

Strålingsinduserte radikaler i enkrystaller av L-arginin monofosfat monohydrat ved 295 K og 77 K

*En modell for studier av ladningstransport i DNA-
proteinkomplekser ved Elektron Magnetisk Resonans
spektroskopi og DFT beregninger*

Bård Olsen



Masteroppgave i fysikk

Biofysikk og medisinsk fysikk, Fysisk Institutt

Universitetet i Oslo

Januar 2008

”De som aldri har gjort en feil, har aldri prøvd noe nytt.”

- Albert Einstein

Forord

Denne masteroppgaven er utført de siste to årene ved EPR-laboratoriet ved gruppa for biofysikk og medisinsk fysikk, Fysisk Institutt, Universitetet i Oslo. Jeg vil aller først få takke min hovedveileder professor Einar Sagstuen og medveileder professor Eli Olaus Hole for god og inspirerende veiledning gjennom hele masterstudiet. En spesiell takk for åpne kontordører og for alltid å ha vært tilgjengelige, særlig når EPR-spektrometeret ikke har vært på min side.

Jeg vil også takke alle andre som på ulike måter har hjulpet meg i forbindelse med masteroppgaven. Senioringeniør Dirk Petersen (Kjemisk Institutt, UiO) takkes for å eksperimentelt ha fremskaffet de NMR-spektrene jeg i oppgaven har fått bruk for. En stor takk rettes også alle studenter og ansatte ved gruppa for biofysikk og medisinsk fysikk for to veldig hyggelige år.

Til slutt vil jeg få takke min kjære Karina for mye tålmodighet og omtanke. Og helt avslutningsvis vil jeg også takke min nå over fem år gamle bærbare datamaskin for enda ikke å ha gått av med pensjon, men stått på sammen med meg hele løpet ut. Takk!

Blindern, 15. januar 2008,

Bård Olsen.

Sammendrag

I celler pakkes DNA-molekylet tett sammen rundt flere ulike proteiner, de såkalte histonene. Det er av interesse å kartlegge hvorledes denne nære kontakten mellom DNA og proteiner påvirker strålingsresponsen til DNA. DNA holdes på plass rundt histonene blant annet ved hjelp av hydrogenbindinger mellom fosfatgruppa i DNA-tråden og sidekjeden til aminosyra L-arginin. Enkrystaller av L-arginin monofosfat monohydrat (LAP) er i så henseende et interessant modellsystem idet dette er et velordnet system som består av hydrogenbundne komplekser av L-arginin, en fosfatgruppe og vann. Enkrystaller av LAP ble bestrålt med røntgenstråling og undersøkt ved elektron paramagnetisk resonans spektroskopi (EPR), samt ved avledede teknikker (ENDOR, EIE). Det ble foreslått modeller for de observerte radikalerne. Disse modellene ble videre undersøkt ved hjelp av DFT-beregninger (Density Functional Theory) som ble sammenlignet med eksperimentelle data.

Ved romtemperaturbestråling ble det observert fem radikaler. To av disse ble identifisert som fosfatradikaler (RI og RII), dannet ved brudd i P – OH bindinger. Av de tre radikalene assosiert til L-arginin ble to identifisert. Det ene ble knyttet til en deaminering (RIII) og det andre til en netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden til L-arginin (RIV). I studier av LAP-krystaller bestrålt og observert ved 77 K ble det funnet minst fem radikaler. Ett av disse (LII) ble identifisert som et radikal dannet ved en dekarboksylering av karboksylgruppa i L-arginin. Ved oppvarming av 77 K-bestrålte krystaller til 240 K forsvant resonanslinjene til LII. Det ble foreslått at dekarboksyleringsradikalet ledet til et radikal, analogt til RIV, dannet ved en netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden. Lavtemperaturredikalalet som LIII representerer ble antatt å ha den samme radikalstrukturen som RIV som også er dannet ved en netto hydrogenabstraksjon i L-arginins sidekjede. For LIII er det imidlertid foreslått at prosessen er en direkte dehydrogenering. Radikal LI, som gav opphav til de klart mest intense resonanslinjene i EPR-spektrene, så fra oppvarmingseksperimentene ut til å være opphavsradikalet til RIII. Det ble i analysen antatt at LI var et karboksylanion, men dette har ikke latt seg stadfeste med sikkerhet. For de to andre radikalene (LIV og LV) som ble observert i 77 K-bestrålte LAP-krystaller kunne det ikke etableres radikalmodeller da det bare fantes svært begrensede eksperimentelle data for LIV og LV. Fosfatradikaler ble ikke observert ved lavtemperaturbestråling, men disse fremkom ved oppvarming. Det ble antatt at opphavsradikalet til fosfatradikalene RI og RII er et (foreløpig ukjent) radikal assosiert til L-arginin som gjennom en sekundær radikalreaksjon avspalter et hydrogenatom. Dette synes så å angripe fosfatgruppen på to ulike posisjoner, noe som leder til en avspaltning av vann og de to fosfatradikalene RI og RII.

Innhold

1. INNLEDNING	11
1.1 IONISERENDE STRÅLING	11
1.2 DNA	13
1.3 HVORFOR ELEKTRON MAGNETISK RESONANS?	15
1.4 TIDLIGERE STUDIER AV LADNINGSTRANSPORT I DNA-PROTEINKOMPLEKSER	15
1.5 L-ARGININ MONOFOSFAT MONOHYDRAT	16
1.6 MÅLET MED MASTEROPPGAVEN	17
2. KORTFATTET EPR-TEORI	19
2.1 GRUNNLEGGENDE EPR.....	19
2.2 ENSLIGE ELEKTRONER I MOLEKYLER.....	23
2.2.1 Elektron-Zeemann \hat{H}_{Zee}	23
2.2.2 Kjerne-Zeemann \hat{H}_{N-Zee}	24
2.2.3 Hyperfinkobling \hat{H}_{hf}	24
2.3 EPR/ENDOR/EIE-EKSPERIMENT	25
2.3.1 EPR-eksperiment	27
2.3.2 ENDOR-eksperiment	27
2.3.3 EIE-eksperiment	28
3. MATERIALER OG METODER.....	31
3.1 RØNTGENDIFFRAKSJON	31
3.2 KRYSTALLER	33
3.2.1 Krystallstruktur.....	33
3.2.2 Krystallgroing.....	35
3.2.3 NMR-studier av hydrogen/deuterium utskiftbarhet i LAP.....	37
3.3 PREPARERING AV PRØVENE.....	41
3.3.1 Bestråling.....	41

3.3.2	<i>Montering</i>	42
3.4	ESR/ENDOR/EIE-EKSPERIMENT	43
3.4.1	<i>EPR-spektrometeret</i>	43
3.4.2	<i>Parametre og apparatur for EPR/ENDOR/EIE</i>	44
3.5	ETABLERINGEN AV TENSORER	46
3.5.1	<i>Et enkrystall-eksperiment</i>	46
3.5.2	<i>Sitesplitting og Schonlands tvetydighet</i>	46
3.5.3	<i>Tensorberegninger</i>	47
3.6	RADIKALIDENTIFIKASJON	48
3.6.1	<i>α-kobling</i>	49
3.6.2	<i>β-kobling</i>	50
3.6.3	<i>Sentralkobling</i>	50
3.7	DENSITY FUNCTIONAL THEORY (DFT).....	51
4.	RESULTATER OG ANALYSE AV ROMTEMPERATURSTUDIET	55
4.1	INNLEDENDE OBSERVASJONER.....	55
4.1.1	<i>Deuterte kontra ikke-deuterte krystaller</i>	55
4.1.2	<i>EPR-spektre ved ulik mikrobølgeeffekt</i>	57
4.2	SCHONLANDTVETYDIGHETEN	57
4.3	SIDERESONANSENE.....	58
4.3.1	<i>EPR-spektre av sideresonansene</i>	58
4.3.2	<i>Analyse av sideresonansene</i>	59
4.3.3	<i>Radikalene RI og RII</i>	61
4.4	SENTRALRESONANSENE	63
4.4.1	<i>EPR-spektre av sentralresonansene</i>	63
4.4.2	<i>ENDOR og EIE av sentralresonansene</i>	64
4.4.3	<i>Radikal RIII</i>	68
4.4.4	<i>DFT-beregninger på RIII</i>	71
4.4.5	<i>Simuleringer av RIII</i>	74

4.4.6	<i>Radikal RIV</i>	75
4.4.7	<i>DFT-beregninger på RIV</i>	78
4.4.8	<i>Simuleringer av RIV</i>	80
4.4.9	<i>Radikal RV</i>	82
4.4.10	<i>Simulerte EPR-spektre av romtemperaturradikalene</i>	84
5.	RESULTATER OG ANALYSE AV LAVTEMPERATURSTUDIET	87
5.1	MANGLENDE FOSFATRADIKALER – FUNN AV FORURENSNINGER	87
5.2	SENTRALRESONANSENE	91
5.2.1	<i>EPR-spektre av sentralresonansene</i>	91
5.2.2	<i>ENDOR og EIE av sentralresonansene</i>	92
5.2.3	<i>Eksperiment med deuterte krystaller</i>	97
5.2.4	<i>Radikal LI</i>	100
5.2.5	<i>DFT-beregninger på LI</i>	103
5.2.6	<i>Simulering av LI</i>	104
5.2.7	<i>Radikal LII</i>	106
5.2.8	<i>DFT-beregninger på LII</i>	108
5.2.9	<i>Simuleringer av LII</i>	110
5.2.10	<i>Radikal LIII</i>	112
5.2.11	<i>DFT-beregninger på LIII</i>	114
5.2.12	<i>Simuleringer av LIII</i>	114
5.2.13	<i>Radikal LIV</i>	115
5.2.14	<i>Radikal LV</i>	116
5.3	OPPVARMINGSEKSPERIMENTER	116
5.3.1	<i>Fosfatradikaler</i>	117
5.3.2	<i>Sentralresonansene</i>	118
6.	DISKUSJON	121
6.1	DISKUSJON AV RADIKALSTRUKTURER	122

6.1.1	<i>RI og RII – PO₃²⁻-varianter (H₂PO₃ og HPO₃⁻)</i>	122
6.1.2	<i>RIII – deaminering</i>	124
6.1.3	<i>RIV – en netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden</i>	127
6.1.4	<i>LI – karboksylanion?</i>	130
6.1.5	<i>LII – dekarboksylering</i>	135
6.1.6	<i>LIII – en netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden</i>	139
6.2	FORSLAG TIL DANNESEMEKANISMER	141
6.2.1	<i>Fosfatradikalene – RI og RII</i>	142
6.2.2	<i>Et karboksylanion som deaminerer – LI og RIII</i>	143
6.2.3	<i>Dekarboksylering som gir hydrogenabstraksjon – LII og RIVb</i>	144
6.2.4	<i>Dehydrogenering i sidekjeden – LIII og RIVa</i>	146
6.3	KONSEKVENSER FOR DNA	147
6.4	FORSLAG TIL VIDERE ARBEIDER	148
6.4.1	<i>Bestemme RV</i>	148
6.4.2	<i>Bestemme flere lavtemperaturredikaler</i>	148
6.4.3	<i>Eksperimenter ved 4 K</i>	149
6.4.4	<i>Oppvarmingseksperimenter</i>	149
6.4.5	<i>Polymolekylære DFT-beregninger</i>	149
	REFERANSER	151
	APPENDIKS	159
A	KRYSTALLOGRAFISKE DATA	159
B	LISTE OVER BENYTTETE DATAPROGRAMMER	168
C	VEDLEGG	171

1. Innledning

Få måneder etter at Wilhelm Conrad Röntgen oppdaget røntgenstrålingen høsten 1895, ble det første røntgenbilde til medisinsk bruk tatt. Röntgen mottok i 1901 den aller første Nobelprisen i fysikk for sin oppdagelse. I moderne medisin er metoder basert på røntgenstråling blant de viktigste verktøyene for diagnostikk av pasienter. Våren 1896 oppdaget Henri Becquerel radioaktiviteten. Sammen med ekteparet Curie mottok han i 1903 Nobelprisen i fysikk. Marie og Pierre Curie fikk prisen for oppdagelsen av de radioaktive stoffene polonium og radium. De biologiske effektene av både røntgenstråling og stråling fra radioaktive kilder ble man raskt klar over. Huden ble rød og sår ved bestråling over en viss tid. Man observerte også at sykt vev kunne helbredes ved å eksponere det for strålingen. Røntgenstråling ble tidlig benyttet i kreftbehandlingen og Pierre Curie nevnte allerede i sitt nobelforedrag at også radium muligens kunne brukes til å behandle kreft. I dag trenger rundt halvparten av alle kreftpasienter strålebehandling i løpet av sykdomsperioden, og da først og fremst i form av ioniserende stråling.

1.1 Ioniserende stråling

Fysisk sett er stråling en form for transport av energi uten noe transportmedium. At strålingen er ioniserende betyr at den har tilstrekkelig energi til å løsrive et elektron fra et atom eller et molekyl. Ioniserende stråling kan deles i to hovedtyper: Elektromagnetisk stråling, som røntgenstråling og gammastråling, og partikkelstråling, i form av energetiske elektroner, protoner eller andre partikler. Det er røntgenstråling som er benyttet i dette arbeidet. I dag brukes ioniserende stråling innen flere felter. Ikke minst gjelder dette innen medisin. For å kunne bruke ioniserende stråling på en mest mulig nyttig og fornuftig måte, er det viktig å vite hvordan strålingen virker på kroppens vev.

I møte med materie vil den ioniserende strålingen vekselvirke med materiens molekyler. Denne vekselvirkningen vil kunne skje på flere måter avhengig av blant annet strålingstypen, strålingens energi, samt materiens tetthet. Elektromagnetisk stråling, altså stråling i form av fotoner, vil i noen tilfeller kunne spres uten tap av energi (koherent spredning), i andre tilfeller vil den spres med tap av energi (Comptoneffekt). Fotonene kan

også fullstendig absorberes i vekselvirkningen (fotoelektrisk effekt). Energiabsorpsjonen skjer ved at fotoner overfører energi til elektroner. Denne energien går med til løsrivelse av og bevegelsesmoment for elektronene. Disse sekundærelektronene overfører så den mottatte energien videre hovedsakelig gjennom Coulombvekselvirkninger med materien. Ved høye fotonenergier på over 1,022 MeV kan vekselvirkninger med atomkjerner føre til at fotoner danner elektron-positron-par (pardannelse). Stråling i form av ladde partikler avsetter sin energi direkte i materien gjennom Coulombvekselvirkninger. [1]

Når ioniserende stråling vekselvirker med materie, vil materiens molekyler kunne skades. I tilfeller hvor et foton ($h\nu$) eller et elektron (e^-) absorberes av et molekyl (MH) vil blant annet de følgende reaksjoner være mulig:

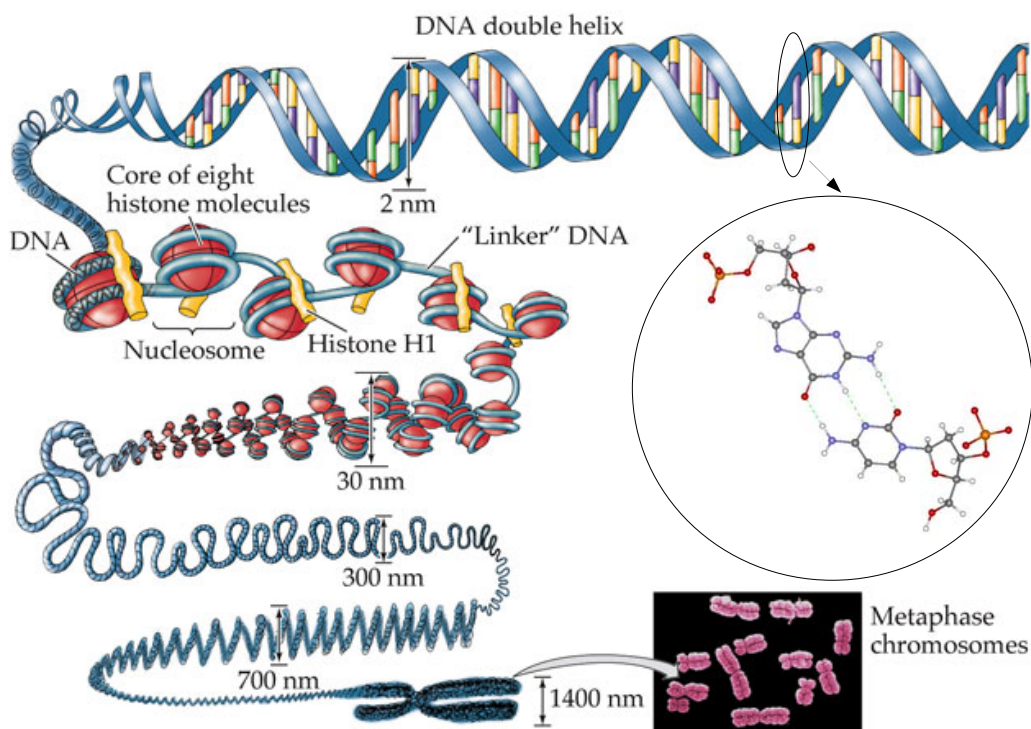
- (i) $MH + h\nu \rightarrow MH^{\bullet+} + e^-$ (Ionisering, kationdanning)
- (ii) $MH + e^- \rightarrow MH^{\bullet-}$ (Elektroninnfangning, aniondanning)
- (iii) $MH + h\nu \rightarrow MH^*, MH^{**}$ (Dannelse av eksiterte/supereksiterte tilstander)
- (iv) $MH^{\bullet+} + e^- \rightarrow MH^*, MH^{**}$ (Rekombinasjon)
- (v) $MH^{\bullet+} \rightarrow M^{\bullet} + H^+$ (Deprotonering)
- (vi) $MH^{\bullet-} + H^+ \rightarrow MH_2^{\bullet}$ (Protonering)
- (vii) $MH^{**} \rightarrow M^{\bullet} + H^{\bullet}$ (Dehydrogenering)
- (viii) $MH + H^{\bullet} \rightarrow MH_2^{\bullet}$ (Hydrogenering)
- (ix) $MH + H^{\bullet} \rightarrow M^{\bullet} + H_2$ (Dehydrogenering)

Reaksjonene (i) og (iii) beskriver en direkte vekselvirkning mellom molekyl og fotonstråling. Slike reaksjoner skjer raskt, typisk i løpet av 10^{-15} s. Prosess (i) beskriver en direkte ionisering og dannelsen av et kation-radikal. Reaksjon (iii) beskriver en eksitering/supereksitering av molekylet. I prosess (ii) fanges et spredt elektron inn av et molekyl og det dannes et anion-radikal. Radikaler er molekylære systemer hvor det finnes minst ett uparet elektron. For elektroner er det imidlertid energihensiktsmessig å opptre i par og derfor er radikaler meget reaktive. Typisk levetid for et radikal er 10^{-10} s. Kationer, anioner og også eksiterte/supereksiterte molekyler reagerer gjerne videre som vist i

prosessene iv – ix. I disse reaksjonene videreføres stråleskadene via radikaler, bortsett fra i prosess (vii) hvor et eksitert/supereksitert molekyl ved dehydrogenering, danner to radikaler.

1.2 DNA

I nyere tid har dyre- og celledforsøk vist at ioniserende stråling kan drepe* eller skape mutasjoner i celler. Mutasjoner er endringer i arvematerialet som videreføres ved celledeling. Slike endringer kan føre til utvikling av kreft. I store doser kan også ioniserende stråling være dødelig for hele organismen. Arvemolekylet DNA** er ansett for å være det viktigste målet for stråleinduserte skader i ei celle [2]. DNA-molekylet inneholder all genetisk informasjon for en organisme.



Figur 1.1: Oversikt over hvordan DNA-dobbeltheliksen kan illustreres med baseparene adenin (grønn), cytosin (gul), guanin (lilla) og tymin (rød), samt hvordan DNA pakkes rundt histoner og videre opp til kromosomer. I sirkelen er to nukleotiders strukturer illustrert. Nukleotidene er bundet til hverandre ved hydrogenbindinger (grønnstripete linjer) mellom baseparene guanin og cytosin.

* Ei celle ansees som drept dersom den har mistet muligheten til å dele seg

** Deoxyribonucleic acid (deoksyribose nukleinsyre)

DNA er et stort molekyl bestående av to sukker(deoksyribose)fosfatkjeder tvinnnet rundt hverandre i en dobbelheliks. Hvert sett av sukker-fosfat er bundet til en av basene adenin (A), cytosin (C), guanin (G) eller tymin (T) og utgjør til sammen et nukleotid. De to sukkerfosfatkjedene holdes sammen av hydrogenbindinger mellom komplementære baser, A-T og G-C, i de to kjedene [3]. Videre pakkes DNA-dobbelheliksen sammen med vannmolekyler rundt proteinmolekyler kalt histoner, som igjen kveiles opp til kromosomer. Histonene er altså proteiner, som er kjeder av aminosyrer. DNA-tråden er således i nær kontakt med flere typer aminosyrer. Blant annet holdes DNA-heliksen på plass rundt histonene ved hjelp av hydrogenbindinger til aminosyrene lysin og arginins sidekjeder [4]. Et spørsmålet som kan reises er i hvilken grad det, ved bestråling, finner sted energi-, elektron- og/eller hulltransport mellom proteinmolekylene og DNA-molekylet.



Figur 1.2: DNA-dobbelheliksen holdes på plass rundt åtte kjernehistoner ved hjelp av blant annet hydrogenbindinger til sidekjedene i lysin og arginin.

1.3 Hvorfor Elektron Magnetisk Resonans?

Elektron Magnetisk Resonans er en fellesbenedelse for EPR og metoder beslektet med EPR. EPR står for **E**lektron **P**aramagnetisk **R**esonans. Sammen med de beslektede metodene er EPR-spektroskopi en unik metode for å studere radikaler. Gjennom sin spesifikke deteksjon av uparede elektroners magnetiske momenter og deres vekselvirkninger innbyrdes og med nærliggende kjerner, kan metodene gi informasjon om radikalstrukturen. Teorien bak EPR blir grundigere behandlet i kapittel 2.

Et av kjennetegnene på ioniserende stråling er dannelsen av radikaler. EPR-spektroskopi er således en meget god metode for å studere effekten av ioniserende stråling. Radikaler har som oftest kort levetid, men i tørre stoffer og krystaller er de ofte stabilisert. For å få informasjon om hvorledes molekylene er orientert i forhold til EPR-spektrometerets ytre magnetfeltet, benyttes molekyllære enkrystaller. Slik kan radikalstrukturen kobles mot krystallstrukturen til enkrystallen og dermed er det mulig å finne ut hvor i molekylet det enslige elektronet er lokalisert og eventuelt hvilke kjerner det vekselvirker med.

Radikaler som detekteres ved romtemperatur er som oftest stabile sluttprodukter i en kjede av radikalreaksjoner. Disse reaksjonene går gjerne tregere ved lave temperaturer. Ved å kjøle ned krystallen under bestråling kan man således finne ut hva slags radikaler som er forløperne til de stabile romtemperaturradikalene. Dersom temperaturen er lav nok kan man også detektere de radikalene som først ble dannet ved bestråling.

1.4 Tidligere studier av ladningstransport i DNA-proteinkomplekser

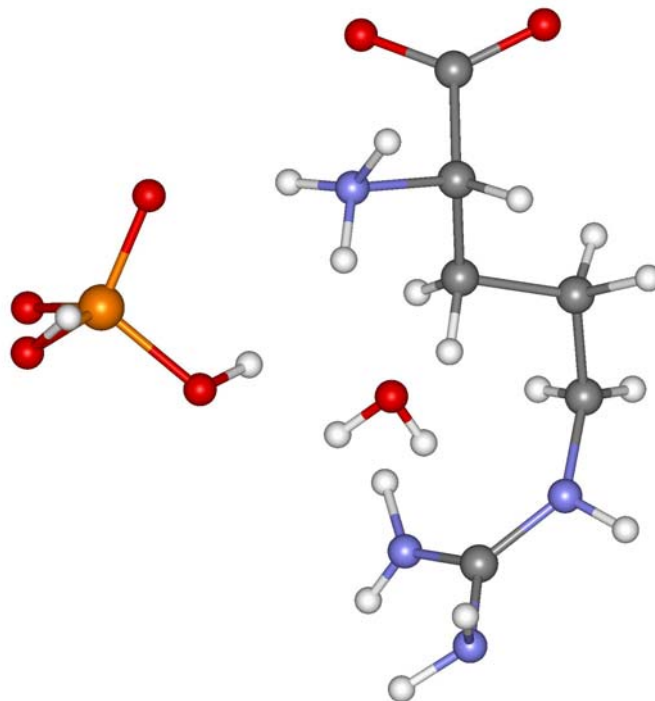
I 1961 fremsatte Alexander og medarbeidere [5] en hypotese om elektronoverføringer fra proteinkomponenter til DNA basert på EPR-studier av γ -bestrålte nukleoproteiner. Weiland og Hüttermann [6] har gjennomgått flere aktuelle arbeider, som alle konkluderer med at det skjer en energioverføring fra proteiner til DNA. De fleste studier på dette området er gjort på histoner og DNA hentet fra celler. DNA-histon-komplekser er kompliserte strukturer. Ved å studere aminosyrer og DNA-komponenter hver for seg og sammen i enklere modellsystemer, er håpet å kartlegge mulige energioverføringer mellom histoner og DNA. Viten om aminosyrenes strålingsrespons alene er viktig i en slik sammenheng. For de enklere

aminosyrene som glysin og alanin synes reaksjonsmønsteret å være godt etablert. For større aminosyrer derimot, og spesielt de med komplekse sidekjedener, er kunnskapen mangelfull både med hensyn på struktur og dannelsesmekanismer for strålingsinduserte radikaler.

Enkle modeller for undersøkelse av energioverføringer i nukleosomet er for eksempel krystaller av en aminosyre og en DNA-komponent. Det er tidligere studert slike modeller av enkle aminosyrer og nukleinbaser. Blant annet er krystaller av glysin og cytosin studert [7,8]. I naturen er det derimot mer vanlig at DNA bindes til kjernehistonene ved hydrogenbindinger mellom de positivt ladde sidekjedene til lysin og arginin, og de negativt ladde fosfatgruppene i DNA [9]. Kunnskapen om eventuelle mekanismer for ladningstransport i slike bindingene er mangelfull.

1.5 L-arginin monofosfat monohydrat

I dette arbeidet er det studert stråleskader i enkrystaller av L-arginin monofosfat monohydrat, ofte forkortet LAP. I figur 1.3 vises strukturen til LAP.



Figur 1.3: Strukturen til LAP. De hvite kulene representerer hydrogenatomer, de grå karbonatomer, de blå nitrogenatomer, de røde oksygenatomer og den oransje representerer et fosforatom.

L-arginin er en av de essensielle aminosyrene. Den består av en karbonhydrogenkjede med en aminogruppe ($-\text{NH}_3$) og en karboksylgruppe ($-\text{COO}$) i den ene enden og en guanidylgruppe ($-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)_2$) i den andre. Fosfat inngår som nevnt i nukleotidene. L-arginin har ikke tidligere vært studert. For å etablere viten om mekanismer for ladningstransport, er det viktig å ha kunnskap om radikaldannelsen i hver av de deltagende komponentene. Det at man i naturen finner lignende bindinger mellom L-arginins guanidylgruppe og fosfat [10] gjør LAP svært interessant som modell for undersøkelse av ladningstransport mellom histoner og DNA i nukleosomer.

1.6 Målet med masteroppgaven

Målet med denne masteroppgaven er å kartlegge hvilke radikaler som dannes ved røntgenbestråling av enkrystaller av LAP ved 295 K og ved 77 K. I tillegg vil det bli lagt frem forslag til dannelsesmekanismer for radikalene.

2. Kortfattet EPR-teori

I dette kapitlet gjennomgås teorien bak de eksperimentelle metodene, EPR/ENDOR/EIE* -spektroskopi, som er benyttet i denne masteroppgaven. For en dypere og mer omfattende gjennomgang henvises det til lærebøker i emnet, for eksempel N. M. Athertons "Principles of electron spin resonance" [11]. Det aller første EPR-spektrum ble rapportert i 1945 [12]. I dag brukes EPR-spektroskopi blant annet i fysikk og i biologisk og medisinsk forskning.

2.1 Grunnleggende EPR

EPR er knyttet til det faktum at elektroner og mange kjerner har spinn \mathbf{S} . Egenverdiene til spinnet $m_s = -S, \dots, S$ i heltallige stepp. For elektroner og protoner er $|\mathbf{S}| = S = 1/2\hbar$, der \hbar er Plancks konstant. Dermed er spinneigenverdiene $m_s = \pm 1/2\hbar$. Disse to tilstandene betegnes gjerne "spinn opp" ved $m_s = 1/2\hbar \Rightarrow |\uparrow\rangle = |\alpha\rangle$ og "spinn ned" ved $m_s = -1/2\hbar \Rightarrow |\downarrow\rangle = |\beta\rangle$. Innen EPR er betegnelsene \mathbf{S} for spinn og m_s for egenverdier forbeholdt elektroner, mens \mathbf{I} og m_I benyttes for protoner og andre kjerner.

Til et spinn er det knyttet et magnetisk moment $\boldsymbol{\mu}$. For elektroner er dette gitt ved:

$$\boldsymbol{\mu} = -g_e \beta \mathbf{S} \quad (2.1)$$

der \mathbf{S} er elektronspinn, g_e er g-verdien for et fritt elektron bestemt til 2,0023 [13] og β er

Bohrmagnetonet gitt ved:

$$\beta = e\hbar/2m_e \quad (2.2)$$

hvor e er elementærladningen og m_e er elektronmassen. \hbar er trukket over fra spinnoperatoren, som i det følgende blir betraktet som dimensjonsløs.

* Elektron Paramagnetisk Resonans / Elektron Kjerne (Nuclear) DObbel Resonans / ENDOR Indusert EPR

Klassisk vil energien E til et magnetisk moment i et magnetfelt \mathbf{B} være:

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B} \quad (2.3)$$

I et kvantemekanisk system blir ligning 2.3 erstattet av Hamiltonoperatoren:

$$\hat{\mathbf{H}} = g_e \beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{B} \quad (2.4)$$

Ligning 2.4 kalles Zeeman-Hamiltonoperatoren. Hvis magnetfeltet definerer z -retningen, $\mathbf{B} = B_0 \mathbf{k}$ i et kartesisk koordinatsystem forenkles ligning 2.4 til:

$$\hat{\mathbf{H}} = g_e \beta S_z B_0 \quad (2.5)$$

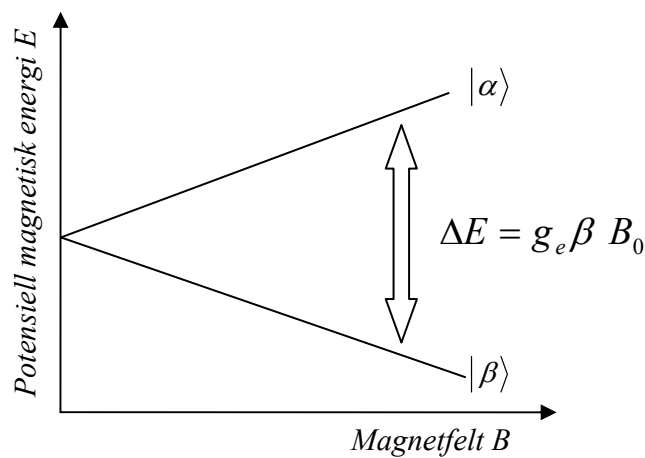
Spinnet til elektronene har egenverdiene $m_s = \pm 1/2$. Hamiltonoperatoren (ligning 2.5) får dermed egenverdiene:

$$E = g_e \beta m_s B_0 \quad (2.6)$$

Energiforskjellen mellom de to spinntilstandene $|\alpha\rangle$ og $|\beta\rangle$ blir da:

$$\Delta E = g_e \beta B_0 \quad (2.7)$$

Ligning 2.7 kalles gjerne resonansbetingelsen, da tilførsel av energi $\Delta E = h\nu$ (hvor $h = 2\pi\hbar$) som oppfyller ligning 2.7 vil kunne indusere elektronspinnoverganger mellom de to nivåene.



Figur 2.1: Energiforskjell mellom spinntilstandene for et elektron under påvirkning av et ytre magnetfelt. Energiforskjellen øker med økende magnetfeltstyrke.

For kjerner vil en tilsvarende utledning lede frem til resonansbetingelsen for kjerner:

$$h\nu_N = g_N\beta_N B \quad (2.8)$$

hvor ν_N er resonansfrekvensen for en fri kjerne. ν_N vil generelt ha ulik verdi for forskjellige typer kjerner. g_N er kjerne-g-verdien og kjerne-Bohrmagnetonet er gitt ved:

$$\beta_N = e\hbar/2m_p \quad (2.9)$$

hvor e er elementærladningen, m_p er protonmassen og \hbar er trukket inn fra spinnoperatoren.

Fordelingen av elektronspinn mellom de to ulike tilstandene er gitt ved

Boltzmannfordelingen:

$$\frac{N_{|\alpha\rangle}}{N_{|\beta\rangle}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (2.10)$$

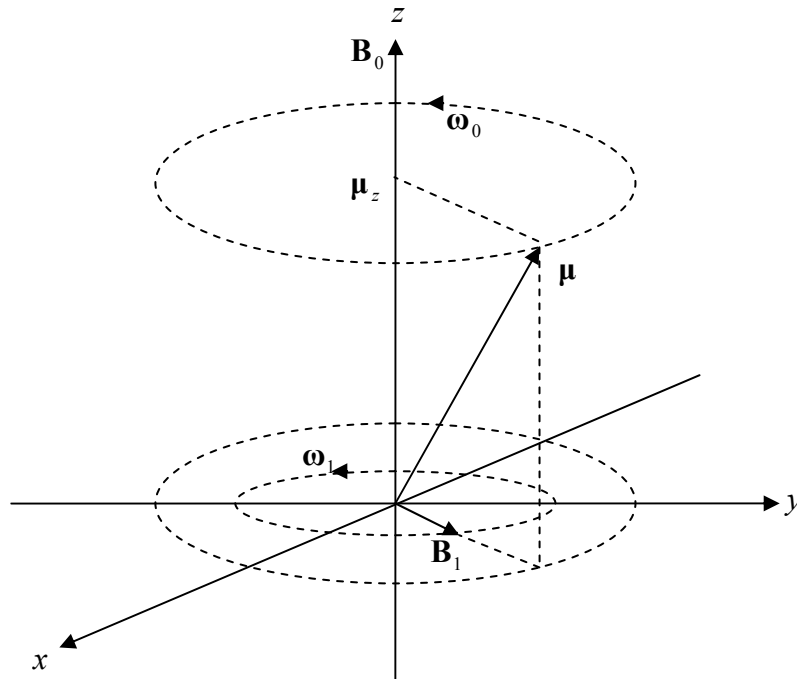
hvor N er antall spinn i en gitt tilstand, k er Boltzmannkonstanten og T er den absolutte temperatur. Ved termisk likevekt vil det være flere spinn i $|\beta\rangle$ -tilstand enn i $|\alpha\rangle$ -tilstand.

Sannsynlighetene for induserte overganger mellom de to spinn-tilstandene er den samme.

Ved tilførsel av energi som oppfyller resonansbetingelsen (likning 2.7) vil overganger induseres. På grunn av ulikheten mellom tilstandenes spinnpopulasjoner vil det finne sted en netto energiabsorpsjon. Det er denne energiabsorpsjonen man registrerer i EPR.

Forskjellen i spinnpopulasjonene opprettholdes av relaksasjonsprosesser. Et system som er ute av likevekt vil i følge termodynamikken, utveksle energi med omgivelsene for å komme tilbake i likevekt. Slike energiutvekslinger kalles relaksasjonsprosesser. Dersom effekten av tilført energi er for stor vil ikke relaksasjonsprosessene opprettholde populasjonsforskjellen og systemet går i metning (populasjonsforskjellen forsvinner). Siden det da ikke vil eksistere noen netto energiabsorpsjon, vil heller ikke EPR-signalet eksistere.

Overganger mellom spinn-tilstandene oppnås ved å tilføre energi i form av et tidsavhengig magnetfelt polarisert i xy -planet med frekvens ν . Dersom ν oppfyller resonansbetingelsen (likning 2.7), vil overganger induseres. For å beskrive resonansfenomenet må selvfølgelig kvantemekanikk benyttes. Allikevel kan man danne seg et nyttig bilde ved den klassiske beskrivelsen som er vist i figur 2.2.



Figur 2.2: Et klassisk bilde av resonansfenomenet. Se beskrivelse i teksten.

Utsettes et magnetisk moment for et ytre magnetfelt \mathbf{B} , vil spinnet presesere med en sirkelfrekvens ω , og med retning parallelt eller antiparallelt med \mathbf{B} . ω er gitt ved:

$$\omega = \gamma \mathbf{B} \quad (2.11)$$

der γ kalles det gyromagnetiske forholdet.

