

Die Anwendung der Elektronenspinresonanz in der Biochemie*

Von G. SCHOFFA

Physikalisches Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe (D R G)

Die Bedeutung der Elektronenspinresonanz (ESR) auf dem Gebiete der Biochemie nahm in den letzten Jahren laufend zu, nicht zuletzt infolge der Erhöhung der Empfindlichkeit der ESR-Spektrometer und durch die Entwicklung spezieller, für Arbeiten an biochemischen Systemen erforderlicher Meßtechniken. Die Aufgabe dieser zusammenfassenden Darstellung soll es vorwiegend sein, die verschiedenen Möglichkeiten für die Anwendung der ESR in der Biochemie zu skizzieren. Das inzwischen stark angeschwollene Schrifttum kann hier nicht vollständig berücksichtigt werden, sondern es wird auf die bisher erschienenen zusammenfassenden Darstellungen verwiesen^{1, 2, 3}. Hier soll vorzugsweise das inzwischen erschienene, in diesen Monographien nicht enthaltene Schrifttum berücksichtigt werden. Die Anwendung der ESR auf dem Gebiete der Photosynthese wird hier nicht behandelt, da erst neulich darüber eine zusammenfassende Arbeit veröffentlicht wurde⁴.

I. Die physikalischen Grundlagen der ESR-Spektroskopie

Es soll hier nur soweit auf die physikalischen Grundlagen der ESR-Spektroskopie eingegangen werden, als dies für das Verständnis der nachfolgenden Kapitel unerlässlich ist.

Die ESR ist ein physikalisches Verfahren zur Messung der ungepaarten Elektronen in der Materie. In Biochemikalien findet man ungepaarte Elektronen in

1. paramagnetischen Komplexen oder Chelaten der Übergangselemente,
2. freien Radikalen,
3. Charge-Transfer- oder Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplexen und
4. in Molekülen im Triplettzustand.

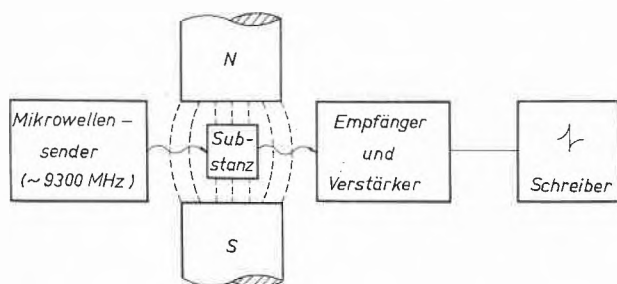


Abb. 1. Prinzipieller Aufbau eines ESR-Spektrometers

Zur Messung der ESR werden die Substanzen mit ungepaarten Elektronen in ein homogenes Magnetfeld eingeführt (Abb. 1), wodurch die ungepaarten Elektronen in Richtung des Magnetfeldes polarisiert werden. Die Projektion des Vektors des magnetischen Moments des Elektrons ist dann z.B. bei freien Radikalen entweder entlang oder entgegengesetzt zum Vektor des äußeren Magnetfeldes gerichtet (Abb. 2). Dabei präzessieren die

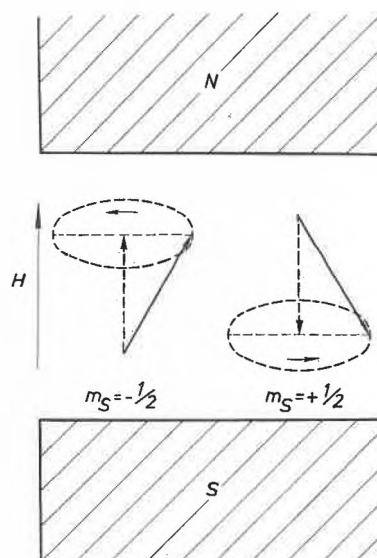


Abb. 2. Die zwei möglichen Orientierungen und die Präzession der magnetischen Momente von ungepaarten Elektronen mit $S = 1/2$ in einem äußeren Magnetfeld. Die Orientierung $m_S = -1/2$ ist energetisch günstiger. Bei Einstrahlung der elektromagnetischen Strahlung, deren Frequenz der Präzessionsfrequenz des Elektrons gleich ist, gehen einige Elektronen aus der Orientierung $m_S = -1/2$ in die Orientierung $m_S = +1/2$ über. Dabei wird die elektromagnetische Strahlung absorbiert und die Absorptionsrate mit einem ESR-Spektrometer gemessen

ungepaarten Elektronen um die Richtung des äußeren Magnetfeldes. Die Präzessionsfrequenz nimmt mit der zunehmenden Magnetfeldstärke zu. Strahlt man nun senkrecht zum äußeren Magnetfeld in die Substanz elektromagnetische Strahlung ein, deren Frequenz genau der Präzessionsfrequenz der ungepaarten Elektronen im Magnetfeld entspricht, so ändern einige in Richtung des äußeren Magnetfeldes liegende Elektronen ihre Polarisationsrichtung, und zwar entgegengesetzt zum äußeren

* Vortrag, gehalten in Basel am 24. Februar 1966 auf Einladung der Basler Chemischen Gesellschaft.

Magnetfeld. Hierbei wird ein Teil der eingestrahnten elektromagnetischen Strahlung absorbiert.

In der ESR-Spektroskopie wird also die Schwächung der eingestrahnten elektromagnetischen Strahlung durch die im Magnetfeld sich befindenden ungepaarten Elektronen gemessen. Hierbei hält man meist die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung konstant und verändert die magnetische Feldstärke solange, bis die Präzessionsfrequenz der im Magnetfeld sich befindenden Elektronen der Frequenz der Strahlung gleich ist, also eine Resonanz zwischen dem Elektronenspin und der elektromagnetischen Strahlung eintritt. Die Größe der Magnetfeldstärke, bei der diese Resonanz zu erwarten ist, beträgt

$$H = \frac{h\nu}{g\beta},$$

worin h die Plancksche Konstante, ν die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung, β das Bohrsche Magneton und g der g -Faktor oder spektroskopischer Aufspaltungsfaktor ist.

