Me) ^{+•}	(S.:O) ⁺	0,85	$g = 2,0086 \pm 0,0011$	$a_{\gamma} = 1,11 \pm 0,18$ $a_{\beta_1} = 1,4 \pm 0,3$ $a_{\beta_2} < 0,4$
GM ^{+•}	S ^{+•}	0,60		
GC ^{+•}	(S.:O) ⁺	0,87		
LC ^{+•}	(S.:O) ⁺			
MM-trans ^{+•}	S ^{+•}	0,63		
MC-trans ^{+•}	S ^{+•} und	0,63		
	(S.:O) ⁺	0,81		
MM-cis ^{+•}	(S.:S) ⁺	0,46		
MC-cis ^{+•}	(S.:S) ⁺	0,44		
CC-cis ^{+•}	(S.:S) ⁺	0,46		

Tabelle 5.18: Zusammenfassung der Radikalstrukturen, des Magnetfeldes bei maximaler CIDNP-Intensität B_{\max} und der bestimmten g -Faktoren und absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten a .

Radikal	$a_{\delta M}^{\text{rel}}$	$a_{\gamma M}^{\text{rel}}$	$a_{\gamma C}^{\text{rel}}$	$a_{\beta_1 C}^{\text{rel}}$	$a_{\beta_2 C}^{\text{rel}}$
Cys(Me) ^{+•}			1,00 ± 0,02	0,48 ± 0,08	1,21 ± 0,08
GM ^{+•}	1,00 ± 0,04	1,09 ± 0,13			
GC ^{+•}			1,00 ± 0,04	1,25 ± 0,19	< 0,4
LC ^{+•}			1,00 ± 0,05	1,47 ± 0,24	< 0,4
MM-trans ^{+•}	1,00 ± 0,04	1,17 ± 0,13			
MC-trans ^{+•}	1,00 ± 0,07	1,0 ± 0,5	1,15 ± 0,07	0,91 ± 0,45	< 0,6
MM-cis ^{+•}	1,00 ± 0,04	1,33 ± 0,08			
MC-cis ^{+•}	1,00 ± 0,03	1,64 ± 0,16	1,02 ± 0,03	0,94 ± 0,27	0,76 ± 0,27
CC-cis ^{+•}			1,00 ± 0,04	1,34 ± 0,17	0,92 ± 0,18

Tabelle 5.19: In diesem Kapitel bestimmte relative Hyperfeinkopplungskonstanten (auf die CH₃-Gruppe normiert). Die Liniengruppen des Met-Residuums sind mit dem Index „M“ und die des Cys(Me)-Residuums mit dem Index „C“ gekennzeichnet.

Radikal	$k_{\text{ex}}/\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$	$k_{\text{para}}/\text{s}^{-1}$
GM ^{+•}	$(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$(1,6 \pm 0,8) \cdot 10^4$
GC ^{+•}	$(2,9 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(3,1 \pm 0,9) \cdot 10^4$
MM-trans ^{+•}	$(3,6 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(4,1 \pm 1,8) \cdot 10^4$
MM-cis ^{+•}	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$< 6 \cdot 10^3$
MC-cis ^{+•} (Met)	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$(1,4 \pm 0,8) \cdot 10^4$
MC-cis ^{+•} (Cys(Me))	$(2,6 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$(7 \pm 6) \cdot 10^3$
CC-cis ^{+•}	$(3,9 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$< 1 \cdot 10^3$

Tabelle 5.20: Raten des degenerierten Elektronenaustausches k_{ex} und der longitudinalen Relaxation der Kernspins der CH₃-Protonen im radikalischen Zustand k_{para} (für MC-cis wurden die Werte für die beiden unterschiedlichen Seitenketten Met und Cys(Me) getrennt aufgelistet).

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Photo-CIDNP-Untersuchungen an frei diffundierenden Systemen, sogenannten Farbstoff-Löscher-Radikalpaaren, in wässriger Lösung durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine spezielle Methode der Kernspinresonanz (NMR), bei welcher ausgenutzt wird, dass es im Verlauf von Radikalpaarreaktionen zu einer nicht-thermischen Kernspinpolarisation und damit zu einer Veränderung der beobachteten NMR-Signalstärke kommen kann. Die CIDNP-Spektroskopie ist damit hervorragend geeignet, um insbesondere kurzlebige Radikale zu untersuchen, und besitzt gegenüber anderen spektroskopischen Methoden, welche ebenfalls in der Lage sind, radikalische Zustände zu vermessen (Elektronenspinresonanz- oder optische Spektroskopie), den Vorteil einer hohen spektralen Auflösung und der Möglichkeit der direkten Zuordnung auftretender Hyperfeinkopplungskonstanten zu bestimmten Kernpositionen.

Ein Ziel der gegenwärtigen Entwicklung der CIDNP-Spektroskopie besteht dabei in der Anwendung dieser Methode auf komplexe biologische Systeme, wie zum Beispiel Proteine oder Nukleinsäuren. In diesem Zusammenhang werden im Allgemeinen zwei Ansätze verfolgt: Zum einen können in der Natur vorkommende Radikale in Struktur und Dynamik untersucht und charakterisiert werden. Zum anderen folgt aus einer Idee von Kaptein, nach welcher nur oberflächenexponierte Aminosäuren einer Sequenz durch die Löschung eines im Lösemittel befindlichen und angeregten Farbstoffes CIDNP-Polarisation erzeugen können, dass aus der vermessenen Signalstärke auf die Lage der Seitenkette innerhalb der Proteingeometrie geschlossen werden kann. Mit der damit erhaltenen Information über die Proteinoberfläche ist es demzufolge möglich zur Strukturaufklärung des Makromoleküls beizutragen. Für jeden dieser beiden Bereiche ist es jedoch notwendig, zunächst in systematischen Studien zu überprüfen, welche experimentellen und strukturellen Parameter einen Einfluss auf die ausgebildete Kernspinpolarisation haben.

Die vorliegende Dissertation beschäftigte sich mit dieser Fragestellung, indem Unterschiede in Radikalstrukturen, Reaktionswegen und CIDNP-Signalstärken bei verschiedenen Dipeptiden mit thioetherhaltigen Aminosäuren analysiert wurden. Zusätzlich konnte im Rahmen der Arbeit das Anwendungsgebiet der CIDNP-Spektroskopie erweitert werden: Auf Grund des komplexen Zusammenhangs zwischen Polarisation und den magnetischen

Parametern war es bisher nur möglich, Hyperfeinkopplungskonstanten durch komplizierte Simulationen mit einer großen Anzahl Anpassungsparameter zu ermitteln. Hier konnte sowohl theoretisch gezeigt, als auch experimentell bestätigt werden, dass unter sehr allgemeinen Bedingungen das CIDNP-Signal eines Kernes proportional zu seiner Hyperfeinkopplungskonstanten ist. Dadurch ist es leicht realisierbar, aus der Kenntnis der magnetischen Eigenschaften eines der beiden Radikalpaarpartner die absoluten Hyperfeinkopplungskonstanten des anderen Radikals zu bestimmen. Dieser Befund wurde zuerst durch miteinander konsistente Messungen eines Testsystems mit bekannten Eigenschaften (L-Tyrosin mit Benzophenon) an unterschiedlichen Spektrometern verifiziert und anschließend auf Systeme mit unbekanntem oder nur ungenau bekannten Kopplungswerten erweitert. Dabei wurden die Hyperfeinkopplungskonstanten für das kationische Tryptophanradikal, das Ketylradikal von Tetracarboxybenzophenon und das Radikalanion sowie das Ketylradikal von 4-Carboxybenzophenon bestimmt.