Figur 2.2 viser et magnetisk moment μ preseserende med frekvens ω_0 i et magnetfelt \mathbf{B}_0 , med et svakere magnetfelt \mathbf{B}_1 roterende i xy -planet med frekvens ω_1 . Generelt vil ikke μ merke \mathbf{B}_1 da disse hurtig går inn og ut av fase. Derimot når $\omega_0 = \omega_1$ vil μ oppfatte \mathbf{B}_1 som et stasjonært felt. \mathbf{B}_1 vil virke på μ med en kraft $\tau = \mu \times \mathbf{B}_1$, som vil få μ til å gå i spiral fra z ned til $-z$. Dette representerer en overgang mellom spinttilstandene. Da er $\omega_1 = \omega_0 = \gamma \mathbf{B}_0$ som tilsvarer resonansbetingelsen (ligning 2.7) ved at det gyromagnetiske forholdet er gitt ved:

$$\gamma = \frac{g_e \beta}{\hbar} \quad (2.12)$$

I EPR velges det et lineært polarisert \mathbf{B}_1 -felt med frekvens ν i GHz-området, altså et mikrobølgefelt. Frekvensen holdes av praktiske grunner konstant, mens magnetfeltet \mathbf{B} kan varieres gjennom resonansbetingelsen for spinnet.

2.2 Enslige elektroner i molekyler

I et molekylært system vil enslige elektroner påvirkes av indre magnetfelter satt opp av nærliggende atomkjerners spinn, i tillegg til påvirkningen systemet får fra et eventuelt påsatt ytre magnetfeltet. Generelt vil Hamiltonoperatoren bestå av flere termer:

$$\hat{\mathbf{H}} = \hat{\mathbf{H}}_{Zee} + \hat{\mathbf{H}}_{N-Zee} + \hat{\mathbf{H}}_{hf} + \hat{\mathbf{H}}_q \quad (2.13)$$

De ulike termene vil behandles hver for seg i de påfølgende delkapitlene. $\hat{\mathbf{H}}_q$ eller kvadrupoltermen som den gjerne kalles, er ikke diskutert her da $\hat{\mathbf{H}}_q = 0$ for de vekselvirkningene som er behandlet i dette studiet.

2.2.1 Elektron-Zeemann $\hat{\mathbf{H}}_{Zee}$

Elektron-Zeemann-termen beskriver vekselvirkningen mellom det uparede elektronet og magnetfeltet. I molekylære omgivelser vil elektron-Zeemann-termen kompliseres noe i forhold til den for et fritt elektron (ligning 2.4). Det totale magnetfeltet vil bestå av det ytre magnetfeltet samt et tilleggsledd som følge av elektronets egen banebevegelse (spinn-bane kobling) og de magnetiske omgivelsene i molekylet. Dette tilleggsleddet vil være retningsbestemt, følgelig må tensorer benyttes:

$$\hat{\mathbf{H}}_{Zee} = \beta \mathbf{B} \cdot \hat{\mathbf{g}} \cdot \mathbf{S} \quad (2.14)$$

Ligning 2.14 viser hvordan det ytre magnetfeltet \mathbf{B} og spinnet \mathbf{S} er sammenkoblet med en tensor $\hat{\mathbf{g}}$, kalt g-tensoren. g-tensoren er en 2. rangs kartesisk tensor (altså egentlig en 3×3 matrise) og kan skrives som en sum av bidrag fra bane-impulsmomentene L til elektronene for hvert atom. Matriseelementene til $\hat{\mathbf{g}}$ kan for et atomært system skrives:

$$g_{ij} = g_e \delta_{ij} - 2\lambda \sum_{n \neq 0} \frac{\langle 0 | L_i | n \rangle \langle n | L_j | 0 \rangle}{E_n - E_0} \quad (2.15)$$

hvor $|0\rangle$ og $|n\rangle$ viser til henholdsvis grunntilstanden og n'te eksiterte tilstand for elektronene. E_0 og E_n er tilstandens energi. λ er spinnbanekoblingskonstanten for det gitte atomet og δ er deltafunksjonen. Indeksene i og j representerer de kartesiske koordinatene x , y og z . I et molekylært system vil det uparede spinnet være delokalisert over flere kjerner. Dermed blir elementene til g-tensor beskrevet ved en sum av bidragene fra bane-

impulsmomentene for hver enkelt kjerne. Ligning 2.15 vil dermed kompliseres ved å gå fra et atomært til et molekylært system [14].

g -tensoren kan bestemmes eksperimentelt og diagonaliseres for å finne prinsipalverdiene med tilhørende egenvektorer. Siden g -tensoren beskriver retningsavhengigheten til elektron-Zemanntermen, vil den kunne gi informasjon om omgivelsene det uparede elektronet opplever.

2.2.2 Kjerne-Zeemann \hat{H}_{N-Zee}

I likhet med elektronets spinn, vil også kjernes spinn \mathbf{I} vekselvirke med et ytre magnetfelt \mathbf{B} . Kjerne-Zeeman-termen vil se ut som:

$$\hat{H}_{N-Zee} = -g_N \beta_N \mathbf{I} \cdot \mathbf{B} \quad (2.16)$$

Som for elektroner kan også overganger mellom kjernespinntilstander induseres ved tilførsel av den energi som tilsvarer energidifferansen mellom kjernespinnes energinivåer.

2.2.3 Hyperfinkobling \hat{H}_{hf}

Hyperfinkoblingstermen er en følge av vekselvirkninger mellom et elektronspinn og et kjernespin:

$$\hat{H}_{hf} = \mathbf{I} \cdot \hat{\mathbf{A}} \cdot \mathbf{S} \quad (2.17)$$

Kjernespinnet \mathbf{I} og elektronspinn \mathbf{S} er sammenkoblet av hyperfinkoblingstensoren $\hat{\mathbf{A}}$ som er en 2. rangs kartesisk tensor. $\hat{\mathbf{A}}$ består av to deler, en isotrop del a_{iso} (Fermis kontaktvekselvirkning) og en anisotrop del $\hat{\mathbf{A}}^0$ (dipol-dipol vekselvirkning) der:

$$\hat{\mathbf{A}} = a_{iso} \hat{\mathbf{1}} + \hat{\mathbf{A}}^0 \quad (2.18)$$

og $\hat{\mathbf{1}}$ er enhetsmatrisen.

Det isotrope leddet er for hydrogenatomet gitt ved:

$$a_{iso} = \frac{2\mu_0}{3} g_e \beta g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \quad (2.19)$$

der $|\psi(0)|^2$ er sannsynligheten for å finne det enslige elektronet på kjernens plass. Følgelig er det bare s-orbitaler som gir bidrag til den isotrope hyperfinkoblingen.

Den anisotrope delen eller dipol-dipol tensoren $\hat{\mathbf{A}}^0$ er symmetrisk og har matriseelementer som kan skrives:

$$A_{ij}^0 = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \beta g_N \beta_N \left\langle \frac{3ij - r^2 \delta_{ij}}{r^5} \right\rangle \quad (2.20)$$

hvor r er avstanden mellom dipolene og hakeparentesen representerer integralet over romdelen av elektronets bølgefunksjon. Den anisotrope delen skyldes at elektroner og kjerner kan sees på som magnetiske dipoler. For sværisk symmetriske orbitaler (s-orbital) vil $\langle \dots \rangle$ i ligning 2.20 integreres til null. Dermed er det bare ikke-sfærisk symmetriske orbitaler (p-, d- og f-orbitaler) som gir et anisotropt bidrag til hyperfinkoblingstensoren.

$\hat{\mathbf{A}}^0$ er traseløs, det vil si at summen av diagonalelementene er null. Siden $\hat{\mathbf{A}}^0$ også er symmetrisk vil a_{iso} kunne bestemmes fra hyperfinkoblingstensoren $\hat{\mathbf{A}}$:

$$a_{iso} = \frac{\text{Trase}(\hat{\mathbf{A}})}{3} \quad (2.21)$$

$\hat{\mathbf{A}}$ kan bestemmes eksperimentelt og ved en diagonalisering av $\hat{\mathbf{A}}$ finner man tilhørende prinspalverdier og egenvektorer.

2.3 EPR/ENDOR/EIE-eksperiment

For å enkelt beskrive et EPR/ENDOR/EIE-eksperiment kan det tas utgangspunkt i et enkelt system hvor et enslig elektron, $S = 1/2$, vekselvirker med et proton, $I = 1/2$ i et ytre magnetfelt. Antas hyperfin- og g-tensorene isotrope vil den totale Hamiltonoperatoren forenkles til:

$$\hat{\mathbf{H}} = g\beta \mathbf{B} \cdot \mathbf{S} - g_N \beta_N \mathbf{B} \cdot \mathbf{I} + a\mathbf{S} \cdot \mathbf{I} \quad (2.22)$$

I et slikt system vil det eksistere fire spinntilstander: $|\alpha\beta_N\rangle$, $|\alpha\alpha_N\rangle$, $|\beta\beta_N\rangle$ og $|\beta\alpha_N\rangle$.

Dersom man antar at $a \ll g\beta B$ (høyfeltsapprosimasjonen) vil elektron-Zeemantermen dominere fullstendig. Dermed kan perturbasjonsteori til første orden benyttes. Med

2.3.1 EPR-eksperiment

En EPR-overgang er en overgang der $\Delta m_s = \pm 1$ og $\Delta m_l = 0$. Dette tilsvarer overgangene $|\alpha\beta_N\rangle \leftrightarrow |\beta\beta_N\rangle$ og $|\alpha\alpha_N\rangle \leftrightarrow |\beta\alpha_N\rangle$ i figur 2.3. I EPR holdes mikrobølgefrequensen konstant mens magnetfeltet varieres. Fra ligning 2.23 kan det vises at EPR-overgangene for en gitt resonansfrekvens svarer til magnetfeltverdiene gitt i ligning 2.24 og 2.25:

$$E_e = h\nu_e = g\beta B_1 + \frac{|a|}{2} \Rightarrow B_1 = \frac{h\nu_e + \frac{|a|}{2}}{g\beta} \quad (2.24)$$

$$E_e = h\nu_e = g\beta B_2 - \frac{|a|}{2} \Rightarrow B_2 = \frac{h\nu_e - \frac{|a|}{2}}{g\beta} \quad (2.25)$$

Siden $\nu_e \gg \nu_N$ vil forskjellen mellom tilstandenes spinpopulasjoner være tilnærmet den samme for begge EPR-overgangene. Derfor vil resonanslinjene tilhørende henholdsvis B_1 og B_2 ha samme intensitet. Resonanslinjene vil være separert med en splitting på:

$$|a'| = \frac{|a|}{g\beta} = (B_2 - B_1) \quad (2.26)$$

hvor a' er splittingen gitt i magnetfeltverdier. EPR-spekteret gir ikke noe informasjon om hvilken overgang som hører til hvilken resonanslinje. Dette fører til at fortegnet til a ikke kan bestemmes. Midtpunktet i spekteret representeres ved g -verdien gitt ved:

$$g = \frac{2h\nu_e}{\beta(B_1 + B_2)} \quad (2.27)$$

2.3.2 ENDOR-eksperiment

ENDOR er en teknikk som kan brukes for å skille resonanser som overlapper hverandre i et EPR-spekter. På grunn av ulike relaksasjonsmekanismer i EPR- og ENDOR-overganger, er linjene i et ENDOR-spekter bare cirka en hundredels så brede som linjene i et EPR-spekter. Dette fører til at et ENDOR-spekter er bedre oppløst enn et EPR-spekter. Dermed kan overlappende EPR-resonanser skilles i ENDOR samt at også mindre splittinger kan observeres.

ENDOR er en kombinasjon av et EPR-eksperiment og et kjerne-magnetisk resonans (NMR) eksperiment. Ved å mette (se side 21) en EPR-overgang ved en bestemt magnetfeltverdi vil populasjonene for kjernespinntilstandene bli forskjellige, mens populasjonsforskjellen mellom EPR-overgangene vil bli lik. Utsettes da prøven for et frekvenssveipende elektromagnetisk felt i rf-området* (radiofrekvens ν_{rf}) vil kjernespinnoverganger induseres når resonansbetingelsen for kjerner (ligning 2.8) er oppfylt. Populasjonene i EPR-overgangen vil da bli forskjellige igjen og systemet vil absorbere mikrobølgeenergi. Det er denne energiabsorpsjonen som detekteres i ENDOR.

Et ENDOR-spekter vil for hver EPR-overgang vise to linjer, en lavfrekvent (-) for overgangen $|\alpha\beta_N\rangle \leftrightarrow |\alpha\alpha_N\rangle$ og en høyfrekvent (+) for overgangen $|\beta\beta_N\rangle \leftrightarrow |\beta\alpha_N\rangle$ jamfør figur 2.3. Dersom $|a|/2 > h\nu_N$ vil linjene være sentrert om $|a''|/2$ med resonansfrekvenser:

$$\nu_{\pm} = \left| \frac{a''}{2} \right| \pm \nu_N \quad (2.28)$$

hvor $a'' = a/h$ der a'' er splittingen gitt i frekvensenheter. Dersom $|a|/2 < h\nu_N$ vil linjene være sentrert om ν_N med resonansfrekvenser på:

$$\nu_{\pm} = \nu_N \pm \left| \frac{a''}{2} \right| \quad (2.29)$$

2.3.3 EIE-eksperiment

Dersom det ytre magnetfeltet B låses til en EPR posisjon med resonansbidrag fra flere radikaler, vil ENDOR-spekteret bestå av resonanslinjene fra alle disse radikalene. EIE er en metode som kan brukes til å relatere de forskjellige linjene i ENDOR-spektret til ett og samme radikal. Slik kan det bestemmes hvor mange forskjellige radikaler som bidrar til EPR-spekteret.

I EIE låses rf-frekvensen, ν_{rf} , til en bestemt ENDOR-linje. Den korresponderende kjernespinnovergangen mettes med høy rf-effekt. Magnetfeltet B sveipes så over et gitt

*Kjerneresonansfrekvensen er gitt ved $\nu_N = (g_N \beta_N B)/\hbar$ (ligning 2.10). ν_N avhenger av det ytre magnetfeltet B . I EPR brukes et ytre magnetfelt B i størrelsesorden 0,1 - 1 T. Innsatt i ligning 2.10 gir dette en ν_N i radiofrekvens(rf)området. Derfor brukes det et frekvenssveipende elektromagnetisk felt i rf-området i ENDOR.

område, samtidig som ν_{rf} hele tiden endres i takt med B slik at resonansbetingelsen for ENDOR-linja alltid er oppfylt. Når magnetfeltets verdi tilsvarer en av ENDOR-linjas korresponderende EPR-overganger vil spinnoverganger induseres. Dermed vil populasjonsforholdene mellom energitilstandene endres. Dette fører til at ENDOR-linjas intensitet endres. Denne endringen i ENDOR-intensiteten som funksjon av magnetfeltet kalles EIE. EIE-spekteret har samme linjeposisjoner som det tilhørende EPR-spekter, men intensitetene er ikke nødvendigvis sammenlignbare.

Av tekniske grunner vises EPR- og ENDOR-spektrene som 1. deriverte absorpsjonsspektre, mens EIE-spektrene vises som et absorpsjonsliknende resonansspekter.

3. Materialer og metoder

I dette kapitlet vil de eksperimentelle metoder som benyttes i dette studiet bli beskrevet. Spesiell oppmerksomhet vil bli vist det krystallsystemet oppgaven bygges rundt.

3.1 Røntgendiffraksjon

Diffraksjon er et fenomen som inntreffer når bølger møter spalter av samme størrelse som deres egen bølgelengde. I krystaller er periodiske avstander av størrelsesorden 10^{-10} m. Røntgenstråling har bølgelengder av samme størrelsesorden og følgelig vil en krystall virke som et tredimensjonalt diffraksjonsgitter for røntgenstråler. Det var Max von Laue som først foreslo dette i 1912 [15].

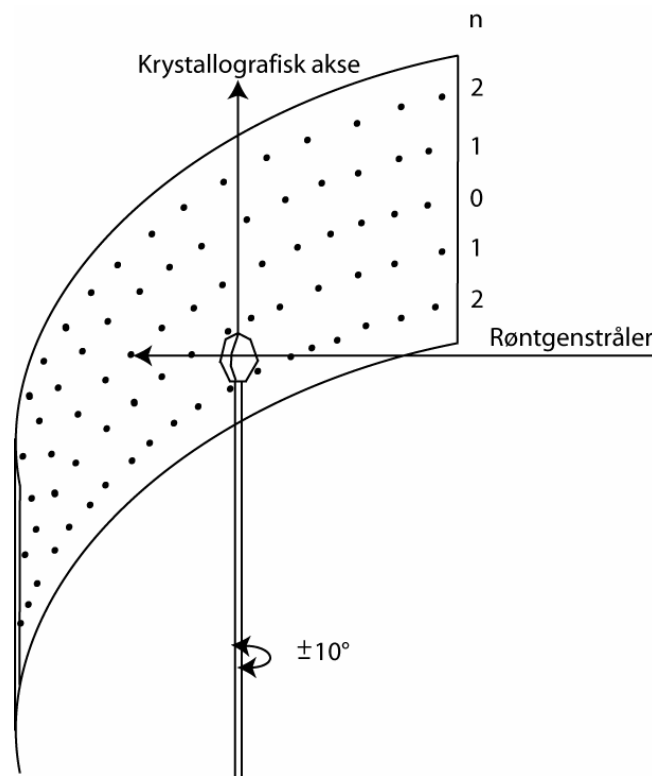
I en krystall er molekylene fastlåst i et gitt mønster, et gitter. I dette gitteret kan det konstrueres såkalte *Braggplan*. Dette er tenkte plan, dannet ved at de går gjennom molekylene i gitteret på bestemte måter. Det finnes flere forskjellige typer Braggplan i en krystall. Siden krystaller har et repeterende mønster vil det til en type plan finnes flere andre som er parallelle. Fra disse planene kan vi ha konstruktiv interferens ved refleksjon av røntgenstråling bare dersom Braggligningen er oppfylt [16]:

$$2d \sin \theta = m\lambda \quad (3.1)$$

der d er avstanden mellom de parallelle planene, θ er vinkelen innkommende stråle danner med planet, λ er røntgenstrålenes bølgelengde og m er et heltall ($m = 1, 2, 3, \dots$). For et gitt forhold mellom innkommende stråle og den krystalliske morfologi er det veldig få plan som oppfyller ligning 3.1 og som følgelig gir reflekser (konstruktiv interferens). For å få refleksjoner fra flere plan kan krystallen roteres ved at θ varieres. Dermed oppfylles ligning 3.1 for flere plan (Weissenbergmetoden).[17]

Et Weissenberg røntgendiffraksjonsapparat er i denne oppgaven brukt til å bestemme akselengder og rette inn rotasjonsakser. Dette gjøres i praksis ved at en krystall festes til et goniometer som igjen monteres til Weissenbergkameraet. Goniometeret muliggjør endringer av krystallens transversale og angulære posisjoner. Slik kan den antatte krystallografiske akse stilles inn ved hjelp av en kikkert med trådkors, montert på kameraet. Rundt krystallen

plasseres en sylindrisk filmholder med røntgensensitiv film. Midt i filmholderen kommer røntgenstrålene inn mot krystallen gjennom en kollimator. Da det meste av strålingen vil gå rett gjennom krystallen plasseres en blender bak for å beskytte filmen. Krystallen roteres hele tiden $\pm 10^\circ$. Den del av strålingen som reflekteres vil fanges opp av filmen i filmholderen. Dersom det roteres omkring en krystallografisk akse vil refleksjoner fra alle mulige Braggplan danne rette parallelle linjer på filmen. Avstanden mellom linjer av samme orden om midtlinja gir mulighet for å finne enhetscellas akselengde og således bestemme hvilken krystallografisk akse det roteres om. Ved mindre avvik fra en krystallografisk akse, kan bildet på filmen brukes til å beregne en korrigerende.



Figur 3.1: Krystallen er fastlimt til en glasstav og roteres $\pm 10^\circ$ parallelt med en av de krystallografiske aksene. En tynn beam av røntgenstråler treffer krystallen og noe av disse reflekteres av Braggplanene under oppfyllelse av ligning 3.1. Disse refleksjonene fanges opp av filmen, som ligger i en sylinder rundt krystallen, og vises som svertning. n representerer refleksjonslinjenes orden.

3.2 Krystaller

I dette studiet er det benyttet enkrystaller av L-arginin monofosfat monohydrat, heretter ofte betegnet LAP.

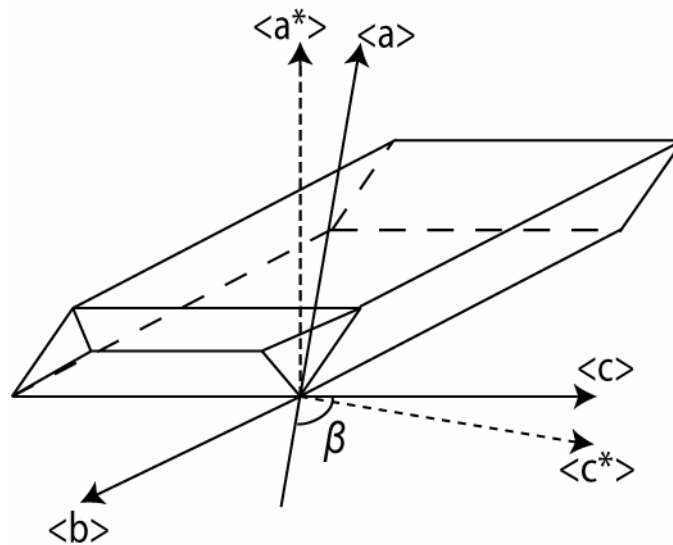
3.2.1 Krystallstruktur

Den minste enhet en krystall kan deles i kalles enhetscellen. Denne er utspent av de krystallografiske aksene $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$. Alt etter hvordan akselengdene er like eller ulike og vinklene mellom dem er rette eller ikke, har krystallsystemet en av sju former.

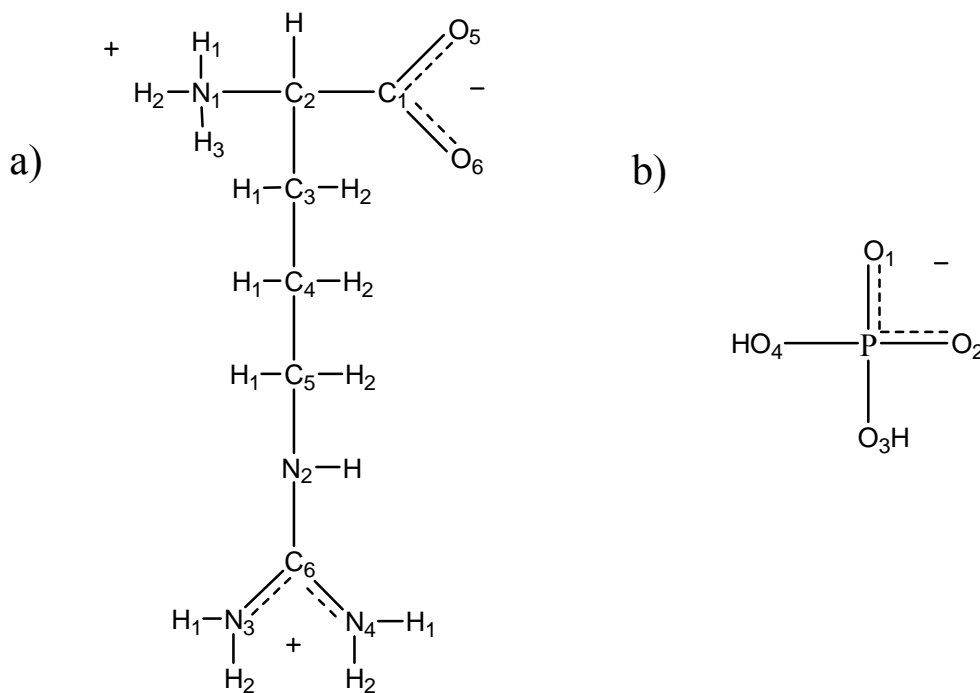
Krystallstrukturer er også delt inn i romgrupper. Romgruppene gir et sett av symmetrielementer som bestemmer hvordan den molekylære enheten (i dette tilfelle LAP) skal repeteres for å bygge opp enhetscellen og antallet molekylære enheter i enhetscellen (Z). Det finnes 230 forskjellige romgrupper [17].

For LAP-krystaller er strukturen kjent, bortsett fra at hydrogenatomene HO4 og H2N3 (se figur 3.3) ikke er lokalisert [10]. I oppgavens figurer av molekylstrukturer og for kvantekjemiske beregninger er derfor HO4 og H2N3 lagt der de antas å være lokalisert.

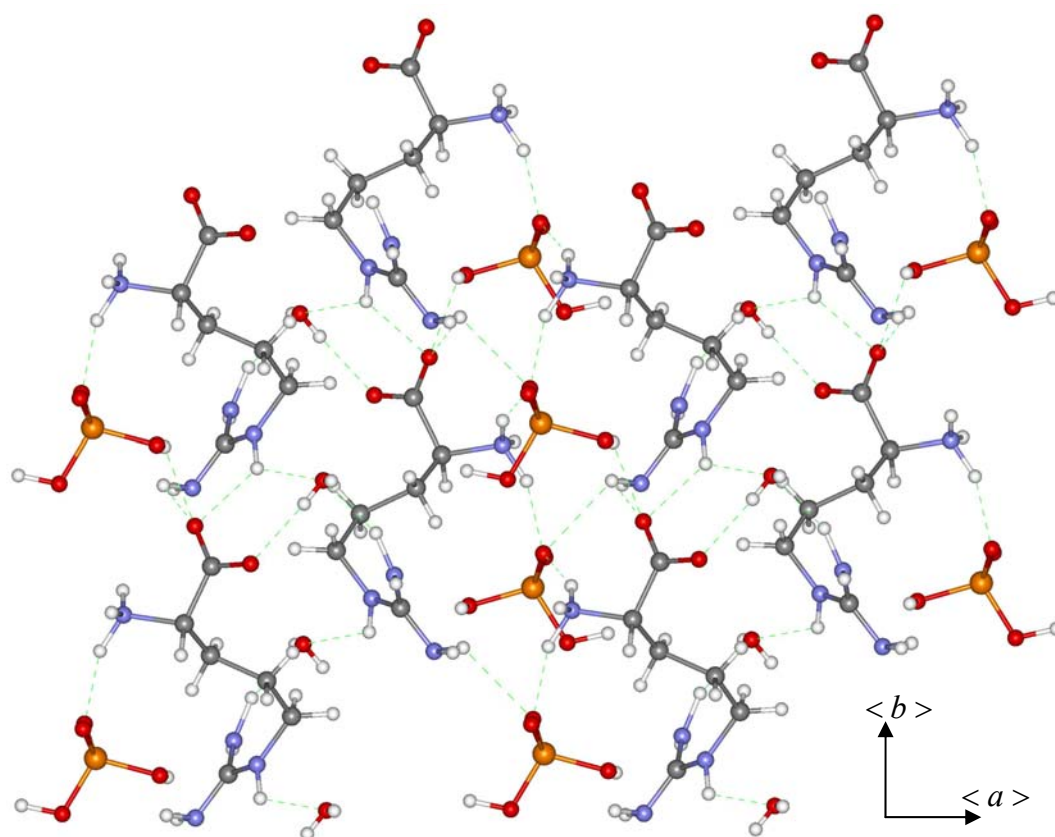
Enhetscellen i enkrystaller av LAP er monoklin med en vinkel $\beta = 98,0^\circ$ og med romgruppe $P2_1$. Enhetscellen inneholder to sett L-arginin, fosfatgruppe og vannmolekyl ($Z = 2$) og har dimensjonene $a = 10,85 \text{ \AA}$, $b = 7,91 \text{ \AA}$ og $c = 7,32 \text{ \AA}$. Avstander og retninger for molekylstrukturen er beregnet med programmet KRYSTMOD fra ESRLIB [18] og gjengitt i appendiks A. Krystallens form og de krystallografiske akser er vist i figur 3.2. L-arginins og fosfatgruppens struktur med atomnummerering er gjengitt i figur 3.3. Figur 3.4 viser molekylenes posisjon innbyrdes i fire enhetsceller for LAP-krystaller med hydrogenbindinger og akser inntegnet.



Figur 3.2: Den ytre formen til enkrystaller av LAP med de krystallografiske akser inntegnet. b -aksen er nålaksen, a^* -aksen står vinkelrett på bc -planet, c^* -aksen står vinkelrett på ab -planet og den monokline vinkelen $\beta = 98^\circ$.



Figur 3.3: Molekylstrukturen til a) L-arginin og b) fosfatgruppa med ladninger slik de forekommer i enkrystaller av LAP. Den brukte nummereringen for molekylene er også tatt med.



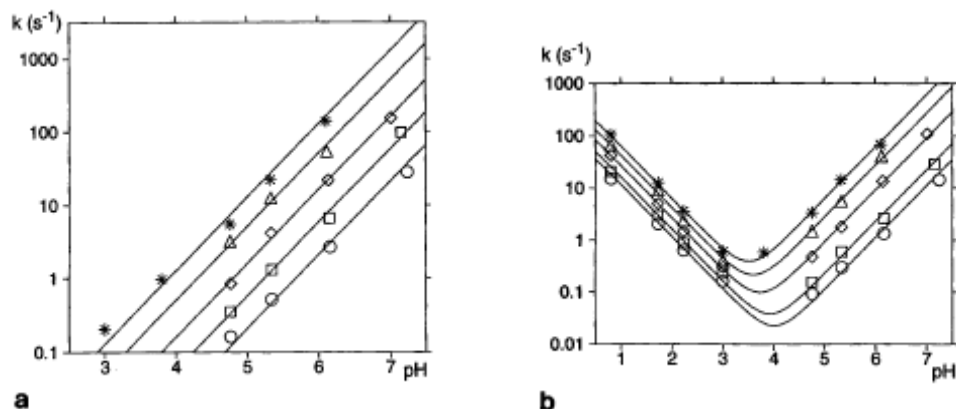
Figur 3.4: Molekylenes posisjoner innbyrdes i fire enhetsceller av LAP-krystaller, to i *a*- og *b*-retning og en i *c*-retning. Hydrogenbindinger vises som grønnstipla linjer. De krystallografiske aksene er vist i figuren. *c**-aksen står rett ut av papirplanet.

3.2.2 Krystallgroing

L-arginin ble kjøpt inn fra *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* i pulverform. I ekvimolare mengder ble L-arginin (5,0 g) blandet med konsentrert fosforsyre >85 % (3,31 g), innkjøpt fra *E. Merck, Darmstadt*. Resultatet ble en seig hvit masse. Det utviklet seg mye varme under blandingsprosessen. Massen ble videre løst opp i destillert vann (75 g) ved ca 30 °C og rørt i til alt var oppløst. Løsningen ble filtrert og satt ved romtemperatur i små glass på ca 10 ml. Etter 10 - 20 dager hadde det blitt felt ut klare og gjennomsiktige krystaller. Krystallene ble tatt ut når de hadde oppnådd en størrelse som var passelig, med dimensjoner fra $2 \times 2 \times 1 \text{ mm}^3$ til $20 \times 10 \times 3 \text{ mm}^3$. For å fastslå at det var LAP-krystaller som var dannet, ble de tre akselengdene for enhetscellen bestemt ved røntgendiffraksjon og sammenlignet med de kjente akselengdene for LAP-krystaller [10].

Det ble også laget deutrerete krystaller (d-LAP) ved bruk av tungtvann (99 % deutret). Massen av L-arginin og fosforsyre ble da løst i tungtvann (84 g) innkjøpt fra *Cambridge*

Isotope Laboratories Inc. Deutrerete krystaller ble rekrystallisert to ganger for å øke utskiftningen av hydrogen med deuterium. Finknuste d-LAP-krystaller (6,4 g) ble da løst i tungtvann (66 g). Løsningen ble filtrert og satt i romtemperatur til krystaller falt ut.



Figur 3.5: Protonutskiftningsraten i guanidylgruppa i acetyl-arginin-NH₂, plottet som funksjon av pH for data målt ved 4°C (sirkler), 10°C (kvadrater), 20°C (rutere), 30°C (triangler) og 36°C (stjerner). (a) er protonutskiftningsraten for NH-gruppa og (b) er raten for NH₂-gruppene. [19]

Etter EPR-målinger på deutrerete krystaller ble det fattet mistanke om at utskiftningen av protoner med deuterium ikke var god, særlig ikke i guanidylgruppa (-NH-C(NH₂)₂). Fra et arbeid av Liepinsh og Otting [19] ble det funnet målinger for protonutskiftningsraten i guanidylgruppa til arginin som funksjon av surhetsgraden i løsningen. Disse målingene er vist i figur 3.5. Det ble foretatt en pH-måling av H₂O-løsningen som LAP-krystaller gros fra og D₂O-løsningen som d-LAP-krystaller rekrystaliseres ut fra andre gang. Til dette ble et standard pH-meter av typen *MeterLab PHM210* fra *Radiometer Copenhagen* brukt. Det viste seg at H₂O-løsningen hadde en pH på 3,33 (± 0,02), mens D₂O-løsningen hadde en pH på 4,27 (± 0,02). Ved en pH på 4,27 ser man fra figur 3.5 at utskiftningsraten ved romtemperatur er på rundt 0,6 utskiftninger per sekund for NH-gruppa og 0,3 utskiftninger per sekund for NH₂-gruppene. Dette er lite og styrker mistanken om dårlig utskifting av protoner med deuterium. Imidlertid beskriver Eimerl og medarbeidere i et arbeid om deutret L-arginin fosfat [20], at ved en lignende fremgangsmåte for fremstilling av d-LAP som er brukt i dette arbeidet, men med tre rekrystalliseringer, er deutreringsgraden 95,5 %. Dette påstås å ha blitt bestemt ved NMR, uten videre opplysninger. For å bekrefte eller avkrefte mistanken om lav deutreringsgrad ble det foretatt NMR-analyse av de fremstilte LAP- og d-LAP-krystallene.

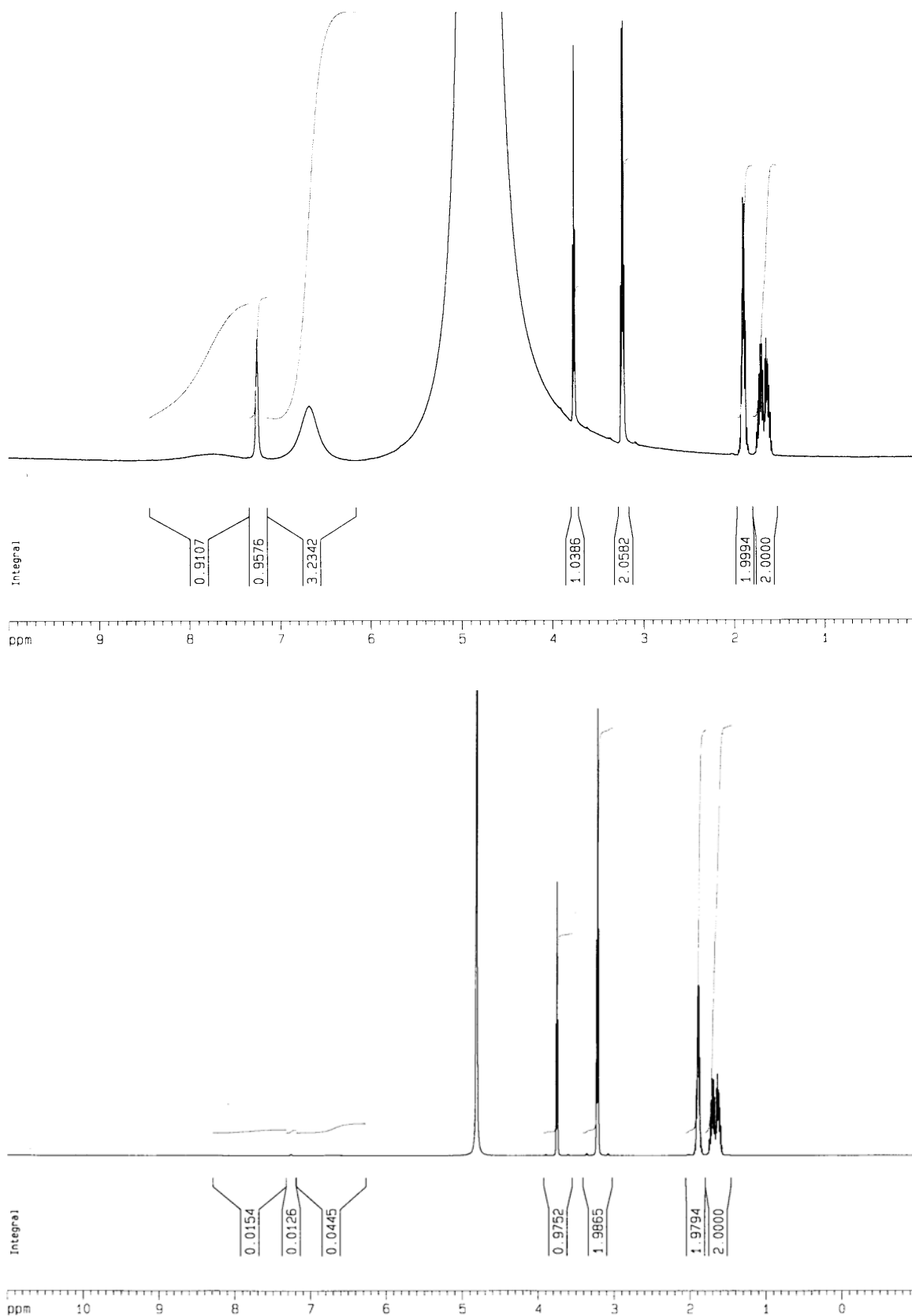
3.2.3 NMR-studier av hydrogen/deuterium utskiftbarhet i LAP

NMR-studier av LAP- og d-LAP-krystaller ble utført ved NMR-laboratoriet ved Kjemisk Institutt, UiO. Krystaller av LAP og d-LAP ble knust til pulver med en morter. Ved å løse pulveret i et løsningsmiddel som ikke har utskiftbare hydrogen/deuteriumatomer vil man ved å sammenligne spektrene for LAP og d-LAP finne ut i hvilken grad d-LAP er deuterert samt hvilke hydrogenatomer som lar seg skifte ut.