Bei freien Radikalen ist der g -Faktor annähernd gleich dem Wert des Landé-Faktors und beträgt 2,0. Setzt man die bekannten Konstanten h , β und $g=2$ in die obige Gleichung ein, so erhält man

$$H \text{ (in Gauß)} = \frac{\nu \text{ (in MHz)}}{2,8045},$$

d. h. bei Einstrahlung von z. B. 9240 MHz würde die Resonanz bei 3300 Gauß liegen. Es ist heute üblich, diese Frequenz und diese Feldstärke in der ESR-Spektroskopie anzuwenden.

In vielen Komplexen oder Chelaten der Übergangselemente befinden sich die ungepaarten Elektronen von Übergangselementen in elektrischen und magnetischen Kraftfeldern, die von den sie umgebenden Liganden erzeugt werden. Diese Kraftfelder können u. a. bewirken, daß die ESR-Absorption bei einer anderen Feldstärke als oben angegeben stattfindet. Dieser von der Substanz herrührende Sachverhalt wird dadurch beschrieben, daß jeder Substanz ein sogenannter g -Faktor zugeschrieben wird. Man erhält ihn aus dem Experiment nach der Beziehung

$$g = \frac{h\nu}{\beta H_0} = 0,71444 \frac{\nu \text{ (in MHz)}}{H_0 \text{ (in Gauß)}},$$

wobei H_0 die Magnetfeldstärke ist, bei der das Maximum der Absorption der elektromagnetischen Strahlung erhalten wurde.

Im folgenden Abschnitt wird gezeigt, daß man aus den Messungen des g -Faktors verschiedene Schlußfolgerungen über die Natur der gemessenen Substanz ziehen kann. Dies bezieht sich aber vorwiegend auf die Substanzen mit stark abweichenden g -Faktoren.

Die ungepaarte Elektronen beeinflussenden elektrischen und magnetischen Felder führen jedoch nicht nur zur Verschiebung der Lage der ESR-Linien, sondern auch vielfach zur Aufspaltung der Linien. Für bioche-

mische Anwendung besonders wichtige Aufspaltung ist die *Hyperfeinstruktur* (Hfs). Sie beruht darauf, daß die ungepaarten Elektronen sich nicht nur in einem äußeren Magnetfeld, sondern gleichzeitig in wesentlich schwächeren Magnetfeldern befinden, die von den magnetischen Momenten einiger Atomkerne herrühren. Die Atomkerne, die ein resultierendes magnetisches Moment aufweisen, haben die magnetische Spinquantenzahl $I \neq 0$. Dazu gehören z. B.

^1H mit $I=1/2$	^{19}F mit $I=1/2$
^2H mit $I=1$	^{35}Cl und ^{37}Cl mit $I=3/2$
^{14}N mit $I=1$	^{55}Mn mit $I=5/2$
^{15}N mit $I=1/2$	^{57}Fe mit $I=1/2$ usw.

Viele andere, in organischen Stoffen häufig vorkommende Kerne haben $I=0$, z. B. ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S usw., und geben daher keine Hyperfeinstruktur.

Die Zahl der Hfs-Linien ist im Falle eines Kerns in Nachbarschaft des ungepaarten Elektrons gleich $2I+1$. Die Position der zwei Hfs-Linien auf der Magnetfeldskala ist bei $I=1/2$

$$H_{1,2} = \frac{h\nu}{g\beta} \pm \Delta H,$$

wobei ΔH das vom Atomkern erzeugte Magnetfeld ist.

Bei mehreren benachbarten Kernen mit $I \neq 0$ findet man kompliziertere Hfs-Spektren. Auf die Deutung dieser Spektren kann hier nicht eingegangen werden.

II. Komplexe oder Chelate der Übergangselemente

Die ESR-Untersuchungen an biochemischen Komplexen oder Chelaten (künftig nur als Komplexe bezeichnet) erstrecken sich hauptsächlich in zwei Richtungen:

1. Die Identifizierung der paramagnetischen Ionen und
2. die Wertigkeitsbestimmungen von paramagnetischen Ionen.

Die Identifizierung von paramagnetischen Ionen in biochemischen Komplexen ist in günstigen Fällen möglich:

- a) durch die typische Position des ESR-Spektrums auf der Feldstärkeskala, d. h. durch die Messung des g -Faktors, und
- b) durch die Messung der für einige Übergangselemente typischen Hyperfeinstruktur.

Die Identifizierung der paramagnetischen Ionen in biochemischen Komplexen durch die Bestimmung des g -Faktors gelingt oft besonders gut bei Eisenkomplexen. Man kann hier verschiedene Fälle unterscheiden.

Typisch für die Fe(III)-Komplexe sind die oft gefundenen: $g=4,3$ oder aber auch $g_{\parallel}=2$ und $g_{\perp}=6$. Solche starken Abweichungen vom $g=2,0023$ für ein freies Elektron beruhen darauf⁵, daß bereits ohne Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes die ungepaarten Elektronen des Fe(III)-Ions ihre Spins im Kristallfeld der Liganden teilweise ausrichten. Beim Zuschalten des äußeren

Magnetfeldes präzessieren sie daher mit einer anderen Frequenz als im Falle des freien Elektrons.

Verschiedene biochemische Fe(III)-Komplexe mit $g=4,3$ sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I. Fe(III)-Komplexe mit $g \approx 4,3$

Hämatin	G. SCHOFFA ⁶
Ferrihämoglobin	G. SCHOFFA ⁶
Ferrimyoglobin	A. EHRENBURG ⁷
Peroxydase	A. EHRENBURG ⁷
	Y. MORITA und H. S. MASON ⁹
Xanthinoxidase	G. PALMER, R. C. BRAY und H. E. BEINERT ¹⁰ , Lit. 1, Zitate 121, 122
Pyrocatechase	T. NAKAZAWA, Y. KOJIMA, H. FUJISAWA, M. NOZAKI und O. HAYASHI ¹¹
Fe-Transferrin und Fe-Conalbumin	R. AASA, B. G. MALMSTRÖM, P. SALTMAN und T. VÄNNGÅRD ¹²
Fe-Fructose	R. AASA, B. G. MALMSTRÖM, P. SALTMAN und T. VÄNNGÅRD ¹⁴
Ferrichrom A	H. H. WICKMAN, M. P. KLEIN und D. A. SHIRLEY ¹³
Dopamin- β -Hydroxylase	W. E. BLUMBERG, M. GOLDSTEIN, E. LAUBER und J. PEISACH ¹⁵
Cytochrom-Reduktase	H. E. BEINERT und R. H. SANDS ¹⁶
	H. E. BEINERT und G. PALMER ¹⁷
DPNH-Dehydrogenase	H. E. BEINERT und R. H. SANDS ¹⁸
Submitochondriale Partikel	R. H. SANDS und H. E. BEINERT ¹⁹

Die Fe(III)-Komplexe mit $g_{\parallel}=2$ und $g_{\perp}=6$ kommen ebenfalls in vielen biochemisch interessanten Substanzen vor (Tabelle II). In Einkristallen, z.B. des Ferri-myoglobin-Fluorids, findet man parallel zur Symmetrieachse des Porphyrinringes $g_{\parallel}=2$ und senkrecht dazu $g_{\perp}=6$. Die beiden g -Faktoren kann man auch in polykristallinen Proben erhalten (Lit. 1, S. 35).