Sofern sichergestellt ist, dass in dem untersuchten System die Primärreaktion von parallelen Reaktion und Folgeprozessen, welche die vermessene Signalintensität beeinflussen, separiert werden kann, ergibt sich somit ein einfacher Weg zur Bestimmung relativer und absoluter Hyperfeinkopplungskonstanten. Dabei existieren, trotz der indirekten Beobachtung der Radikaleigenschaften mittels NMR-Methoden, gegenüber Standard-ESR-Untersuchungen deutliche Vorteile. So ist aus den Messergebnissen einerseits sofort ersichtlich, welcher Kern mit welcher Stärke koppelt, und andererseits lässt sich auch das sonst nur sehr schwierig bestimmbare Vorzeichen der Hyperfeinkopplungskonstanten leicht ermitteln.

Zusammen mit der Variation des Magnetfeldes während der Experimente ergibt sich daraus die Möglichkeit, allein mittels CIDNP-Untersuchungen die magnetischen Parameter (Hyperfeinkopplungskonstanten und g -Faktoren) von Radikalen zu bestimmen, was in der vorliegenden Arbeit erstmals realisiert wurde. Darüber hinaus war es möglich, die primäre Reaktion von auftretenden Folgereaktionen spektroskopisch zu trennen, indem die Zeitabhängigkeit der Polarisation verfolgt wurde. Dadurch können Informationen über den vorliegenden Reaktionsmechanismus sowie den Reaktionspfad erhalten werden.

Die vorgestellten Experimente konzentrieren sich im Wesentlichen auf Untersuchungen an den beiden chemisch sehr ähnlichen, thioetherhaltigen Aminosäuren Methionin und S-Methyl-Cystein. Dabei wurden die freien Säuren und verschiedene aus ihnen aufgebaute zyklische Dipeptide, welche einfache Modellsysteme für den inneren Bereich einer Proteinsequenz darstellen, vermessen.

Für alle hier untersuchten Substanzen wurde Elektronentransfer vom Schwefelatom zum sich im Triplettzustand befindenden Farbstoffmolekül beobachtet. Trotz des gleichen Reaktionsmechanismus der Radikalpaarreaktionen sowie des sehr ähnlichen Polarisationsmusters, bei welchem nur die Protonen an den zum Schwefel benachbarten Kohlenstoffatomen CIDNP zeigen, konnten unterschiedliche Radikaltypen ermittelt werden. Die Ursache dafür

liegt in der Neigung schwefelzentrierter Kationradikale, sich durch Bildung einer „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung mit Hilfe freier Elektronenpaare anderer Atome in der Umgebung zu stabilisieren [82]. Daher spielt die direkte Nachbarschaft des Radikalzentrums bei der Ausbildung der Radikalstruktur eine entscheidende Rolle.

So führt eine Verkürzung der Seitenkette zwischen Schwefelatom und Aminosäuregruppe bzw. Peptidgerüst dazu, dass statt des vollständig auf dem Schwefel zentrierten Radikals des Methionins ($S^{\bullet+}$) eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zwischen dem Schwefel- und dem Sauerstoffatom ($(S \cdot O)^+$) unter Bildung eines Fünfferringsystems entsteht. Weiterhin konnte bei Dipeptiden mit zwei schwefelhaltigen Aminosäuren beobachtet werden, dass ein intramolekulares $(S \cdot S)^+$ -Radikal (eine „2-Zentren-3-Elektronen“-Bindung zwischen den beiden Schwefelatomen) gebildet wird, sofern dies sterisch erlaubt ist. Für diese beiden Radikaltypen war es erstmals möglich, die magnetischen Strukturparameter zu bestimmen.

Der Vergleich der Ergebnisse der zyklischen mit denjenigen der entsprechenden linearen Peptide [42] zeigte dabei, dass in letzterem Fall noch ein weiterer Effekt auftreten kann. Aufgrund der relativen Nähe der Peptidengruppen zu den Schwefelzentren erfolgt eine Stabilisierung des radikalischen Zustandes dann auch unter Bildung eines $(S \cdot N)^+$ -Radikals mit dem Stickstoff, sofern sich die Thioether enthaltende Seitenkette am N-Terminus des Peptides befindet. Insgesamt wird demnach in thioetherhaltigen Aminosäuren eine deutlich größere Bandbreite möglicher Radikalstrukturen ($S^{\bullet+}$, $(S \cdot O)^+$, $(S \cdot N)^+$, $S \cdot S^+$) ausgebildet, als dies bei anderen Peptiden (z.B. bei linearem Tryptophan-Tyrosin, in welchem die gleichen Strukturen, wie sie bei den jeweiligen freien Aminosäuren vorliegen [76, 51], auftreten,) der Fall ist.

Zusammenfassend ist demnach festzuhalten, dass nicht nur eine Wechselwirkung des Schwefelzentrums mit den Termini (wie bei Methionin und linearem Methionin-Glycin in basischen Lösungen [42]) und dem Peptidrückgrat, sondern auch Reaktionen zwischen räumlich benachbarten Seitenketten berücksichtigt werden müssen.