NMR-løsningsmiddelet DMSO-6d inneholder ikke utskiftbare hydrogen/deuteriumatomer. Derimot inneholder løsningsmiddelet noe vann. Det viste seg at det var vanskelig å løse LAP- og d-LAP-pulveret i DMSO-d₆. Løsningsgraden var så dårlig at vann var i stort overtall. Dermed vil eventuelle deuteriumatomer i d-LAP kunne la seg skifte ut med hydrogenatomer fra vann. Det viste seg også at konsentrasjonen av løst LAP (og d-LAP) i DMSO-6d var så lav at NMR-spektrene ble ubrukelige.

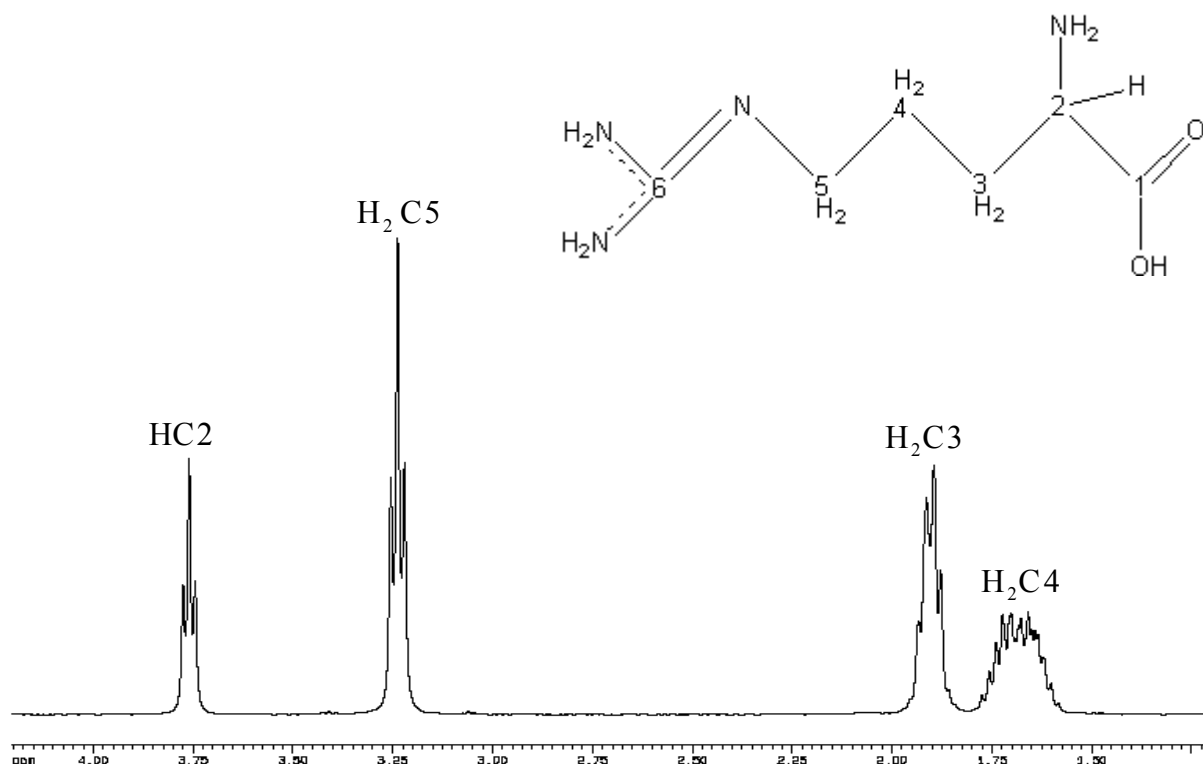
Ett nytt NMR-eksperiment ble utført. Ved å løse d-LAP-pulveret i tungtvann (> 99 %) vil eventuelle deuteriumatomer og utskiftbare hydrogenatomer i d-LAP-molekylene bare la seg skifte ut med deuterium fra tungtvann. Et slikt eksperiment vil derfor ikke kunne gi svar på deuteringsgraden i de opprinnelige d-LAP-krystallene. Derimot vil eksperimentet gi svar på hvilke hydrogenatomer i molekylet som er utskiftbare og hvilke som ikke er det. Som referanse ble det tatt opp NMR-spektre av udeuterert LAP, knust og løst i destillert vann.

NMR-prøven for d-LAP besto av cirka 35 mg d-LAP-pulver løst i 700 mg tungtvann (forhold 1:20). Løsningen d-LAP rekrystalliseres fra består av d-LAP-pulver og tungtvann i forholdet 1:10. Forholdene i NMR-prøven antas derfor å være mindre sur enn forholdene i løsningen d-LAP fremstilles fra. For å etterprøve denne antagelsen ble surhetsgraden til NMR-prøven for d-LAP målt til å ha en pH på rundt 4,6 – 4,9. pH-målingen ble utført med *pH indikatorstrips (0-14 pH)*, levert fra *Merck KGaA, Darmstadt*. Ved en pH på 4,75 er utskiftningsraten ved romtemperatur rundt 1,0 utskiftninger pr. sekund for NH-gruppa og rundt 0,6 utskiftninger pr. sekund for NH₂-gruppene (se figur 3.5). Dette er cirka en dobling av utskiftningsraten i forhold til det som ble bestemt for løsningen d-LAP krystallene rekrystalliseres fra. Prøvene ble oppbevart en uke i romtemperatur før NMR-spektrene ble tatt opp. Oppbevaringen er selvfølgelig med på å øke utskiftningsgraden.



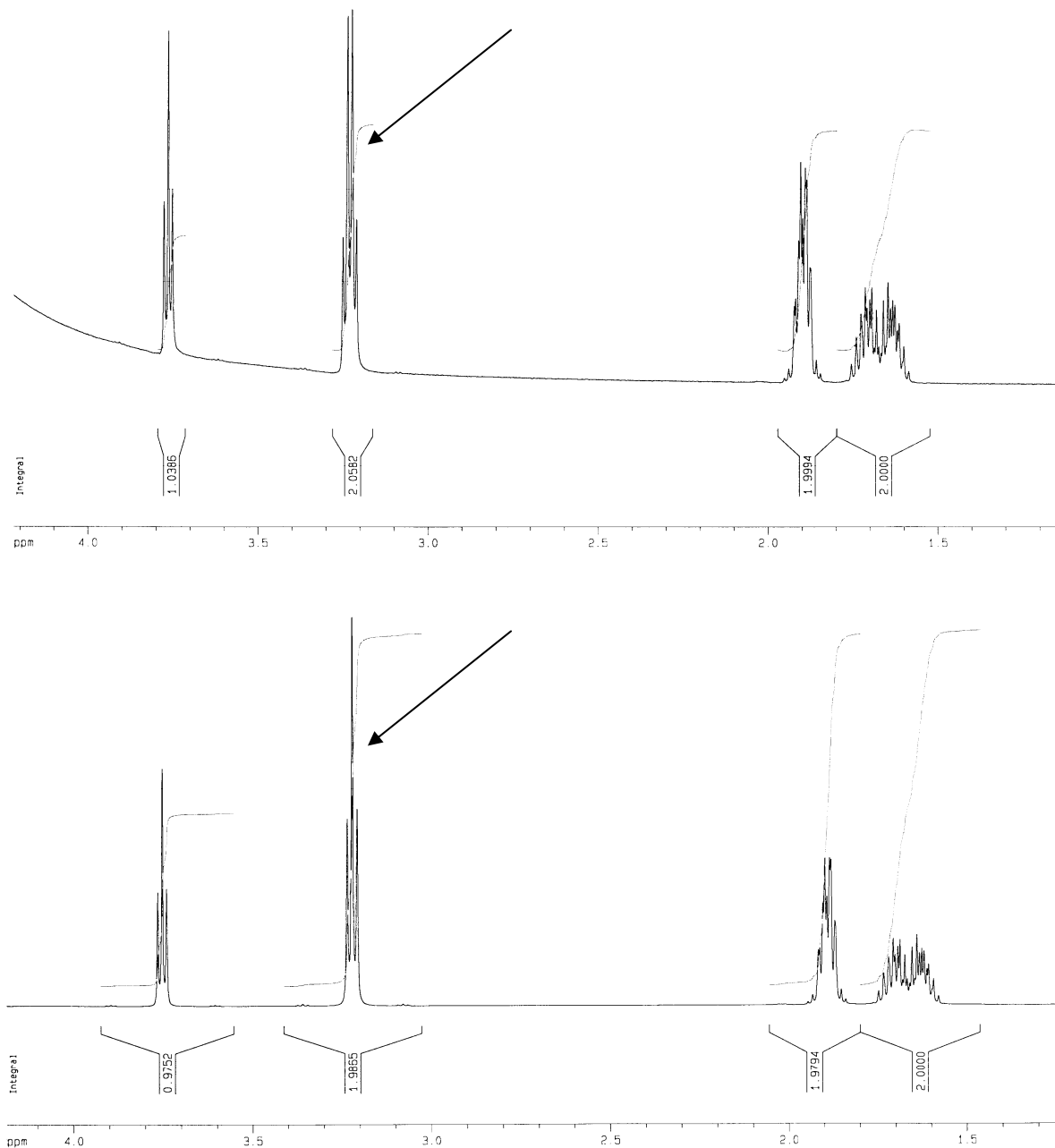
Figur 3.6: Øverst vises $^1\text{H-NMR}$ -spektret for LAP og nederst er spektret til d-LAP. Resonanslinjene helt til venstre i spektret for LAP deutereres tilnærmet helt bort i spektret for d-LAP. For NMR-linja helt til høyre er integrasjonsflaten normert til 2,0. Denne linja tilhører to ekvivalente protoner jamfør figur 3.7.

Figur 3.6 viser ^1H -NMR-spektrene for LAP og d-LAP. Det vises tydelig at under de forholdene som er beskrevet for d-LAP-prøven, finnes det i hvert fall fem hydrogenatomer som nesten fullstendig skiftes ut med deuterium. Å bestemme hvilke resonanslinjer i ^1H -NMR-spekteret som tilhører hvilke hydrogenatomer i molekylet er en omfattende jobb, men for alle aminosyrer er dette allerede bestemt i litteraturen. Figur 3.7 viser ^1H -NMR-spekteret til L-arginins ikke-utskiftbare hydrogenatomer, hentet fra BMRB [21].



Figur 3.7: ^1H NMR-spekter til ikke-utbyttbare hydrogenatomer i L-arginin-molekyler av den konformasjon som er vist i figuren. Resonanslinjene i NMR-spekteret er sortert og markert med den/de ^1H -atomene linja tilhører. Nummereringen av atomer er den samme som ellers er brukt i denne oppgaven (se figur 3.3). [21]

Dessverre viser ^1H NMR-spekteret i figur 3.7 kun de NMR-linjene som tilhører hydrogenatomer bundet til karbonatomene i L-arginin. Dessuten er den undersøkte konformasjonen av L-arginin fra figur 3.7 ikke den samme som den man finner i enkrystaller av LAP (se figur 3.3). Dermed er det ikke mulig å si spesifikt hvilke ^1H -atomer som tilhører hvilke av de resonanslinjene som i figur 3.6 deutereres bort.



Figur 3.8: ^1H NMR-spektrene for LAP (øverst) og d-LAP (nederst). Den markerte NMR-linja er en kvartett i LAP-spekteret og en triplett i NMR-spekteret til d-LAP.

Figur 3.8 viser ^1H NMR-spekteret til LAP og d-LAP for alle ikke-utskiftbare hydrogenatomer. Begge spektrene er svært like, med ett unntak. NMR-linja markert med piler i figur 3.8 er en kvartett i spekteret til LAP og en triplett i spekteret til d-LAP. Ved sammenligning med figur 3.7 ser man at den nevnte NMR-linja tilhører hydrogenatomene til C5. En slik ekstra splitting kan bare forklares med at C5-hydrogenatomene har ett hydrogenatom mer å vekselvirke med i LAP enn i d-LAP. I L-arginin-konformasjonen som

er vist i figur 3.7 er N2 ikke bundet til noe hydrogenatom slik tilfelle er for L-arginin i LAP (se figur 3.3). Av NMR-spekteret i figur 3.7 ser man derfor at resonanslinja til C5 sine ^1H -atomer er en triplett. Dette må bety at det er HN2 som forårsaker kvartettdannelsen i NMR-linja tilhørende H_2C_5 i LAP. Siden NMR-linja tilhørende protonene H_2C_5 i d-LAP (figur 3.8) er en triplett, lik den for NMR-linja til H_2C_5 i figur 3.7, må det bety at HN2 i d-LAP er erstattet med deuterium.

I ett sett LAP-molekyler finnes det 11 hydrogenatomer som er bundet til nitrogen eller oksygen, i tillegg til ett vannmolekyl. I NMR-spektrene i figur 3.6 vises det totalt fem hydrogenatomer som deutereres bort. Når krystaller av LAP løses i vann er det muligheter for at L-arginin-molekylet og fosfatgruppen vil innta andre konformasjoner enn den de har i krystallform. Dermed er det vanskelig å spesifikt bestemme hvilke ^1H -atomer de utbyttbare NMR-linjene tilhører. Dette har da heller ikke blitt bestemt. Det som imidlertid er sikkert er at hydrogenatomet HN2 er utskiftbart.

I NMR-prøven var deutereringsgraden til de utbyttbare hydrogenatomene på over 98 %. Protonutskiftningsraten til NMR-prøven ble funnet til det dobbelte av hva utskiftningsraten er for løsningen d-LAP framstilles fra. I tillegg har NMR-prøven blitt oppbevart i en uke før spektrene ble tatt opp. Det forventes dermed at utskiftningsgraden for NMR-prøven er betydelig bedre enn for d-LAP-krystallene. Allikevel, siden de utbyttbare hydrogenatomene var nær fullstendig erstattet med deuterium i NMR-prøven, må det også for d-LAP-krystallene være en betydelig utskiftning av hydrogen med deuterium, i alle fall for de hydrogenatomene som i figur 3.6 har utskiftbare NMR-linjer.

3.3 Preparering av prøvene

3.3.1 Bestråling

For bestråling av krystallene ble det benyttet et *Phillips PW 1732/10-rør* med kromanode og kraftforsyning fra et *Phillips PW 1732/10 3 kW powersupply*. Ved romtemperaturbestråling ble krystallene lagt cirka 6 cm fra kilden i en blybelagt boks og på en beholder med vann. Det ble brukt en spenning på 60 kV og strøm på 40 mA, noe som gav en dose på rundt 580 Gy pr. minutt. Bestrålingen foregikk i 2 timer. Dette tilsvarer en estimert dose på 69,6

kGy. Etter bestråling hadde krystallene skiftet farge til lys gul og konsistensen var av en sprøere karakter.

Ved lavtemperaturreksperimenter ble krystallen først montert og så bestrålt ved 77 K, nedkjølt av flytende nitrogen. Røntgenbestrålingen skjedde ved 60 kV og 40 mA i 2,5 timer. Dette gir en estimert dose på cirka 35 kGy.

3.3.2 Montering

Ved utvelgelse av passende krystall til eksperimentene ble det lagt vekt på at krystallen var tykkest mulig i retningen det ble rotert om. Noen krystaller var for store. Disse ble slipt skånsomt til med smergelpapir. Denne tilslipingen var det fordelaktig å gjøre før bestråling, da ubestrålte krystaller hadde bedre mekanisk styrke.

For romtemperaturstudiet ble den bestrålte krystallen limt til en tynn glassnål med *Duco Cement*-lim uttynnet med amyl-acetat, og festet til et goniometer. Ved hjelp av en kikkert som goniometeret ble festet til, kunne krystallen innstilles til rotasjon om den antatte aksene. Dette ble ved røntgendiffraksjon verifisert, eventuelt rettet opp. Krystallen ble så overført til en tilpasset kvartstav, med rotasjonsaksen parallelt med kvartstavsens lengderetning.

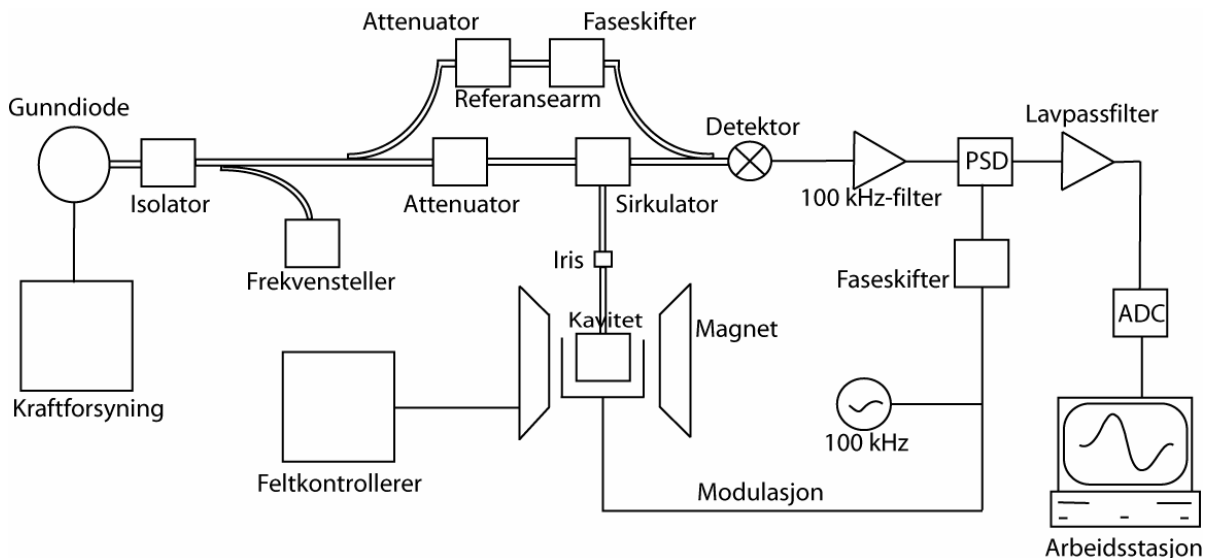
Ved lavtemperaturforsøk må krystallen bestråles i oppmontert nedkjølt posisjon. De ubestrålte og røntgendiffraksjonsinnstilte krystallene ble overført til en kobberstav og limt fast til denne med sølvepoxy-lim *Tra-Con (USA) BA-2902*. Metaller som kobber og sølv danner ikke radikaler når de bestråles. Kobberstaven ble festet til en kryostat av type *Heli-Tran LT3-110 (Air Products, USA)* og ført ned i kaviteten.

Feilorienteringen ved monteringsprosessen anslås til å være på maksimalt 2°.

3.4 ESR/ENDOR/EIE-eksperiment

3.4.1 EPR-spektrometeret

I figur 3.9 vises et forenklet blokkskjema over et EPR-spektrometer. Dette bør sees i sammenheng med teksten i dette delkapittelet.



Figur 3.9: Forenklet blokkskjema over et EPR-spektrometer. For utfyllende forklaring henvises det til teksten.

EPR-spektrometeret virker på følgende måte. Prøven plasseres i en prøveholder, en kavitert, som står i et sterkt ytre magnetfelt. Dette feltet kontrolleres med et Hallelement.

Mikrobølgene som eksempelvis kommer fra en gunndiode, går via en tilpasset bølgeleder til kaviterten. Gunndioden beskyttes mot tilbakespredt stråling av en isolator.

Mikrobølgeeffekten kan varieres med attenuatoren. Sirkulatorens oppgave er å lede all mikrobølgestrålingen ned mot kaviterten. Ved å variere mikrobølgefrequensen oppnås det stående mikrobølger inne i kaviterten. Kaviterten med prøven impedanstilpasses så det øvrige mikrobølgesystemet ved hjelp av en justerbar iris slik at det ikke reflekteres bølger fra kaviterten tilbake mot sirkulatoren. Kaviterten er konstruert slik at i midten, der prøven plasseres, har mikrobølgefeltets magnetfelt sin maksimalverdi (lineært polarisert) og det elektriske feltet sin minimalverdi. Når det ytre magnetfeltet så varieres vil det ved gitte verdier, altså ved oppfyllelse av resonansbetingelsen (ligning 2.7), absorberes energi av

spinnene i prøven. Da vil forholdene inne i kaviteten endres, impedansen vil endres og det vil reflekteres mikrobølger. Effekten av reflektert mikrobølger er proporsjonalt med mengden absorbert energi. De reflekterte mikrobølgene ledes så via sirkulatoren inn til en detektor. På grunn av detektorens følsomhetskarakteristikk ledes noe av gunndiodens mikrobølger direkte over til detektoren via en referansearm. For at kavitetens reflekterte bølger og referansearmens skal være i fase, finnes det en faseskifter på referansearmen. Modulasjonsspoler på begge sider av kaviteten frekvenskoder signalet. Etter detektoren er det et båndpassfilter som plukker ut den frekvenskodede strømmen. Dette kombineres med en fasesensitiv detektor (PSD) som tar ut den del av signalet som er i fase med modulasjonsreferansen. Etter at signalet er filtrert gjennom et lavpassfilter, er det meste av støyen fjernet og signalet digitaliseres (ADC) og kan vises og lagres på datamaskinen.

3.4.2 Parametre og apparatur for EPR/ENDOR/EIE

Det benyttede EPR-spektrometeret er et *BRUKER EleXsyS 560 SuperX X-band* EPR/ENDOR-spektrometer, tilkoblet til en *Linux* arbeidsstasjon med *BRUKER X-EPR* programvare. *DICE ENDOR*-teknologi fra *Bruker* er brukt ved ENDOR. Her genereres en firkantmodulert rf-puls som forsterkes i en bredbåndsforsterker av type *ENI 3200L 200 W* eller *AR A220 150 kW*.

I romtemperaturstudiet av EPR-spekterets sentraldel ble det benyttet en sylindrisk TM_{011} -kavitet *EN 801* fra *Bruker*. Ved ENDOR kan varmedannelse i ENDOR-spolene medføre at radikalene i prøven henfaller. For å hindre oppvarming av krystallen ved ENDOR-opptak, ble systemet kjølt ned til 240 K ved hjelp av kald nitrogen. For studiet av fosfatradikalene ble det brukt en rektangulær TE_{102} -kavitet *ER4102* fra *Bruker*.

Ved lavtemperaturarbeidet ble en sylindrisk TM_{011} -kavitet brukt. Denne er spesiallaget ved BMF-gruppa [22]. Spesialkaviteten tillater at krystallen kan holdes nedkjølt under hele forsøket, også under bestrålingsprosessen. Nedkjøling skjer ved å la flytende nitrogen fordampe ved krystallen. Temperaturmåleren og varmeelementet i kryostaten, gir kontroll over temperaturen og muligheten til en kontrollert oppvarming av systemet.

Instrumentelle parametere av interesse for romtemperaturstudiet er gitt i tabell 3.1 og for lavtemperaturstudiet i tabell 3.2.

Tabell 3.1: Oversikt over eksperimentelle parametere benyttet i romtemperaturstudiet.

Romtemperatur		
EPR (sentraldel):	Mikrobølgeeffekt	0,19 mW
	Modulasjonsbredde	0,1 mT
	Modulasjonsfrekvens	10 kHz
	Sweeptid	41,94 s
	Tidskonstant	40.96 ms
	Sweep-bredde	20 mT
EPR (fosfatradikaler):	Mikrobølgeeffekt	5,03 mW
	Modulasjonsbredde	0,5 mT
	Modulasjonsfrekvens	100 kHz
	Sweeptid	163,84 s
	Tidskonstant	163,84 ms
	Sweep-bredde	90 mT
ENDOR / EIE:	Mikrobølgeeffekt	12,44 mW
	Modulasjonsdybde	150 kHz
	Modulasjonsfrekvens	10 kHz
	Sweeptid	671,09 s / 167,77 s
	Tidskonstant	163,84 ms / 327,68 ms
	Sweep-bredde	1 – 80 MHz / 20 mT

Tabell 3.2: Oversikt over eksperimentelle parametere benyttet i lavtemperaturstudiet (77 K).

Lavtemperatur (77 K)		
EPR (sentraldel):	Mikrobølgeeffekt	0,019 mW
	Modulasjonsbredde	0,2 mT
	Modulasjonsfrekvens	100 kHz
	Sweeptid	41,94 s
	Tidskonstant	10,24 ms
	Sweep-bredde	25 mT
EPR (fosfatradikaler):	Mikrobølgeeffekt	12,35 mW
	Modulasjonsbredde	0,4 mT
	Modulasjonsfrekvens	100 kHz
	Sweeptid	83,886 s
	Tidskonstant	163,840 ms
	Sweep-bredde	80 mT
ENDOR / EIE:	Mikrobølgeeffekt	12,35 mW
	Modulasjonsdybde	150 kHz
	Modulasjonsfrekvens	10 kHz
	Sweeptid	671,09s / 167,77s
	Tidskonstant	163,84ms / 327,68 ms
	Sweep-bredde	1 - 70 MHz / 25 mT

3.5 Etableringen av tensorer

3.5.1 Et enkrystall-eksperiment

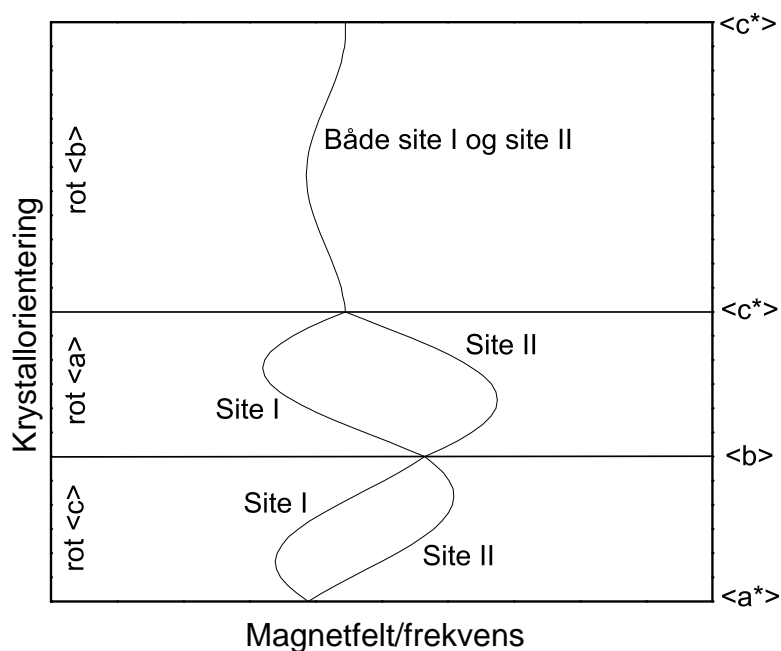
I dette arbeidet ønskes det å kartlegge hvilke radikaler som blir dannet når enkrystaller av LAP utsettes for røntgenstråling. For å kunne nyttiggjøre seg av den informasjonen EPR gir må man kjenne til hvorledes molekylene er orientert i forhold til det ytre magnetfeltet. I en enkrystall er molekylene orientert på en fast og repeterende måte. Dette gjør at man kan bestemme hvordan spinnvekselvirkningene varierer som funksjon av orientering til det ytre magnetfeltet. Ved å rotere krystallen om de tre krystallografiske aksene vil tensorene som er beskrevet i kapittel 2.2 kunne etableres. En rotasjon på 180° av en krystall om en gitt akse, vil gi rotasjonsplanet for den gitte aksene. Ved rotasjon av et ortogonalt aksesystem vil rotasjonsplanet inneholde de to aksene det ikke roteres om.

3.5.2 Sitesplitting og Schonlands tvetydighet

En krystals enhetscelle består vanligvis av mer enn ett molekyl. LAP har $Z = 2$, altså to sett av molekyler i enhetscella. Molekylene vil generelt ha ulik orientering i forhold til hverandre og dermed også til et ytre magnetfelt. Dette gjelder også for de to molekylsettene i LAP. Ved en generell krystallorientering i forhold til det ytre magnetfeltet vil man observere EPR-spekteret (eller ENDOR-spekteret) til det samme radikalet i begge molekylsettene samtidig. Dette kan derfor arte seg som en ekstra oppsplitting av spekteret og kalles derfor sitesplitting. For en monoklin krystall vil det ikke være sitesplitting ved rotasjon om den totallige symmetriaksen $\langle b \rangle$. For rotasjon om de to andre aksene vil det være sitesplitting, unntatt når det ytre magnetfeltet er parallelt med en av de krystallografiske aksene. I et rotasjonsplan med sitesplitting vil "site"-ene være speilet om en krystallografisk akse. Derfor inneholder et smart valgt 90° rotasjonsplan tilstrekkelig informasjon til å teoretisk kunne danne et 180° rotasjonsplan, ved å kombinere informasjon fra begge "site"-ene. Om b -aksen må det derimot tas opp et 180° rotasjonsplan for å få med all informasjon. Figur 3.10 viser et eksempel på sitesplitting for rotasjonsplanene ved rotasjon om aksene $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$ for en monoklin krystall.

Da det benyttes ulike krystaller for hvert rotasjonseksperiment, vil det ved tensorberegninger være umulig å vite hvilken rekkefølge og retning av "site"-ene som skal benyttes. I det

foreliggende tilfelle ($Z = 2$) får vi 4 forskjellige tensorer. Disse kalles Schonlandpermutasjonene [23]. Bare to er fysikalsk riktige. Disse hører til hver sitt molekyl i enhetscellen. Det to andre følger ved feil kombinasjon av "site"-ene. Ofte kan man skille de riktige fra de uriktige ved å se om tensorens prinspalverdier stemmer overens med kjente koblingstyper. Bare ved å rotere om en ikke-krystallografisk akse som danner et rotasjonsplan uten å inneholde noen krystallografisk akse (et skråplan), kan man fastslå hvilke av Schonlandpermutasjonene som er de riktige.



Figur 3.10: Figuren viser hvordan resonanslinjenes posisjoner endres som følge av krystall i de tre rotasjonsplanene rot $\langle a \rangle$, rot $\langle b \rangle$ og rot $\langle c \rangle$ for en monoklin enkrystall. Se beskrivelse i teksten.

3.5.3 Tensorberegninger

For fosfatradikalene er både hyperfinkoblingstensoren \hat{A} og \hat{g} -tensoren bestemt. Dette er gjort ved programmet TRIORD [24]. Da fosfatradikaler gir koblinger store nok til å være sammenlignbare med elektron-Zeemantermen, er andre ordens perturbasjonsprosedyre benyttet. TRIORD beregner først \hat{g} og \hat{A} -tensorene på grunnlag av første ordens perturbasjonsteori. Tilpasningen til eksperimentelle data gjøres ved minste kvadraters metode. Videre beregnes det for hver orientering et korrigert magnetfelt og så en g -verdikorleksjon. En ny g -tensor tilpasses så de korrigererte punktene. Slik forsetter prosedyren iterativt til g -verdikorleksjonen er mindre enn $5 \cdot 10^{-5}$ for alle punkter. Dermed kan andre

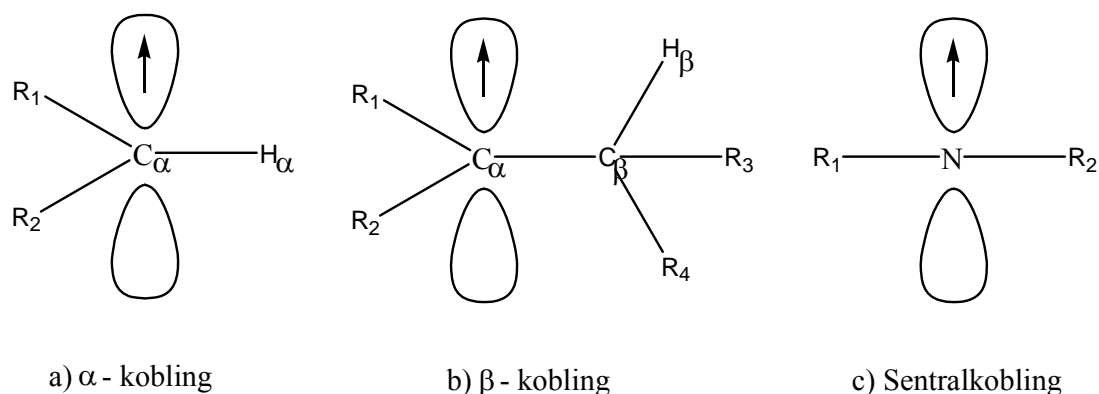
ordens \hat{g} -tensor bestemmes. \hat{A} -tensor forandres ikke fra første til andre ordens perturbasjonsteori for protonkoblinger ($I = 1/2$).

Alle proton-hyperfinkoblingstensorer \hat{A} fra ENDOR-data er beregnet med programmet MAGRES [25] ved første ordens perturbasjonsteori. g -tensor antas å være isotrop. MAGRES etablerer først en starttensor ved å utføre en lineær tredimensjonal tilpassning til de eksperimentelt målte hyperfinsplittningene. Starttensoren er grunnlaget for en videre iterativ ikke-lineær tilpassning til målverdiene der \hat{A} endelig bestemmes. Det kan foretas en optimalisering med hensyn på vinkler, akseposisjoner og fri-kjerneresonans, i alt opptil 15 variabler.

Det henvises til tidligere hovedfagsoppgaver for en grundigere gjennomgang av disse tensorberegningsteknikkene [26].

3.6 Radikalidentifikasjon

De eksperimentelt bestemte hyperfinkoblingstensorer og g -tensorer vil gi informasjon om det uparede elektrons omgivelser, avhengig av opparbeidet kunnskap om ulike koblingers egenskaper. I figur 3.11 er tre viktige vekselvirkningsmodeller skissert.



Figur 3.11: Oversikt over de tre vanligste koblingstypene. For alle typene er sentralatomet antatt å være sp^2 -hybridisert med et uparet elektron i et $2p^{\uparrow}$ -orbital. a) er en α -kobling, b) er en β -kobling og c) er en sentralkobling. For utfyllende forklaringer henvises det til teksten.

3.6.1 α -kobling

En α -kobling er en vekselvirkning mellom et uparet elektron i et $2p^\pi$ -orbital på sentralatomet og et proton også bundet til sentralatomet. Hyperfinkoblingen er karakterisert ved å ha negative egenverdier på formen $(A_{maks}, A_{int}, A_{min}) \approx (3A_{min}, 2A_{min}, A_{min})$, ($A_{min} < 0$). For intermediærverdien A_{int} forventes den tilhørende egenvektor å være parallell med det uparede elektrons orbital (π -orbitalet). Den minimale egenverdien A_{min} sin egenvektor forventes å være parallell med C_α - H_α -retningen.

Isotropverdien til en α -kobling er negativ som følge av spin-exchange vekselvirkninger mellom det enslige elektronet i $2p^\pi$ -orbitalet og elektronspinnene i C_α - H_α -bindingen. Typisk er $a_{iso}^\alpha \approx A_{int}$. McConnell fant følgende relasjon mellom isotropverdien og spinntettheten i π -orbitalet, ofte kalt McConnells ligning [27]:

$$a_{iso}^\alpha = Q_{CH}^H \rho^\pi \quad (3.2)$$

hvor ρ^π er spinntettheten i π -orbitalet og $Q_{CH}^H = -(2,3-2,9)$ mT [28].

Hyperfinkoblingens anisotrope komponent har typiske verdier $(-a_d^\alpha, 0, a_d^\alpha)$ hvor $a_d^\alpha \approx |A_{min}|$. Gordy gir en sammenheng mellom den største positive anisotrope egenverdien (med $B \parallel C_\alpha$ - H_α) og ρ^π [29]:

$$a_d^\alpha = A_{min} - a_{iso}^\alpha = Q_Z \rho^\pi \quad (3.3)$$

der Q_Z empirisk er funnet til å være 38,7 MHz [30].

Isotropverdien til en α -kobling varierer sterkt med vinkelen bindingen C_α - H_α danner med nodalplanet til C_α . McConnells ligning forutsetter at bindingene til sentralatomet er plane. Dipolbidraget til hyperfinkoblingstensen avhenger svært lite av om C_α - H_α bindingen er plan eller ikke. Dette fører til at dersom H_α -atomet ikke ligger i nodalplanet til C_α vil ρ^π bli betydelig forskjellig alt ettersom om man har brukt McConnells eller Gordys relasjon. Denne observasjonen kan brukes til å gi informasjon om geometrien til et radikalsystem [31].