Tabelle II. Fe(III)-Komplexe mit $g_{\parallel} \approx 2$ und $g_{\perp} \approx 6$

Hämoglobin- und Myoglobin-Verbindungen	Lit. 1, Zitate 69, 71, 73, 74, 76, 212, 253, 245, 254, 271, 330, 332, 333, 604 sowie G. SCHOFFA ⁶
	H. REIN und O. RISTAU ²⁰
	H. REIN, O. RISTAU und F. JUNG ²¹
	A. EHRENBURG ²²
Hämoglobin M	A. HAYASHI, A. SHIMIZU, Y. YAMAMURA und H. WATARI ²⁴
Bakterielle Häm-Proteine	A. EHRENBURG und M. D. KAMEN ²³
Peroxydase	A. EHRENBURG ⁷
	Y. MORITA und H. S. MASON ⁹
Cytochrom c	W. GORDY und H. N. REXROAD, Lit. 2, Seite 263

Im Falle der Fe(II)-Komplexe erhält man bei Zimmertemperatur gewöhnlich keine ESR-Absorption. Dies kann einmal darauf beruhen, daß es sich um kovalent gebundene Fe(II)-Komplexe handelt, bei denen die sechs Elektronen auf der 3d-Elektronenschale des Eisen-Ions gepaart und die Komplexe daher diamagnetisch sind. Das Fehlen des ESR-Signals bei ionogen gebundenen Fe(II)-Komplexen mit vier ungepaarten Elektronen auf der 3d-Schale beruht meist auf einer sehr kleinen Spin-Gitter-Relaxationszeit bei Zimmertemperatur. Die Fe(II)-Komplexe sind daher kaum untersucht. So kennt man noch heute keine ESR-Messun-

gen vom reduzierten Hämoglobin oder Myoglobin. Bei 4,2°K dürfte in vielen Fällen die Spin-Gitter-Relaxationszeit länger werden, so daß man die ESR-Spektren von vielen Fe(II)-Komplexen registrieren könnte.

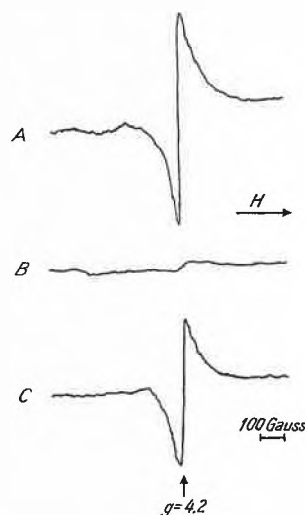


Abb. 3

- A. Das ESR-Spektrum von nativer Pyrocatechase. Das Signal bei $g=4,2$ stammt vom dreiwertigen Eisen in Pyrocatechase
 B. Das Verschwinden des Signals bei Titration mit Catechin infolge des Wertigkeitswechsels Fe(III) $\rightarrow$ Fe(II)
 C. Die Reoxydation des Fe(II) durch Luftsauerstoff. Alle Messungen wurden bei -150°C ausgeführt und, wie in der ESR-Spektroskopie üblich, als erste Ableitung der Mikrowellenabsorption registriert¹¹.

Das Fehlen des ESR-Signals in Fe(II)-Komplexen wurde oft zur Untersuchung der Wertigkeitsänderung $\text{Fe}^{+++} \leftrightarrow \text{Fe}^{++}$ ausgenutzt. Ein Beispiel dafür ist auf der Abb. 3 zu sehen¹¹. Aus den ESR-Spektren ist zu entnehmen, daß die Oxydation des Catechins durch die Pyrocatechase mit der Reduktion des Fe(III) zum Fe(II) einhergeht. Das Fe(II) läßt sich dann durch den Luftsauerstoff zum Fe(III) reoxydieren.

Ein weiteres Beispiel ist das Verschwinden des ESR-Signals bei $g=4,3$ bei Titration der Cytochromreduktase mit DPNH¹⁶ sowie bei der Titration der DPNH-Dehydrogenase mit DPNH oder Succinat¹⁸.

Die Fe(III)-Komplexe mit $g_{\parallel}=2$ und $g_{\perp}=6$ gehören zu den sogenannten «High spin»-Komplexen. Bei diesen Komplexen ist oft einer der Liganden stärker elektro-negativ (z.B. F, Cl, OH⁻, usw.). Ihre magnetische Suszeptibilität entspricht ungefähr der des freien Fe(III)-Ions.

Eine andere Gruppe der Fe(III)-Komplexe bilden die sogenannten «Low spin»-Komplexe. Die magnetische Suszeptibilität dieser Komplexe ist gegenüber der Suszeptibilität des freien Fe(III)-Ions stark reduziert und entspricht ungefähr der Suszeptibilität eines freien Elektrons. Der g -Faktor der «Low spin»-Komplexe liegt bei etwa 2. So sind z.B. die g -Faktoren des typischen «Low spin»-Komplexes Ferrihämoglobin-Azid²⁵: $g_x=1,72$, $g_y=2,22$ und $g_z=2,80$.

Die Theorie der «High spin»- und «Low spin»-Komplexe ist von GRIFFITH²⁶ und anderen gegeben worden. Verschiedene Fe(III)-Komplexe des «Low spin»-Typs sind in der Tabelle III zu sehen.