Da bereits beim Übergang von der einzelnen Aminosäure zum Dipeptid große Unterschiede beobachtet werden konnten, ist es sinnvoll und notwendig, die Studie zunächst auf weitere kleine Peptide auszuweiten, bevor Proteine untersucht werden. Dabei ist es notwendig zu prüfen, unter welchen Bedingungen die Stabilisierungen des Schwefelkations auch mit freien Elektronenpaaren eines Sauerstoff- oder Stickstoffatoms in weiteren Seitenketten stattfinden kann (z.B. Tyrosin, Tryptophan, Histidin, Glutamin, Serin, Asparagin). Auch hier würde es sich, aufgrund der relativen Einfachheit des Systems, anbieten, zunächst mit kleinen zyklischen Peptiden in cis-Konformation zu arbeiten. Wenn die Wechselwirkungen zwischen zwei Seitenketten verstanden sind, kann zur Untersuchung von Tripeptiden übergegangen werden, um zu analysieren, welche Auswirkung zwei benachbarte Seitenketten haben.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit (Kapitel 5.4) gezeigt werden, dass die Umgebung des Radikalzentrums nicht nur einen signifikanten Einfluss auf die Radikalstruktur,

sondern auch auf die CIDNP-Signalstärke hat: Obwohl es bereits möglich ist, mit Hilfe der zeitaufgelösten CIDNP die Primärreaktion von nachfolgenden Prozessen auf der Mikrosekundenzeitskala (z.B. Relaxation der Kernspins im paramagnetischen Zustand, degenerierter Elektronenaustausch) zu trennen, führten sowohl unterschiedliche Reaktivitäten bei unterschiedlichen Strukturen der Radikale, als auch intramolekularer Elektronentransfer zwischen den Seitenketten der Peptide, zu signifikant unterschiedlichen Intensitäten. Auch hier sind weitere systematische Variationen der betrachteten Systeme notwendig, um mehr Informationen über mögliche Ursachen zu erhalten. Die einfache Idee, von der Stärke des CIDNP-Effektes, bei alleiniger Kenntnis der radikalchemischen Parameter (Struktur und Reaktionswahrscheinlichkeit) der freien Aminosäuren, direkt auf die Oberflächenlage einzelner Seitenkette in Proteinen zu schließen, stellt sich auf Grund der vielen einfließenden Faktoren aus der Umgebung des Radikalzentrums als schwierig umsetzbar heraus (zumindest, wenn Elektronentransfer zwischen den Radikalpartnern stattfindet).

Deshalb wird vorgeschlagen, den zukünftigen Schwerpunkt der CIDNP-Spektroskopie auf die Charakterisierung von Radikalreaktionen (Reaktionsmechanismus, Radikalstrukturen) und deren Folgeprozessen in Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren zu legen. Dabei kann diese Methode ebenfalls dazu benutzt werden, um intramolekulare Elektronentransferprozesse, welche auch in Proteinen relevant sind, zu untersuchen, da die Messung der Zeitabhängigkeit des CIDNP-Signals eine Bestimmung der Transferrate erlaubt (gezeigt an Tryptophan-Tyrosin [76, 51]). Hier öffnet sich ein großes Feld für weiterführende Studien, indem Elektronentransferprozesse in Peptiden mit einer schwefelhaltigen Aminosäure und einer weiteren CIDNP-aktiven Aminosäure (Tyrosin, Tryptophan, Histidin) betrachtet werden. Erste vorläufige Messungen an dem Pentapeptid Met-Enkephalin (welches sowohl Methionin, als auch Tyrosin enthält) wurden bereits in Berlin durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass ein Elektron vom Methionin zum Tyrosin wandert.

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit wichtige Erkenntnisse bezüglich der Abhängigkeit des CIDNP-Effektes von strukturellen Eigenschaften der untersuchten Peptide. Dabei stellte sich heraus, dass CIDNP äußerst empfindlich auf Unterschiede in der vorliegenden Radikalstruktur und Radikalreaktion ist, und dass in den vorgestellten Prozessen selbst zwischen freien Aminosäuren und den entsprechenden Seitenketten in verhältnismäßig kleinen Systemen deutliche Unterschiede existieren.

Literaturverzeichnis

- [1] MOROZOVA, Olga B.; KIRYUTIN, Alexey S.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.: Electron Transfer between Guanosine Radicals and Amino Acids in Aqueous Solution. II. Reduction of Guanosine Radicals by Tryptophan. In: *Journal of Physical Chemistry B* 112 (2008), Nr. 9, S. 2747–2754
- [2] VOGT, Walther: Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. In: *Free Radical Biology & Medicine* 18 (1995), Nr. 1, S. 93–105
- [3] STADTMAN, Earl R.; VAN REMMEN, Holly; RICHARDSON, Arlan; WEHR, Nancy B.; LEVINE, Rodney L.: Methionine oxidation and aging. In: *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics* 1703 (2005), Nr. 2, S. 135–140
- [4] SCHÖNEICH, Christian: Redox Processes of Methionine Relevant to β -Amyloid Oxidation and Alzheimer's Disease. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397 (2002), Nr. 2, S. 370–376
- [5] SCHÖNEICH, Christian: Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. In: *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics* 1703 (2005), Nr. 2, S. 111–119
- [6] GLASER, Charles B.; YAMIN, Ghiam; UVERSKY, Vladimir N.; FINK, Anthony L.: Methionine oxidation, α -synuclein and Parkinson's disease. In: *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics* 1703 (2005), Nr. 2, S. 157–169
- [7] KAPTEIN, R.; DIJKSTRA, K.; NICOLAY, K.: Laser photo-CIDNP as a surface probe for proteins in solution. In: *Nature (London, United Kingdom)* 274 (1978), Nr. 5668, S. 293–4
- [8] FESSENDEN, Richard W.; SCHULER, Robert H.: Electron spin resonance studies of transient alkyl radicals. In: *Journal of Chemical Physics* 39 (1963), Nr. 9, S. 2147–95
- [9] BARGON, Joachim; FISCHER, Hanns; JOHNSEN, Uwe: Nuclear magnetic resonance emission lines during fast radical reactions. I. Recording methods and examples. In: *Zeitschrift für Naturforschung, Teil A: Astrophysik, Physik und Physikalische Chemie* 22 (1967), Nr. 10, S. 1551–5
- [10] WARD, Harold R.; LAWLER, Ronald G.: Nuclear magnetic resonance emission and enhanced absorption in rapid organometallic reactions. In: *Journal of the American Chemical Society* 89 (1967), Nr. 21, S. 5518–19