3.6.2 β -kobling

En β -kobling er for eksempel en vekselvirkning mellom et enslig elektron i et $2p^\pi$ -orbital på sentralkarbonatomet og et hydrogenatom bundet til et karbonatom som igjen er bundet til det sentrale karbonatomet. Det fremgår at hyperfintensoren for en β -kobling er nær aksialsymmetrisk med egenverdier $(A_{maks}, A_{min}, A_{min})$. Den største egenverdien, A_{maks} , vil ha en egenvektor nær C_α - H_β -retningen.

Det isotrope bidraget for en β -kobling er positivt og kan estimeres fra Heller-McConnell-relasjonen [28]:

$$a_{iso}^\beta = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta) \rho^\pi \quad (3.4)$$

der B_0 og B_2 er konstanter som varierer med hensyn på type kjerne, avstand mellom sentralkjerne og proton samt systemets konformasjon [32]. For et C_α - C_β - H_β -system kan B_0 og B_2 anslås til $B_0 \approx 0$ MHz og $B_2 \approx 110 - 130$ MHz. Dihedralvinkelen θ er vinkelen mellom planet utspent av C_α - C_β - H_β og planet utspent av C_α - C_β og π -orbitalets akse.

Siden avstanden C_α - H_β er stor sammenlignet med elektronets utstrekning, kan elektronet betraktes som en punktdipol. Det anisotrope bidraget til hyperfintensoren vil typisk være $(2a_d^\beta, -a_d^\beta, -a_d^\beta)$. Verdien til a_d^β er omvendt proporsjonal med r^3 , der r er avstanden C_α - H_β :

$$a_d^\beta = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \beta g_N \beta_N \frac{\rho^\pi}{r^3} \quad (3.5)$$

hvor μ_0 er permeabilitetskonstanten. For protoner kan ligning 3.5 beregnes til:

$$a_d^\beta \sim \frac{80 \rho^\pi}{r^3} [\text{MHz } \text{\AA}^{-3}] \quad (3.6)$$

hvor r er gitt i ångstrøm (\AA).

3.6.3 Sentralkobling

En sentralkobling er for eksempel en vekselvirkning mellom et enslig elektron i et $2p$ -orbital på et nitrogenatom og nitrogenatomet selv. Isotropverdien er positiv og skyldes individuelle spinnpolariseringer av sentralatomenes $2s$ -orbitaler.

En slik kobling vil videre ha en aksialsymmetrisk anisotrop tensor med typiske egenverdier $(2a_d, -a_d, -a_d)$, hvor:

$$a_d = \frac{2}{5} g_e \beta g_N \beta_N \left\langle \frac{1}{r^3} \right\rangle \rho^\pi = a_d^0 \rho^\pi \quad (3.7)$$

hvor $\langle r^{-3} \rangle$ representerer et integral over bølgefunksjonen til det uparede elektron der r er avstanden til kjernen. Hyperfinkoblingens maksimale egenverdi forventes å ha en egenvektor nær parallell med det uparede elektrons orbital.

Nitrogen har $a_d^0 \sim 50$ MHz og $a_{iso}^0 \sim 1540$ MHz, mens fosfor har $a_d^0 \sim 290$ MHz og $a_{iso}^0 \sim 10180$ MHz*.

3.7 Density Functional Theory (DFT)

Density Functional Theory (DFT) er en metode for å beregne elektronstrukturen i et molekyl. Utfyllende informasjon om DFT finnes blant annet i tidligere hovedfagsoppgaver [33, 34].

Å løse den elektroniske bølgefunksjonen Ψ analytisk er ikke mulig for mer kompliserte systemer enn hydrogenatomet. Derfor må det benyttes numeriske metoder med forenklinger og tilnærmelser. Metoder som Hartree-Fock baserer seg på å løse den totale elektronbølgefunksjonen. For et større system tar dette mye tid, selv for de raskeste datamaskinene. Grunnen til dette er at antall frihetsgrader for et system går som $3N$ der N er antall elektroner i systemet.

DFT baserer seg på elektrontetthetsfunksjonen ρ . Tettheten ρ varierer kun med posisjonen \vec{r} , altså kun med tre variabler. Dermed er DFT en mye enklere og raskere metode enn for eksempel Hartree-Fock.

* De oppgitte verdier baserer seg på et arbeid av Morton og medarbeidere [35] hvor a_d^0 ble beregnet til 47,8 MHz for nitrogen og 286,7 MHz for fosfor. Verdiene ble i et senere arbeid av Morton og Preston [36], beregnet til å være ~ 56 MHz for nitrogen og ~ 367 MHz for fosfor, men et arbeid av Fitzpatrick og medarbeidere fra 2005 [37] støtter opp om at de opprinnelige verdiene til Morton [35] er nærmere sannheten. Arbeidet av Fitzpatrick og medarbeidere støtter også opp om de beregnede isotropverdiene til Morton [35].

DFT har sitt fundament i to teoremer, etablert av Hohenberg og Kohn i 1964 [38].

Eksistensteoremet sier at hvis grunntilstanden til elektron tetthetsfunksjonen ρ_0 er kjent, vil også grunntilstanden til elektronbølgefunksjonen for et mangepartikkelsystem Ψ_0 kunne bestemmes. Dette skyldes at det finnes et entydig forhold mellom ρ_0 og Ψ_0 . Det andre teoremet, variasjonsteoremet, sier at i ρ_0 er det et energimessig minimum. Dette gir DFT muligheten til å optimalisere.

Funksjonaler er funksjoner av funksjoner. Energifunksjonalen for et tidsuavhengig ikke-relativistisk mangepartikkelsystem kan som følge av eksistensteoremet uttrykkes [39]:

$$E_0[\rho(\vec{r})] = T_{iv}[\rho(\vec{r})] + V_{ke}[\rho(\vec{r})] + V_{ee}[\rho(\vec{r})] + \Delta T[\rho(\vec{r})] + \Delta V_{ee}[\rho(\vec{r})] \quad (3.8)$$

der T_{iv} er kinetisk energi for alle ikke-vekselvirkende elektroner, V_{ke} er potensiell energi mellom elektroner og kjerner, V_{ee} er den klassiske elektron-elektronrepulsjonstermen, ΔT er et korreksjonsledd for vekselvirkende elektroners kinetiske energi og ΔV_{ee} korrigerer for den klassiske potensielle energien som skyldes kvantemekaniske exchange-effekter.

Det største problemet for DFT er at det eksakte uttrykket for ΔT og ΔV_{ee} bare er kjent for fri elektrongass. For å komme videre må det gjøres kvalifiserte gjetninger som beskriver ΔT og ΔV_{ee} best mulig. Bare sammenligning med eksperimenter kan avgjøre hvor gode de konstruerte funksjonalene er. I denne oppgaven er hybridfunksjonalen B3LYP brukt. B3 står for en exchange-funksjonal, eksperimentelt optimalisert for tre variabler [40]. LYP er korrelasjonsfunksjonalene til Lee, Yang og Parr [41].

Dersom variasjonsmetoden benyttes på energifunksjonalen 3.8 kan Kohn-Sham-ligningen etableres. Dette er en integraldifferensialligning som kan løses numerisk. Det viser seg imidlertid at det tidsmessig lønner seg å approksimere molekylorbitalene med en type LCAO-metode (Linear Combination of Atomic Orbitals) der atomorbitalene som benyttes igjen gjerne er kombinasjoner av Slater- eller Gauss-type orbitaler. Slike sett av approksimasjoner kaller gjerne basissett. Slater-type-orbitaler ligner atomorbitalene for ulike kjerner godt, men de er ofte vanskelige å regne med. Gaussian-type-orbitaler (GTO) er lette å regne med, men beskriver atomorbitalene dårligere. Ved å lineærkombinere flere GTO kan man få en tilfredsstillende approksimasjon som samtidig er god å regne med. Slike lineærkombinasjoner av GTO kalles Contracted-Gaussian-Function (CGF). Basissett kan

enkelt sagt være minimale eller utvidede, hvor sistnevnte beskriver molekylorbitalene i større detalj.

Programmet Gaussian03 [42] har DFT-type beregningsalgoritmer inkludert. I denne oppgaven har Gaussian03 blitt brukt til å beregne optimale radikalstrukturer med tilhørende hyperfinkoblingstensorer. I beregningen av optimale strukturer (dvs. molekylets geometriske elektronstruktur ved laveste energitilstand) er det brukt et enkelt CGF-splittbasissett 6-31+G(2d,p)^{*}. Ved beregningen av hyperfinkoblingstensorer til den optimale strukturen er et mer komplisert basissett, 6-311+G(2df,p)^{**}, brukt. Dette basissettet har vist seg å gi gode estimater av mange typer eksperimentelle resultater [43]. Ved å sammenligne de eksperimentelle og teoretiske hyperfinkoblingstensorer kan man danne seg et bilde over hvor godt den antatte radikalmodellen stemmer overens med den eksperimentelle virkeligheten. I en krystall er et molekyl alltid påvirket av andre molekyler i sine omgivelser. Siden DFT-beregningene kun gjøres for et isolert molekyl kan det forventes å være forskjeller mellom teoretiske og eksperimentelle verdier.

* 6 GTO-funksjoner kombineres for å skildre hvert ikke-valensatomorbital. 31 markerer en DZ-splitt, det vil si at hvert valensatomorbital i det minimale basissettet beskrives av to orbitaler, hvor 3 GTO skildrer første p-orbital og 1 GTO skildrer neste p-orbital. + markerer at det legges til diffuse s- og p-orbitaler til alle ikke-hydrogenatomer. (...) beskriver polariseringsorbitalene. 2 sett d-orbitaler polariserer ikke-hydrogenorbitalene, mens ett sett p-orbitaler polariserer hydrogenorbitalene.

** 6 GTO-funksjoner kombineres for å skildre hvert ikke-valensatomorbital. 311 markerer en TZ-splitt, det vil si at hvert valensatomorbital i det minimale basissettet beskrives av tre orbitaler, hvor 3 GTO skildrer første p-orbital og 1 GTO skildrer hvert av de neste p-orbitalene. + markerer at det legges til diffuse s- og p-orbitaler til alle ikke-hydrogenatomer. (...) beskriver polariseringsorbitalene. 2 sett d-orbitaler og ett sett f-orbitaler polariserer ikke-hydrogenorbitalene, mens ett sett p-orbitaler polariserer hydrogenorbitalene.

4. Resultater og analyse av romtemperaturstudiet

Dette kapittelet tar for seg resultater fra eksperimentene ved romtemperaturbestråling og analysene av disse. Kapitlet starter med noen innledende observasjoner. Videre vil det bli foreslått mulige modeller for radikalstrukturer ut fra de resultatene som er funnet. Disse radikalmodellene vil bli videre diskutert i kapittel 6.

4.1 Innledende observasjoner

EPR-spektrene av enkrystaller av LAP måtte tas opp i to omganger da de dels besto av sterke signaler i sentraldelen, fra nå kalt sentralresonansene, og dels svakere signaler karakterisert ved store koblingskonstanter, fra nå kalt sideresonansene. Det ble også sjekket om radikalene var stabile over tid, noe de viste seg å være. Krystallene ble oppbevart ved romtemperatur. Selv ett par måneder etter bestråling var EPR-spektrene nesten uforandret.

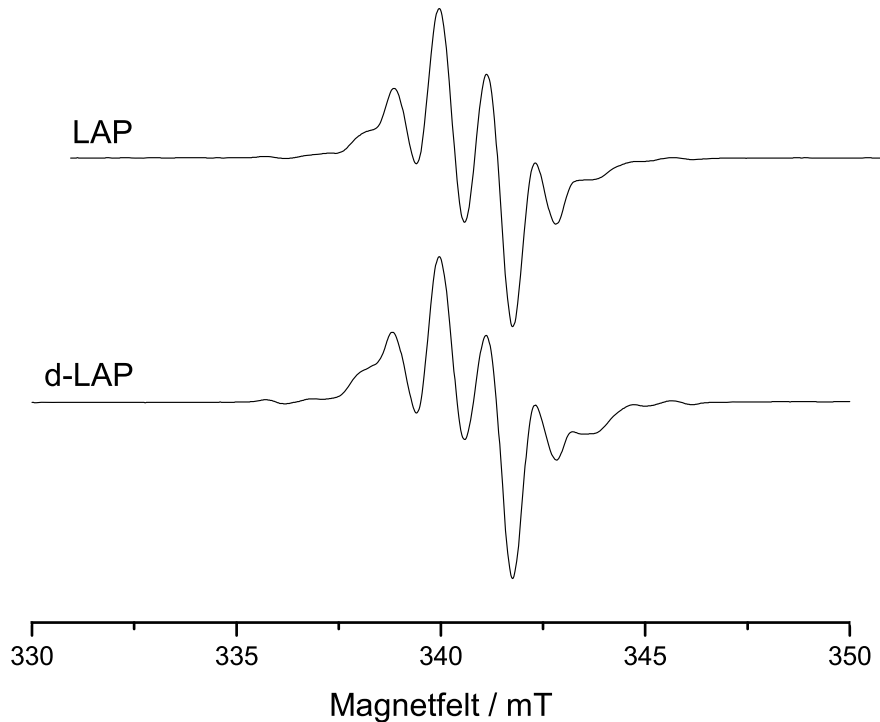
20. mars 2007 ble magnetfeltet til EPR-spektrometeret på EPRlab2 kalibrert. Det ble funnet at magnetfeltet lå rundt 0,5 mT lavere enn den nominelle verdien. Alle data der EPR-spektre er brukt, samt figurer, er korrigert for dette.

4.1.1 Deuterte kontra ikke-deuterte krystaller

Det ble gjort EPR-forsøk med deuterte krystaller, rekrystallisert to ganger fra tungtvann (D_2O). Protoner som er bundet til oksygen- og nitrogenatomer lar seg ofte skifte ut med deuteriumkjerner når krystallen fremstilles fra løsninger av tungtvann.

Hyperfinsplittingen er avhenging av kjerne-g-verdien g_N (se kap. 2.2.3). For protoner er $g_p \approx 5,585$ [44] og for deuterium er $g_D \approx 0,857$ [44]. Dette medfører at hyperfinsplittingen til deuterium er cirka 6,5 ganger mindre enn for protoner. Koblinger til deuterium blir derfor ofte ikke oppløst i et EPR-spekter. Ved å sammenligne EPR-spektre fra deuterte og ikke-deuterte krystaller vil man kunne si noe om de observerte radikalene vekselvirker med utskiftbare protoner eller ei. Slik informasjon er til stor hjelp for å kunne etablere modeller for de observerte radikalene.

Figur 4.1 viser EPR-spektrene fra krystaller dyrket i H₂O (LAP) og D₂O (d-LAP). Som det fremgår av figuren er EPR-spektrene for LAP- og d-LAP-krystaller ved krystallorienteringen $B \parallel \langle c \rangle$ tilnærmet helt like. Spektrene ble også undersøkt ved $B \parallel \langle a \rangle$ med samme resultat.



Figur 4.1: 1.deriverte EPR-spektre av romtemperaturbestrålte enkeltkrystaller av LAP og d-LAP med magnetfeltet rettet parallelt med c-aksen. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,5577 GHz.

Det ble også tatt opp ENDOR-spektre av LAP- og d-LAP-krystaller for å sammenligne disse, både ved $B \parallel \langle c \rangle$ og $B \parallel \langle a \rangle$. I et ENDOR-spekter er oppløsningen mye bedre enn i et EPR-spekter slik at også små koblinger vil være oppløst. For vekselvirkninger med deuteriumkjerne vil resonanslinjenes frekvens være avhengig av frideuteriumfrekvensen ν_D istedenfor friprotonfrekvensen ν_p . Med hensyn på linjeoposisjoner var ENDOR-spektrene for LAP og d-LAP helt like, bortsett fra rundt frikjerne-frekvensområdene. Det var derimot noe forskjell i intensitet for enkelte ENDOR-linjer, men dette er å forvente da erstatning av protoner med deuteriumkjerne vil kunne påvirke relaksasjonsprosessene i systemet.

Observasjonene i EPR/ENDOR-spektrene til LAP- og d-LAP-krystallene tyder klart på at ingen av de koblingene som vil beskrives i dette kapittelet, skyldes vekselvirkninger mellom uparede elektroner og utbyttable protoner. NMR-eksperimentene med deutrerete og ikke-

deutrerete krystaller (se kap. 3.2.3) konkluderte med at graden av protonutskiftning i de benyttede d-LAP-krystallene etter all sannsynlighet var betydelig. Det ble derimot ikke bestemt hvilke spesifikke protoner som lot seg skifte ut bortsett fra at protonet HN2 ble funnet til å være utskiftbart. Eventuelle koblinger med NH- og OH-protoner kan dermed ikke utelukkes.

4.1.2 EPR-spektre ved ulik mikrobølgeeffekt

For å sjekke om EPR-spektrene var avhengig av mikrobølgeeffekten ble sentralspekteret tatt opp ved ulike effekter. Når en EPR-resonans blir mettet (se side 21) vil populasjonsforskjellene i spinntilstandene utjevnes. Dermed vil det ikke være noe netto energiabsorpsjon og EPR-signalet vil forsvinne. Slik informasjon kan derfor brukes til å skille ulike radikaler fra hverandre i EPR-spekteret i det metningspunktet vil være ulikt for de ulike radikalene.

Det ble gjort forsøk der EPR-spektre for sentralresonansene ble tatt opp ved ulike mikrobølgeeffekter, fra 0,2 mW til 101 mW. Spekteret forble uforandret når mikrobølgeeffekten økte, bortsett fra at den svake flankeresonansen forsvant ved høye mikrobølgeeffekter. Dette tyder på at flankeresonansen ikke tilhører de samme radikalene som bidrar til EPR-spekteret for de mer sentrale resonansene.

4.2 Schonlandtvetydigheten

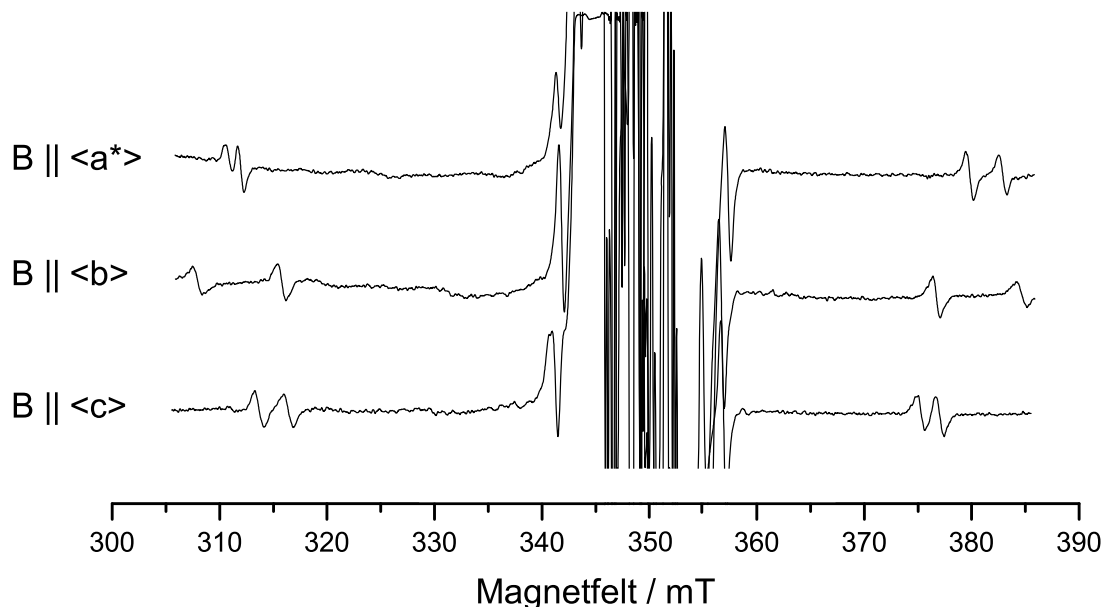
Som nevnt i kapittel 3.5.2 er den eneste muligheten for å kunne skille mellom Schonlandpermutasjonene å rotere krystallen i et såkalt skråplan. Dette er ikke gjort i dette studiet. For å avgjøre hvilket sett av Schonlandpermutasjonene som er det fysikalsk riktige i dette studiet er det kun sett på om egenverdiene til hyperfinkoblingstensorene stemmer overens med kjente koblingstyper, i tillegg til en vurdering av hvor god tilpasningen til de eksperimentelle dataene er. Til hver tensor vil det også være to mulige fortegnkombinasjoner. Disse tilhører hvert sitt molekyl i enhetscella. I alle tabeller er kun en fortegnsvariant listet. Den andre varianten fås lettest ved å skifte fortegn til -elementene for alle egenvektorene.

4.3 Sideresonansene

For å studere sideresonansene ble EPR-spektrene tatt opp ved romtemperatur for hver femte grad ved rotasjon om aksene $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$, samt $\langle a^* \rangle$ som står vinkelrett på bc -planet. Dette ble gjort fordi programmet TRIORD [24], som brukes til å beregne hyperfin- og g -tensorene, er avhengig av et ortogonalt koordinatsystem. Følgelig brukes referansesystemet a^* , b , c for studiet av sideresonansene.

4.3.1 EPR-spektre av sideresonansene

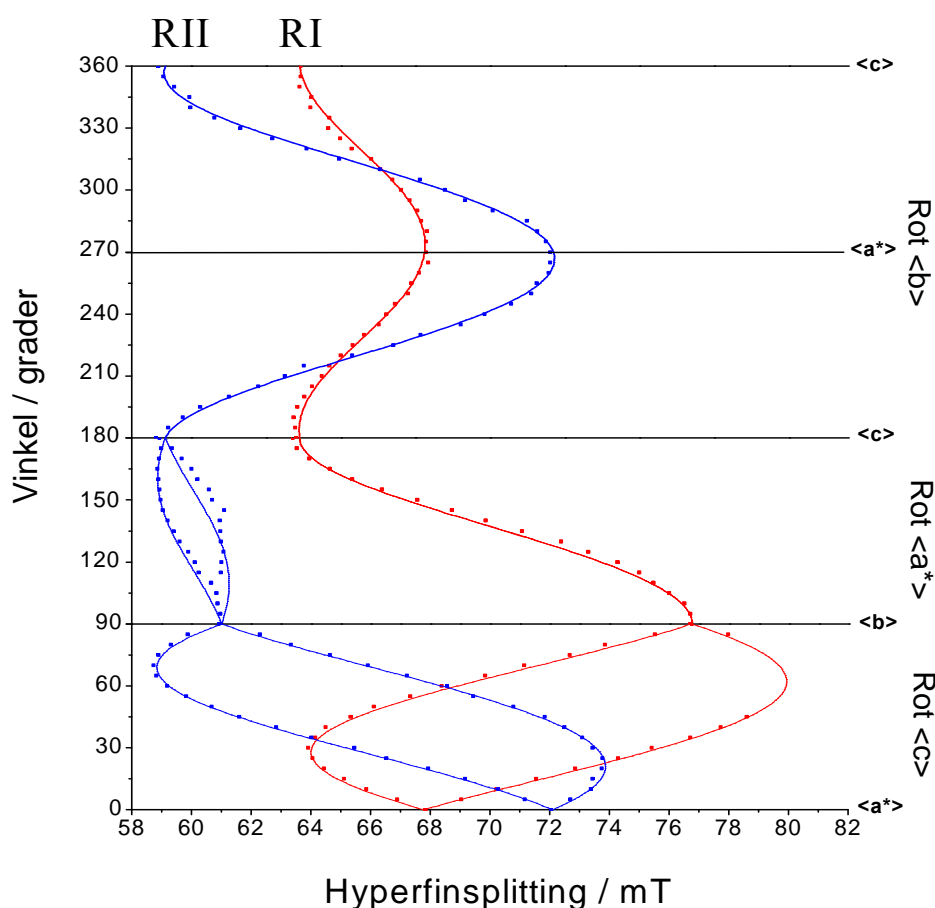
Sideresonansene består av to godt oppløste dubletter med store koblingskonstanter på mellom 64 mT og 80 mT. Splittingene er betydelig større enn for kjente protonkoblinger. Sideresonansene antas derfor å skyldes vekselvirkninger med andre kjerner. Figur 4.2 viser EPR-spektrene av sideresonansene med magnetfeltet rettet parallelt med aksene $\langle a^* \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$. Fra figuren ser man at intensitetsforholdet mellom de to dublettene er ca. 1:1. Dubletter er en følge av spinnvekselvirkninger med kjerner som har spinn $I = 1/2$.



Figur 4.2: 1. deriverte EPR-spektre av sideresonansene til enkrystaller av LAP, bestrålt og observert ved romtemperatur, med magnetfeltet rettet parallelt med de krystallografiske aksene $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$, samt med $\langle a^* \rangle$ som står vinkelrett på bc -planet. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,763380 GHz.

4.3.2 Analyse av sideresonansene

På grunn av de store splittingskonstantene til sideresonansene kunne koblingene analyseres fra EPR-spektrene. De to dublettene var lette å følge ved rotasjon om $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$. Litt vanskeligere var det å følge dublettene ved rotasjon om $\langle a^* \rangle$, da signal-til-støyforholdet for disse spektrene var dårlig. Grunnen til dette ligger i at krystallenes flate form fører til at utstrekningen i a^* -retning er mye mindre enn for de andre aksene. Prøveholderen (kaviteten) begrenser krystallenes utstrekning i de to ikke-rotasjonsretningene. Dermed blir krystallene som brukes til eksperimenter ved rotasjon om $\langle a^* \rangle$, volummessig betydelig mindre enn krystallene som benyttes ved rotasjon om de to andre aksene. Et mindre volum gir signal fra færre radikaler og dermed et dårligere signal-til-støyforhold. Figur 4.3 viser hvorledes hyperfinsplittningene til de to observerte vekselvirkningene varierer med krystallorienteringen.



Figur 4.3: Hyperfinsplittningene (i mT) som funksjon av krystallorienteringen for koblingene RI og RII observert i enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved romtemperatur. Punktene er målte verdier og kurvene representerer beregnede verdier basert på hyperfinkoblingstensorene i tabell 4.2.

Hyperfinsplittingstensorene og g-tensorene ble beregnet med programmet TRIORD. g-tensorene er gitt i tabell 4.1 og hyperfinsplittingstensorene er gitt i tabell 4.2. Da TRIORD ikke beregner usikkerheter er tilpasningen til måleverdier gitt i form av RMS (Root Mean Square)-verdier.

Tabell 4.1: g-tensorene for koblingene RI og RII, funnet i enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved romtemperatur. Tilpasningen til målte verdier i tre plan er gitt ved RMS (Root Mean Square)-verdier.

Kobling (RMS)	Isotrop g- verdi	Eigenverdier	Egenvektorer		
			<a*>		<c>
RI ($2,0 \cdot 10^{-4}$)	2,0016	2,0023	0,575	0,817	0,056
		2,0018	0,807	-0,577	0,125
		2,0008	-0,134	0,026	0,991
RII ($3,0 \cdot 10^{-4}$)	2,0017	2,0024	0,074	0,967	-0,245
		2,0017	0,997	-0,076	0,002
		2,0012	0,017	0,245	0,969

Tabell 4.2: Hyperfinkoblingstensorer (i mT) for koblingene RI og RII, funnet i enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved romtemperatur. Tilpasningen til målte verdier i tre plan er gitt ved RMS (Root Mean Square)-verdier. I tillegg er noen molekulære referansevektorer listet, samt vinkelforskjellene mellom noen egenvektorer og referansevektorer.

Kobling (RMS)	Isotrop verdi (mT)	Anisotrope verdier (mT)	Eigenverdier (mT)	Egenvektorer			$\Delta\phi^a$ (grader)
				<a*>		<c>	
RI (0,3)	69,2	10,8	79,9	0,467	-0,884	-0,007	6,2 ₁
		-5,1	64,1	-0,800	-0,426	0,423	
		-5,7	63,5	0,377	0,192	0,906	
RII (0,2)	63,9	10,0	73,9	-0,931	-0,361	-0,065	36,5 ₂
		-4,6	59,4	0,267	-0,546	-0,794	
		-5,4	58,5	0,251	-0,756	0,604	
Molekulære referansevektorer ^b							
1 Retningsvektoren P – O4				0,521	-0,850	0,079	
2 Retningsvektoren P – O3				-0,963	-0,265	-0,052	

^a Vinkelavviket mellom egenvektoren og den molekulære referansevektor hvis nummer er gitt som indeks.

^b Referansevektorer fra appendiks A.

Siden g -tensorene i tabell 4.1 er ganske isotrope er det store usikkerheter forbundet med egenverdiens egenvektorer. Det legges også merke til at isotropverdien ligger noe under g -verdien for fritt proton på $g_e = 2,0023$.

Fra tabell 4.2 sees det at hyperfinkoblingstensorene RI og RII har den karakteristiske formen til en sentralkobling (se kap 3.6.3). Isotropdelen er stor. Aksialsymmetrien for hyperfinkoblingstensorene fører til at spesielt intermediær- og minimalverdiens egenvektorer er beheftet med store usikkerheter. På grunn av en mer anisotrop karakter kan hyperfinkoblingstensorene vektlegges sterkere g -tensorene. Strengt tatt er det nok bare egenvektorene for de maksimale hyperfinkoblingene det kan festes lit til.

Bortsett fra hydrogen er det bare fosfor (^{31}P) og karbonisotopen ^{13}C som har spinn $I = 1/2$ i LAP, dersom det antas fravær av eventuelle forurensninger. ^{13}C utgjør 1,1 % av naturlige karbonatomer. Den observerte maksimale anisotropi (dvs. $2a_d^0$) for RI og RII på henholdsvis cirka 10,8 mT og 10,0 mT er imidlertid vesentlig høyere enn den forventede maksimale anisotropi for ^{13}C på cirka 6,5 mT [35], men godt innenfor den forventede maksimale anisotropi for ^{31}P på cirka 20,5 mT [35] (se kap. 3.6.3). Dermed er det lite sannsynlig at RI og RII tilhører en ^{13}C -kobling. Det antas derfor at koblingene skyldes en vekselvirkning med ^{31}P .

4.3.3 Radikalene RI og RII

Ved å sammenligne resultatene for RI og RII med Bungums [26] oppsummering av tidligere kjente fosfatradikaler, synes radikalet PO_3^{2-} å være interessant. Dette radikalet ble først påvist ved bestråling av $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ av Horsfield og medarbeidere [45]. De viste at radikalet PO_3^{2-} var stabilt ved romtemperatur. Det hadde en aksialsymmetrisk hyperfinkoblingstensor med egenverdier på 70,25 mT, 54,07 mT og 54,03 mT. g -tensoren var nær isotrop med egenverdier på 1,9994, 2,0011 og 2,0004. Radikalet syntes å være sp^3 -hybridisert og med egenvektoren for hyperfinkoblingstensorens maksimalverdi og egenvektoren for g -tensorens minimalverdi parallell med det uparede elektrons orbital (LEO). Spinntettheten ble funnet til 0,165 i 3s- og 0,527 i 3p-orbital på fosforatomet, og til 0,103 på hvert av oksygenatomene.

Både RI og RII har for hyperfinkoblingstensorene en stor isotrop del på henholdsvis cirka 69 mT og 64 mT. Det betyr at det uparede elektronets orbital må ha betydelig s-karakter, da det bare er s-orbitaler som gir bidrag til den isotrope hyperfinkoblingen.

For å redusere usikkerheten i sammenligningen av hyperfinkoblings- og g-tensorene ønskes det bare å ta hensyn til maksimalverdiens egenvektorer. Ortogonalitet for egenvektorene medfører at $g_{\min} \parallel A_{maks} \Rightarrow g_{maks} \perp A_{maks}$. Vinkelen mellom egenvektorene til g_{maks} og A_{maks} er for RI 63° og for RII 107° . Det store avviket fra 90° kan trolig tilskrives den store usikkerheten i egenvektorene til g-tensorene.

Ved sammenligning med krystalldata for den uskadde molekylstrukturen (appendiks A) kan man se at for RI avviker egenvektoren for A_{maks} , som altså representerer det uparede elektrons orbitals retning, og retningen til bindingen P – O4 med bare $6,2^\circ$. For RII er avviket på $36,5^\circ$ mellom egenvektoren til A_{maks} og retningen til bindingen P – O3.

Spinntetthetene a_s^2 til 3s-orbital og a_p^2 til 3p-orbital er beregnet fra relasjonene [46]:

$$a_s^2 = \frac{a_{iso}}{A^0} \quad (4.1)$$

og

$$a_p^2 = \frac{2B}{2B^0} \quad (4.2)$$

A^0 er forventet hyperfinkobling for et elektron i 3s-orbital og er for fosfor beregnet til $A^0 = 363,5$ mT [35]. $2B^0$ er forventet dipol-kobling parallelt med magnetfeltet for et elektron i 3p-orbital. For fosfor er det beregnet at $2B^0 = 20,48$ mT [35]. $2B$ er den målte dipolkoblingen $2B = A_{maks} - a_{iso}$, som for RI og RII beregnes fra tabell 4.2. For RI blir $a_s^2 = 0,190$ og $a_p^2 = 0,525$ og for RII blir $a_s^2 = 0,176$ og $a_p^2 = 0,488$. Disse verdiene stemmer bra overens med PO_3^{2-} -radikalet til både Horsfield [45] og Bungum [26].

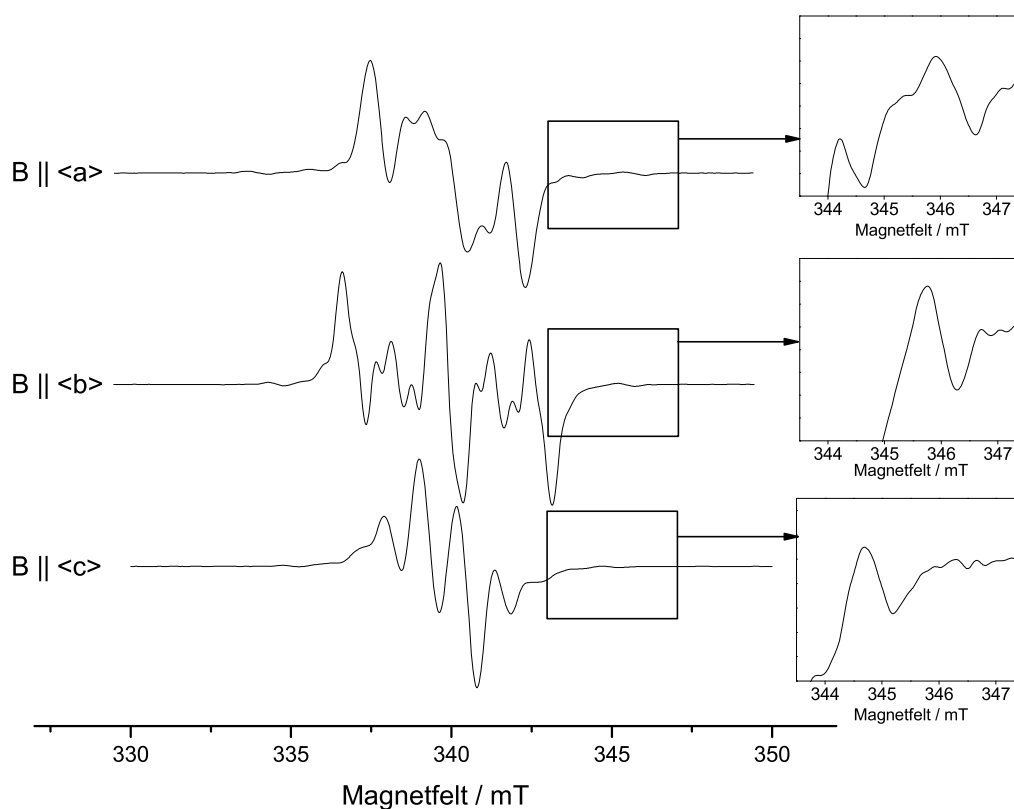
Radikaler som ligner PO_3^{2-} , men hvor et eller flere av oksygenatomene er protonert, kan ha en hyperfinkoblingstensor til fosfor av lignende karakter og størrelse [47]. Fra de beskrevne sammenligningene er det grunn til å tro at både RI og RII kan være radikalet PO_3^{2-} eller varianter av dette. RI er antagelig dannet ved brudd i bindingen P – O4. RII antas dannet ved brudd i bindingen P – O3. Avviket på $36,5^\circ$ kan forklares ved en eventuell dreining av

fosfatgruppen på grunn av brudd i P – O3-bindingen. Både O3 og O4 er i utgangspunktet protonerte oksygenatomer, men på grunn av en eventuell reorganisering i fosfatgruppen etter bindingsbrudd, er det vanskelig å fastslå akkurat hvilken PO_3^{2-} -radikalvariant RI og RII representerer.

4.4 Sentralresonansene

4.4.1 EPR-spektre av sentralresonansene

Sentralresonansenes EPR-spektre ble tatt opp for hver femte grad ved rotasjon om de krystallografiske aksene $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$.