Tabelle III. Fe(III)-Komplexe mit den «Low spin»-g-Faktoren

	g_x	g_y	g_z	
Ferrimyoglobin-Azid	1,72	2,22	2,80	Lit. 1, Zitate 73, 253, 254, 330, 333
Ferrimyoglobin-Azid	1,75	2,25	2,80	A. EHRENBURG ⁷
Ferrihämoglobin-Azid	1,70	2,20	2,82	Lit. 1, Zitate 69, 254, 330
Peroxydase-Hydroxyd	1,67	2,12	2,86	Y. MORITA und H. S. MASON ⁹

In vielen Fällen findet man sowohl die für «High spin»- als auch für «Low spin»-Komplexe typischen ESR-Linien im gleichen Fe(III)-Komplex. Dies ist z. B. der Fall bei Ferrihämoglobin-SCN²⁰. Die magnetische Suszeptibilität dieses Komplexes liegt ebenfalls zwischen der «Low spin»- und der «High spin»-Suszeptibilität^{27, 28}. «Low spin»- und «High spin»-g-Faktoren fand man auch bei Cytochrom c² sowie bei Peroxydase^{7, 9}. In allen diesen Komplexen besteht anscheinend ein thermisches Gleichgewicht der Komplexe mit «Low spin» und der Komplexe mit «high spin».

In der letzten Zeit wurden durch die Reduktion verschiedener biochemischer Eisenkomplexe ESR-Spektren erhalten, deren g-Faktoren kleiner als zwei waren, z. B. $g_1 = 1,93$, $g_2 = 1,94$, $g_3 = 2,00$ ^{18, 29, 30, 31}. Da man ein ähnliches Spektrum durch die Reduktion des $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ zum $[\text{Fe}^{\text{I}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ im pH-Bereich zwischen 5 und 10 erhielt, wurden die niedrigen g-Faktoren durch die Bildung der Fe(I)-Komplexe erklärt. Diese Deutung scheint jedoch nicht voll gesichert zu sein. Zu beachten ist, daß durch die polarographische Reduktion des $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ zum $[\text{Fe}^{\text{I}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ die ESR-Spektren mit $g_{\perp} = 2,0313$ und $g_{\parallel} = 2,0059$ erhalten wurden³². Bei der Reduktion der Einkristalle des $\text{Na}_2[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ durch die Bestrahlung erhielt man ebenfalls g-Werte, die größer als 2 waren ($g_{\parallel} = 2,0069$, $g_{\perp} = 2,0374$)³³. Nach neuesten Ergebnissen⁴³ scheinen die g-Faktoren, die kleiner als 2 sind, mit der Bindung des Eisens an Schwefelatome zusammenzuhängen, was auch z. T. theoretisch belegt wurde.

Die den Kupfer enthaltenden biochemischen Komplexe sind im Falle der Cu(II)-Komplexe paramagnetisch und lassen sich mit der ESR gut nachweisen. Die Cu(I)-Komplexe haben dagegen kein ungepaartes Elektron am Kupferatom und geben daher keine ESR-Absorption. Die Cu(II)-Komplexe der Porphyrine, des Tetraphenylporphyrins, des Phthalocyanins und des Chlorophylls gehören heute zu den bestuntersuchten biochemischen Komplexen (s. Lit. 1). Einige für die Enzymologie interessante und mit der ESR gemessene Kupferkomplexe sind in der Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV. Biochemische Kupferkomplexe

Laccase	Lit. 1, Zitate 443, 444, 497, 498 L. BROMAN, B. G. MALMSTRÖM, R. AASA und T. VÄNNGÅRD ^{34, 35}
Cytochromoxydase	Lit. 1, Zitate 585, 214 H. E. BEINERT, D. E. GRIFFITH, D. C. WHARTON und R. H. SANDS ³⁶ M. MORRISON, S. HORIE und H. S. MASON ³⁷ N. ATHERTON, Q. H. GIBSON und C. GREENWOOD ³⁸
Coeruloplasmin	Lit. 1, Zitat 444 H. E. BEINERT, D. E. GRIFFITH, D. C. WHARTON und D. H. SANDS ³⁶ C. B. KASPER, H. F. DEUTSCH und H. E. BEINERT ³⁹ T. VÄNNGÅRD und R. AASA ⁴⁰
Tyrosinase	M. FLING, N. H. HOROWITZ und S. F. HEINEMANN ⁴¹ S. BOUCHILLOUX, P. McMAHILL und H. S. MASON ⁴²
Adenosintriphosphat Hämocyanin	D. B. RUSSEL und S. J. WYARD ⁴⁴ T. NAKAMURA und H. S. MASON ⁴⁵
Azurin	L. BROMAN, B. G. MALMSTRÖM, R. AASA und T. VÄNNGÅRD ³⁵ H. S. MASON ⁴⁶
Protein von Pseudomonas Monoamin-Oxydase	H. YAMADA, K. T. YASUNOBU, T. YAMANO und H. S. MASON ⁴⁷
Dopamin- β -Hydroxylase	W. E. BLUMBERG, M. GOLDSTEIN, E. LAUBER und J. PEISACH ⁴⁸

Die Identifizierung des Cu(II)-Ions in unbekannten Biochemikalien aus dem g-Faktor ist mit einiger Unsicherheit verbunden. Die typischen g-Faktoren der Cu(II)-Komplexe liegen zwar oft bei $g_{\perp} = 2,2$ und $g_{\parallel} = 2,04$, aber es gibt noch andere paramagnetische Übergangselemente mit ähnlichen g-Faktoren. Immerhin konnte die in ATP gefundene ESR-Linie durch den Vergleich mit dem ESR-Spektrum des Cu(II)-Phthalocyanins als von den Cu(II)-Ionen stammende Verunreinigung identifiziert werden⁴⁴. In einigen Fällen ist die Identifizierung des vermutlichen Cu(II)-Ions durch die Hyperfeinstruktur möglich. Das Kupfer zeigt unter günstigen Versuchsbedingungen infolge des Kernspins $I = 3/2$ für ⁶³Cu und ⁶⁵Cu vier Hfs-Linien. ⁵⁶Fe hat dagegen wegen $I = 0$ keine Hfs, ⁵⁵Mn wegen $I = 5/2$ sechs Linien, ⁵⁹Co wegen $I = 7/2$ acht Linien usw. Die vier Hfs-Linien des Kupfers sind auch in polykristallinen Proben oft gut aufgelöst. Man konnte z. B. im Falle der Laccase (Tabelle IV) die vom Kupferkern stammende Hfs erhalten. Mit zunehmender Denaturierung der Laccase kam die Hfs deutlicher heraus, bevor noch andere Effekte als Folge der Denaturierung beobachtet wurden³⁴.