- [11] CLOSS, Gerhard L.; CLOSS, Liselotte E.: Induced dynamic nuclear spin polarization in photoreductions of benzophenone by toluene and ethylbenzene. In: *Journal of the American Chemical Society* 91 (1969), Nr. 16, S. 4550–2
- [12] CLOSS, Gerhard L.; TRIFUNAC, A. D.: Theory of chemically induced nuclear spin polarization. III. Effect of isotropic g shifts in the components of radical pairs with one hyperfine interaction. In: *Journal of the American Chemical Society* 92 (1970), Nr. 7, S. 2183–4
- [13] KAPTEIN, R.; OOSTERHOFF, Luitzen J.: Chemically induced dynamic nuclear polarization. II. Relation with anomalous ESR spectra. In: *Chemical Physics Letters* 4 (1969), Nr. 4, S. 195–7
- [14] KAPTEIN, R.; OOSTERHOFF, Luitzen J.: Chemically induced dynamic nuclear polarization. III. Anomalous multiplets of radical coupling and disproportionation products. In: *Chemical Physics Letters* 4 (1969), Nr. 4, S. 214–16
- [15] ADRIAN, Frank J.: Radical Pair Mechanism of Chemically Induced Magnetic Polarisation. In: MUUS, L. T. (Hrsg.); ATKINS, P. W. (Hrsg.); MCCLAUCHIAN, K. A. (Hrsg.); PEDERSEN, J. B. (Hrsg.): *Chemical Induced Magnetic Polarisation*. Dordrecht : D. Reidel, 1977, S. 77–105
- [16] FREED, Jack H.: Numerical Methods and Model Dependence in Chemically Induced Dynamic Spin Polarization. In: MUUS, L. T. (Hrsg.); ATKINS, P. W. (Hrsg.); MCCLAUCHIAN, K. A. (Hrsg.); PEDERSEN, J. B. (Hrsg.): *Chemical Induced Magnetic Polarisation*. Dordrecht : D. Reidel, 1977, S. 309–355
- [17] ADRIAN, Frank J.: Role of diffusion-controlled reaction in chemically induced nuclear-spin polarization. II. General theory and comparison with experiment. In: *Journal of Chemical Physics* 54 (1971), Nr. 9, S. 3912–17
- [18] PEDERSEN, J. B.: Effects of diffusion on reaction rates. In: *NATO Advanced Study Institutes Series, Series C: Mathematical and Physical Sciences* C34 (1977), Nr. Chem. Induced Magn. Polariz., S. 283–96
- [19] KAPTEIN, R.: Simple rules for chemically induced dynamic nuclear polarization. In: *Journal of the Chemical Society [Section] D: Chemical Communications* (1971), Nr. 14, S. 732–3
- [20] ZIENTARA, Gary P.; FREED, Jack H.: Theory of chemically-induced dynamic spin polarization. IV. Low-field effects. In: *Journal of Chemical Physics* 70 (1979), Nr. 3, S. 1359–70
- [21] KIRYUTIN, A. S.; IVANOV, K. L.; MOROZOVA, O. B.; YURKOVSKAYA, A. V.; VIETH, H. M.; PIROGOV, Yu A.; SAGDEEV, R. Z.: TR-CIDNP as tool for quantitative analysis of hyperfine couplings in elusive radicals. In: *Doklady Physical Chemistry* 428 (2009), Nr. 1, S. 183–188

- [22] HORE, P. J.; EGMOND, M. R.; EDZES, H. T.; KAPTEIN, R.: Cross-relaxation effects in the photo-CIDNP spectra of amino acids and proteins. In: *Journal of Magnetic Resonance (1969-1992)* 49 (1982), Nr. 1, S. 122–50
- [23] VOLLENWEIDER, Jean K.; FISCHER, Hanns; HENNIG, Jürgen; LEUSCHNER, Rainer: Time-resolved CIDNP in laser flash photolysis of aliphatic ketones. A quantitative analysis. In: *Chemical Physics* 97 (1985), Nr. 2-3, S. 217–34
- [24] MOROZOVA, Olga B.; KORCHAK, Sergey E.; SAGDEEV, Renad Z.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.: Time-Resolved Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization Studies of Structure and Reactivity of Methionine Radical Cations in Aqueous Solution as a Function of pH. In: *Journal of Physical Chemistry A* 109 (2005), Nr. 45, S. 10459–10466
- [25] TSENTALOVICH, Yuri P.; MOROZOVA, Olga B.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; HORE, P. J.: Kinetics and mechanism of the photochemical reaction of 2,2'-dipyridyl with tryptophan in water: Time-resolved CIDNP and laser flash photolysis study. In: *Journal of Physical Chemistry A* 103 (1999), Nr. 27, S. 5362–5368
- [26] YURKOVSKAYA, Alexandra V.; SNYTNIKOVA, Olga A.; MOROZOVA, Olga B.; TSENTALOVICH, Yuri P.; SAGDEEV, Renad Z.: Time-resolved CIDNP and laser flash photolysis study of the photoreaction between triplet 2,2'-dipyridyl and guanosine-5'-monophosphate in water. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 5 (2003), Nr. 17, S. 3653–3659
- [27] KIMMICH, Rainer; ANOARDO, Esteban: Field-cycling NMR relaxometry. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 44 (2004), Nr. 3-4, S. 257–320
- [28] FASANO, Mauro: Biological applications of relaxometry. In: *Chimica e l'Industria (Milan, Italy)* 83 (2001), Nr. 10, S. 89
- [29] BERTINI, Ivano; GUPTA, Yogesh K.; LUCHINAT, Claudio; PARIGI, Giacomo; SCHLÖRB, Christian; SCHWALBE, Harald: NMR spectroscopic detection of protein protons and longitudinal relaxation rates between 0.01 and 50 MHz. In: *Angewandte Chemie, International Edition* 44 (2005), Nr. 15, S. 2223–2225
- [30] LUCHINAT, Claudio; PARIGI, Giacomo: Collective Relaxation of Protein Protons at Very Low Magnetic Field: A New Window on Protein Dynamics and Aggregation. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), Nr. 5, S. 1055–1064
- [31] REDFIELD, A. G.: The theory of relaxation processes. 1 (1966), S. 1–32
- [32] KIRYUTIN, Alexey; IVANOV, Konstantin; YURKOVSKAYA, Alexandra; VIETH, Hans-Martin: High-resolution study of nuclear magnetic relaxation dispersion of purine nucleotides: Effects of spin-spin coupling. In: *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 34 (2008), Nr. 1-2, S. 142–149
- [33] IVANOV, Konstantin L.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; VIETH, Hans-Martin: Cohe-