Figur 4.4: 1. deriverte EPR-spektre for romtemperaturbestrålte enkeltkrytaller av LAP observert ved 240 K. Magnetfeltet B er rettet parallelt med de krystallografiske aksene $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrequens på 9,5265 GHz.

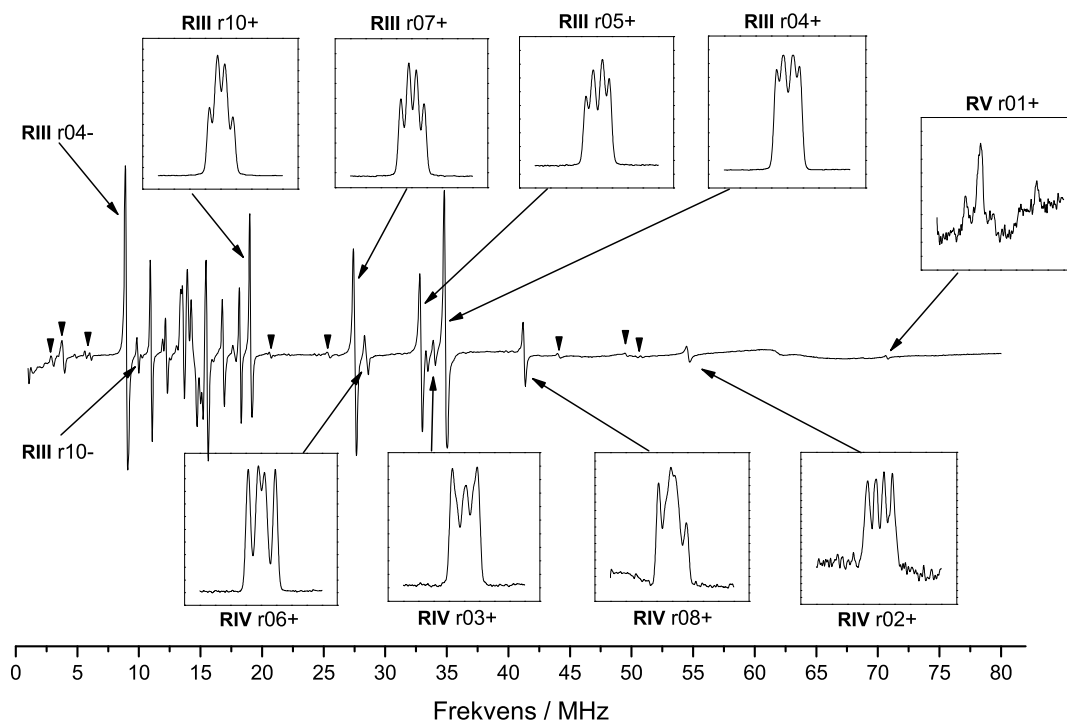
Figur 4.4 viser EPR-spektrene med magnetfeltet rettet parallelt med de krystallografiske aksene. Spektrene viser kraftige resonanslinjer i midten med noen mye svakere flankeresonanser. Midtresonansen har helt tydelig bidrag fra mer enn et radikal. Spesielt ser man det for spekteret med $B \parallel \langle b \rangle$. Ved $B \parallel \langle c \rangle$ har spekteret en klar 1:2:2:1 formasjon. Symmetrien i spektrene tilsier at g -verdien må være ganske lik for de ulike radikalene, men ved $B \parallel \langle b \rangle$ er det asymmetri i EPR-spekteret. Dette kan skyldes en noe ulik g -verdi for de ulike radikalene. Flankeresonansen er svært svak og antas å tilhøre ett eget radikal (se kap. 4.1.2), eventuelt flere. Konklusjonen blir at synes å være minimum tre radikaler som bidrar til EPR-spektrene for sentralresonansene.

4.4.2 ENDOR og EIE av sentralresonansene

Da EPR-spekteret viser minst tre overlappende radikaler ble ENDOR-spektre tatt opp for hver femte grad med rotasjon om de tre krystallografiske aksene ved 240 K. Magnetfeltet ble under ENDOR-opptak låst til en magnetfeltverdi nær midten av EPR-spekteret. ENDOR-spektrene for rotasjon om b -aksen viste rundt 25 linjer som helt eller delvis kunne følges. Dessverre var det en del av linjene som ikke var synlige ved rotasjon om de to andre aksene. Dette skyldes at linjeintensiteten halveres i plan med sitesplitting. Som for fosfatradikalstudiet gjorde krystallenes form at det spesielt var rotasjonsplanet om $\langle a \rangle$ som satte begrensningen på hvor mange ENDOR-linjer som kunne følges i alle de tre rotasjonsplanene. (Aksene $\langle a \rangle$ og $\langle a^* \rangle$ avviker bare med 8° .)

Siden $\nu_N \propto B$ vil ENDOR-linjene for koblinger med $|a|/2 > h\nu_N$ ha høyfrekvente linjer som vil flytte seg mot høyere frekvenser med økende magnetfeltstyrke B . Tilhørende lavfrekvente linjer vil flytte seg mot lavere frekvenser. Hvis derimot koblingene har $|a|/2 < h\nu_N$ vil både høy- og lavfrekventgreinene av ENDOR-resonansene flytte seg mot høyere frekvenser med økende B . Ved å låse magnetfeltet på litt forskjellige steder i EPR-spekteret under ENDOR-opptaket kan man derfor ofte sortere ut lav- og høyfrekvente ENDOR-linjer. Dette ble gjort for de aktuelle linjene. I denne oppgaven er alle høyfrekvente ENDOR-linjer markert med +, mens lavfrekvente linjer er markert med -.

For å sortere de ulike ENDOR-linjene med hensyn på hvilket radikal de tilhørte, ble det tatt opp EIE-spektre ved to ulike krystallorienteringer. I figur 4.5 vises EIE-spektrene tatt opp ved rotasjon om b -aksen, 45° fra $B \parallel \langle a \rangle$.



Figur 4.5: 1.derivert ENDOR-spekter tatt opp 45° fra $B \parallel \langle a \rangle$ i rot $\langle b \rangle$ -planet (vist med stiplet linje i figur 4.6). 11 av de 12 linjene som kunne følges i alle tre plan er tegnet inn med piler og navngitt som for eksempel r01+. Ved å sammenligne EIE-spektrene er ENDOR-linjer tilhørende samme radikal sortert. EIE-spektrene til de tre radikalene, RIII, RIV og RV er også vist i figuren. EIE-spektrene har alle en totalbredde på 20 mT. ENDOR-linja r12+ ligger under linja r04+ og er ikke synlig ved denne orienteringen. Svake linjer det ikke var mulig å følge i andre plan en rot $\langle b \rangle$, er vist med små piler.

Totalt kunne 12 ENDOR-linjer følges gjennom alle de tre rotasjonsplanene. Figur 4.5 viser, ved analyse av EIE-spektre, at EPR-spekteret til sentralresonansene i alle fall får bidrag fra tre radikaler. Fire høyfrekvente og to lavfrekvente ENDOR-linjer tilhører radikal RIII og fire høyfrekvente linjer tilhører radikal RIV. Linja r01+ tilhører et tredje radikal, kalt RV. ENDOR-linja r12+ ligger i figur 4.5 skult under den sterke linja r04+.

Ved å låse magnetfeltet på forskjellige steder i EPR-spekteret kan man sortere de ENDOR-linjene som gir bidrag til den aktuelle EPR-resonansen. Når magnetfeltet ble låst til de ytterste flankeresonansene i EPR-spekteret var det bare r01+ samt 5 andre ubestemte linjer som var synlige i ENDOR-spekteret. Disse ENDOR-linjene er markert med ▼ i figur 4.5 og de befinner seg alle fra 15 MHz og oppover. Linja r12+ var ikke synlig i ENDOR-spekteret med magnetfeltet låst til flankeresonansene og hører dermed ikke til samme radikal som r01+.

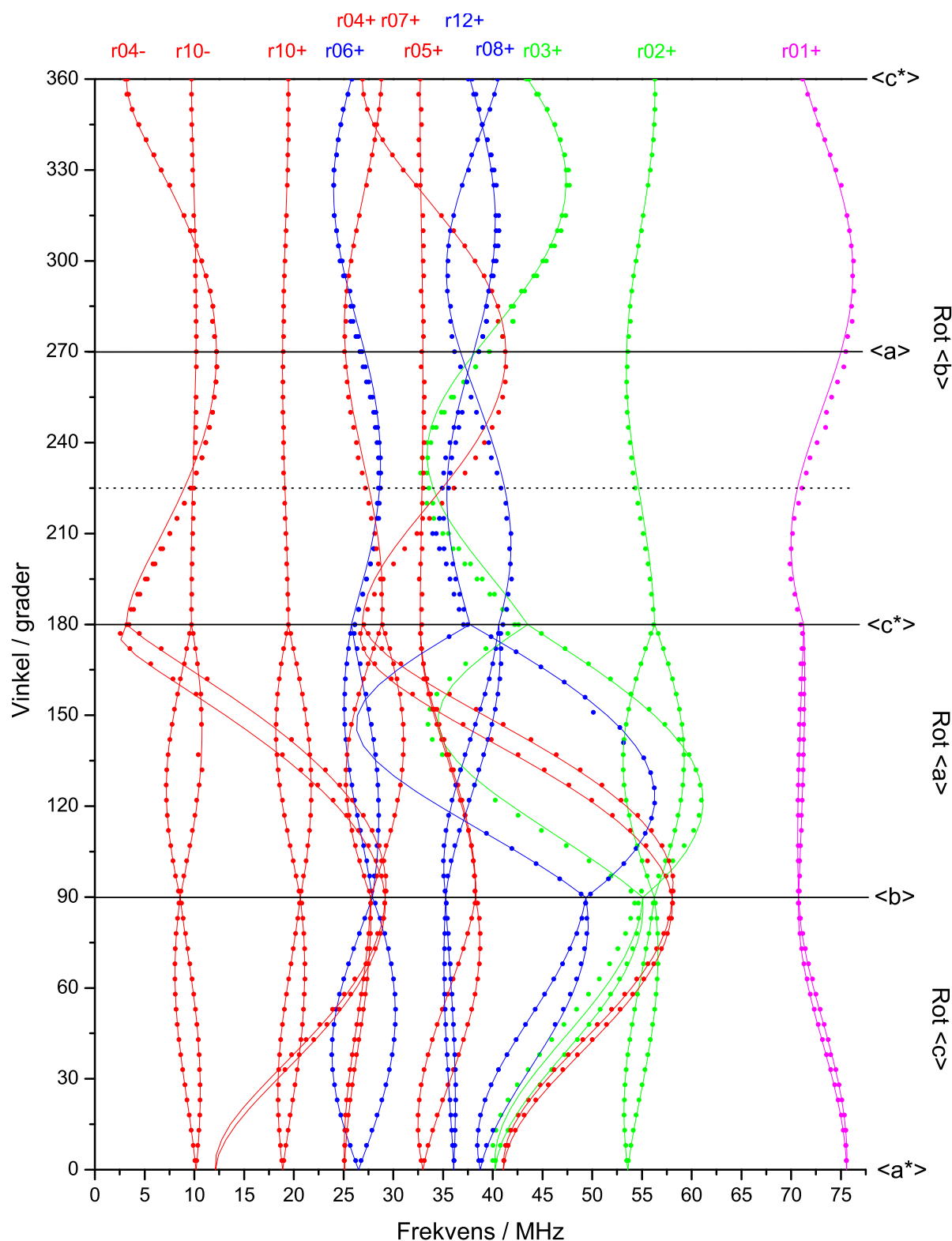
EIE-spektre ble også tatt opp ved orientering 8° fra $\langle c^* \rangle$ i rotasjonsplanet om a-aksen. Da kunne en også observere EIE-spekteret for ENDOR-linja r_{12+} . Det viste seg at EIE-spekteret for r_{12+} var svært likt spektrene til de koblinger som var blitt knyttet til radikal RIV. Ved en nærmere analyse ble det fastslått at EIE-spektrene til r_{03+} og r_{02+} var litt smalere enn spektrene til r_{12+} , r_{06+} og r_{08+} . Det ble derfor mistenkt at radikal RIV hadde to ulike konformasjoner.

Det er dermed funnet tre ulike radikaler, to som gir opphav til midtresonansene og et som gir opphav til flankeresonansene. De 12 hyperfinkoblingstensorene til ENDOR-linjene ble bestemt ved bruk av programmet MAGRES [25]. Figur 4.6 viser ENDOR-linjenes målepunkter samt de forventede ENDOR-linjevariasjonene beregnede fra disse tensorene.

For linja r_{03+} er tilpasningen mellom observerte verdier og den beregnede tensor ikke helt optimal. Dette skyldes at r_{03+} er en svak linje som lett blir påvirket av mer intense linjer i nærheten. Utslaget sees i figur 4.6, hvor tilpasningen for r_{03+} er dårligst i nærheten av andre linjer, spesielt de sterke linjene til r_{04+} og r_{05+} .

Linja r_{04-} i figur 4.6 nærmer seg lave frekvenser (< 5 MHz) rundt $B \parallel \langle c^* \rangle$. Dette gir et problem i tilpasningen ved bruk av første ordens perturbasjonsteori. Utslaget sees i tabell 4.3 der hyperfinkoblingenes i tallverdi minste egenverdier er forskjellige for r_{04+} og r_{04-} . Siden dette problemet ikke er aktuelt for r_{04+} , er r_{04+} blitt benyttet videre i analysen.

Linjene til r_{03+} og r_{12+} synes i figur 4.6 å ha en nokså lik orienteringsvariasjon. Spesielt gjelder dette ved rotasjon om a-aksen, men også i de andre rotasjonsplanene er det mange fellestrekk. En slik likhet i oppførsel styrker mistanken om at RIV er et radikal med to konformasjoner, hvor r_{03+} og r_{12+} tilhører hver sin konformasjon.



Figur 4.6: Oversikt over alle de 12 ENDOR-linjene som kunne følges i alle tre rotasjonsplan. Punktene er måleverdiene. De heltrukne linjene representerer beregnede ENDOR-linjevariasjoner basert på de etablerte hyperfinkoblingstensorene i tabell 4.3, 4.5 og 4.7. Linjer og punkter tilhørende radikal R111 er røde, tilhørende R1A er blå, R1Bs linjer og punkter er grønne og r01+ (tilhørende RV) er merket lilla. Den stiplede linja tilsvarer orienteringen hvor ENDOR-spekteret i figur 4.5 ble tatt opp.

4.4.3 Radikal RIII

Tabell 4.3: Hyperfinkoblingstensorer for koblinger knyttet til radikal RIII funnet ved ENDOR-spektroskopi av enkrystaller av LAP bestrålt ved 295 K og observert ved 240 K. Tallet i parentes angir usikkerheten til siste siffer. I tillegg er noen molekulære referansevektorer listet, samt vinkelforskjellene mellom noen egenvektorer og referansevektorer.

Kobling (type)	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Eigenverdier (MHz)	Eigenvektorer			$\Delta\varphi^a$ (grader)
				<a>		<c*>	
r04+ (α)	-55,18 (2)	-32,22 (4)	-87,40 (3)	0,014 (1)	0,998 (0)	-0,064 (1)	20,9 ₁ 40,9 ₂
		1,47 (4)	-53,71 (3)	0,999 (0)	-0,013 (1)	0,008 (1)	
		30,75 (4)	-24,43 (4)	0,007 (1)	-0,064 (1)	-0,998 (0)	
r04- (α)	-58,26 (2)	-29,19 (4)	-87,45 (3)	0,012 (0)	0,998 (0)	-0,065 (0)	
		4,89 (4)	-53,37 (3)	0,999 (0)	-0,012 (0)	0,012 (0)	
		24,30 (5)	-33,96 (5)	0,011 (0)	-0,065 (0)	-0,998 (0)	
r05+ (β)	40,36 (1)	8,11 (2)	48,47 (2)	0,264 (1)	0,964 (16)	-0,012 (5)	
		-3,83 (2)	36,53 (2)	0,286 (0)	-0,067 (4)	0,956 (2)	
		-4,29 (2)	36,07 (2)	0,921 (1)	-0,256 (5)	-0,294 (17)	
r07+ (β)	25,36 (1)	7,85 (2)	33,21 (2)	0,083 (2)	-0,631 (13)	0,771 (1)	
		-3,51 (2)	21,85 (2)	0,605 (1)	0,648 (7)	0,464 (11)	
		-4,34 (2)	21,02 (2)	0,792 (1)	-0,428 (7)	-0,435 (8)	
r10+ (γ)	10,27 (1)	4,59 (2)	14,86 (2)	0,216 (3)	0,812 (4)	-0,542 (6)	
		-1,28 (2)	8,99 (2)	0,844 (1)	0,123 (4)	0,522 (2)	
		-3,30 (2)	6,97 (2)	0,491 (2)	-0,570 (6)	-0,659 (4)	
r10- (γ)	10,22 (6)	4,60 (8)	14,82 (6)	0,192 (16)	0,815 (15)	-0,546 (24)	
		-1,23 (14)	8,99 (13)	0,840 (3)	0,151 (18)	0,521 (9)	
		-3,36 (13)	6,86 (11)	0,507 (5)	-0,559 (21)	-0,656 (14)	
Molekulære referansevektorer ^b :							
1 Retningsvektor C2 – N1				-0,929	0,150	-0,337	
2 Retningsvektor C2 – HC2				-0,178	-0,676	0,715	
3 Retningsvektor C2 – H1C3				0,472	-0,233	-0,850	
4 Retningsvektor C2 – H2C3				0,168	-0,736	-0,655	
5 Retningsvektor C2 – H1C4				0,961	-0,260	-0,094	
6 Retningsvektor C2 – H2C4				0,702	-0,674	0,231	
7 Retningsvektor (C1 – C2) × (C2 – C3)				-0,864	0,320	0,388	

^a Vinkelavviket mellom egenvektoren og den molekulære referansevektor hvis nummer er gitt som indeks.

^b Referansevektorer hentet fra appendiks A.

ENDOR-linjene r04-, r04+, r05+, r07+, r10- og r10+ er ved EIE-spekteranalyse knyttet til radikal RIII. Hyperfinkoblingstensorene for disse linjene er listet i tabell 4.3.

Schonlandpermutasjonene til tensorene er så like at for alle praktiske formål er forskjellen ubetydelig. I tabell 4.3 er det derfor bare listet en variant.

EIE-spekterets bredde vil være representativt for summen av de bidragsgivende hyperfinsplittingene ved en spesifikk orientering. Ved den orienteringen som er vist med stiplet linje i figur 4.6 har EIE-spekteret til RIII en halvverdibredde på rundt 4,7 mT. Summen av hyperfinsplittingene som knyttes til RIII i tabell 4.3 kan ved denne orienteringen anslås til cirka 4,4 mT. Dette betyr at det for radikal RIII antagelig finnes ytterligere koblinger på til sammen cirka 0,3 mT. Dette utgjør rundt 10 MHz. Ved orienteringen nær $B \parallel \langle c^* \rangle$ er det funnet to ENDOR-linjer på henholdsvis 11,3 MHz og 18,3 MHz. Disse ble ved EIE-spektrene knyttet til radikal RIII. Linjene var vanskelig å få knyttet sammen med linjer i de andre to planene da de ble overskygget av andre linjer rundt friprotonfrekvensen. Det var derfor ikke mulig å beregne tensorer til disse to linjene. De to linjene er sentrert om 14,8 MHz og ser dermed ut til å være lav- og høyfrekventgrener til en kobling på omtrent 7 MHz (0,25 mT). Dermed ser det ut til at det er denne koblingen som mangler for radikal RIII, som dermed er assosiert til totalt 5 koblinger, 4 kjente og en (liten) ukjent.

Av egenverdiene til tensorene i tabell 4.3 fremkommer det at r04+ har form av en α -kobling, mens r05+, r07+ og r10+ har egenverdier på form av β -koblinger. r10+ har en karakteristisk lavere anisotropi og er derfor trolig en γ -kobling*. Forutsatt at det ikke finner sted noen reorientering av molekylet etter radikaldannelse vil det for en α -kobling være slik at retningen til den brutte bindingen vil ligge nær parallell med retningen til det enslige elektrons orbital (LEO), som igjen ligger parallelt med egenvektoren (t_{int}^{α}) til koblingens intermediære egenverdi A_{int} . Denne retningen kalles ofte intermediærretningen til tensoren. Den numerisk minste egenverdien, A_{min} , har en egenvektor (t_{min}^{α}) som vil ligge nær retningen $C_{\alpha}-H_{\alpha}$. Retningen t_{min}^{α} kalles ofte tensorens minimalretning. For en β - eller γ -kobling vil egenvektoren (t_{maks}^{β}) til tensorens numerisk maksimale egenverdiverdi, A_{maks} , ligge nær

* En γ -kobling ligner en β -kobling, men er en kobling av type $C_{\alpha}-C_{\beta}-C_{\gamma}-H_{\gamma}$. Siden avstanden mellom $C_{\alpha}-H_{\gamma}$ er større enn for en β -kobling vil den anisotrope tensoren til en γ -kobling ha elementer som i tallverdi er lavere enn elementene til en β -kobling se kapittel 3.6.2).

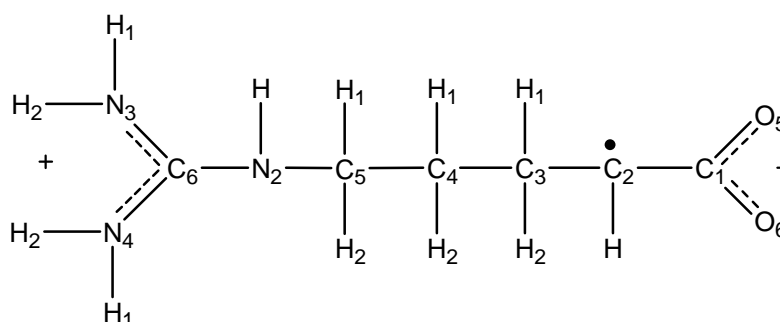
parallelt med retningen $C_{\alpha}-H_{\beta}$. t_{maks}^{β} kalles gjerne maksimalretningen til tensoren. Ved å sammenligne de forskjellige tensorenes egenvektorer og de krystallografiske referansevektorene for den uskadde molekylstrukturen (se appendiks A) vil man få en indikasjon på hvor det enslige elektronet kan være lokalisert. Etter radikaldannelse vil imidlertid molekylstrukturen gjerne endre seg, slik at det forventes å finne avvik mellom egenvektorene og referansevektorer for den uskadde molekylstrukturen.

Studiene av de deutrerete krystallene (se kap. 4.1.1) konkluderte med at ingen av tensorene til radikal RIII tilhørte vekselvirkninger med utskiftbare protoner. NMR-studiet av deutrereringen i d-LAP-krystallene kunne imidlertid ikke sikkert konkluderes med at alle NH-protoner i de deutrerete krystallene var skiftet ut med deuteriumkjerner (se kap. 3.2.3).

α -tensoren r_{04+} har egenverdier som forventet for et karbonsentrert spinn ($-3a_d, -2a_d, -a_d$). Til forskjell har nitrogensentrerte spinn α -tensorer hvor egenverdiene typisk har en høyere intermediærverdi på bekostning av en lavere minimalverdi [47]. Dessuten vil et nitrogensentrert spinn gi opphav til en sentralkobling til nitrogenkjernen. Noe slikt er ikke observert. For RIII er det observert en og bare en α -tensor. Som en følge av disse betraktningene må derfor RIII være dannet ved enten en netto hydrogenabstraksjon av C5, C4 eller C3, eller ved en deaminering av C2. Alle andre alternativer skulle enten gi nitrogensentrerte spinn eller et større antall α -protoner. Alternativt kunne RIII representere en dekarboksylering. Et dekarboksyleringsradikal ville hatt vekselvirkninger med protonene tilhørende N1. Slike koblinger er ikke observert, forutsatt at utskiftbarheten med deuteriumkjerner i aminogruppa er betydelig. Det har dessuten vist seg at dekarboksyleringsradikaler gjerne er ustabile ved romtemperatur [48], og som dermed gjør et dekarboksyleringsradikal mindre sannsynlig som modell for RIII.

Spinntettheten for RIII sitt sentrale karbonatom kan beregnes ut fra både McConnells ligning (ligning 3.2) og Gordys relasjon (ligning 3.3). Ved å bruke isotropverdien for r_{04+} og $Q = -72,8$ MHz [49] fås ved McConnells ligning en spinntetthet på $\rho^{\pi} \approx 0,76$. Ved å bruke den maksimale anisotrope egenverdien til r_{04+} gir Gordys relasjon en spinntetthet på $\rho^{\pi} \approx 0,79$. At Gordys og McConnells relasjoner gir omtrent samme resultat, tyder på at RIII's C_{α} -atom er sp^2 -hybridisert.

Ved å sammenligne egenvektorer for α -tensoren r_{04+} med referansevektorer fra krystalldata (se tabell 4.3) synes en deaminering ved brudd i bindingen C2 – N1 å være det beste alternativet til radikalmodell for RIII. Imidlertid er en vinkelforskjellene på $20,9^\circ$ mellom t_{int}^α og retningen C2 – N1 og $40,9^\circ$ mellom t_{min}^α og retningen C2 – HC2 svært stor. Dersom man antar at en restrukturering av molekylet etter brudd i bindingen C2 – N1 først og fremst fører til at HC2 forflyttes, vil det kunne tenkes at kryssproduktet mellom retningsvektorene til bindingene C1 – C1 og C2 – C3 vil ligge nær parallell med LEO. Fra tabell 4.3 kan man beregne at disse retningene avviker med rundt 31° . Dette betyr at det etter en deaminering av C2 må finne sted en større restrukturering enn at bare HC2 flyttes. Et deamineringsradikal vil ha en α -kobling, to β -koblinger og opp til to γ -koblinger. For RIII er det observert (se tabell 4.3) en klar α -kobling, to større koblinger med β -karakter, en mindre kobling med γ -karakter, samt en mindre ukjent kobling.



Figur 4.7: Radikalstrukturen til et radikal dannet ved en deaminering av L-arginin, foreslått dannet i romtemperaturbestrålte enkrystaller av LAP.

4.4.4 DFT-beregninger på RIII

Ved hjelp av DFT-beregninger kan man finne spinn tettheter og hyperfinkoblingstensorer for den optimale radikalstrukturen til det antatte radikalet. Med utgangspunkt i krystallografiske data fra appendiks A ble molekylstrukturen for L-arginin satt opp. Før DFT-beregningene ble aminogruppa fjernet. Dermed beregnes det en optimal struktur tilhørende den antatte modellen for RIII. I en krystall er molekylene hele tiden påvirket av nærliggende molekyler gjennom blant annet hydrogenbindinger. For å simulere krystallografiske forhold kan man i DFT-beregningen låse posisjoner, bindingslengder og vinkler for enkelte atomer.

For DFT-beregningen på antatt modell for RIII ble atomposisjonene i guanidylgruppa, C4 og C5, samt deres hydrogenatomer, låst. Resten ble fritt optimalisert. Med disse begrensningene ble det beregnet de hyperfinkoblingstensorer som er listet i tabell 4.4.

Tabell 4.4: DFT-beregnete hyperfinkoblingstensorer for et radikal dannet ved en deaminering av C2, foreslått dannet i enkrystaller av LAP bestrålt ved 295 K.

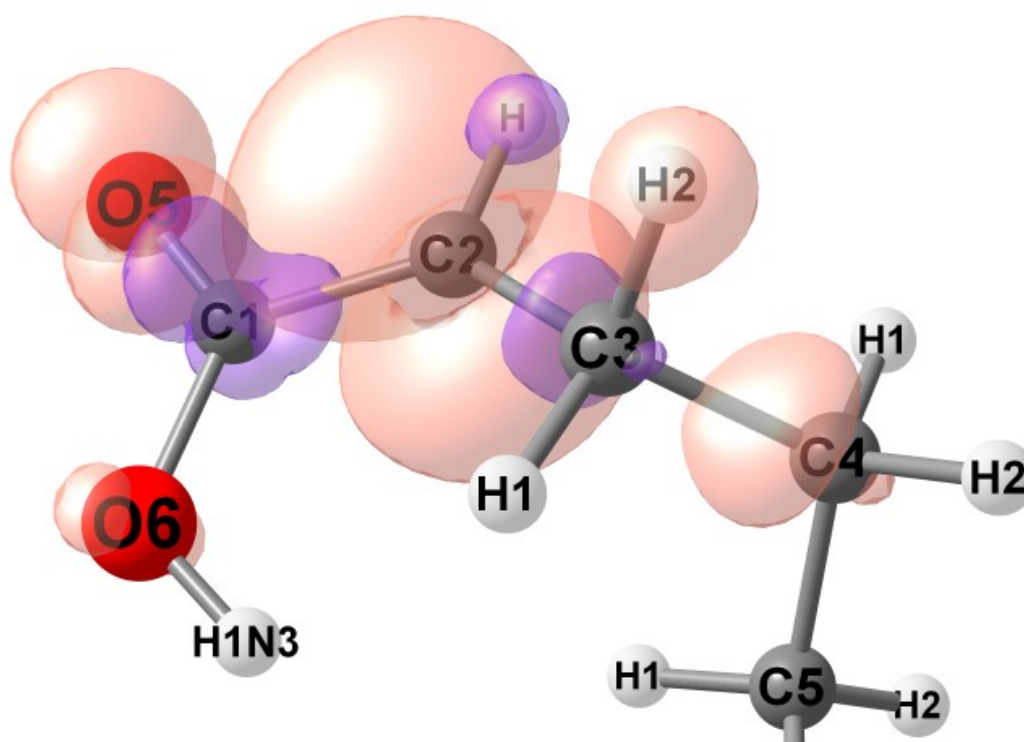
Kobling (type)	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Eigenverdier (MHz)	Egenvektorer			Eksp. kobling ^a
				<a>		<c*>	
HC2 (DFT)	-47,82	-31,60	-79,42	0,048	0,872	-0,487	r04+
		-1,72	-49,54	0,942	-0,202	-0,270	
		33,33	-14,49	0,334	0,446	0,831	
H1C3 (DFT)	3,12	7,74	10,86	0,319	0,882	0,346	r07+
		-3,43	-0,31	0,873	-0,132	-0,469	
		-4,31	-1,19	0,368	-0,452	0,813	
H2C3 (DFT)	76,51	8,69	85,2	0,398	0,803	-0,444	r05+
		-3,83	72,68	-0,348	0,580	0,737	
		-4,86	71,65	0,849	-0,139	0,510	
H1C4 (DFT)	-1,65	6,51	4,86	0,649	-0,479	0,591	
		-1,83	-3,48	0,431	0,872	0,234	
		-4,69	-6,34	-0,627	0,103	0,772	
H2C4 (DFT)	4,96	4,48	9,44	-0,062	0,948	-0,312	r10+
		-1,34	3,62	0,959	-0,030	-0,282	
		-3,14	1,82	0,277	0,317	0,907	

^a Den eksperimentelle tensor i tabell 4.3 som den DFT-beregnete tensor er assosiert med.

Samsvaret mellom de DFT-beregnete og eksperimentelle tensorene er dårlig. Et dårlig samsvar mellom teori og eksperiment kan bety at feil radikalmodell er lagt til grunn for de beregnede resultatene. Siden DFT-beregninger gjøres på et enkelt isolert molekyl er det imidlertid forventet en viss forskjell mellom de DFT-beregnete og de eksperimentelle verdiene. Hvis derimot avvikene er svært store kan det bety at det å gjøre DFT-beregningene på et isolert molekyl er en dårlig approksimasjon. Ved å sammenligne egenvektorene for DFT-beregningene i tabell 4.4 og de eksperimentelle tensorers egenvektorer i tabell 4.3, finner man at det er et rimelig samsvar mellom HC2(DFT) og r04+. For β - og γ -koblingene

er samsvaret noe dårligere, men det er noe likhet mellom H1C3(DFT) og r07+, H2C3 og r05+ samt H3C4 og r10+. For disse hyperfinkoblingstensorene stemmer de DFT-beregnete anisotrope egenverdier godt overens med eksperimentelle verdier. Ser man derimot på isotropverdiene er samsvaret dårlig. Unntaket er α -tensoren r04+ som har en isotropverdi på -55 MHz mot en DFT beregnet isotropverdi på -48 MHz.

Fra DFT-beregningene kan spinnthetsfordelingen beregnes. Figur 4.8 viser hvordan spinnnet er fordelt for et radikal dannet ved en deaminering av C2, som RIII antas å representere. Lobene representerer punkter med lik spinnthet.



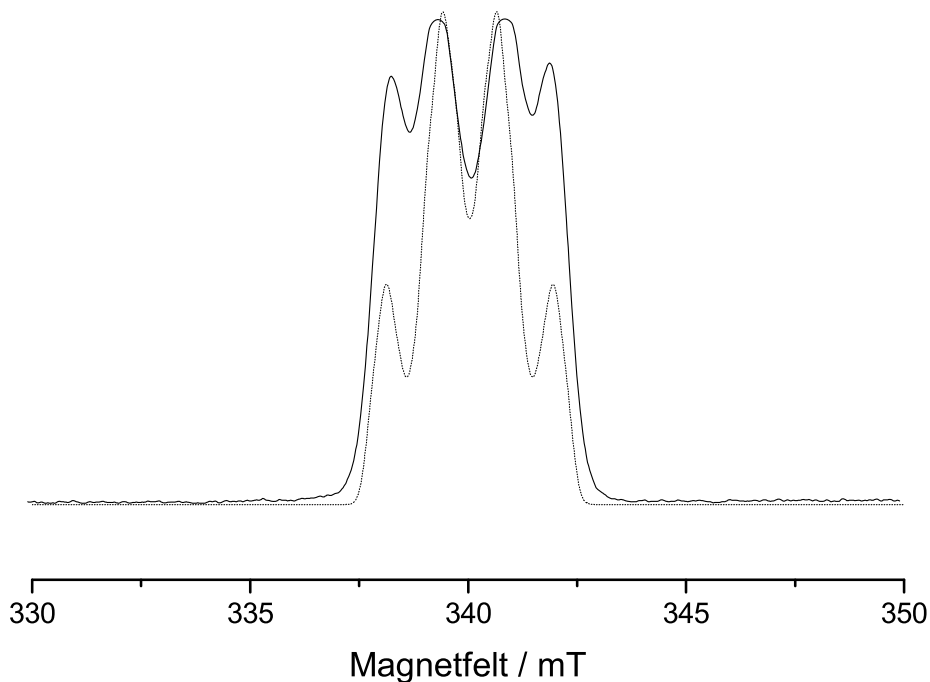
Figur 4.8: Distribusjon av spinnthet for et radikal dannet ved en deaminering av C2. Positiv spinnfordeling vises som røde lober, negativ vises som lilla lober. Spinnthetsfordelingen er hentet fra DFT-beregningene for denne strukturen (se teksten).

Som det fremgår av figur 4.8 er mesteparten av spinnnet lokalisert til et sp^2 -hybridisert C2. Hydrogenatomene H1C3, H1C4 og H2C4 ligger nesten i nodalplanet til LEO, noe som forklarer de små koblingene fra DFT-beregningen. Karboksylgruppa har i DFT-optimaliseringen blitt bikket ned mot guanidylgruppa ($-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)_2$) slik at O6 har fanget opp et hydrogenatom fra et av nitrogenatomene i guanidylgruppa. I en krystallstruktur synes

en slik reorganisering å være urealistisk da frihetsgraden til O5 og O6 begrenses av hydrogenbindinger mellom O5 og O6 og nærliggende molekyler. Det har blitt utført DFT-beregninger hvor enten O5 eller O6 eller begge er blitt låst i optimaliseringen. I disse beregningene ble imidlertid ikke strukturen optimalisert til sp^2 -hybridisering rundt C2, noe de eksperimentelle resultatene klart tyder på at har funnet sted.

4.4.5 Simuleringer av RIII

Simuleringsprogrammet KVASAT [50, 51] gjør det mulig å simulere EPR-spektre ut fra gitte tensorer eller gitte splittingskonstanter. EPR-absorpsjonsspekteret for radikal RIII er simulert ved å bruke de tensorene som er knyttet til radikal RIII fra tabell 4.3, samt i tillegg en isotrop kobling på 7 MHz (se kap. 4.4.3).



Figur 4.9: Eksperimentelt EIE-spekter (heltrukken linje) for RIII sammenlignet med simulert EPR-absorpsjonsspekter (prikket linje) for koblingene assosiert med radikal RIII, Krystallorienteringen er som vist med stiplet linje i figur 4.6 og magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,5294 GHz.

Som det fremgår av figur 4.9 er det en meget god overensstemmelse mellom det observerte EIE-spekteret for RIII og det simulerte EPR-absorpsjonsspekteret av de koblingene som er knyttet til RIII.

4.4.6 Radikal RIV

Hyperfinkoblingstensorene r03+, r08+, r02+, r12+ og r06+ er knyttet til radikal RIV. Den Schonlandvarianten hvis egenverdier har best samsvar med kjente koblingstyper (se kap. 3.5 og 3.6) er listet i tabell 4.5.

Tabell 4.5: Hyperfinkoblingstensorer for koblinger knyttet til radikal RIV funnet ved ENDOR-spektroskopi av LAP bestrålt ved 295 K og observert ved 240 K. RIV finnes i de to konformasjonene RIVa og RIVb. Tallene i parentes angir usikkerheten til siste siffer. I tillegg er noen referansevektorer listet, samt vinkelforskjellen mellom noen referansevektorer og egenvektorer.