Keine ESR-Signale von kupferhaltigen Enzymen wurden im Falle des einwertigen Kupfers z. B. bei Tyrosinase erhalten. Auch im Hämocyanin konnte die umstrittene Wertigkeit des Kupfers zugunsten des Cu⁺ mit der ESR-Spektroskopie entschieden werden.

Beim Wertigkeitswechsel Cu(II) → Cu(I) verschwindet das ESR-Signal. So schließt man aus dem Verschwinden des ESR-Signals bei der katalytischen Wirkung der Laccase auf Catechin auf den Valenzwechsel des Kupfers

(Lit. 1, S. 129). Auch kinetische Studien am Ceruloplasmin ergaben die Reduktion des Cu(II) zum Cu(I) durch das Substrat und die erneute Reoxydation durch den Sauerstoff³⁵.

In der Xanthinoxidase konnte mit der ESR-Spektroskopie das Molybdän gemessen werden. Die Xanthinoxidase enthält jedoch neben Molybdän noch Eisen unbekannter Wertigkeit. Zur Identifizierung des Molybdäns müßte man sechs schwache Hfs-Linien nachweisen, die von den natürlich vorkommenden stabilen Isotopen ^{95}Mo ($I=5/2$, natürliche Konzentration 15,78%) und ^{97}Mo ($I=5/2$, natürliche Konzentration 9,60%) herühren. In älteren Arbeiten wurden sie mangels der Empfindlichkeit der Spektrometer noch nicht gefunden (Lit. 1, Zit. 121, 122, 699 sowie Lit. 49). In einer neueren Arbeit konnte H. E. BEINERT¹⁰ die Hfs in den während der Reaktion der Xanthinoxidase mit dem Xanthin bei pH 9,6 eingefrorenen Lösungen nachweisen. Hier handelt es sich wahrscheinlich um einen Mo(V)-Komplex. Die bei der Xanthinoxidase angewandte Technik ist bezeichnend für die Anwendung der ESR in der Biochemie. Die Lösungen, z. B. der Xanthinoxidase und des Xanthins, wurden durch die sogenannte Durchflußtechnik unmittelbar vor der Messung gemischt und dann in einer Zeit zwischen 1 und 8 msec eingefroren. Durch schnelles Einfrieren konnten die Reaktionen gestoppt werden. Die Wichtigkeit des schnellen Einfrierens wird z. B. in der Arbeit¹⁰ demonstriert, in der völlig verschiedene ESR-Spektren bei Einfrieren 0,026 sec und 1,4 sec nach der Mischung des Enzyms mit dem Substrat erhalten wurden.

III. Freie Radikale und Charge-Transfer-Komplexe

Ein freies Radikal ist ein durch geeignete Modifikation aus einem normalen Molekül mit gerader Elektronenzahl entstandenes Molekül mit einem ungepaarten Elektron. Gewöhnlich ist die Bindungsstruktur mit einem ungepaarten Elektron weniger stabil als die normale Bindungsstruktur mit gepaarten Elektronen. Die Stabilität der freien Radikale kann jedoch z. B. durch die ebene Struktur des Moleküls begünstigt werden, da hierbei durch die Wechselwirkung der π -Elektronen Resonanzenergie gewonnen wird. Der beachtliche Gewinn an Resonanzenergie wurde z. B. von E. HÜCKEL⁵⁰ im Falle des relativ stabilen Radikals Triphenylmethyl theoretisch berechnet. Solche günstigen Bedingungen sind in biochemischen Systemen nur selten zu finden. Die meisten biochemischen Radikale in der flüssigen Phase sind daher sehr kurzlebig.

Zur Messung der kurzlebigen Radikale mit der ESR wurden in den letzten Jahren verschiedene Verfahren entwickelt. Bei der sogenannten Durchflußtechnik werden die Reaktionspartner unmittelbar vor dem Meßresonator des ESR-Spektrometers gemischt und während der ablaufenden Reaktion durch den Resonator geschickt^{51, 52, 53}. Zur Verlängerung der Lebensdauer der

Radikale werden oft die Lösungen unmittelbar nach dem Mischen eingefroren⁵³, um die Reaktion zu stoppen bzw. zu verlangsamen. In wäßrigen Lösungen wird außerdem noch die Empfindlichkeit der Messungen erhöht, da Wasser und andere stark polarisierbare Flüssigkeiten im nichteingefrorenen Zustand zu starken Verlusten der Mikrowellenenergie führen.

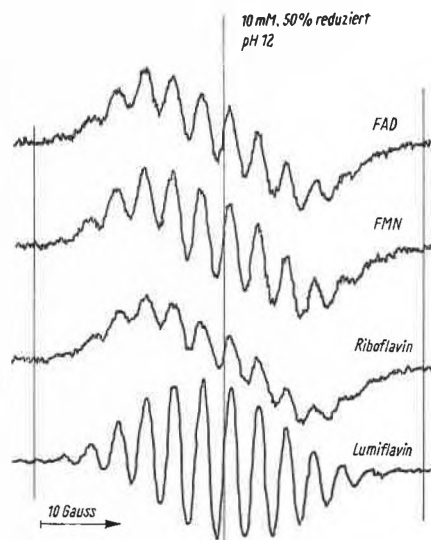


Abb. 4. Die ESR-Spektren der verschiedenen, mit Thiosulfat reduzierten Isoalloxazin-Abkömmlinge zeigen eine aus vielen Linien bestehende Hyperfeinstruktur, deren Ursprung inzwischen weitgehend geklärt ist⁸.

Besonders groß ist die Zahl der mit der ESR untersuchten Radikale, die durch Reduktion oder durch Oxydation von Biochemikalien erzeugt werden¹. Zu den bestuntersuchten Substanzen gehören hier das reduzierte Riboflavin und andere Isoalloxazin-Abkömmlinge. Die Reduktion erfolgt entweder durch Thiosulfat^{54, 55}, durch metallisches Aluminium⁵⁶ oder durch die elektrolytische Reduktion⁵⁶. Die ESR-Spektren zeigen hierbei eine Hyperfeinstruktur, die auf der Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit den verschiedenen Atomkernen im Molekül beruht (Abb. 4). Eine Aufklärung der Hyperfeinstruktur gelang zuerst GUZZO und TOLLIN⁵⁶, die fanden, daß das ungepaarte Elektron am meisten am Stickstoffkern in Position 10 lokalisiert ist, wodurch eine isotrope Hfs-Aufspaltung von 7 Gauß resultiert. Am Stickstoffkern in Position 9 und an Protonen ist das ungepaarte Elektron nur zur Hälfte lokalisiert und führt zur Aufspaltung der Hfs von 3,5 Gauß. ERIKSON und EHRENBURG⁵⁵ sicherten und erweiterten diese Ergebnisse durch die Berechnung des ESR-Spektrums für Lumiflavin mit Hilfe einer elektronischen Rechenmaschine.