- rent transfer of hyperpolarization in coupled spin systems at variable magnetic field. In: *Journal of Chemical Physics* 128 (2008), Nr. 15, S. 154701/1–154701/13
- [34] MIESEL, K.; IVANOV, K. L.; KÖCHLING, T.; YURKOVSKAYA, A. V.; VIETH, H. M.: Field-cycling effects on dynamic nuclear polarization. In: *Applied Magnetic Resonance* 34 (2008), Nr. 3-4, S. 423–437
- [35] GROSSE, S.; GUBAYDULLIN, F.; SCHEELKEN, H.; VIETH, H. M.; YURKOVSKAYA, A. V.: Field cycling by fast NMR probe transfer: design and application in field-dependent CIDNP experiments. In: *Applied Magnetic Resonance* 17 (1999), Nr. 2-3, S. 211–225
- [36] BRAUN, S.; KALINOWSKI, H.-O.; BERGER, S.: *100 and More Basic NMR Experiments*. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft, 1996
- [37] NOACK, F.: NMR field-cycling spectroscopy: principles and applications. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 18 (1986), Nr. 3, S. 171–276
- [38] JOB, Cosntantin; ZAJICEK, Jaroslav; BROWN, Michael F.: Fast field-cycling nuclear magnetic resonance spectrometer. In: *Review of Scientific Instruments* 67 (1996), Nr. 6, S. 2113–2122
- [39] BAGRYANSKAYA, E. G.; GRISHIN, Yu A.; AVDIEVICH, N. I.; SAGDEEV, R. Z.; MOLIN, Yu N.: Studies of various mechanisms of nuclear polarization due to a resonant high-frequency field in radical reactions. In: *Chemical Physics Letters* 128 (1986), Nr. 2, S. 162–7
- [40] BIELECKI, A.; ZAX, D. B.; ZILM, K. W.; PINES, A.: Zero-field NMR and NQR spectrometer. In: *Review of Scientific Instruments* 57 (1986), Nr. 3, S. 393–403
- [41] GROSSE, S.: *CIDNP-Untersuchungen an photoinduzierten Radikalpaar-Reaktionen mit Feldzyklisierung im Magnetfeldbereich von 0 bis 7 Tesla*, Freie Universität Berlin, Dissertation, 2000
- [42] KORCHAK, Sergey E.: *Hyperpolarization in Coupled Multi-Spin Systems*, Freie Universität Berlin, Dissertation, 2010
- [43] IVANOV, Konstantin L.; VIETH, Hans-Martin; MIESEL, Karsten; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; SAGDEEV, Renad Z.: Investigation of the magnetic field dependence of CIDNP in multi-nuclear radical pairs. Part II. Photoreaction of tyrosine and comparison of model calculation with experimental data. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 5 (2003), Nr. 16, S. 3470–3480
- [44] POGOCKI, D.: *persönliche Mitteilung*. 2010. – Institute of Chemistry and Nuclear Technology, Warschau
- [45] BECKE, Axel D.: Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. In: *Journal of Chemical Physics* 98 (1993), Nr. 7, S. 5648–52
- [46] DAVIDSON, Ernest R.; FELLER, David: Basis set selection for molecular calculations.

- In: *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* 86 (1986), Nr. 4, S. 681–96
- [47] BARONE, Vincenzo; ADAMO, Carlo; RUSSO, Nino: Density functional theory: an effective theoretical tool for the study of s radicals. In: *International Journal of Quantum Chemistry* 52 (1994), Nr. 4, S. 963–71
- [48] CANCES, E.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J.: A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. In: *Journal of Chemical Physics* 107 (1997), Nr. 8, S. 3032–3041
- [49] CANCES, E.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J.: Analytical derivatives for geometry optimization in solvation continuum models. II. Numerical applications. In: *Journal of Chemical Physics* 109 (1998), Nr. 1, S. 260–266
- [50] COSSI, Maurizio; BARONE, Vincenzo; MENNUCCI, Benedetta; TOMASI, Jacopo: Ab initio study of ionic solutions by a polarizable continuum dielectric model. In: *Chemical Physics Letters* 286 (1998), Nr. 3,4, S. 253–260
- [51] MOROZOVA, O. B.; YURKOVSKAYA, A. V.; TSENTALOVICH, Yu P.; FORBES, M. D. E.; HORE, P. J.; SAGDEEV, R. Z.: Time resolved CIDNP study of electron transfer reactions in proteins and model compounds. In: *Molecular Physics* 100 (2002), Nr. 8, S. 1187–1195
- [52] GLASOE, Paul K.; LONG, F. A.: Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. In: *Journal of Physical Chemistry* 64 (1960), S. 188–90
- [53] KAPTEIN, R.: Introduction to Chemically Induced Magnetic Polarisation. In: MUUS, L. T. (Hrsg.); ATKINS, P. W. (Hrsg.); MCCLAUCHIAN, K. A. (Hrsg.); PEDERSEN, J. B. (Hrsg.): *Chemical Induced Magnetic Polarisation*. Dordrecht : D. Reidel, 1977, S. 1–16
- [54] GÖZ, Martin; ROZWADOWSKI, Jaroslaw; MARCINIAK, Bronislaw: Photoinduced Electron Transfer, Decarboxylation, and Radical Fragmentation of Cysteine Derivatives: A Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization Study. In: *Journal of the American Chemical Society* 118 (1996), Nr. 12, S. 2882–91
- [55] TOMKIEWICZ, Micha; MCALPINE, Robert D.; COCIVERA, Michael: Photooxidation and decarboxylation of tyrosine studied by EPR and CIDNP [chemically-induced dynamic nuclear polarization] techniques. In: *Canadian Journal of Chemistry* 50 (1972), Nr. 23, S. 3849–56
- [56] SÄUBERLICH, J.; BREDE, O.; BECKERT, D.: Photoionization of Benzophenone Carboxylic Acids in Aqueous Solution. A FT EPR and Optical Spectroscopy Study of Radical Cation Decay. In: *Journal of Physical Chemistry* 100 (1996), Nr. 46, S. 18101–18107
- [57] TSENTALOVICH, Yu P.; LOPEZ, J. J.; HORE, P. J.; SAGDEEV, R. Z.: Mechanisms of

- reactions of flavin mononucleotide triplet with aromatic amino acids. In: *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 58A (2002), Nr. 9, S. 2043–2050
- [58] BLEIFUSS, Günther; KOLBERG, Matthias; PÖTSCH, Stephan; HOFBAUER, Wulf; BITTL, Robert; LUBITZ, Wolfgang; GRÄSLUND, Astrid; LASSMANN, Günter; LENDZIAN, Friedhelm: Tryptophan and Tyrosine Radicals in Ribonucleotide Reductase: A Comparative High-Field EPR Study at 94 GHz. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 50, S. 15362–15368
- [59] CONNOR, Henry D.; STURGEON, Bradley E.; MOTTLEY, Carolyn; SIPE, Herbert J.; MASON, Ronald P.: L-Tryptophan Radical Cation Electron Spin Resonance Studies: Connecting Solution-Derived Hyperfine Coupling Constants with Protein Spectral Interpretations. In: *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008), Nr. 20, S. 6381–6387
- [60] TSENTALOVICH, Yuri P.; MOROZOVA, Olga B.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; HORE, P. J.; SAGDEEV, Renad Z.: Time-Resolved CIDNP and Laser Flash Photolysis Study of the Photoreactions of N-AcetylHistidine with 2,2'-Dipyridyl in Aqueous Solution. In: *Journal of Physical Chemistry A* 104 (2000), Nr. 30, S. 6912–6916
- [61] DIXON, William T.; MURPHY, David: Determination of the acidity constants of some phenol radical cations by means of electron spin resonance. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72 (1976), Nr. 7, S. 1221–30
- [62] CANONICA, Silvio; HELLRUNG, Bruno; WIRZ, Jakob: Oxidation of Phenols by Triplet Aromatic Ketones in Aqueous Solution. In: *Journal of Physical Chemistry A* 104 (2000), Nr. 6, S. 1226–1232
- [63] LAND, E. J.; PORTER, G.; STRACHAN, E.: Primary photochemical processes in aromatic molecules. VI. Absorption spectra and acidity constants of phenoxyl radicals. In: *Transactions of the Faraday Society* 57 (1961), S. 1885–93
- [64] HURLEY, John K.; LINSCHITZ, Henry; TREININ, Avner: Interaction of halide and pseudohalide ions with triplet benzophenone-4-carboxylate: kinetics and radical yields. In: *Journal of Physical Chemistry* 92 (1988), Nr. 18, S. 5151–9
- [65] MOROZOVA, Olga B.; IVANOV, Konstantin L.; KIRYUTIN, Alexey S.; SAGDEEV, Renad Z.; KÖCHLING, Talea; VIETH, Hans-Martin; YURKOVSKAYA, Alexandra V.: Time-resolved CIDNP: an NMR way to determine the EPR parameters of elusive radicals. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011), Nr. 14, S. 6619–6627
- [66] HORE, P. J.; BROADHURST, R. W.: Photo-CIDNP of biopolymers. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 25 (1993), Nr. 4, S. 345–402
- [67] HORE, P. J.; WINDER, Stephen L.; ROBERTS, Claire H.; DOBSON, Christopher M.: Stopped-Flow Photo-CIDNP Observation of Protein Folding. In: *Journal of the*