Variant	Kobling (type)	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Egenverdier (MHz)	Egenvektorer			$\Delta\phi^a$ (grader)
					<a>		<c*>	
RIVa	r12+ (α)	-51,35 (2)	-32,39 (4)	-83,74 (4)	-0,051 (1)	0,837 (0)	0,545 (1)	12,5 ₁ 25,3 ₂
			3,36 (4)	-47,99 (3)	0,978 (0)	0,151 (1)	-0,142 (0)	
			29,02 (4)	-22,33 (4)	-0,201 (0)	0,526 (1)	-0,826 (0)	
	r08+ (β)	46,02 (1)	8,83 (2)	54,85 (2)	0,438 (1)	0,108 (2)	0,892 (2)	48,3 ₄
			-3,02 (2)	43,00 (2)	0,705 (1)	-0,657 (2)	-0,267 (2)	
			-5,82 (2)	40,20 (2)	0,557 (0)	0,746 (0)	-0,364 (1)	
r06+ (β)	24,54 (1)	9,60 (2)	34,14 (2)	0,641 (1)	0,666 (3)	0,382 (1)	44,4 ₃	
		-3,14 (2)	21,40 (2)	0,176 (1)	-0,612 (3)	0,771 (3)		
		-6,45 (2)	18,09 (2)	0,747 (1)	-0,427 (3)	-0,510 (4)		
RIVb	r03+ (α)	-58,90 (2)	-34,68 (4)	-93,58 (3)	-0,115 (1)	0,825 (1)	0,553 (1)	38,3 ₁ 49,6 ₂
			3,76 (2)	-55,14 (3)	0,803 (0)	0,455 (1)	-0,437 (0)	
			30,93 (4)	-27,97 (3)	-0,584 (0)	0,394 (1)	-0,709 (1)	
	r02+ (β)	81,61 (1)	8,06 (2)	89,67 (2)	-0,100 (1)	0,706 (7)	0,702 (9)	6,2 ₃
			-3,38 (2)	78,23 (2)	-0,843 (0)	0,315 (7)	-0,437 (3)	
			-4,69 (2)	76,92 (2)	0,530 (0)	0,635 (6)	-0,563 (5)	
Molekylære referansevektorer ^b :								
1 Retningsvektor C5 – H2C5					0,998	0,048	0,049	
2 Retningsvektor C5 – H1C5					0,230	0,584	-0,779	
3 Retningsvektor C5 – H1C4					-0,065	0,777	0,627	
4 Retningsvektor C5 – H2C4					-0,377	0,183	0,908	
5 Retningsvektor C5 – HN2					-0,377	-0,923	0,078	

^a Vinkelavviket mellom egenvektoren og den molekylære referansevektor hvis nummer er gitt som indeks.

^b Referansevektorer fra appendiks A.

Under analysen av EIE-spektrene og ved å studere ENDOR-linjenes variasjon som funksjon av krystallorientering, ble det konkludert med at RIV er et radikal som foreligger i to

konformasjoner. Ved å sammenligne tensorene til koblingene r_{03+} og r_{12+} i tabell 4.5 ser man at disse har veldig like egenvektorer. I den videre analysen vil tensorene r_{12+} , r_{08+} og r_{06+} knyttes til konformasjon a (RIVa), mens r_{03+} og r_{02+} knyttes til konformasjon b (RIVb).

For begge konformasjoner har EIE-spekteret for RIV en halvverdibredde på 5,2 mT ved den orientering som er vist med stiplet linje i figur 4.6. Ved den samme orienteringen er summen av hyperfinsplittingene til RIVa anslått til rundt 4,4 mT og til cirka 4,2 mT for RIVb. Det vil si at det mangler noen mindre koblinger. Det er observert linjer nær friprotonfrekvensen som har EIE-spektre som ligner EIE-spektrene for RIVa og RIVb. Derfor antas det at de manglende koblingene er små, sentrert om og nær friprotonfrekvensen og av denne grunn ikke identifisert. De uidentifiserte små koblingene vil bare gi bidrag til linjebredden i EPR-spekteret.

Av tabell 4.5 kan det sees at tensoren r_{12+} og r_{03+} har egenverdier på form som α -koblinger, mens tensorene r_{08+} , r_{06+} og r_{02+} har egenverdier på form av β -koblinger. McConnells ligning (ligning 3.2) gir, ved å bruke isotropverdien for r_{03+} og $Q = -72,8$ MHz [49], en spinn tetthet til RIVb sitt sentrale karbonatom på $\rho^\pi \approx 0,81$. Gordys relasjon (ligning 3.3) gir for den maksimale anisotrope egenverdien til r_{03+} , en spinn tetthet på $\rho^\pi \approx 0,80$. At Gordys og McConnells relasjoner gir omtrent samme resultat tyder en sp^2 -hybridisering av det sentrale karbonatom til RIVb. For varianten RIVa gir isotropverdien til r_{12+} en spinn tetthet på C_α på $\rho^\pi \approx 0,71$ ved McConnell og ved bruk av den maksimale anisotrope egenverdien til r_{12+} gir Gordys relasjon en spinn tetthet på $\rho^\pi \approx 0,75$. Også for RIVa kan det konkluderes med et sp^2 -hybridisert C_α -atom.

Eksperimenter med deutrerete krystaller viste at ingen av tensorene for RIV i tabell 4.5 tilhørte utskiftbare protoner. Denne observasjonen kan ikke brukes til å fullstendig utelukke vekselvirkning med NH-protoner, da NMR-studiet (se kap. 3.2.3) ikke ga noe entydig svar angående deutreringsgraden i d-LAP-krystallene. Imidlertid sannsynliggjorde NMR-studiet at det var en merkbar grad av deutring i d-LAP krystallene. Spesielt ble det pekt på at HN2 i d-LAP-krystallene var utbyttet i betydelig grad. Dermed er det høyst sannsynlig at det for RIV ikke finner sted noen vekselvirkning med HN2.

De to α -tensorene r_{03+} og r_{12+} har egenverdier som er karakteristisk like de som forventes for et karbonsentrert spinn, typisk $(-3a_d, -2a_d, -a_d)$. Det er heller ikke observert sentralkoblinger til nitrogenkjerner. Lokaliseringen av det uparede elektron begrenses dermed til karbonkjernene C2, C3, C4 og C5. Siden det bare er funnet en α -tensor for hver av konformasjonene må radikalet være dannet ved en netto hydrogenabstraksjon, da et brudd i bindingene mellom karbonatomene i sidekjeden ville ha gitt opphav til to α -tensorer. RIV kan selvfølgelig også være dannet ved deaminering av C2, men i andre konformasjoner enn RIII. Imidlertid gjør den store ulikheten i EIE-spektrene samt den svært forskjellige oppførselen i orienteringsavhengighetene for r_{04+} og r_{12+}/r_{03+} (se figur 4.6) at en konformasjonsvariant av deamineringsradikalet kan regnes som en lite sannsynlig modell for RIV. Også dekarboksylering vil gi et karbonsentrert spinn med en α -tensor, men som nevnt tidligere er dekarboksyleringsradikaler gjerne ustabile ved romtemperatur [48]. Dette begrenser RIV til en struktur dannet ved en netto hydrogenabstraksjon av enten C3, C4 eller C5.

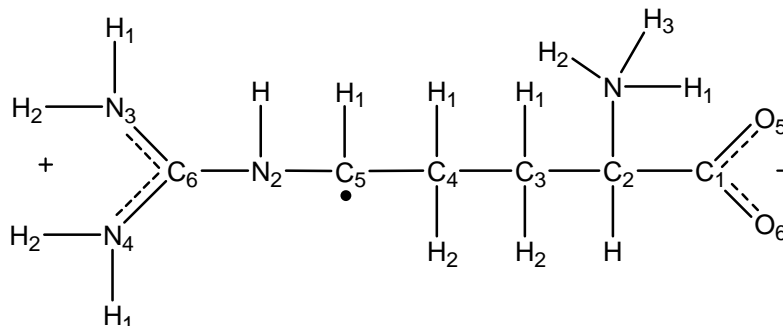
Karbonatomene C3, C4 og C5 befinner seg i en alifatisk kjede med betydelige muligheter for reorganisering etter radikaldannelse. Dette gjør forsøket på å finne en rimelig radikalmodell vanskelig. Ved allikevel å sammenligne eksperimentelle egenvektorer med krystalldata for den uskadde strukturen i appendiks A, fremstår et radikal dannet ved en hydrogenabstraksjon av H2C5 som det beste alternativet. Avvikene mellom egenvektorer og krystalliske referanseretninger er gjengitt i tabell 4.5. For radikalkonformasjon RIVa avviker r_{12+} sin intermediærretning med $12,5^\circ$ i forholdt til bindingsretningen C5 – H2C5.

Minimalretning til r_{12+} avviker med $25,3^\circ$ fra bindingsretningen C5 – H1C5.

Maksimalretningene til β -tensorene r_{08+} og r_{06+} avviker imidlertid betydelig med C_α -H β -retninger for de nærliggende H β -protonene til C5. For RIVb avviker β -tensoren r_{02+} sin maksimalretning bare $6,2^\circ$ fra retningen C5 – H2C4. For α -tensoren r_{03+} avviker intermediærretningen $38,3^\circ$ fra bindingsretningen C5 – H2C5 og minimalretningen $49,6^\circ$ fra bindingsretningen C5 – H1C5. De større restruktureringene som må antas for at RIV skal kunne representere en netto hydrogenabstraksjon av H2C5, vil diskuteres videre i kapittel 6.1.3.

Et radikal dannet ved hydrogenabstraksjon av H2C5 vil ha en α -tensor og opptil tre β -tensorer. Et slikt radikal vil også, som det fremgår av figur 4.10, kunne ha en vekselvirkning mellom det enslige elektronet lokalisert til C5 og HN2. Ingen av de etablerte tensorene

kunne knyttes til dette protonet som følge av observasjoner fra d-LAP-eksperimenter. Dette utelukker imidlertid ikke et C5-sentrert spinn, såfremt HN2 tilnærmet ligger i LEOs nodalplan og derfor bare gir opphav til en veldig liten kobling.



Figur 4.10: Radikalstrukturen til et radikal dannet ved en netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden til L-arginin, foreslått dannet i romtemperaturbestrålte enkrystaller av LAP.

4.4.7 DFT-beregninger på RIV

RIV er et radikal i to konformasjoner. At et radikal kan eksistere i to konformasjoner skyldes gjerne vekselvirkninger med nærliggende molekyler. I DFT-beregningen optimaliseres radikalstrukturen for et isolert molekyl, mens man prøver å simulere krystalliske forhold ved å låse enkelte atomposisjoner, vinkler og bindingslengder. Uansett vil DFT-beregningen kun gi *ett* resultat og dermed må både RIVa og RIVb i utgangspunktet sammenlignes med den samme DFT-beregningen. For å simulere krystalliske forhold ved DFT-beregninger på RIV er følgende atomkoordinater låst i beregningen: C1, C2, C3, C4, C6, N1, N2, N3 og N4 samt hydrogenatomene til N1, N3 og N4. Dette gav hyperfinkoblingstensorene som er listet i tabell 4.6.

De DFT-bregnede tensorene i tabell 4.6 stemmer generelt dårlig overens med de eksperimentelle tensorene i tabell 4.5, men det er noen unntak. α -tensoren r_{03+} sin isotropverdi på -58,90 MHz stemmer bra med isotropverdien til H1C5 på -62,26 MHz. Når det gjelder de tilhørende egenvektorene er det bare de eksperimentelt og beregnede maksimalretningene som viser noe samsvar ved bare å avvike med 16,8°. For de andre egenvektorene er avvikene betydelige. Tensoren r_{03+} tilhører sammen med r_{02+} radikalkonformasjonen RIVb. β -tensoren r_{02+} har en betydelig isotropverdi på 81,61 MHz. Den DFT-bregnede tensoren til H2C4 har også en betydelig isotropverdi på 90,51 MHz.

Imidlertid stemmer også her egenvektorene dårlig overens, med maksimalretningens avvik på 32,7° som beste overensstemmelse.

Tabell 4.6: DFT-bregnede hyperfinkoblingstensorer for et radikal dannet ved en hydrogenabstraksjon av H2C5, foreslått dannet i enkrystaller av LAP bestrålt ved 295 K.

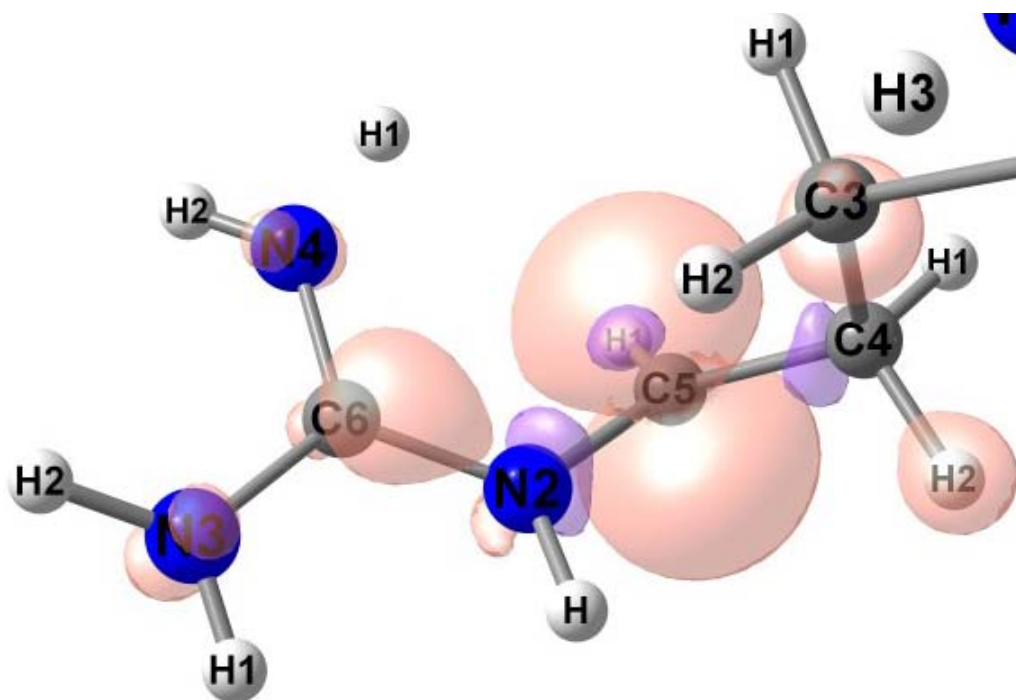
Kobling	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Eigenverdier (MHz)	Egenvektorer			Eksp. kobling ^a
				<a>		<c*>	
H1C5 (DFT)	-62,26	-37,14	-99,40	0,168	0,857	0,487	r12+, r03+
		0,24	-62,02	0,630	-0,473	0,616	
		36,90	-25,36	0,758	0,203	-0,619	
H1C4 (DFT)	2,03	8,38	10,41	0,022	0,851	0,525	r06+
		-3,32	-1,29	0,700	-0,388	0,600	
		-5,05	-3,02	0,714	0,354	-0,604	
H2C4 (DFT)	90,52	9,50	100,02	-0,366	0,249	0,897	r08+, r02+
		-4,64	85,88	-0,192	0,923	-0,335	
		-4,87	85,65	0,911	0,294	0,290	
HN2 (DFT)	29,84	8,71	38,55	-0,708	-0,685	0,173	
		-2,60	27,24	0,311	-0,522	-0,794	
		-6,11	23,73	0,634	-0,508	0,582	

^a Den eksperimentelle tensor i tabell 4.5 som den DFT-bregnede tensor er assosiert med.

For den andre konformasjonen, RIVa, ligger isotropverdien til r12+ rundt 10 MHz under isotropverdien til den DFT-bregnede α -tensoren. Samsvaret mellom de DFT-bregnede egenvektorene til H1C5 og de eksperimentelle egenvektorene til r12+ er også dårlig, bortsett fra for maksimalretningen som bare avviker med 13,1°. For β -tensoren r06+ stemmer isotropverdien på 24,54 MHz rimelig bra med isotropverdien på 29,84 MHz som tilhører den beregnede tensoren til HN2. Egenvektorene for disse tensorene samsvarer derimot dårlig med hverandre. Eksperimenter med deutrerete krystaller sannsynliggjorde dessuten at koblinger knyttet til RIV ikke kunne skyldes vekselvirkninger med HN2. Tensor r06+ må dermed assosieres til H1C4(DFT), men det er dårlig samsvar mellom isotropverdiene på 2,03 MHz for H1C4(DFT) og den eksperimentelle isotropverdien til r06+ på 24,54 MHz. Også for egenverdiene er avvikene store.

Den siste av de eksperimentelle tensorene tilhørende RIVa er β -tensoren r_{08+} . Isotropverdien til r_{08+} på 46,02 MHz er den største av de to β -koblingene som knyttet til RIVa. Den største isotropverdien til de DFT-beregnete tensorene tilhører H2C4 og er på hele 90,52 MHz. Ved å sammenligne egenvektorene til r_{08+} og H2C4(DFT) finner man at avvikene er store.

Fra DFT-beregningen kan det også hentes ut informasjon om den beregnede spinnfordelingen til radikalet. I figur 4.11 illustreres spinnfordelingen for radikal RIV.



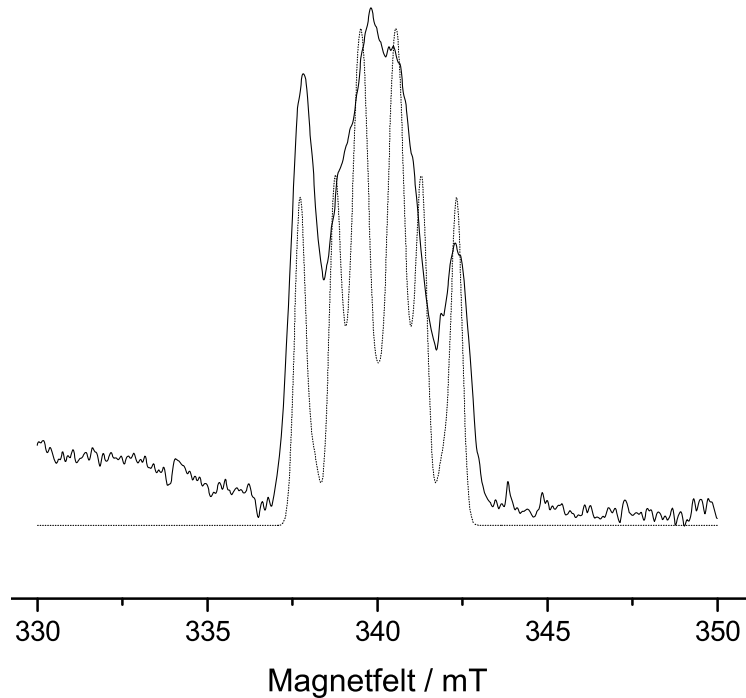
Figur 4.11: Distribusjon av positiv (røde sfærer) og negativ (lilla sfærer) spinn tetthet for radikal RIV dannet ved en netto hydrogenabstraksjon av H2C5 i enkrystaller av LAP. Spinn tetthetsfordelingen er hentet fra DFT-beregningene for denne strukturen (se teksten).

Fra figur 4.11 ser man at størstedelen av spinn et som antatt, er lokalisert til C5. H2C4 er lokalisert med et stort overlapp med LEO. Dette forklarer den store isotropverdien som er beregnet for H2C4 (se tabell 4.6). Figuren viser også en klar sp^2 -hybridisering rundt C5.

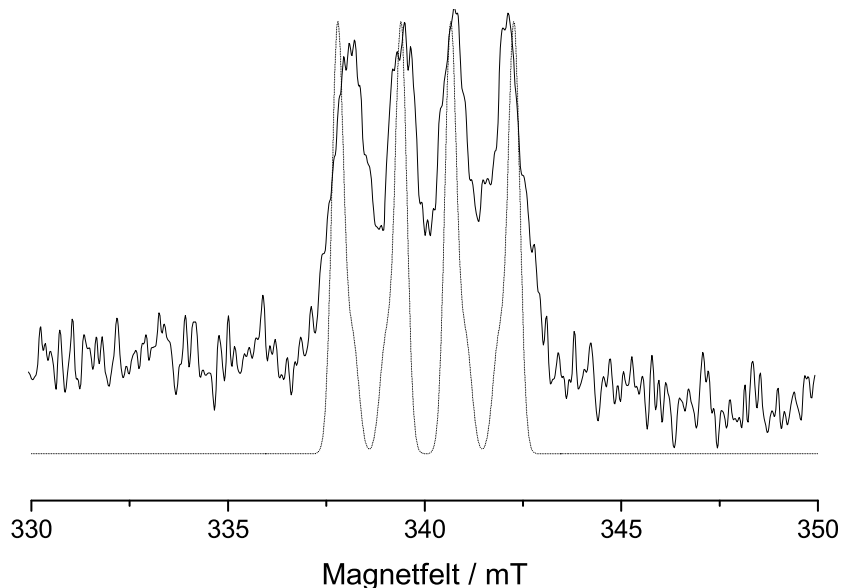
4.4.8 Simuleringer av RIV

Simuleringen av de to radikalkonformasjonene RIVa og RIVb i figur 4.12 og 4.13 er gjort med simuleringprogrammet KVASAT [50, 51] på basis av tensorene som er listet i tabell

4.5 for hver av konformasjonene. Som figur 4.12 og 4.13 viser er det en god tilpasning mellom simulert EPR-absorpsjonsspekter og det observerte EIE-spekteret for begge konformasjonene.



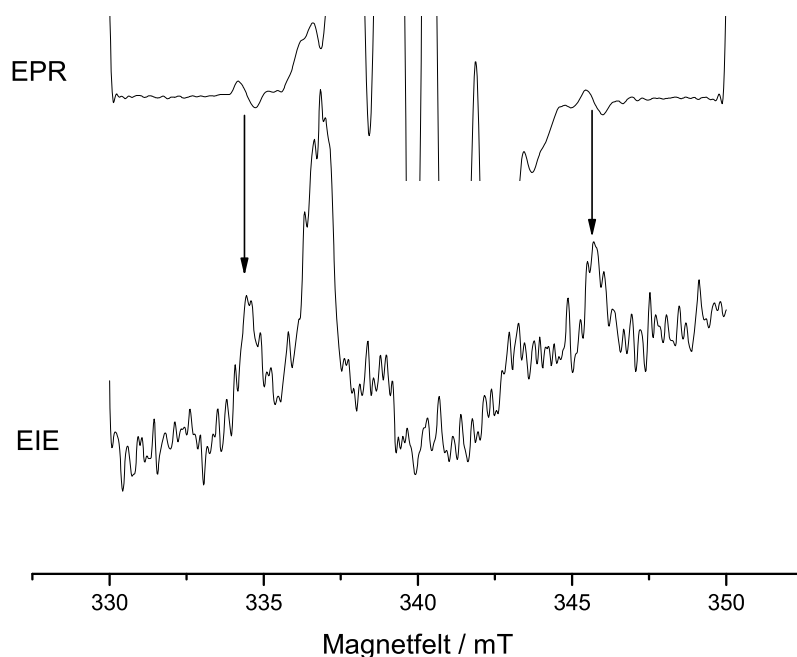
Figur 4.12: Simulert EPR-absorpsjonsspekter (prikket linje) for radikal RIVa, sammenlignet med EIE-spekteret (heltrukket linje) for samme radikal. Krystallorienteringen er som vist med stiplet linje i figur 4.6. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrequens på 9,5292 GHz.



Figur 4.13: Simulert EPR-absorpsjonsspekter (prikket linje) for radikal RIVb, sammenlignet med EIE-spekteret (heltrukket linje) for samme radikal. Orienteringen er som vist med stiplet linje i figur 4.6. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrequens på 9,5293 GHz.

4.4.9 Radikal RV

Til radikal RV er det bare knyttet en beregnet hyperfinkoblingstensor, nemlig r_{01+} . Den tilsvarende ENDOR-linja er meget svak i ENDOR-spektret og var kun mulig å følge i de tre rotasjonsplanene da den forekommer ganske alene ved høye radiofrekvenser. EIE-spekteret til r_{01+} er bredere en for de andre radikalene. Figur 4.14 viser en sammenligning mellom EPR-spekteret og EIE-spekteret til RV. De sammenfallende linjeposisjonene bekrefter at r_{01+} tilhører de svake flankeresonansene i EPR-spekteret.



Figur 4.14: Øverst er et 1.derivert EPR-spekter og nederst et EIE-spekter for ENDOR-linja r_{01+} , begge tatt opp ved den orienteringen som er angitt med stiplet linje i figur 4.6. Figuren viser at kobling r_{01+} med stor sannsynlighet kan tilskrives flankeresonansen i EPR-spekteret, da de to ytterste EPR-linjene sammenfaller helt med de ytre toppene i EIE-spekteret.

I tabell 4.7 er hyperfinkoblingstensoren r_{01+} gjengitt for den Schonlandvarianten hvis egenverdier best stemte overens med kjente koblingstyper. Av egenvektorene gjenkjennes r_{01+} som en β -kobling. EIE-spekteret til RV har en totalbredde på cirka 11,3 mT ved krystallorienteringen markert med stiplet linje i figur 4.6. Isotropverdien til r_{01+} tilsvarer en hyperfinsplittingsplitting på rundt 4,1 mT. Dermed må det finnes flere koblinger tilhørende radikal RV for å kunne forklare bredden i det tilhørende EIE-spekteret.

Tabell 4.7: Hyperfinkoblingstensor r_{01+} bestemt til å tilhøre radikal RV, funnet ved ENDOR-spektroskopi av romtemperaturbestrålte enkrystaller av LAP observert ved 240 K. Tallene i parentes angir usikkerheten til siste siffer. I tillegg er en referansevektorer listet, samt vinkelforskjellen mellom referansevektoren og en egenvektor.

Kobling (type)	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Egenverdier (MHz)	Egenvektorer			$\Delta\varphi^a$ (grader)
				<a>		<c*>	
r01+ (β)	115,69 (1)	7,81 (2)	123,50 (2)	0,893 (5)	0,063 (2)	-0,446 (2)	26,2 ₁
		-3,13 (2)	112,56 (2)	0,107 (8)	-0,992 (1)	0,075 (5)	
		-4,67 (2)	111,02 (2)	0,438 (9)	0,114 (5)	0,892 (1)	
Molekylære referansevektor ^b :							
1 Retningsvektor C4 - H2C5				0,810	-0,383	-0,445	

^a Vinkelavviket mellom egenvektoren og den molekylære referansevektor hvis nummer er gitt i parentes.

^b Referansevektor hentet fra appendikset A.

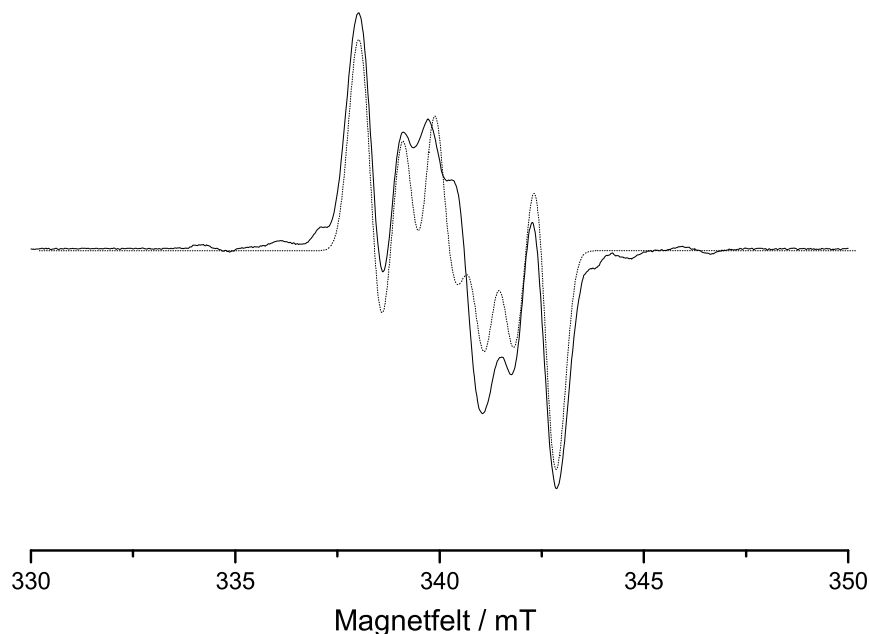
Ved å låse magnetfeltet til den ytterste flankeresonansen i EPR-spekteret under ENDOR-opptak forsvant alle linjene til RIII og RIV fra spekteret. ENDOR-spekteret besto da av totalt 6 intensitetsmessig meget svake linjer, 3 høyfrekvente- og to lavfrekvente linjer i tillegg til r01+ (se svake linjer markert med ▼ i figur 4.5). Dette viser at det i alle fall finnes fire vekselvirkende protoner assosiert med radikal RV. Sammenligninger av ENDOR-spektre for krystaller av LAP og d-LAP viser at ingen av disse 4 koblingene kan knyttes til utskiftbare protoner. Det ble i dette arbeidet ikke tatt opp noe ENDOR-rotasjonsplan ved å konsekvent låse magnetfeltet til EPR-spekterets flankeresonans.

Maksimalverdien til r01+ avviker 26,2° fra retningen C4 – H2C5 (fra krystalldata for en uskadd struktur i appendiks A). Denne observasjonen antyder vagt at RV kan være et spinn sentrert til C4 for et radikal dannet ved en netto hydrogenabstraksjon av enten H1C4 eller H2C4. Et slikt radikal vil ha et potensial for fem protonvekselvirkninger, en α - og fire β -koblinger, i tillegg til eventuelle svakere γ -koblinger.

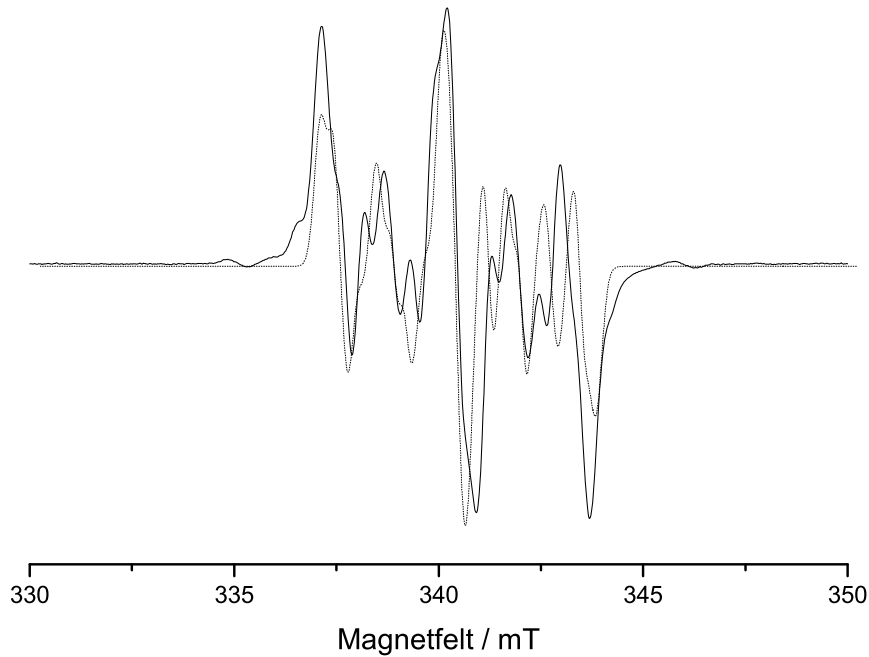
Siden det bare er funnet en hyperfinkoblingstensor knyttet til RV i dette studiet, er det vanskelig å etablere en troverdig radikalmodell for RV. Det er derfor heller ikke gjort noe DFT-beregninger og selvfølgelig ikke noen simuleringer av RV.

4.4.10 Simulerte EPR-spektre av romtemperaturredikale

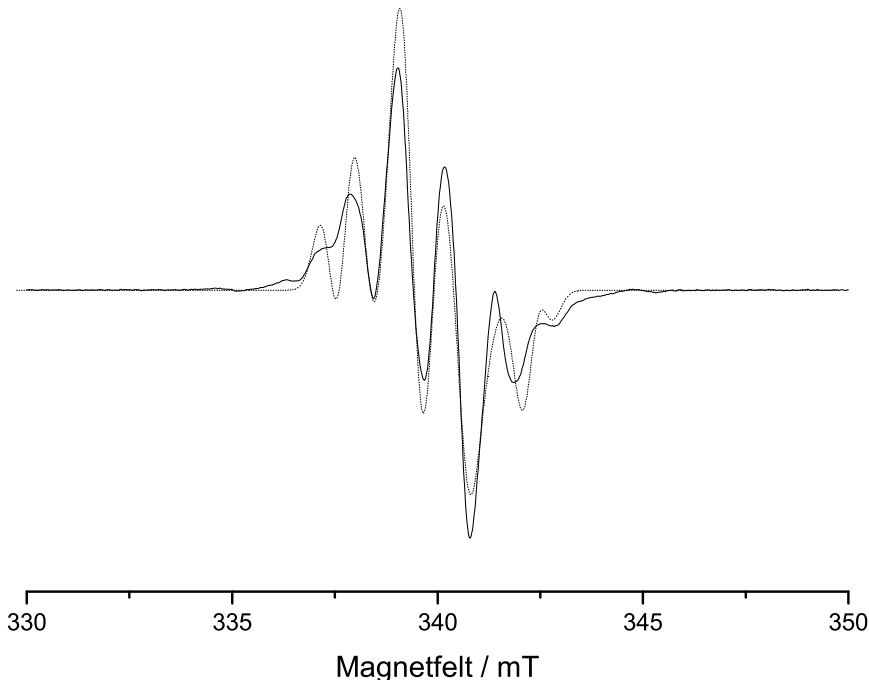
For å teste de antagelser som er gjort angående hvilke koblinger som er knyttet til hvilke radikaler for sentralresonansene, ble EPR-spektrene langs de krystallografiske aksene simulert og sammenlignet med de eksperimentelle EPR-spektrene. Simuleringen ble gjort i KVASAT [50, 51] ved å benytte de tensorene som er knyttet til de ulike radikalene slik som beskrevet i de tidligere avsnittene. I figurene 4.15-17 vises de simulerte 1.deriverte EPR-spektrene sammenlignet med de eksperimentelle spektrene med magnetfeltet rettet parallelt med de krystallografiske aksene. I simuleringen er g-tensoren antatt å være isotrop og den samme for alle radikalene. Radikalene er mengdemessig vektet med 80 % for RIII, 15 % for RIVa og 5 % for RIVb.



Figur 4.15: Eksperimentelt 1.derivert EPR-spekter (heltrukken linje) for LAP-krystaller sammenlignet med simulert 1.derivert EPR-spekter (prikket linje) for de antatte romtemperaturredikale RIII, RIVa og RIVb. Magnetfeltet er rettet parallelt med *a*-aksen og magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,5365 GHz.



Figur 4.16: Eksperimentelt 1.derivert EPR-spekter (heltrukken linje) for LAP-krystaller sammenlignet med simulert 1.derivert EPR-spekter (prikket linje) for de antatte romtemperaturredikale RIII, RIVa og RIVb. Magnetfeltet er rettet parallelt med b-aksen og magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,5346 GHz.



Figur 4.17: Eksperimentelt 1.derivert EPR-spekter (heltrukken linje) for LAP-krystaller sammenlignet med simulert 1.derivert EPR-spekter (prikket linje) for de antatte romtemperaturredikale RIII, RIVa og RIVb. Magnetfeltet er rettet parallelt med c-aksen og magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,5265 GHz.

Samsvaret mellom de simulerte og de observerte spektrene for $B \parallel \langle a \rangle$ i figur 4.15 og $B \parallel \langle c \rangle$ i figur 4.17 er relativt godt. Derimot for $B \parallel \langle b \rangle$ i figur 4.16, er samsvaret dårligere mellom det simulerte og det observerte spekteret. Analysen av EPR-spektrene i kapittel 4.4.1 påpekte en viss asymmetri i EPR-spekteret for $B \parallel \langle b \rangle$. Det ble pekt på at dette kunne skyldes at de resonansgivende radikalene hadde noe forskjellige g -verdier ved denne orienteringen. I simuleringene er den samme isotrope g -tensoren benyttet for de ulike radikalene. Ved $B \parallel \langle a \rangle$ og $\langle c \rangle$ ser denne forenklingen ut til å være god. For EPR-spekteret ved krystallorienteringen $B \parallel \langle b \rangle$ i figur 4.16 kan altså denne approksimasjonen være årsaken til det noe dårlige samsvaret mellom simulert og observert spekter. I appendiks C vises en figur som sammenligner eksperimentelt EPR-spekter med det simulerte EPR-spekteret for hvert av radikalene RIII, RIVa og RIVb.

Det er i denne sammenheng også viktig å huske på at det til flankeresonansen ikke er bestemt noen spesifikk radikalmodell, og flankeresonansen er derfor utelatt i de simulerte EPR-spektrene. På grunn av den store bredden om mange hyperfinkoblingene som er knyttet til dette radikalet ville det ved en simulering måtte gis en forholdsvis stor vekstfaktor.