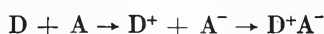
Eines der Beispiele für die Erzeugung der Radikale durch Oxydation ist in der Arbeit von D. C. BORG⁵⁷ gegeben. Mit der Durchflußtechnik werden hier z. T. in 3 Sekunden ESR-Spektren von Radikalen registriert, die durch die Oxydation des Epinephrins, Adrenochroms, Insulins, der Östrogene und verschiedener anderer

Hormone entstanden waren. Die Radikale waren sehr kurzlebig, weshalb eine besonders schnelle Durchflußtechnik angewandt werden mußte⁵⁸.

Die langlebigen Radikale kommen in der flüssigen Phase sehr selten vor, dagegen häufiger in der festen Phase infolge stark behinderter Rekombination. Zu den langlebigen Radikalen gehört z.B. das Melanin, welches in der Haut, in Haaren oder in anderen tierischen und menschlichen Organen vorkommt. Auch bestrahlte feste Biochemikalien geben Radikale, die monate- oder jahrelang stabil bleiben.

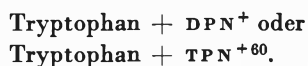
Eine wesentliche Erhöhung der Stabilität und damit der Lebensdauer der freien Radikale ist bei der Bildung der molekularen Charge-Transfer-Komplexe (künftig als CT-Komplexe bezeichnet) zu erwarten. Ein großer Teil der Radikale in biochemischen Systemen ist durch die Bildung der CT-Komplexe stabilisiert.

Die CT-Komplexe sind Komplexe zwischen zwei Molekülen, von denen eines ein Elektronendonator, das andere ein Elektronenakzeptor ist. Sie werden daher auch als Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplexe oder EDA-Komplexe bezeichnet. Die Moleküle in einem CT-Komplex werden durch die van der Waals'schen Kräfte, aber insbesondere durch die infolge der Elektronenübertragung

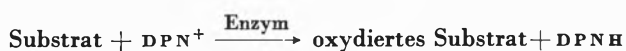


ins Spiel kommenden Coulombschen Kräfte und Elektronenaustauschkräfte zusammengehalten.

Die Theorie der CT-Komplexe wurde von MULLIKEN⁵⁹ entwickelt. Gute Elektronendonatoren zeichnen sich aus durch niedriges Ionisationspotential, so z.B. Benzol und alle Polyzyklen. Aber auch Alkohole, Äther, Amine und unter Umständen sogar Kohlenwasserstoffe können Elektronendonatoren sein. Viele biologisch wichtige Substrate sind Elektronendonatoren. Gute Elektronenakzeptoren sind Moleküle mit relativ großer Elektronenaffinität. Dazu gehören z.B. aromatische Kohlenwasserstoffe mit elektrophilen Substituenten, Halogenchinone, Nitrobenzole, Nitrile, Anhydride usw. Von biologisch wichtigen Substanzen sind Riboflavin, DPN⁺, aber auch Sauerstoff gute Elektronenakzeptoren. So bildet der biologische Elektronenakzeptor DPN⁺ oder TPN⁺ mit vielen Substraten CT-Komplexe, die ESR-Signale geben, z.B.



Zahlreiche mit der ESR-Spektroskopie gemessene freie Radikale bei enzymatischen Prozessen



(s. Lit. 1, Tab. 13, S. 118) werden anscheinend durch die Bildung der CT-Komplexe stabilisiert. HOLLOCHER⁶¹ zeigte durch Messungen der Temperaturabhängigkeit der Linienintensität der ESR-Spektren von DPNH-Glycylglycin-Cytochromreduktase, daß infolge der Abweichung der Linienintensität vom $1/T$ -Gesetz eine Bil-

dung der CT-Komplexe vorliegen müßte. Die Temperaturabhängigkeit der Linienintensität entsprach hier dem von BIJL, KAINER und ROSE-INNES⁶² gegebenen Verlauf für die CT-Komplexe. In diesen und anderen Arbeiten sprechen die Autoren im Falle der CT-Radikale von Biradikalen, ausgehend von dem Gedanken, daß bei der Elektronendelokalisation am Donator ein Elektron fehlt und am Akzeptor ein Elektron zu viel ist. Ob man in diesem Falle von Biradikalen sprechen kann, ist umstritten. Ein Biradikal wäre bewiesen, wenn man statt des für freie Radikale typischen magnetischen Moments von etwa $1,73 \mu_B$ das magnetische Moment für ein Biradikal, nach der Theorie $\sqrt{6} = 2,45 \mu_B$, messen würde. Bei intermolekularem Abstand zwischen den beiden Molekülen in einem CT-Komplex von 2,8 Å bis 3,5 Å müßte man auch im Falle zweier Elektronen eine elektrische Dipol-Dipol-Wechselwirkung erwarten, die zu einer erheblichen Verbreiterung der ESR-Linien führen würde. Statt dessen wurden meist schmale Linien gefunden.

Die ESR-Signale, die beim Hinzufügen verschiedener Inhibitoren (Phenazinmethosulfat, Streptonigrin, Rubiflavin) zu den Bakteriensuspensionen beobachtet wurden⁶³, werden wahrscheinlich ebenfalls durch die Bildung der CT-Komplexe stabilisiert.

CT-Komplexe verschiedener Purin- und Pyrimidinbasen mit dem Chloranil untersuchten optisch SLIFKIN⁶⁴ und mit der ESR-Spektroskopie DUCHESNE u.a.⁶⁵.

Riboflavin und andere Flavine, einschließlich Flavin-Enzyme sind gute Elektronenakzeptoren. CT-Komplexe des Flavinmononucleotids (FMN) mit Serotonin oder mit Tryptophan wurden von ISENBERG, SZENT-GYÖRGYI und BAIRD⁶⁶ gemessen. Iodkomplexe des Riboflavins und des Lumiflavins untersuchten FLEISCHMANN und TOLLIN⁶⁷.