- American Chemical Society* 119 (1997), Nr. 21, S. 5049–5050
- [68] LYON, Charles E.; SUH, Eui-Sik; DOBSON, Christopher M.; HORE, P. J.: Probing the Exposure of Tyrosine and Tryptophan Residues in Partially Folded Proteins and Folding Intermediates by CIDNP Pulse-Labeling. In: *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002), Nr. 44, S. 13018–13024
- [69] MOK KEN, Hun; HORE PETER, J.: Photo-CIDNP NMR methods for studying protein folding. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 34 (2004), Nr. 1, S. 75–87
- [70] IVANOV, K. L.; YURKOVSKAYA, A. V.; HORE, P. J.; LUKZEN, N. N.: Theoretical study of the CIDNP kinetics of the reaction of a photo-excited dye with a reactive spot on the surface of a sphere: application to CIDNP of proteins. In: *Molecular Physics* 104 (2006), Nr. 10-11, S. 1687–1702
- [71] MOROZOVA, Olga B.; HORE, P. J.; SAGDEEV, Renad Z.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.: Intramolecular electron transfer in lysozyme studied by time-resolved chemically induced dynamic nuclear polarization. In: *Journal of Physical Chemistry B* 109 (2005), Nr. 46, S. 21971–21978
- [72] TSENTALOVICH, Y. P.; MOROZOVA, O. B.: Laser flash photolysis and time resolved CIDNP study of photoreaction of 2,2'-dipyridyl with N-acetyltyrosine in aqueous solutions. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 131 (2000), Nr. 1-3, S. 33–40
- [73] GÖZ, Martin; ROZWADOWSKI, Jaroslaw; MARCINIAK, Bronislaw: CIDNP spectroscopic observation of $(S\cdot\cdot N)^+$ radical cations with a two-center three-electron bond during the photooxidation of methionine. In: *Angewandte Chemie, International Edition* 37 (1998), Nr. 5, S. 628–630
- [74] MOROZOVA, Olga B.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.: Aminium Cation Radical of Glycylglycine and its Deprotonation to Aminyl Radical in Aqueous Solution. In: *Journal of Physical Chemistry B* 112 (2008), Nr. 40, S. 12859–12862
- [75] MOROZOVA, Olga B.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; VIETH, Hans-Martin; SAGDEEV, Renad Z.: Intramolecular Electron Transfer in Tryptophan-Tyrosine Peptide in Photoinduced Reaction in Aqueous Solution. In: *Journal of Physical Chemistry B* 107 (2003), Nr. 4, S. 1088–1096
- [76] MOROZOVA, Olga B.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; TSENTALOVICH, Yuri P.; FORBES, Malcolm D. E.; SAGDEEV, Renad Z.: Time-Resolved CIDNP Study of Intramolecular Charge Transfer in the Dipeptide Tryptophan-Tyrosine. In: *Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002), Nr. 6, S. 1455–1460
- [77] HUG GORDON, L.; BOBROWSKI, Krzysztof; POGOCKI, Dariusz; HÖRNER, Gerald; MARCINIAK, Bronislaw: Conformational influence on the type of stabilization of sulfur radical cations in cyclic peptides. In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 8 (2007), Nr. 15, S. 2202–10

- [78] HUG, Gordon L.; BOBROWSKI, Krzysztof; POGOCKI, Dariusz; MARCINIAK, Bronislaw; SCHÖNEICH, Christian; HÖRNER, Gerald: Factor analysis of transient spectra. Free radicals in cyclic dipeptides containing methionine. In: *Research on Chemical Intermediates* 35 (2009), Nr. 4, S. 431–442
- [79] YASHIRO, Haruhiko; WHITE, Ryan C.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; FORBES, Malcolm D. E.: Methionine Radical Cation: Structural Studies as a Function of pH Using X- and Q-Band Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. In: *Journal of Physical Chemistry A* 109 (2005), Nr. 26, S. 5855–5864
- [80] BOBROWSKI, Krzysztof; MARCINIAK, Bronislaw; HUG, Gordon L.: 4-Carboxybenzophenone-sensitized photooxidation of sulfur-containing amino acids. Nanosecond laser flash photolysis and pulse radiolysis studies. In: *Journal of the American Chemical Society* 114 (1992), Nr. 26, S. 10279–88
- [81] HUG, Gordon L.; MARCINIAK, Bronislaw; BOBROWSKI, Krzysztof: Acid-Base Equilibria Involved in Secondary Reactions Following the 4-Carboxybenzophenone Sensitized Photooxidation of Methionylglycine in Aqueous Solution. Spectral and Time Resolution of the Decaying (S·N)⁺ Radical Cation. In: *Journal of Physical Chemistry* 100 (1996), Nr. 36, S. 14914–14921
- [82] ASMUS, Klaus D.: Stabilization of oxidized sulfur centers in organic sulfides. Radical cations and odd-electron sulfur-sulfur bonds. In: *Accounts of Chemical Research* 12 (1979), Nr. 12, S. 436–42
- [83] MOROZOVA, Olga B.; KORCHAK, Sergey E.; VIETH, Hans-Martin; YURKOVSKAYA, Alexandra V.: Photo-CIDNP Study of Transient Radicals of Met-Gly and Gly-Met Peptides in Aqueous Solution at Variable pH. In: *Journal of Physical Chemistry B* 113 (2009), Nr. 20, S. 7398–7406
- [84] BOBROWSKI, Krzysztof; HUG GORDON, L.; POGOCKI, Dariusz; MARCINIAK, Bronislaw; SCHÖNEICH, Christian: Stabilization of sulfide radical cations through complexation with the peptide bond: mechanisms relevant to oxidation of proteins containing multiple methionine residues. In: *The journal of physical chemistry. B* 111 (2007), Nr. 32, S. 9608–20
- [85] DAVIES, Michael J.; GILBERT, Bruce C.; NORMAN, Richard O. C.: Electron-spin resonance studies. Part 64. The hydroxyl radical-induced decarboxylation of methionine and some related compounds. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* (1983), Nr. 5, S. 731–8
- [86] STOB, S.; KAPTEIN, R.: Photo-CIDNP of the amino acids. In: *Photochemistry and Photobiology* 49 (1989), Nr. 5, S. 565–77
- [87] GÖZ, M.; ROZWADOWSKI, J.: Photo-CIDNP investigation of the radical cation of methionine. In: *Journal of Information Recording* 25 (2000), Nr. 3-4, S. 301–306
- [88] KORCHAK, Sergey E.; IVANOV, Konstantin L.; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; VIETH,