5. Resultater og analyse av lavtemperaturstudiet

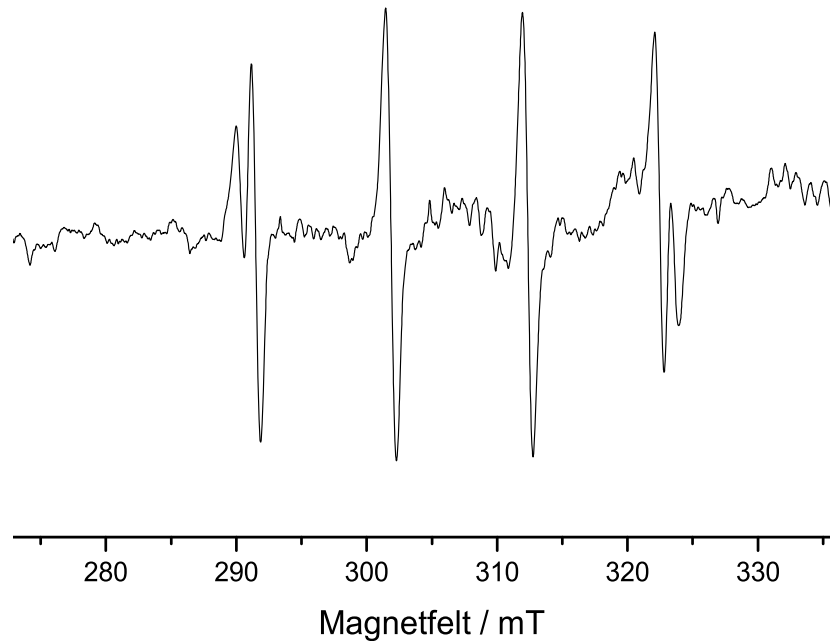
Dette kapittelet tar for seg resultater og analyser av eksperimentene etter lavtemperaturbestråling. Radikalmodellene som foreslås vil diskuteres mer i detalj i kapittel 6. Enkrystaller av LAP ble i lavtemperaturstudiet kjølt ned til 77 K ved hjelp av flytende nitrogen. Deretter ble krystallene bestrålt i cirka 2,5 timer, noe som tilsvarer en dose på cirka 35 kGy. ENDOR-spektrene etter lavtemperaturbestråling var komplekse. Det har derfor ikke vært mulig, innenfor de tidsrammene en masteroppgave har, å utføre et så detaljert studie av lavtemperaturredikale som det som ble gjort for romtemperaturredikale.

5.1 Manglende fosfatradikaler – funn av forurensninger

Fosfatradikaler ble ikke observert i enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved 77 K. Det ble gjort forsøk hvor bestrålingstiden ble doblet til omlag 5 timer. Dette gir en estimert dose på cirka 70 kGy til krystallene, altså omtrent den samme dosen som ble gitt til krystallene i romtemperaturstudiet. Heller ikke da ble fosfatradikaler observert. Derimot ble det observert resonanslinjer som skyldes vekselvirkninger med fosfor ved oppvarming av lavtemperaturbestrålte krystaller. Dette beskrives nærmere i kapittel 5.3.1.

Fosfatradikalene som ble observert ved romtemperatur hadde store splittingskonstanter. Letingen etter fosfatkoblinger ble derfor gjort i brede EPR-spektre på 80 mT. Under denne letingen dukket det opp resonanslinjer ved lavere magnetfeltverdier (høyere g -verdi) enn for sentralresonansen til EPR-spekteret (se figur 5.1). Linjene var svært svake og ble først kun observert ved rotasjon om b -aksen. En dobling av bestrålingstiden til 5 timer førte til at disse resonanslinjene fremkom mye tydeligere.

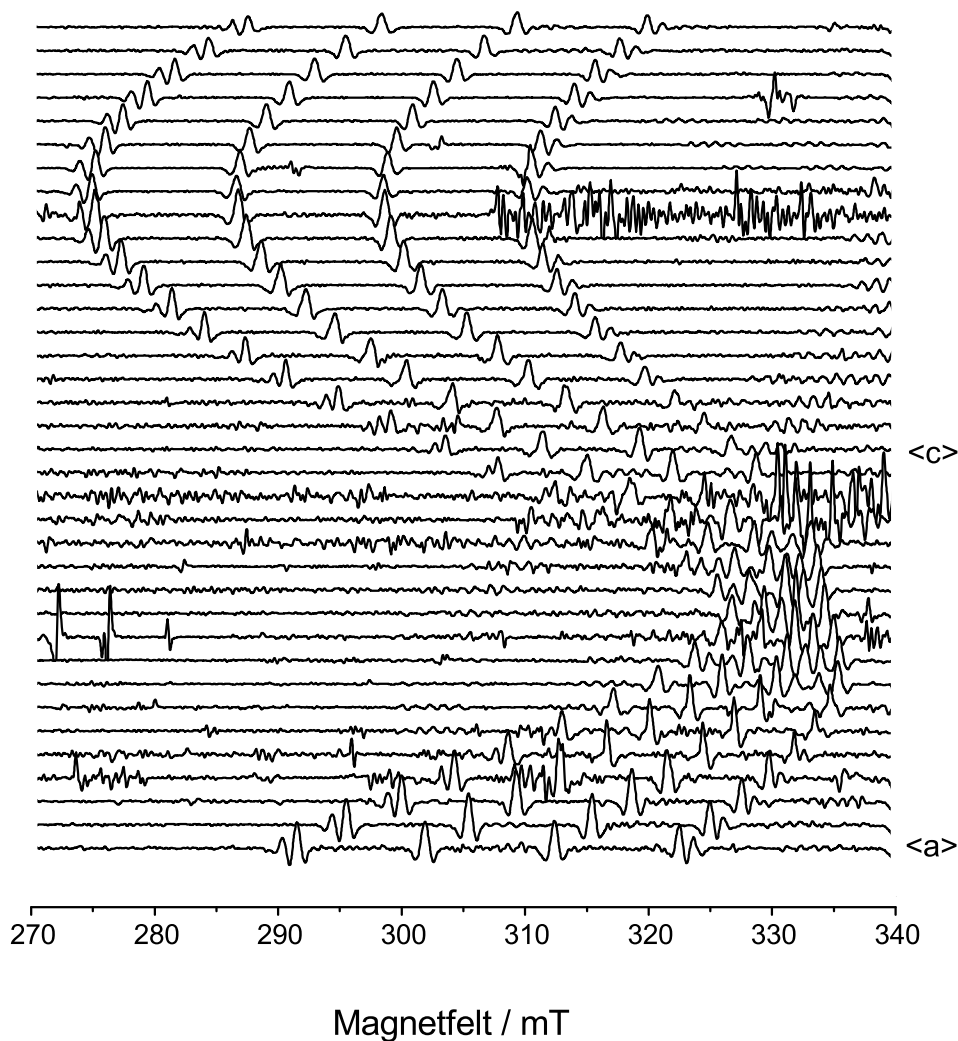
Resonanslinjene i figur 5.1 ser ut til å bestå av til sammen seks linjer. De to midterste linjene ser ut til å være litt bredere enn de ytterste. Imidlertid ser det ut til at de ytterste resonanslinjene er splittet i to. Intensitetsforholdet mellom de to ytterste linjene av denne resonansen er cirka 3:7. Avstanden mellom hver av resonanslinjene er omtrent den samme.



Figur 5.1: 1. derivert EPR-spekter av resonanslinjene som ble observert ved lavere magnetfeltverdier enn sentralresonansen i enkrytaller av LAP bestrålt og observert ved 77 K. Spekterets orientering er nær $B \parallel \langle a \rangle$. Det bør spesielt legges merke til at de ytre resonanslinjene er splittet, samt at de to indre linjene kan se ut til å være litt bredere enn de ytre. Magnetfeltet tilsvarer en mikrobølgefrequens på 9,7578 GHz.

Det ble tatt opp EPR-spektre av de omtalte resonanslinjene for hver femte grad i et rotasjonsplan om b-aksen. Dette rotasjonsplanet, presentert i figur 5.2, viser tydelig at splittingsen resonanslinjene seg imellom ser ut til å være konstant ved hver krystallorientering. Det ser også ut til at linjene må ha samme g -verdi for hver orientering. Begge disse betraktningene sannsynliggjør at resonanslinjene tilhører ett og samme system. Fire like linjer av denne oppførselen, med hensyn på splittingsen og g -verdi, kan skyldes en kobling mellom et enslig elektron og en kjerne med spinn $I = 3/2$, en såkalt kvartett. En løsning som kan forklare disse resonanslinjenes form og oppførsel er om de besto av to kvartetter med bare noe forskjellig splittingsen. Et slikt system ville kunne ha to oppløste linjer på hver av kantene og to bredere linjer i midten bestående av to uoppløste linjer hver. Det bemerkes også fra figur 5.2 at resonanslinjene har maksimal hyperfinsplittingsen og g -verdi ved samme orientering og også minimal hyperfinsplittingsen og g -verdi ved samme orientering ($g \propto B^{-1}$).

Ingen av kjernene i LAP har spinn $I = 3/2$. Derfor antas resonansene å skyldes forurensninger i krystallene. Denne forurensningen må ha kommet fra en eller flere av de komponentene som krystallen produseres fra. Dette har sin begrunnelse i at linjene ble observert i krystaller fra to forskjellige produksjoner. For den konsentrerte fosforsyra som er benyttet i krystallproduksjonen, er det oppgitt at den kan inneholde blant annet maksimalt 0,0002 % klor, maksimalt 0,0005 % kobber og maksimalt 0,05 % natrium.



Figur 5.2: Et 180° rotasjonsplan om b -aksen bestående av 2. deriverte EPR-spektre tatt opp for hver femte grad, av 77 K-bestrålte LAP-krystaller. Aksene $\langle a \rangle$ og $\langle c \rangle$ er avmerket. Legg også merke til den svakere kvartetten som kommer inn fra høyre ved $B \parallel \langle c \rangle$. Magnetfeltet tilsvarer en mikrobølgefrequens på 9,7578 GHz.

Dersom resonanslinjene tilhører to nesten like kvartetter kan kvartettene ha sitt opphav fra vekselvirkninger med to isotoper til samme kjerne, men hvor isotopene har litt forskjellige g_N -verdier. Hyperfinsplittingen er avhengig av blant annet g_N (se kap. 2.2.3).

Intensitetsforholdet mellom de to ytre oppsplittede resonanslinjene er som nevnt cirka 3:7. Kvartettens opphav begrenses dermed til vekselvirkninger med kjerner som finnes naturlig i to isotoper. Begge isotopene må ha spinn $I = 3/2$, og de må ha noe ulike g_N -verdier. Det naturlige mengdeforholdet mellom isotopene bør være rundt 3:7.

Klor og kobber har begge to isotoper med $I = 3/2$. Klor har to stabile isotoper hvor det finnes naturlig 75,77 % Cl^{35} og 24,23 % Cl^{37} [44]. Kobber har også to isotoper med naturlig fordeling av 69,2 % Cu^{63} og 30,8 % Cu^{65} [44]. Både klor og kobbers to isotoper har noe forskjellige g_N -verdier. En større g_N -verdi vil gi en større hyperfinsplitting. Fra spekteret i figur 5.1 er det imidlertid slik at den minst intense kvartetten har større splitting enn den intensitetsmessig største kvartetten. For klor har Cl^{35} (75,77 %) en noe større g_N -verdi enn det isotopen Cl^{37} (24,23 %) har. Siden det er den intensitetsmessig minste kvartetten som er assosiert med den største splittingen, kan det derfor ikke være vekselvirkninger med klorkjerner som gir opphav til kvartettstrukturene i figur 5.1. For kobber derimot er det motsatt. g_N -verdiene til isotopene Cu^{63} (69,2 %) og Cu^{65} (30,8 %) er på henholdsvis 1,484 og 1,588 [44]. Forholdet mellom g_N -verdiene til Cu^{65} og Cu^{63} er omtrent 1,070, noe man også ville forvente for forholdet mellom hyperfinsplittingene tilhørende de to isotopene. Dersom man ut fra figur 5.1 beregner forholdet mellom splittingene til den minst og mest intense kvartettene, finner man at dette blir cirka 1,076. Dette er i godt samsvar med det forventede forholdet mellom hyperfinsplittingene til de to kvartettene dersom kvartettene tilskrives vekselvirkninger med kobber.

For rotasjonsplanet om b-aksen i figur 5.2 kan man anslå maksimale og minimale hyperfinsplittings og g -verdier. Splittingene for den mest intense kvartetten finner man til $A_{maks} \cong 11,8$ mT og $A_{min} \cong 2,5$ mT. g -verdiene for den mest intense kvartetten kan anslås til $g_{maks} \cong 2,389$ og $g_{min} \cong 2,109$. Ved sammenligning med kjente kobberradikaler finner man et godt samsvar mellom de anslåtte hyperfinsplittingene og g -verdiene og verdier bestemt for radikalet Cu^{2+} [52]. Også for Cu^{2+} er det slik at maksimal hyperfinsplitting og g -verdi er omtrent ved den samme orienteringen, samt at minimal hyperfinsplitting og g -verdi også er

ved omtrent den samme orienteringen. Mye tyder derfor på at det er radikalet Cu^{2+} som gir den observerte kvartettstrukturen.

To bare nesten like kvartetter kan også ha sitt opphav fra to ulike radikaler som vekselvirker med samme type kjerne. Natrium, som finnes stabilt bare som Na^{23} , har $I = 3/2$ og er følgelig en kandidat for et slikt tilfelle. Det er imidlertid fremkommet for lite informasjon i dette arbeidet til å si noe om kvartettstrukturene kan skyldes vekselvirkninger med natriumkjerner.

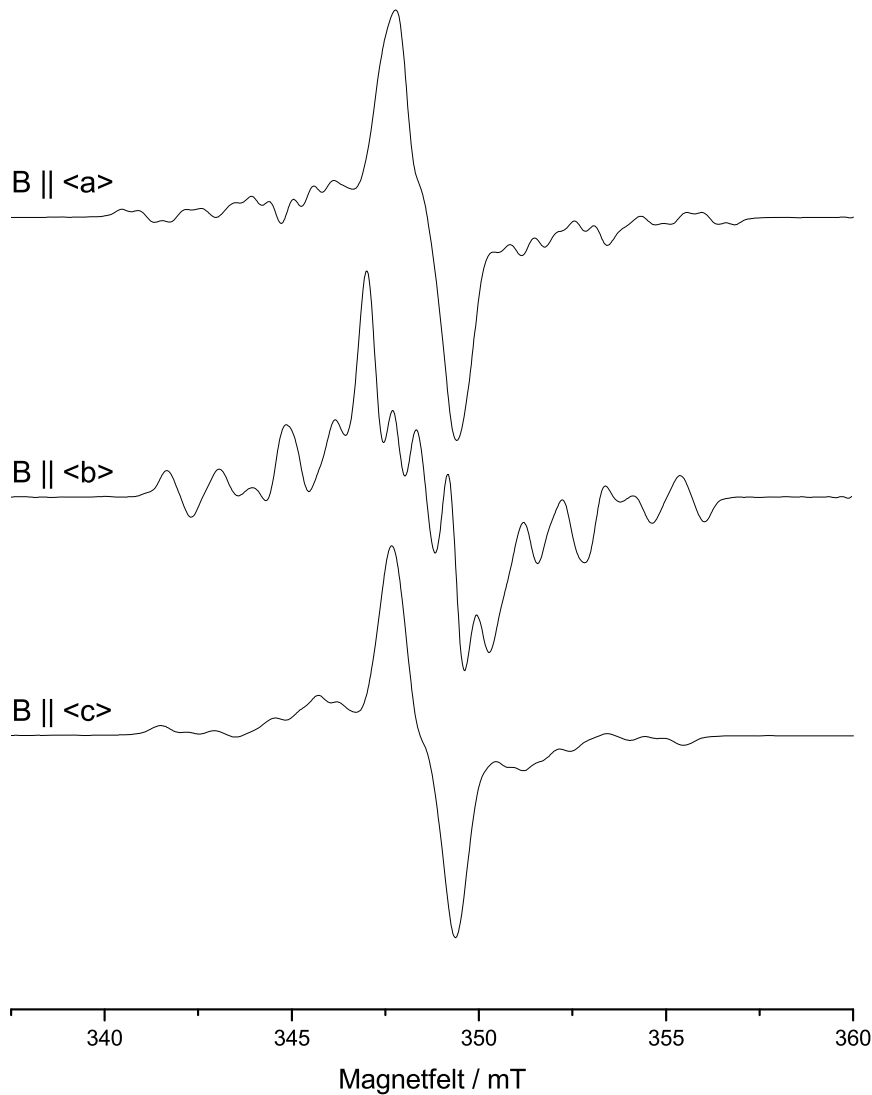
Det bemerkes at ved oppvarming fra 77 K reduseres kvartettene gradvis til å bli helt borte ved romtemperatur. Ved nedkjøling kommer kvartettene tilbake igjen. Mest trolig er det temperaturavhengige relaksasjonsprosesser som er årsaken til den observerte variasjonen i linjeintensitetene med temperatur. Den svakere kvartetten som ble nevnt i figur 5.2 er det ikke gjort noe videre forsøk på å analysere, annet enn å bemerke at den eksisterer.

5.2 Sentralresonansene

5.2.1 EPR-spektre av sentralresonansene

EPR-spektrene til sentralresonansene ble tatt opp for hver femte grad ved rotasjon om de krystallografiske aksene $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$.

Figur 5.3 viser EPR-spektrene til enkrystaller av LAP med magnetfeltet rettet langs de krystallografiske aksene $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$. Figuren viser at det er en svært sterk resonans i midten av spekteret. På hver side er det svakere resonanslinjer. I spektrene finnes det også flere uoppløste linjer. Det tyder på bidrag fra flere radikaler. Spesielt tydelig ser man dette i spekteret for $B \parallel \langle b \rangle$. I samme spekter ser man også godt en liten asymmetri. Dette tyder på at de radikalene som bidrar til spekteret har noe forskjellige g -verdier. Den klart sterkeste resonansen nær midten av spektrene antas å tilhøre ett eget radikal. Symmetrien på flankene i spektrene sannsynliggjør at også de ytterste flankeresonansene (på hver side) tilhører ett eget radikal. I tillegg må det være minst ett radikal til, muligens flere, som er med og bidrar til EPR-spektrene.



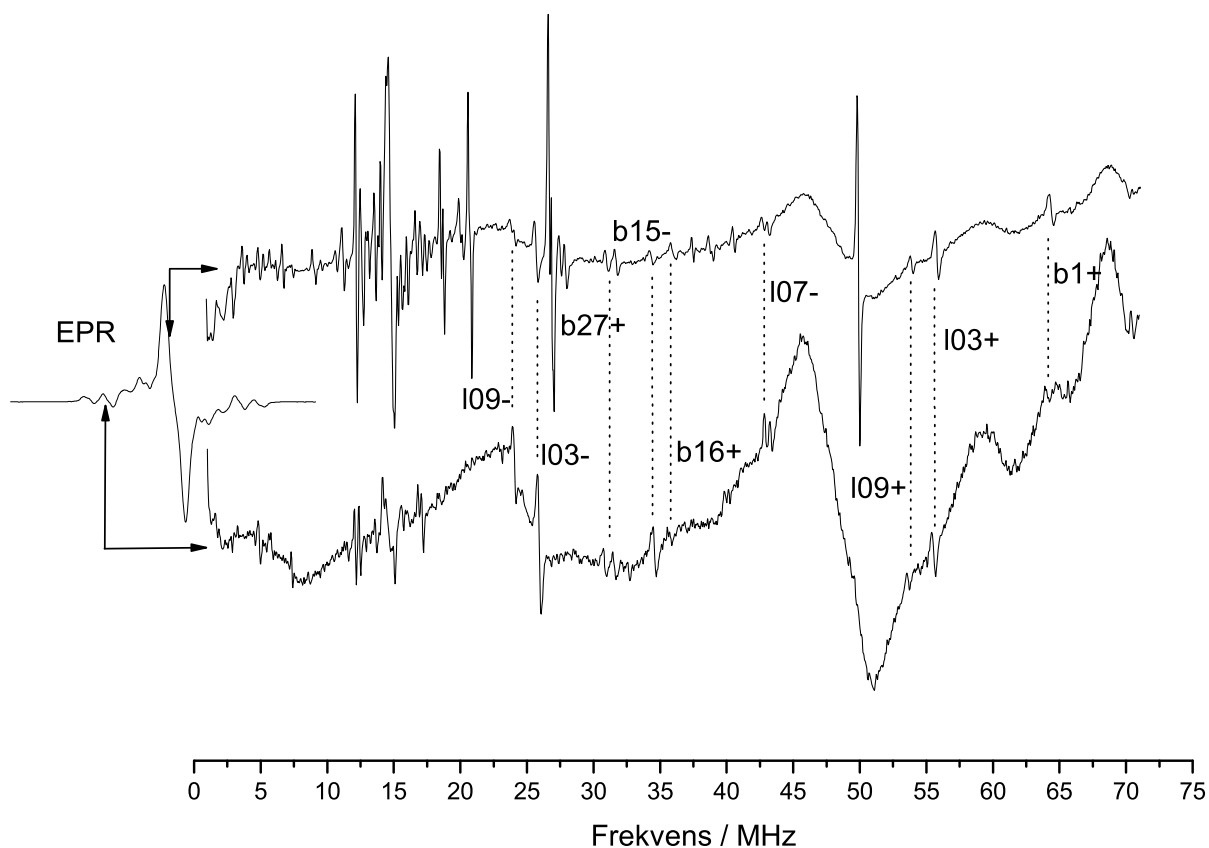
Figur 5.3: 1. deriverte EPR-spektre av enkeltkrystaller av LAP, bestrålt og observert ved 77 K og med magnetfeltet er rettet parallelt langs de tre krystallografiske aksene. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,7644 GHz.

5.2.2 ENDOR og EIE av sentralresonansene

EPR-spektrene viser som nevnt tydelig bidrag fra flere ulike radikaler. For å kunne skille disse fra hverandre ble ENDOR-spektre tatt opp. Magnetfeltet ble låst til en resonanslinje nær midten av EPR-spekteret. ENDOR-opptak ble gjort ved rotasjon av krystallen om de krystallografiske aksene i trinn på fem grader. Det ble til sammen observert 28 ENDOR-linjer, men det var bare mulig å følge 11 av disse i alle tre plan. Som ved romtemperaturstudiet var det spesielt rotasjonsplanet om a-aksen som satte begrensninger på det antall linjer det kunne beregnes hyperfinkoblingstensorer for.

Høy- og lavfrekventlinjer ble kartlagt på samme måte som ved romtemperaturstudiet, altså ved å låse magnetfeltet til litt forskjellig verdier og så observere hvorledes ENDOR-linjene frekvensforflyttet seg. I dette arbeidet er alle høyfrekvente ENDOR-linjer og tilhørende tensorer markert med +, mens lavfrekvente ENDOR-linjer og tensorer er markert med -.

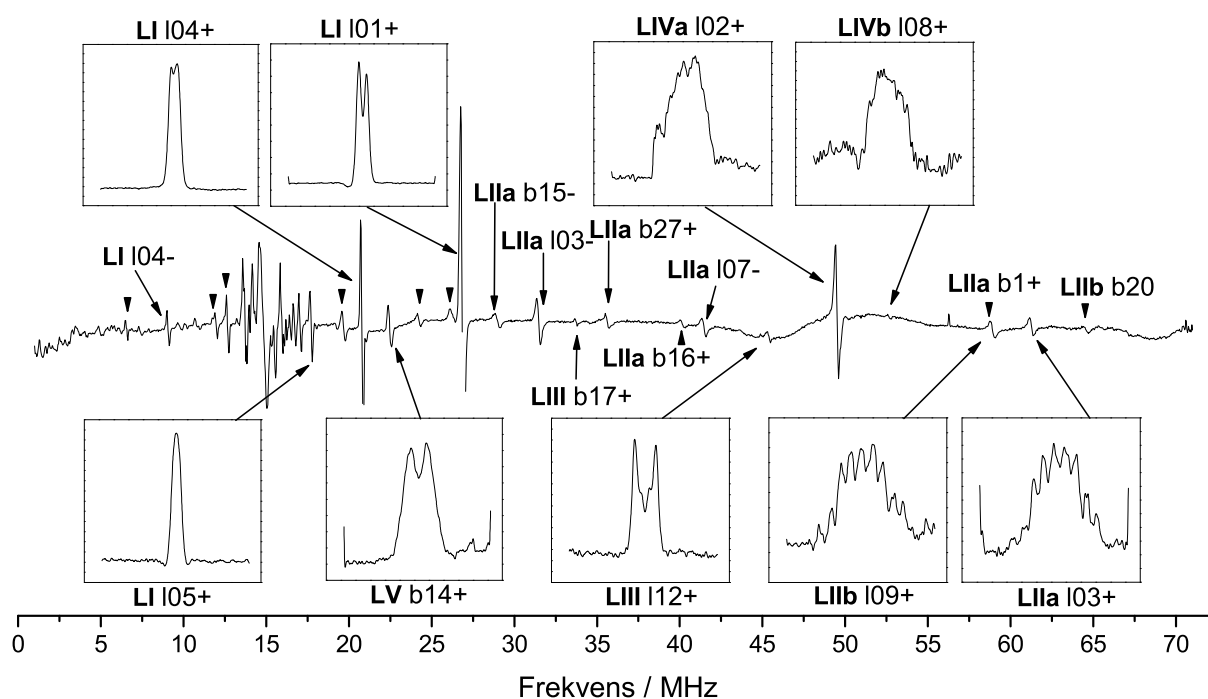
Ved å låse magnetfeltet til bestemte EPR-linjer under ENDOR-opptak, kan man si noe om hvilke ENDOR-linjer som hører til hvilke EPR-linjer. Dette ble blant annet gjort ved å låse magnetfeltet til en resonanslinje nær midten av EPR-spekteret og til flankeresonansene. Flankeresonansene ble i kapittel 5.2.1 antatt å tilhøre et eget radikal uten betydelig overlapp med resonanser fra andre radikaler. Dersom så er tilfellet vil linjene i ENDOR-spekteret som fremkommer ved å låse magnetfeltet til flankeresonansene, tilhøre ett og samme radikal.



Figur 5.4: 1.deriverte ENDOR-spektre av enkrystaller av LAP, bestrålt og observert ved 77 K og orientert 10° fra $\langle c^* \rangle$ i rot $\langle b \rangle$ -planet (vinkel 350° , jamfør figur 5.6). Det øverste ENDOR-spekteret fremkommer når magnetfeltet låses sentralt i EPR-spekteret, mens det nederste ENDOR-spekteret er tatt opp ved å låse magnetfeltet til flankeresonansen i EPR-spekteret (vises med piler i figurens EPR-spekter).

Figur 5.4 viser ENDOR-spektrene når magnetfeltet låses sentralt og til flankene i EPR-spekteret. Når magnetfeltet låses til flankeresonansen er det av de ENDOR-linjene det er etablert tensorer for, bare linjene $l03-$, $l07-$, $l09+$ og $l03+$ som fremkommer. I tillegg fremkommer linjene $b1+$, $b27+$, $b15-$ og $b16+$ markert i figur 5.4. Disse linjene var ikke synlige i alle tre rotasjonsplan og derfor var det ikke mulig å bestemme de respektive koblingstensorene.

ENDOR-linjer kan sorteres med hensyn på radikaltilhørighet ved å sammenligne de ulike linjenes EIE-spektre. Likheten i EIE-spektrene for de ENDOR-linjene som er assosiert med flankeresonansen i EPR-spektrene, bekreftet tilhørigheten til ett og samme radikal. I tillegg ble koblinger tilhørende andre radikaler identifisert.



Figur 5.5: 1. derivert ENDOR-spekter tatt opp 40° fra $B \parallel \langle a \rangle$ ved rotasjon om $\langle b \rangle$ (orientering vist med stiplet linje i figur 5.6). De 11 linjene som kunne følges i alle tre rotasjonsplan er navngitt i figuren. I tillegg er EIE-spektrene for 9 høyfrekvente linjer vist. På bakgrunn av EIE-spektrene er ENDOR-linjene sortert til radikalene LI, LII, LIII, LIV og LV. Radikalene LII og LIV forekommer i to konformasjoner, markert som a og b. De linjer som bare kunne følges i to eller færre plan, er markert med enkel pil og merket med radikaltilhørighet samt navngitt dersom dette lot seg bestemme. EIE-spektrene har alle en bredde på 25 mT.

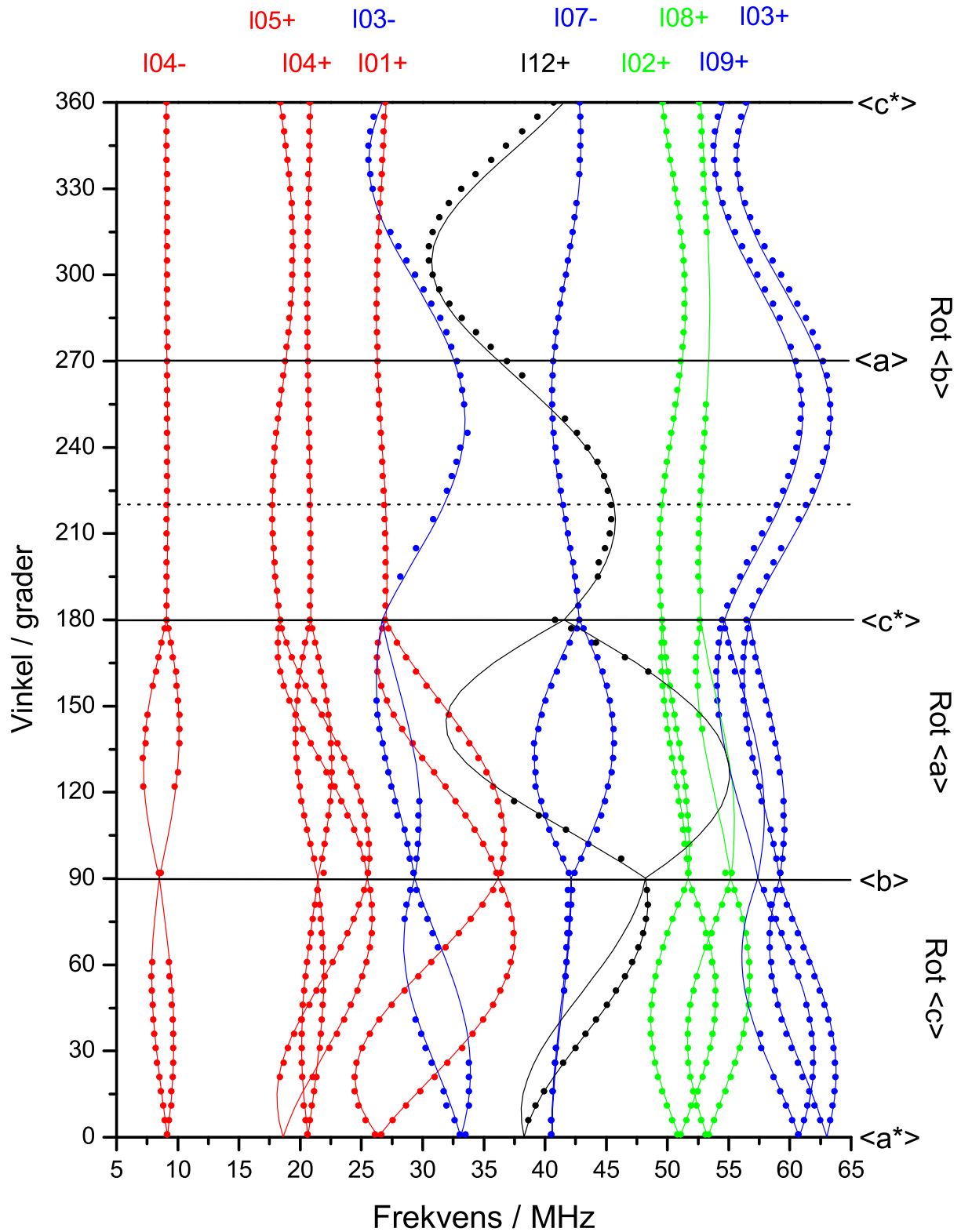
Det ble på bakgrunn av EIE-spektrene til ENDOR-linjene godtgjort at det er dannet totalt fem forskjellige radikaler. Disse er navngitt LI – LV. Noen av radikalene ble funnet å forekomme i to konformasjoner, noe som vil begrunnes senere i dette kapitlet. Figur 5.5 viser EIE-spektrene til de høyfrekvente linjene som kunne følges i alle tre rotasjonsplan. Unntaket er radikal LV. For dette radikalet var det ikke mulig å følge tilhørende ENDOR-linjer i mer en rot $\langle b \rangle$ -planet. Følgelig kunne det heller ikke beregnes noen hyperfinkoblingstensor tilhørende LV. ENDOR-linja /07- er bestemt til å være en lavfrekvent linje som har sin høyfrekventgrein utenfor opptaksområdet (>72 - 73 MHz). Kavitetens utforming gjorde at det ikke var mulig å få ENDOR-opptak på frekvenser over cirka 70 MHz.

Krystallorienteringen er forskjellig for figur 5.4 og 5.5. Figur 5.9 viser ENDOR-rotasjonsplanet om b-aksen. Her er også krystallorienteringene tilsvarende figur 5.4 og figur 5.5 markert, samt at enkelte ENDOR-linjer er navngitt.

Elleve tensorer ble beregnet på grunnlag av de elleve ENDOR-linjene som kunne følges i alle de tre rotasjonsplanene. Figur 5.6 viser både målepunkter og linjeposisjoner beregnet fra tensorene gitt i tabell 5.1, 5.2, 5.4 og 5.5 for de tre ENDOR-rotasjonsplanene.

ENDOR-linjene /03+ og /09+ varierer lite i form, men /09+ ligger mellom 1,8 og 2,5 MHz lavere i frekvens enn /03+. Dessuten er /03+ rundt 3 ganger mer intens enn /09+. Det er derfor rimelig grunn til å tro at disse to linjene tilhører samme kobling i to litt forskjellige konformasjoner av samme radikal, hvor konformasjonen til /03+ er den hyppigst forekommende. Den lavfrekvente ENDOR-linja /03- blir påvirket av den veldig sterke linja /01+, noe som kan forklare de små avvikene mellom målte og beregnede verdier tilhørende /03-.

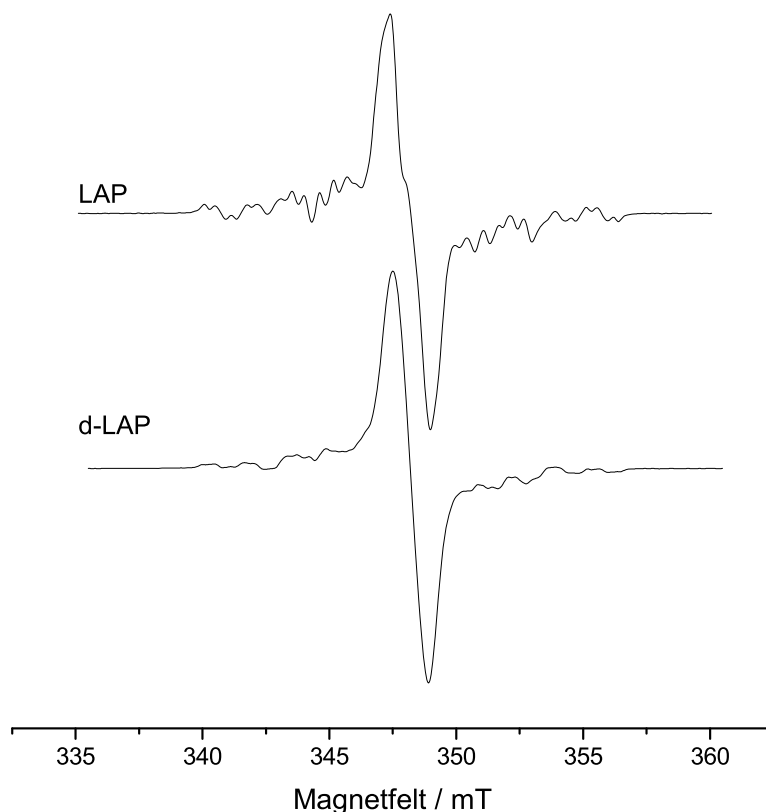
Linja /12+ har en stor anisotropi, og var også oppsplittet i rotasjonsplanet om $\langle b \rangle$. Denne oppsplittingen skyldes at linjer med stor anisotropi krever en større grad av nøyaktighet i innstilling av rotasjonsaksen. I tensorberegningen ble middelveidien til de to splittingene brukt. Dette kan forklare det større avviket mellom måleverdiene og tilhørende tensor for /12+ i rotasjonsplanet om b-aksen (se figur 5.6).