CT-Komplexe spielen eine wesentliche Rolle bei biochemischen Prozessen, insbesondere bei Elektronenübertragung^{68, 69}.

IV. Triplettzustände

Die Untersuchung der Triplettzustände mit der ESR-Spektroskopie steht zur Zeit im Mittelpunkt des Interesses. Moleküle im Triplettzustand haben zwei ungepaarte Elektronen, deren Spins im Magnetfeld gleichgerichtet sind. Während bei Radikalen die Spinquantenzahl $S=1/2$ ist, hat man bei Molekülen im Triplettzustand $S=1$. Die beiden ungepaarten Elektronen stehen in magnetischer Dipol-Dipol-Wechselwirkung miteinander, die stark anisotrop ist, weshalb in polykristallinen Proben die ESR-Linien stark verbreitert sind, so daß man mitunter den Triplettzustand nicht nachweisen kann. Die wichtigsten Ergebnisse über die Triplettzustände wurden daher an Einkristallen erhalten. Aber auch in eingefrorenen Lösungen konnten in vielen Fällen brauchbare ESR-Spektren gemessen werden. Typisch und für den Nachweis der Triplettzustände sehr wesentlich ist eine Linie bei etwa halber Feldstärke als die nor-

male ESR-Resonanz. Sie stammt vom verbotenen Übergang $\Delta m = 2$ und ist daher meist sehr schwach, dennoch in vielen Fällen noch nachweisbar. Ein Überblick über die Theorie der Triplettzustände ist an verschiedenen Stellen gegeben worden, z. B. bei ^{70, 75}.

Die durch uv-Strahlen angeregten Triplettzustände des Tryptophans, Phenylalanins und des Tyrosins wurden von DOUZOU und PTAK ⁷¹ gemessen. SMALLER ⁷² untersuchte neben vielen anderen aromatischen Verbindungen auch die biochemisch interessanten Riboflavin, 3,4-Benzpyren, Tryptophan und Mg-Phthalocyanin. Die Triplettzustände des Uracils, Thymidins, Cytosins u. a. Pyrimidine wurden von HAUG und DOUZOU ⁷⁴ gemessen.

Die Bedeutung der Triplettzustände für die Biochemie liegt darin, daß über Triplettzustände der Energietransport erfolgen kann. Hierfür kommen insbesondere die CT-Komplexe in Frage. Im CT-Komplex aus Phenanthren und Naphthalin konnte der Energietransport in sehr eleganter Weise nachgewiesen werden ⁷⁵. Die $\Delta m = 2$ ESR-Linien liegen bei beiden Substanzen an verschiedenen Stellen. Regte man nun den Triplettzustand des Phenanthrens durch eine kurzzeitige Belichtung an, so konnte man unmittelbar nach der Entstehung der Linie des Phenanthrens ihre Abnahme und gleichzeitig die Zunahme der Linie des Naphthalins beobachten.

Im kristallinen Zustand ist auch der Energietransport durch Triplettexcitonen möglich. Der wichtigste Mechanismus ist hierbei der quantenmechanische Elektronenaustausch. Der Elektronenaustausch erfolgt so schnell, daß die Anisotropie der Hyperfeinstruktur oder gar der Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Elektronen ausgemittelt wird. Triplettexcitonen geben daher auch in polykristallinen Proben meist sehr schmale Linien. Solche Linien konnten z. B. im polykristallinen CT-Komplex aus Thymin und Chloranil ⁷⁶ nachgewiesen werden.

Die Arbeiten über den Energietransport durch Triplettexcitonen sind erst am Anfang, aber man widmet diesem Problem in der letzten Zeit große Aufmerksamkeit.