- Hans-Martin: Structure and magnetic resonance parameters of the cation-radicals of methionine as studied by the CIDNP magnetic field dependence. In: *ARKIVOC (Gainesville, FL, United States)* (2004), Nr. 8, S. 121–131
- [89] INBAR, Shai; LINSCHITZ, Henry; COHEN, Saul G.: Quenching, radical formation, and disproportionation in the photoreduction of 4-carboxybenzophenone by 4-carboxybenzhydrol, hydrazine, and hydrazinium ion. In: *Journal of the American Chemical Society* 103 (1981), Nr. 24, S. 7323–8
- [90] BOBROWSKI, Krzysztof; MARCINIAK, Bronislaw; HUG, Gordon L.: A reinvestigation of the mechanism of photoreduction of benzophenones by alkyl sulfides. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 81 (1994), Nr. 3, S. 159–68
- [91] COHEN, Saul G.; OJANPERA, Salme: Photooxidation of methionine and related compounds. In: *Journal of the American Chemical Society* 97 (1975), Nr. 19, S. 5633–4
- [92] ASMUS, Klaus D.; GÖBL, Manfred; HILLER, Karl O.; MAHLING, Sabine; MÖNIG, Jörg: Sulfur-nitrogen and sulfur-oxygen three-electron-bonded radicals and radical cations in aqueous solutions. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* (1985), Nr. 5, S. 641–6
- [93] MCLAUCHLAN, Keith A.; RITCHIE, Andrew J. D.: Spin-polarized (CIDEP) neutral alpha -aminoalkyl radicals from tertiary amines observed in solution by flash-photolysis electron spin resonance. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* (1984), Nr. 2, S. 275–9
- [94] ROZWADOWSKI, J.: *Sensybilizowane fotoutlenianie zwiaskow organicznych zawierajacych atom siarki (II) w roztworach*, Adam Mickiewicz University, Poznan, Dissertation, 1996
- [95] DESEKE, Eckart; NAKATANI, Yoichi; OURISSON, Guy: Intrinsic reactivities of amino acids towards photoalkylation with benzophenone. A study preliminary to photolabeling of the transmembrane protein glycophorin A. In: *European Journal of Organic Chemistry* (1998), Nr. 2, S. 243–251
- [96] MORETTO, Alessandro; CRISMA, Marco; FORMAGGIO, Fernando; HUCK, Lawrence A.; MANGION, Dino; LEIGH, William J.; TONIOLO, Claudio: Photoinduced intramolecular macrocyclization reaction between a Bpa and a Met residue in a helical peptide: 3D structures of the diastereomeric products. In: *Chemistry–A European Journal* 15 (2009), Nr. 1, S. 67–70
- [97] GAINES, Susan M.; BADA, Jeffrey L.: Aspartame decomposition and epimerization in the diketopiperazine and dipeptide products as a function of pH and temperature. In: *Journal of Organic Chemistry* 53 (1988), Nr. 12, S. 2757–64
- [98] LÖFF, I.; RABANI, J.; TREININ, A.; LINSCHITZ, H.: Charge transfer and reactivity of $n\pi^*$ and $\pi\pi^*$ organic triplets, including anthraquinonesulfonates, in interactions

- with inorganic anions: a comparative study based on classical Marcus theory. In: *Journal of the American Chemical Society* 115 (1993), Nr. 20, S. 8933–42
- [99] ABRAGAM, A.: *The principles of Nuclear Magnetism*. Oxford : Clarendon Press, 1961
- [100] NAITO, Akira; AKASAKA, Kazuyuki; HATANO, Hiroyuki: Dimer cation radicals of N-acetyl methionine: ESR and ENDOR studies. In: *Molecular Physics* 44 (1981), Nr. 2, S. 427–43
- [101] SHIELDS, Howard; GORDY, Walter: Electron spin resonance studies of radiation damage to amino acids. In: *Journal of Physical Chemistry* 62 (1958), S. 789–98
- [102] KIVELSON, D.: Electron Spin Relaxation in Liquids. Selected Topics. In: MUUS, L. T. (Hrsg.); ATKINS, P. W. (Hrsg.): *Electron Spin Relaxation in Liquids*. New York : Plenum Press, 1972, S. 213–273
- [103] LUKZEN, N. N.: *persönliche Mitteilung*. 2011. – International Tomography Center of SB RAS, Nowosibirsk, Russland
- [104] GROSSE, Stefan; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; LOPEZ, Jakob; VIETH, Hans-Martin: Field Dependence of Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization (CIDNP) in the Photoreaction of N-AcetylHistidine with 2,2'-Dipyridyl in Aqueous Solution. In: *Journal of Physical Chemistry A* 105 (2001), Nr. 26, S. 6311–6319
- [105] KOPPLE, Kenneth D.; MARR, David H.: Conformations of cyclic peptides. Folding of cyclic dipeptides containing an aromatic side chain. In: *Journal of the American Chemical Society* 89 (1967), Nr. 24, S. 6193–200
- [106] SHEINBLATT, M.: NMR studies on the conformation of aromatic cyclodipeptides with two non-identical L-aromatic amino acid residues in solution: cyclo[L-5(MeO)Trp-L-Tyr(Me)]. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* (1990), Nr. 1, S. 127–32
- [107] KOBAYASHI, Junichi; NAGAI, Ukon: A solvent effect on the side-chain conformation of phenylalanine derivatives and phenylalanine residues in dipeptides. In: *Biopolymers* 17 (1978), Nr. 9, S. 2265–77
- [108] KOBAYASHI, J.; HIGASHIJIMA, T.; SEKIDO, S.; MIYAZAWA, T.: Nuclear magnetic resonance study on solvent dependence of side chain conformations of tyrosine and tryptophan derivatives. In: *International journal of peptide and protein research* 17 (1981), Nr. 4, S. 486–94
- [109] KOBAYASHI, Junichi; HIGASHIJIMA, Tsutomu; MIYAZAWA, Tatsuo: Nuclear magnetic resonance analyses of side chain conformations of histidine and aromatic amino acid derivatives. Solvent and pH dependence. In: *International Journal of Peptide & Protein Research* 24 (1984), Nr. 1, S. 40–7
- [110] GILBERT, Bruce C.; HODGEMAN, Daryl K. C.; NORMAN, Richard O. C.: Electron

- spin resonance. XXXVIII. Formation of dimeric radical-cations in the one-electron oxidation of sulfides. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* (1973), Nr. 13, S. 1748–52
- [111] DAVIES, Michael J.; GILBERT, Bruce C.; NORMAN, Richard O. C.: Electron spin resonance. Part 67. Oxidation of aliphatic sulfides and sulfoxides by the sulfate radical anion and of aliphatic radicals by the peroxydisulfate anion. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* (1984), Nr. 3, S. 503–9

Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge:

AQS	...	9,10-Anthrachinon-2-Sulfonsäure
BP	...	Benzophenon
4CBP	...	4-Carboxybenzophenon
CC-cis	...	Zyklisches L-Methylcystein-L-Methylcystein (cis-Konformation)
CIDEP	...	Chemisch induzierte dynamische Elektronenspinpolarisation
CIDNP	...	Chemisch induzierte dynamische Kernspinpolarisation
Cys(Me)	...	S-Methylcystein
DFT	...	Dichtefunktionaltheorie
ESR	...	Elektronenspinresonanz
FID	...	Freier Induktionszerfall
GC	...	Zyklisches Glycin-S-Methylcystein
GM	...	Zyklisches Glycin-Methionin
MC-cis	...	Zyklisches L-Methionin-L-Methylcystein (cis-Konformation)
MC-trans	...	Zyklisches D-Methionin-L-Methylcystein (trans-Konformation)
Met	...	Methionin
MM-cis	...	Zyklisches L-Methionin-L-Methionin (cis-Konformation)
MM-trans	...	Zyklisches D-Methionin-L-Methionin (trans-Konformation)
NMR	...	Kernspinresonanz
RF	...	Radiofrequenz
TCBP	...	3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon
Trp	...	Tryptophan
Tyr	...	Tyrosin

Veröffentlichungen

Im Rahmen der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation wurden folgende wissenschaftliche Veröffentlichungen angefertigt:

Artikel in Fachzeitschriften

- MIESEL, Karsten; IVANOV, Konstantin L.; KÖCHLING, Talea; YURKOVSKAYA, Alexandra V.; VIETH, Hans-Martin:
Field-cycling effects on dynamic nuclear polarization. In: *Appl Magn Reson* 34 (2008), S. 423–437
- MOROZOVA, Olga B.; IVANOV, Konstantin L.; KIRYUTIN, Alexey S.; SAGDEEV, Renad Z.; KÖCHLING, Talea; VIETH, Hans-Martin; YURKOVSKAYA, Alexandra V.:
Time-resolved CIDNP: an NMR way to determine the EPR parameters of elusive radicals. In: *Phys Chem Chem Phys* 13 (2011), 6619–6627

Konferenzbeiträge

- KÖCHLING, Talea; IVANOV, Konstantin; KORCHAK, Sergey; YURKOVSKAYA, Alexandra; VIETH, Hans-Martin:
Magnetic Relaxation Dispersions of Biomolecules: Effects of Field-Cycling. *Verhandl. DPG (VI) 43 1/* (2008); Berlin (Deutschland)
- KÖCHLING, Talea; HÖRNER, Gerald; KORCHAK, Sergey; YURKOVSKAYA, Alexandra; VIETH, Hans-Martin:
CIDNP as a tool to determine magnetic resonance parameters and structure of radicals in biomolecules. *Verhandl. DPG (VI) 44 5/* (2009); Dresden (Deutschland)
- KÖCHLING, Talea; HÖRNER, Gerald; KORCHAK, Sergey; YURKOVSKAYA, Alexandra; VIETH, Hans-Martin:
CIDNP as a Tool to Determine Magnetic Resonance Parameters and Structure of Radicals in Biomolecules. *4th European Young Investigator Conference* (2009); Slubice (Polen)
- KÖCHLING, Talea; HÖRNER, Gerald; KORCHAK, Sergey; YURKOVSKAYA, Alexandra; VIETH, Hans-Martin:
Time dependent CIDNP study of peptides with S-containing amino acids. *Central European Conference on Photochemistry* (2010); Bad Hofgastein (Österreich)
- KÖCHLING, Talea; HÖRNER, Gerald; KORCHAK, Sergey; YURKOVSKAYA, Alexandra;

VIETH, Hans-Martin:

CIDNP measurements of peptides with sulfur containing amino acids. *Joint EURO-MAR 2010 and 17th ISMAR Conference* (2010); Florenz (Italien)

- KÖCHLING, Talea; HÖRNER, Gerald; KORCHAK, Sergey; YURKOVSKAYA, Alexandra; VIETH, Hans-Martin:

CIDNP study of cyclic peptides with sulfur containing amino acids . *Verhandl. DPG (VI) 46 1/* (2011); Dresden (Deutschland)

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Hans-Martin Vieth danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die vorliegende Arbeit in seiner Gruppe durchzuführen, und der dabei immer ein kompetenter Ansprechpartner war.

Außerdem möchte ich Prof. Robert Bittl für sein Interesse an der Arbeit und der Begutachtung dieser danken.

Bei Alexandra Yurkowskaya möchte ich mich für die anregenden Gespräche und vielen die Arbeit betreffenden Diskussion bedanken. Einen besonderen Dank möchte ich Gerald Hörner aussprechen, der nicht nur fleißig meine „Probenwünsche“ erfüllt hat, sondern in vielen anregenden Diskussionen mir insbesondere die Chemie näher gebracht hat. Vielen Dank auch an Sergey Korchak, der mir bei Problemen mit den Experimenten oder der Auswertung geholfen hat. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei dem Rest sowie den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die in viele Richtungen anregenden Gespräche bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Konstantin Ivanov und Nikita Lukzen für ihre Unterstützung von theoretischer Seite sowie bei Dariusz Pogocki für die DFT-Rechnungen.

Die Dissertation wurde dabei größtenteils von der Leibniz-Graduiertenschule „Molekulare Biophysik“ finanziert. Hierbei möchte ich mich besonders beim Hauptverantwortlichen Herrn Prof. Bernd Reif für die Unterstützung bedanken. Auch den nichtwissenschaftlichen Mitgliedern des Fachbereiches möchte ich für die freundschaftliche Unterstützung und Hilfe danken. Vielen Dank auch an alle die diese Arbeit Korrektur gelesen haben. Erst durch diese Hilfe sind einige Abschnitte und Sätze lesbar geworden.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank Ringo Wenzel, der meine Stimmungsschwankungen und Tiefphasen ertragen und gut aufgefangen hat. Ferner will ich an dieser Stelle noch meinen Eltern dafür danken, dass ich immer auf ihre Hilfe zählen kann.