Schrifttum

1. G. SCHOFFA, *Elektronenspinresonanz in der Biologie*, Verlag Braun, Karlsruhe 1964.
2. *Free Radicals in Biological Systems*, herausgegeben von M. S. BLOIS, Academic Press 1961.
3. Application à la Biochimie et à la Chimie Structurale de la Spectroscopie des Radiofréquences, *Compte Rendu du Colloque à Bruxelles, 1961*, Brüssel, Palais des Académies, Rue Ducale 1.
4. M. S. BLOIS und E. C. WEAVER, Electron Spin Resonance and its Application to Photophysiology, in *Photophysiology*, Band 1, herausgegeben von A. C. GIESE, Academic Press, New York 1964.
5. TH. CASTNER jr., G. S. NEWELL, W. C. HOLTON und C. P. SLICHTER, *J. Chem. Physics* 32 (1960) 668.
6. G. SCHOFFA, *Nature* 203 (1964) 640.
7. A. EHRENBURG, *Ark. Kemi* 19 (1962) 119.
8. A. EHRENBURG, *Ark. Kemi* 19 (1962) 97.
9. Y. MORITA und H. S. MASON, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 2654.
10. G. PALMER, R. C. BRAY und H. E. BEINERT, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2657, 2667.
11. T. NAKAZAWA, Y. KOJIMA, H. FUJISAWA, M. NOZAKI und O. HAYASHI, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) PC3225.
12. R. AASA, B. G. MALMSTRÖM, P. SALTMAN und T. VÄNNGARD, *Biochim. Biophys. Acta* 75 (1963) 203.
13. H. H. WICKMAN, M. P. KLEIN und D. A. SHIRLEY, *J. Chem. Physics* 42 (1965) 2113.
14. R. AASA, B. G. MALMSTRÖM, P. SALTMAN und T. VÄNNGARD, *Biochim. Biophys. Acta* 80 (1964) 430.
15. W. E. BLUMBERG, M. GOLDSTEIN, E. LAUBER und J. PEISACH, *Biochim. Biophys. Acta* 99 (1965) 187.
16. H. E. BEINERT und R. H. SANDS, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1 (1959) 171.
17. H. E. BEINERT und G. PALMER, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 475.
18. H. E. BEINERT und R. H. SANDS, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3 (1960) 41.
19. R. H. SANDS und H. E. BEINERT, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3 (1960) 47.
20. H. REIN und O. RISTAU, *Biochim. Biophys. Acta* 94 (1965) 516.
21. H. REIN, O. RISTAU und F. JUNG, *Z. physik. Chem.* 228 (1965) 102.
22. A. EHRENBURG, *Z. naturwiss.-med. Grundlagenforsch.* 2 (1965) 203.
23. A. EHRENBURG und M. D. KAMEN, *Biochim. Biophys. Acta* 102 (1965) 333.
24. A. HAYASHI, A. SHIMIZU, Y. YAMAMURA und H. WATARI, *Biochim. Biophys. Acta* 102 (1965) 626.
25. J. F. GIBSON und D. J. E. INGRAM, *Nature* 180 (1957) 29.
26. J. S. GRIFFITH in *Molecular Biophysics*, herausgegeben von B. PULLMAN und M. WEISSBLUTH, Academic Press, New York 1965, S. 191.
27. G. SCHOFFA, W. SCHELER, O. RISTAU und F. JUNG, *Acta Biol. Med. Germ.* 3 (1959) 65.
28. F. JUNG, G. SCHOFFA, O. RISTAU und W. SCHELER, *Naturwiss.* 46 (1959) 317.
29. Y. I. SHETHNA, P. W. WILSON, R. E. HANSEN und H. E. BEINERT, *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)* 52 (1964) 1263.
30. H. E. BEINERT, G. PALMER, T. CREMONA und TH. P. SINGER, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 475.
31. G. PALMER und R. H. SANDS, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 253.
32. D. A. MCNEIL, J. B. RAYNOR und M. C. R. SYMONS, *J. Chem. Soc.* 1965, 410.
33. J. DANON, R. P. A. MUNITZ und H. PANEPUCCI, *J. Chem. Physics* 41 (1964) 3651.
34. L. BROMAN, B. G. MALMSTRÖM, R. AASA und T. VÄNNGARD, *J. Mol. Biol.* 5 (1962) 301.
35. L. BROMAN, B. G. MALMSTRÖM, R. AASA und T. VÄNNGARD, *Biochim. Biophys. Acta* 75 (1963) 365.
36. H. E. BEINERT, D. E. GRIFFITH, D. C. WHARTON und R. H. SANDS, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 2337.
37. M. MORRISON, S. HORIE und H. S. MASON, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 2220.
38. N. ATHERTON, Q. H. GIBSON und C. GREENWOOD, *Biochem. J.* 86 (1963) 554.
39. C. B. KASPER, H. F. DEUTSCH und H. E. BEINERT, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 2338.
40. T. VÄNNGARD und R. AASA, in *Proceedings of the 1st International Conference, Jerusalem, 1962*.
41. M. FLING, N. H. HOROWITZ und S. F. HEINEMANN, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 2045.
42. S. BOUCHILLOUX, P. MCMAHILL und H. S. MASON, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1699.
43. H. BRINTZINGER, G. PALMER und R. H. SANDS, *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)* 55 (1966) 397.
44. D. B. RUSSEL und S. J. WYARD, *Nature* 191 (1961) 65.
45. T. NAKAMURA und H. S. MASON, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3 (1960) 297.
46. H. S. MASON, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10 (1963) 11.
47. H. YAMADA, K. T. YASUNOBU, T. YAMANO und H. S. MASON, *Nature* 198 (1963) 1092.
48. W. E. BLUMBERG, M. GOLDSTEIN, E. LAUBER und J. PEISACH, *Biochim. Biophys. Acta* 99 (1965) 187.
49. R. C. BRAY, R. PETTERSSON und A. EHRENBURG, *Biochem. J.* 81 (1961) 178.
50. E. HÜCKEL, *Z. Physik* 83 (1933) 632.
51. A. S. BRILL, in *Lit.* 2, S. 53.
52. B. CHANCE, in *Techniques of Organic Chemistry*, Vol. 8, Kap. 10, Wiley & Sons, New York 1953.
53. L. H. PIETTE, in *NMR & EPR Spectroscopy*, Kap. 17, Pergamon Press, New York 1960.
54. A. EHRENBURG, L. E. GÖRAN ERIKSON, *Arch. Biochem. Biophys.* 105 (1964) 453.
55. L. E. GÖRAN ERIKSON und A. EHRENBURG, *Arch. Biochem. Biophys.* 110 (1965) 628.

56. A.V. GUZZO und G. TOLLIN, *Arch. Biochem. Biophys.* 105 (1964) 380.
57. D. C. BORG, *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)* 53 (1965) 633 und 829.
58. D. C. BORG, *Nature* 201 (1964) 1087.
59. R. S. MULLIKEN, *J. Amer. Chem. Soc.* 72 (1950) 600, *J. Chem. Physics* 19 (1951) 514, *J. Physic. Chem.* 56 (1952) 801.
60. I. ISENBERG und A. SZENT-GYÖRGYI, *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)* 45 (1959) 1229.
61. T. C. HOLLOCHER, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 491.
62. D. BIJL, H. KAINER und A. C. ROSE-INNES, *J. Chem. Physics* 30 (1959) 765.
63. J. R. WHITE und H. H. DERMAN, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 54 (1965) 887.
64. M. A. SLIFKIN, *Biochim. Biophys. Acta* 103 (1965) 365.
65. J. DUCHESNE, P. MACHMER und M. READ, *C. R. Acad. Sci.* 260 (1965) 2081.
66. I. ISENBERG, A. SZENT-GYÖRGYI und S. L. BAIRD jr., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46 (1960) 1307.
67. D. E. FLEISCHMANN und G. TOLLIN, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53 (1965) 237.
68. A. SZENT-GYÖRGYI, *Bioenergetics*, Academic Press, New York 1957.
69. A. SZENT-GYÖRGYI, in *Lit.* 3, S. 162.
70. J. H. VAN DER WAALS und M. S. DE GROOT, *J. Chim. Physique* 1964, S. 1643.
71. P. DOUZOU und M. PTAK, *J. Chim. Physique* 1964, S. 1681.
72. B. SMALLER und J. REMKO, *J. Chem. Physics* 37 (1962) 1578.
73. B. SMALLER und J. REMKO, *N.R.C. Organic Crystal Symposium, Ottawa, Canada*, 10–12 (1962) 163.
74. A. HAUG und P. DOUZOU, *Z. Naturforsch.* 20b (1965) 509.
75. B. SMALLER in *Advances of Biological and Medical Physics*, Vol. 9, Academic Press, New York 1963, S. 225.
76. G. SCHOFFA, unveröffentlicht.