Figur 5.6: Oversikt over de 11 ENDOR-linjene som kunne følges i alle tre rotasjonsplan for lavtemperaturbestrålte enkrystaller av LAP. Punktene er de målte verdiene og linjene er beregnet ut fra de etablerte tensorene. Hvert radikal er fargekodet: LI er rød, LII er blå, LIII er svart og LIV er grønn. Den stiplede linja angir orienteringen hvor EIE-eksperimentet i figur 5.5 ble utført.

5.2.3 Eksperiment med deuterte krystaller

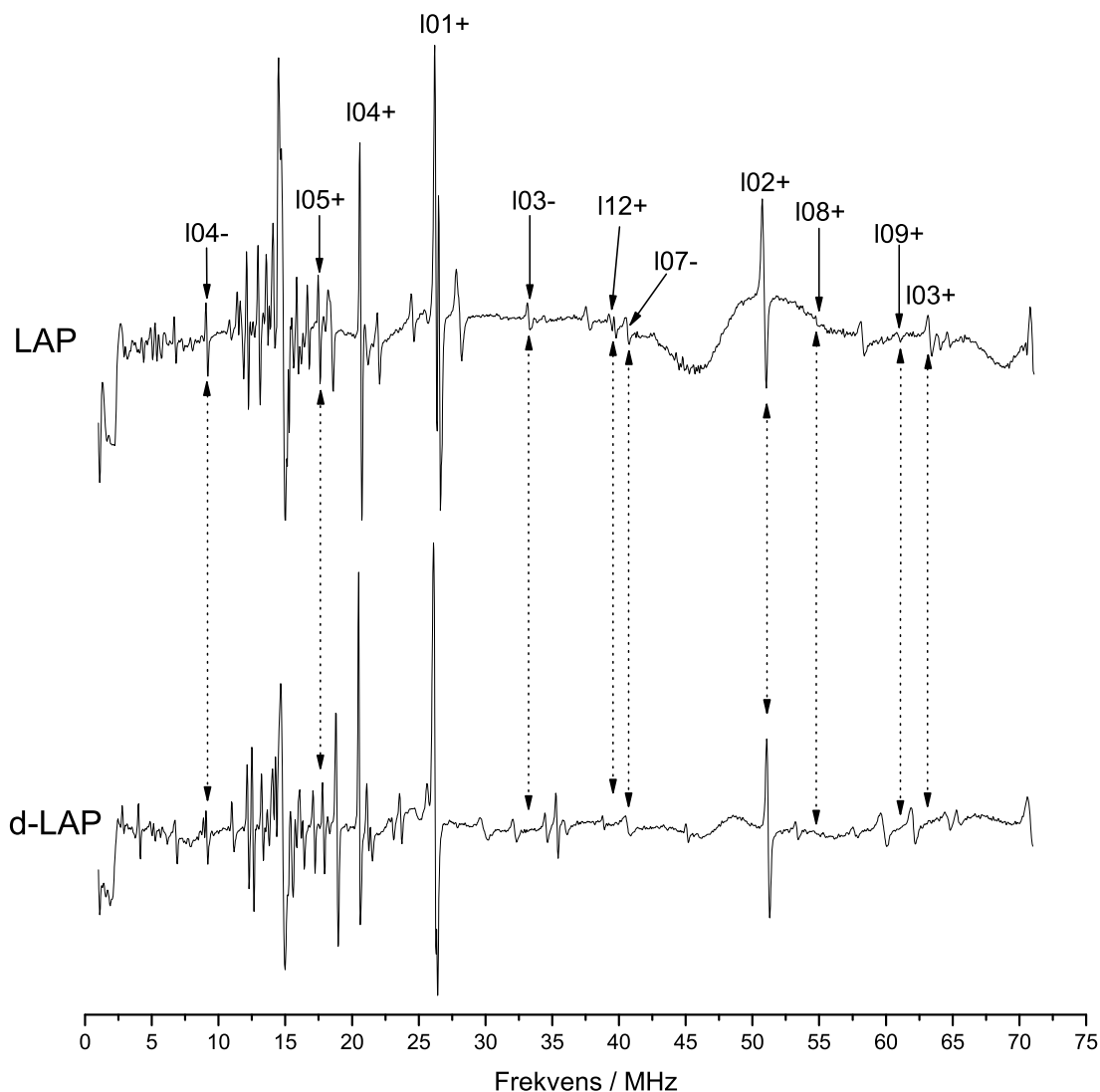
For å undersøke om noen av de observerte koblingene kan tilskrives vekselvirkninger med protoner som er utskiftbare med deuterium når krystallene gros fra løsninger av tungtvann, ble det tatt opp EPR- og ENDOR-spektre av både LAP- og d-LAP-krystaller.



Figur 5.7: 1.deriverte EPR-spektre av enkrystaller av LAP og d-LAP bestrålt og observert ved 77 K, med magnetfeltet $B \parallel \langle a \rangle$. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,7537 GHz.

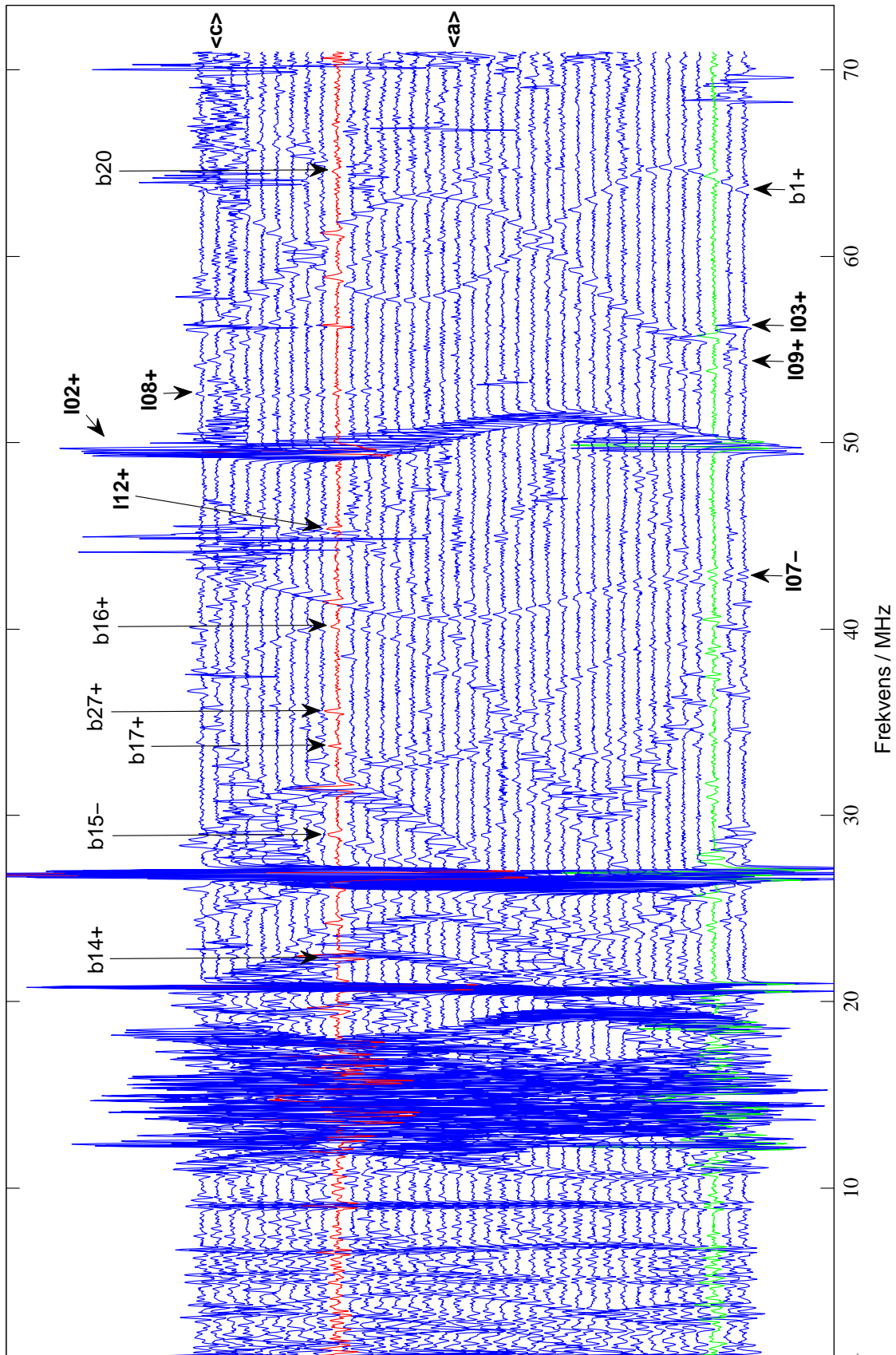
Figur 5.7 viser EPR-spektrene av LAP- og d-LAP-krystaller med magnetfeltet $B \parallel \langle a \rangle$. For den sterke sentralresonansen er det liten forskjell i EPR-spektrene, bortsett fra at den lille skulderen midt på resonanslinja forsvinner i EPR-spekteret for d-LAP. For de ytterste flankeresonansene er linjeposisjonene i de to spektrene nær like. For de svakere resonansene mellom flankeresonansen og den svært sterke midtresonansen ser det ut til å være noe større forskjeller mellom spektrene til LAP og d-LAP.

For å hente ut mer informasjon om spesifikt hvilke koblinger som eventuelt tilhører utskiftbare protoner, ble ENDOR-spektrene for LAP- og d-LAP-krystaller tatt opp ved å låse magnetfeltverdien til en resonanslinje nær midten av EPR-spekteret. Figur 5.8 viser forskjeller og likheter i ENDOR-spektrene for LAP- og d-LAP-krystallene.



Figur 5.8: 1.deriverte ENDOR-spektre av enkrystaller av LAP og d-LAP bestrålt og observert ved 77 K med magnetfeltet $B \parallel \langle a \rangle$.

Av de koblingene det er etablert tensorer for, viser det seg at $I01+$, $I04+/-$, $I05+$, $I07-$ og $I02+$ helt klart ikke skyldes vekselvirkninger med utskiftbare protoner. For tensoren $I08+$ er det vanskelig å fastslå om koblingen stammer fra et ikke-utskiftbart proton, da ENDOR-linja til $I08+$ er svært svak. For de øvrige koblingene er det observert ENDOR-linjer i spekteret for d-LAP som ikke samsvarer eksakt med tilsvarende linjeposisjon i spekteret til LAP, men som ligger ganske nært til disse. Når noe hydrogen erstattes med deuterium i et molekyl, vil dette ofte kunne medføre endringer i geometrien til de radikaler som dannes. Slike geometriske endringer kan igjen føre til endringer i ENDOR-linjenes posisjon. Dermed er det ikke mulig å entydig fastslå om koblingene $I03+/-$, $I09+$ og $I12+$ stammer fra vekselvirkninger med utskiftbare protoner.



Figur 5.9 Et ENDOR-rotasjonsplan om b-aksen bestående av 2.deriverte ENDOR-spektre tatt opp for hver femte grad ved rotasjon av LAP-krystall, bestrålt ved 77 K, om den krystallografiske b-aksen. Krystallorienteringene hvor magnetfeltet er parallelt med <a> og <c> er avmerket på figuren. Det røde spekteret tilsvarer orienteringen til ENDOR-spekteret i figur 5.5 og det grønne spekteret svarer til orienteringen til ENDOR-spektrene i figur 5.4.

5.2.4 Radikal LI

Radikal LI har de klart sterkeste ENDOR-linjene, /01+, /04+ og /05+. Schonlandvarianten med egenverdier som best stemte overens med kjente koblingstyper (se kap. 3.5 og 3.6) er til hver hyperfinkobling listet i tabell 5.1.

Tabell 5.1: Hyperfinkoblingstensorer for koblinger knyttet til radikal LI funnet ved ENDOR-spektroskopi av enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved 77 K. Tallet i parentes angir usikkerheten til siste siffer. I tillegg er noen referansevektorer listet, samt vinkelforskjellen mellom noen referansevektorer og egenvektorer.

Kobling (type)	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Egenverdier (MHz)	Egenvektorer			$\Delta\phi^a$ (grader)
				<a>		<c*>	
/01+ (β)	29,48 (1)	16,47 (2)	45,81 (2)	-0,312 (1)	-0,927 (2)	0,207 (1)	2,8 ₁
		-5,76 (2)	23,58 (2)	-0,380 (0)	-0,080 (1)	-0,922 (1)	
		-10,30 (2)	19,04 (2)	0,871 (1)	-0,367 (1)	-0,327 (2)	
/04+ (γ)	12,13 (1)	3,56 (2)	15,69 (2)	0,243 (3)	-0,767 (3)	-0,594 (8)	12,3 ₂
		-0,68 (2)	11,45 (2)	0,916 (1)	-0,019 (4)	0,400 (1)	
		-2,87 (2)	9,26 (2)	0,318 (2)	0,642 (6)	-0,698 (3)	
/04- (γ)	12,11 (2)	3,43 (4)	15,54 (4)	0,233 (6)	-0,778 (5)	-0,584 (10)	
		-0,46 (4)	11,65 (3)	0,900 (2)	-0,055 (6)	0,432 (3)	
		-2,97 (4)	9,14 (3)	0,368 (3)	0,626 (9)	-0,687 (4)	
/05+ (β)	11,91 (1)	10,57 (2)	22,48 (2)	-0,263 (1)	-0,953 (3)	-0,153 (3)	23,0 ₃
		-4,30 (2)	7,61 (2)	-0,693 (0)	0,297 (1)	-0,658 (2)	
		-6,28 (2)	5,63 (2)	0,672 (1)	-0,067 (3)	-0,738 (3)	
Molekylære referansevektorer ^b :							
1 Retningsvektor C1 – HC2				-0,356	-0,908	0,219	
2 Retningsvektor C1 – H1C3				0,139	-0,654	-0,744	
3 Retningsvektor C1 – H2C3				-0,079	-0,865	-0,496	

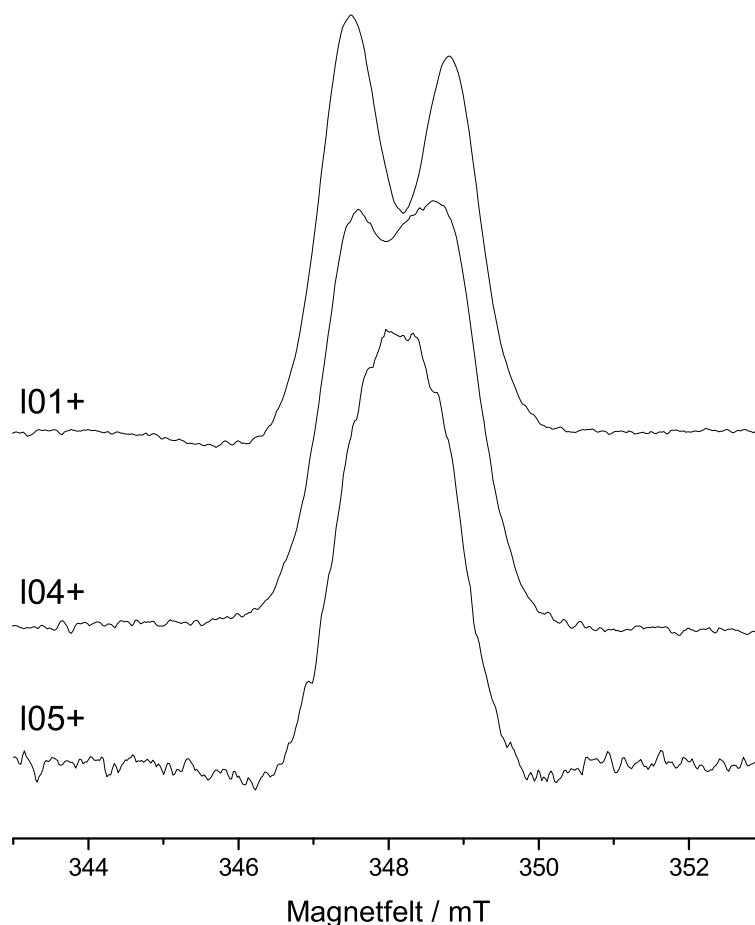
^a Vinkelavviket mellom egenvektoren og den molekylære referansevektor hvis nummer er gitt som indeks.

^b Referansevektorer fra appendiks A.

Ved krystallorienteringen avmerket med stiplet linje i figur 5.6 har EIE-spekteret til LI en halvverdbredde på rundt 2,5 mT. Ved den samme orienteringen ble summen av hyperfinkoblingene til tensorene listet i tabell 5.1 anslått til 1,6 mT. Dermed mangler det koblinger på til sammen 0,9 mT for å kunne forklare EIE-spekterets bredde. Det ble også observert to ENDOR-linjer (høy- og lavfrekventgrein) samt en lavfrekvent ENDOR-linje på 12,5 MHz. Alle disse kan knyttes til LI ved likheter i EIE-spektrene. Linjene tilsvarer

splittinger på henholdsvis 0,1 mT og 0,2 mT. De resterende koblingene på rundt 0,6 mT antas å tilhøre flere små koblinger som bare bidrar til linjerbredden i EPR-spekteret.

ENDOR-linjenes EIE-spektre er noe forskjellige. EIE-spekteret til $I05+$ skiller seg mest ut ved at det ser ut som en singlett samt at spekteret har en noe smalere bredde enn EIE-spektrene til de to andre linjene. EIE-spektrene til $I01+$ og $I04+$ er begge dubletter og spektrene har identisk lik bredde. Derimot kan det se ut som om dubletten for spekteret tilhørende $I01+$ har en større splitting enn for EIE-spekteret tilhørende $I04+$. En sammenligning av EIE-spektrene til $I01+$, $I04+$ og $I05+$ vises i figur 5.10.

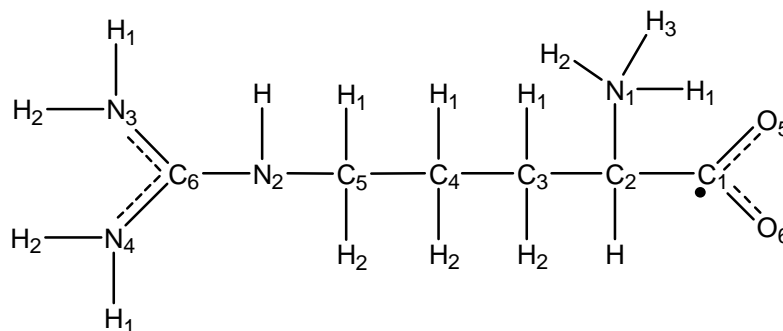


Figur 5.10: Sammenligning av EIE-spektrene til ENDOR-linjene $I01+$, $I04+$ og $I05+$, alle sortert til radikal LI. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrequens på 9,7567 GHz.

Siden EIE-spekteret til $I05+$ viste seg å være noe smalere enn spektrene til $I01+$ og $I04+$, ble det vurdert om $I05+$ tilhører et eget radikal, eller eventuelt stammer fra en egen konformasjon av radikal LI. En tilsynelatende likhet i orienteringsvariasjon mellom $I01+$ og $I05+$ i figur 5.6 styrker en slik hypotese. Imidlertid er det signifikante forskjeller i egenvektorene tilhørende tensorene $I01+$ og $I05+$. Dessuten er $I05+$ en liten kobling med en isotropverdi på under 12 MHz og vil bare gi bidrag til EPR-spekterets linjebredde. Siden det manglet en del koblinger for å forklare bredden av EIE-spektrene til $I01+$ og $I04+$ ble allikevel $I05+$ knyttet sammen med $I01+$ og $I04+$ til radikal LI.

Både tensor $I01+$, $I04+$ og $I05+$ har egenverdier på typisk β/γ -form. I eksperimentet med krystaller av d-LAP (se kap. 5.2.3) ble ingen av de tilhørende ENDOR-linjene entydig funnet til å skyldes koblinger til utskiftbare protoner. Det ble heller ikke knyttet linjer med α -tensortrekk til radikal LI. Dersom en slik α -kobling hadde eksistert er det sannsynlig at denne ville vært observert, siden LI gir opphav til de mest intense linjene i ENDOR-spektrene. Disse observasjonene skulle begrense radikalstrukturene som LI kan representere til enten være et spinn sentrert til C1 (et karboksylanion) eller være et radikal dannet ved en hydrogenabstraksjon av HC2. Alle andre spinnlokalisasjoner må medføre vekselvirkninger enten til α -protoner eller til utskiftbare protoner.

Ved å sammenligne tensorenes maksimalretninger med molekylære retninger for den uskadde molekylstrukturen (appendiks A), noe som er gjort i tabell 5.1, finner man at et spinn sentrert til C1 gir godt samsvar med retninger til nærliggende β - og γ -protoner. Spesielt gjelder dette for retningen C1-HC2 som bare avviker $2,8^\circ$ mot maksimalretningen tilhørende $I01+$. For de andre tensorene, $I04+$ og $I05+$, stemmer maksimalretningene også forholdsvis bra overens med retningene C1-H1C3 og C1-H2C3 fra appendiks A.



Figur 5.11: Radikalstruktur for et karboksylanion, foreslått dannet i bestrålte enkrystaller av LAP ved 77 K.

Imidlertid stemmer de anisotrope egenverdiene til I_{01} + dårlig overens med kjente C_{α} - C_{β} - H_{β} -koblinger i karboksylanioner. Tilsvarende stemmer også de anisotrope egenverdiene til I_{05} + dårlig overens med kjente C_{α} - C_{β} - C_{γ} - H_{γ} -koblinger slik som H_2C_3 -koblingen ville utgjøre for et karboksylanion. I kapittel 6.1.4 diskuteres tensorenes anisotrope egenverdier nærmere, samt at alternative radikalmodeller for LI belyses.

5.2.5 DFT-beregninger på LI

Det har vist seg svært vanskelig å gjøre DFT-beregninger på det karboksylanionet som er foreslått og vist i figur 5.11. Flere forsøkt er utført uten at det har lyktes å få et spinn dannet ved en reduksjonsprosess, lokalisert til C1. Først ble DFT-optimaliseringen utført for et anion med den intakte L-arginin-strukturen. Spinnnet ble da lokalisert til et $2p_z$ -orbital på C6. Dette gav i hovedsak to store koblinger på rundt 81 MHz og 103 MHz til henholdsvis HN_2 og H_1N_4 , begge med anisotrope egenverdier på rundt (7, -2, -4) MHz. I tillegg ble det også beregnet vekselvirkninger med nitrogenkjernene N3 og N4. De andre β -protonene så av den optimaliserte strukturen ut til å ligge i planet til guanidylgruppa ($-NH-C(NH_2)_2$) og dermed også i nodalplanet til LEO. Det isotrope bidraget fra vekselvirkninger med disse protonene ble da også beregnet til nær null.

Det ble også forsøkt å gjøre DFT-beregninger på karboksylanionet til L-arginin ved å erstatte hele guanidylgruppa med et hydrogenatom. I tillegg ble også O5 protonert. Med sidekjeden låst og uten noen geometriske restriksjoner for resten av molekylet ble aminogruppa spaltet av spontant i optimaliseringsberegningen. For å unngå dette ble den

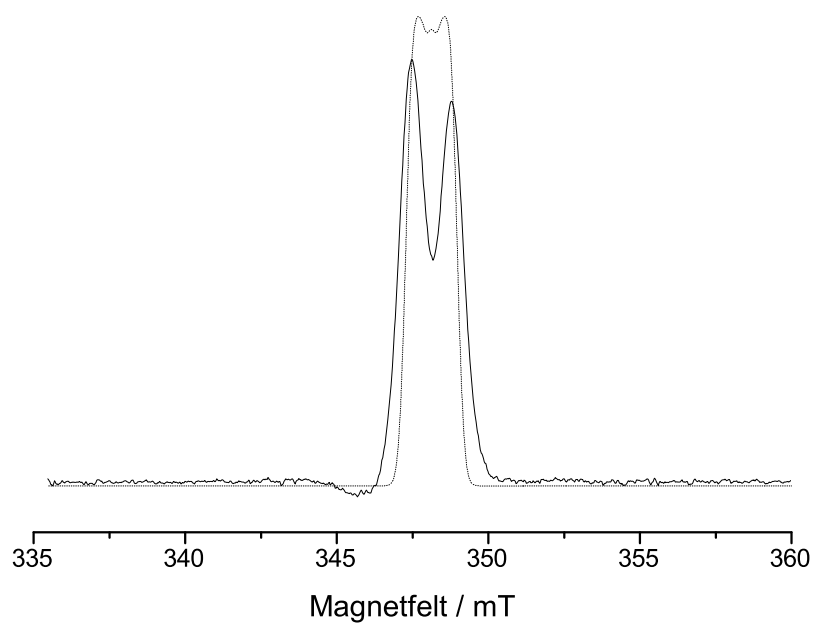
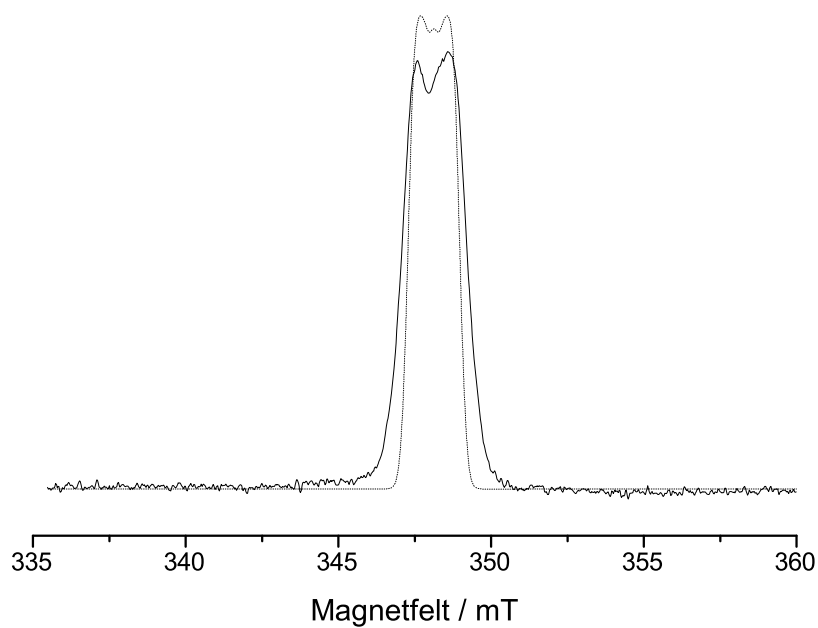
samme beregningen utført, men ved å låse bindingslengden C2-N1 til 1,6 Å. DFT-optimaliseringen lokaliserte da spinnet til C2, med en α -kobling til HC2 og koblinger til H1C3 ($a_{iso}^{\beta} = 14$ MHz) og H2C3 ($a_{iso}^{\beta} = 135$ MHz). Ingen av tensorene hadde derimot anisotrope egenverdier på samme form som /01+. Det ble også prøvd å protonere O6 i beregningen, samt å bøye karboksylgruppa ned mot sidekjeden før DFT-beregningen ble utført, uten at det ble oppnådd et C1-lokalisert spinn i DFT-optimaliseringen. Ved å låse aminogruppa i tillegg til sidekjeden under optimaliseringen ble det beregnet anisotrope egenverdier på samme form som for /01+. Disse anisotrope egenverdiene tilhørte imidlertid vekselvirkninger med aminogruppas protoner. NMR-eksperimentene for de benyttede d-LAP-krystallene i kapittel 3.2.3 konkluderte med at NH-protonene sannsynligvis i betydelig grad var utskiftet i d-LAP-krystallene. Eksperimenter med d-LAP-krystaller (se kap. 5.2.3) viste at /01+ etter alt å dømme ikke tilhørte vekselvirkninger med et utskiftbart proton.

Det at det ikke har vært mulig å gjenskape karboksylanionet vist i figur 5.11 ved DFT-beregninger, gjør det vanskeligere å bestemme hvor god modell et karboksylanion utgjør for radikal LI.

5.2.6 Simulering av LI

Simuleringen av LI er gjort med simuleringsprogrammet KVASAT [50, 51] ved bruk av de tensorene som er assosiert til LI og som er listet i tabell 5.1.

Figur 5.12 viser en rimelig god tilpasning mellom det simulert EPR-absorpsjonsspekteret til LI og det eksperimentelle EIE-spekteret til /04+. For EIE-spekteret til /01+ derimot, er samsvaret dårligere. Grunnen til dette er at det ser ut til at dublettsplittingen i EIE-spekteret til /01+ er noe større enn i spekteret til /04+.



Figur 5.12: EPR-absorpsjonsspektre (prikket linje) simulert på bakgrunn av koblingene assosiert til LI i tabell 5.1 sammenlignet med det eksperimentelle EIE-spekteret til LI (heltrukket linje). Krystallorienteringen er som vist med stiplet linje i figur 5.6. Øverst er det simulerte spekteret sammenlignet med EIE-spekteret til ENDOR-linja I04+, nederst er det simulerte spekteret sammenlignet med EIE-spekteret til ENDOR-linja I01+. Magnetfeltskalaen tilsvarer i begge tilfellene en mikrobølgefrequens på 9.7561 GHz.

5.2.7 Radikal LII

Til radikal LII ble det knyttet totalt fire hyperfinkoblingstensorer. Den Schonlandvarianten med egenverdier som best stemte overens med kjente koblingstyper, er listet i tabell 5.2.

Tabell 5.2: Hyperfinkoblingstensorer for koblinger knyttet til radikal LII funnet ved ENDOR-spektroskopi av enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved 77 K. Tallet i parentes angir usikkerheten til siste siffer. I tillegg er noen referansevektorer listet, samt vinkelforskjell mellom referansevektorene og tilknyttede egenvektorer.

Variant	Kobling (type)	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Egenverdier (MHz)	Egenvektorer			$\Delta\phi^a$ (grader)
					<a>		<c*>	
LIIa	I03+ (β)	88,97 (1)	9,53 (2)	98,50 (2)	-0,861 (1)	0,376 (1)	0,343 (1)	14,8 ₄
			-2,04 (2)	86,93 (2)	-0,394 (1)	-0,919 (1)	0,018 (2)	
			-7,50 (2)	81,47 (2)	0,322 (1)	-0,120 (2)	0,939 (0)	
	I03- (β)	88,45 (1)	9,75 (2)	98,20 (2)	-0,858 (1)	0,384 (1)	0,342 (1)	
			-2,04 (2)	86,41 (2)	-0,406 (1)	-0,919 (1)	0,007 (2)	
			-7,70 (3)	80,75 (3)	0,315 (1)	-0,133 (2)	0,940 (0)	
I07- (β)	113,21 (1)	7,70 (2)	120,91 (2)	-0,132 (1)	-0,663 (0)	-0,737 (5)	18,3 ₂	
		-2,38 (2)	110,83 (2)	-0,990 (0)	0,126 (4)	0,064 (1)		
			-5,32 (2)	107,89 (2)	0,051 (0)	0,738 (4)	-0,673 (1)	
LIIb	I09+ (β)	84,97 (2)	9,83 (4)	94,80 (3)	-0,830 (1)	0,458 (2)	0,317 (2)	
			-2,56 (5)	82,41 (5)	-0,489 (2)	-0,872 (1)	-0,022 (3)	
			-7,26 (4)	77,71 (2)	0,267 (1)	-0,173 (3)	0,948 (0)	
Molekylære referansevektorer ^b :								
1 Retningsvektor C2 – N1					-0,929	0,150	-0,337	
2 Retningsvektor C2 – H2C3					0,168	-0,736	-0,655	
3 Retningsvektor C2 – H1C3					0,472	-0,233	-0,850	
4 Retningsvektor C2 – H1N1					-0,954	0,151	0,258	
5 Retningsvektor C2 – H2N1					-0,893	-0,293	-0,342	
6 Retningsvektor C2 – H3N1					-0,639	0,395	-0,660	

^a Vinkelavviket mellom egenvektoren og den molekylære referansevektor hvis nummer er gitt som indeks.

^b Referansevektorer fra appendiks A

Det ble tidligere argumentert med at likheten i orienteringsvariasjonen til ENDOR-linjene I03+ og I09+ (se figur 5.6) kunne tolkes dit hen at tilhørende koblingene representerer en vekselvirkning med samme proton i to ulike radikalkonformasjoner. Denne hypotesen styrkes ved at tensorene I03+ og I09+ i tabell 5.2 er svært like. Radikalkonformasjonen som tensoren I03+ tilhører, antas å være den hyppigst forekommende, da ENDOR-linja I03+ er

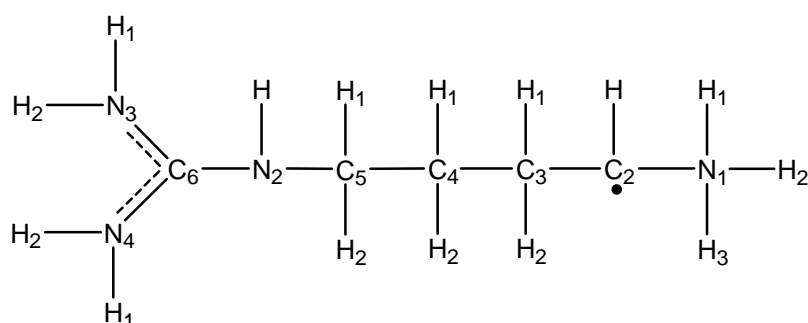
rundt 3 ganger mer intens enn linja I_{09+} . Videre antas det ut fra intensitetsvurderinger at også koblingen I_{07-} tilhører den dominerende radikalkonformasjonen, som fra nå kalles LIIa. Radikalkonformasjonen LIIa vil vektlegges mest i den videre analysen.

Ved krystallorienteringen som er avmerket med stiplet linje i figur 5.6 har EIE-spektret til radikal LII en bredde på rundt 14,0 mT. LII har dermed klart det bredeste EIE-spekteret av alle de observerte lavtemperaturredikalerne. Summen av hyperfinsplittingene til I_{03+} og I_{07-} utgjør cirka 7,4 mT ved den samme krystallorienteringen. Følgelig må det finnes flere koblinger tilhørende LII. Det ser man også ut fra formen til EIE-spekteret. Det er ikke kartlagt flere tensorer til LII, men ved å låse magnetfeltet til flankeresonansen under opptak av ENDOR-spekteret, ble det funnet flere koblinger. Disse er markert i figur 5.4 som b_{15-} , b_{27+} , b_{16+} og b_{1+} . Analysen av EIE-spektrene (se figur 5.5) bekreftet at de nevnte koblingene tilhører LII. Figur 5.9 viser hvorledes koblingene b_{15-} , b_{27+} , b_{16+} og b_{1+} varierer ved rotasjon om b-aksen. I tillegg ble også koblingen b_{20} assosiert til LII. b_{20} er markert i figur 5.5 og 5.9.

Tensorene I_{03+} og I_{09+} har begge typiske β -kobling egenverdier. Fra eksperimentene med deutrerete krystaller var det usikkert hvorvidt I_{03+} og I_{09+} tilhører vekselvirkninger med utskiftbare protoner. I_{07-} har også egenverdier på form av en β -kobling. Det kunne imidlertid fastslås at I_{07-} tilhørte en vekselvirkning med et ikke-utskiftbart proton.

Summen av hyperfinsplittingene til alle koblingene som er assosiert til LII blir rundt 21 mT ved krystallorienteringen som er vist med stiplet linje i figur 5.6. Ved samme orientering var EIE-spekterets bredde bare 14 mT. Dette bekrefter at LII eksisterer i to ulike konformasjoner. Dersom koblingene I_{03+} , I_{07-} , b_{1+} , b_{16+} og b_{27+} knyttes til LIIa blir summen av hyperfinsplittingene på til sammen 13,8 mT (ved krystallorienteringen markert med stiplet linje i figur 5.6). Dette er nært opp til EIE-spekterets halvverdibredde. Det fremgår av figur 5.9 at b_{1+} er en stor kobling som i rot $\langle b \rangle$ -planet ligger på rundt 60 MHz. Den har bare liten anisotrop variasjon og antas derfor å være en β -kobling. Også b_{16+} har anisotrop variasjon på β -form. I rot $\langle b \rangle$ -planet ligger denne ENDOR-linja på rundt 35 MHz. Koblingen b_{27+} derimot har stor anisotrop variasjon. Det antas derfor at b_{27+} er en α -kobling. Denne varierer mellom cirka 28 – 50 MHz i rot $\langle b \rangle$ -planet (se figur 5.9). Dermed er det for LIIa funnet en α -kobling, en middelstor β -kobling, to store β -koblinger og en veldig stor β -kobling.

At det ble funnet såpass mange som fire β -koblinger assosiert til LII begrenser mulige lokaliseringer av LEO. En netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden kan riktignok gi opphav til fire β -koblinger, men ikke til tre så store β -koblinger som de som er knyttet til LIIa. Det eneste alternativet som virker sannsynlig er en dekarboksylering av karboksylgruppa til C2. I et slikt tilfelle vil man i tillegg til en α -kobling fra HC2, kunne få en stor og en mindre β -kobling fra H1C3 og H2C3. I tillegg vil man også kunne ha to store β -koblinger til to av aminogruppas protoner under forutsetning av at aminogruppa ikke roterer ved 77 K.



Figur 5.13: Radikalstruktur for et radikal dannet ved dekarboksylering av L-arginin, foreslått dannet i enkrystaller av LAP ved bestråling og observasjon ved 77 K.

Et radikal dannet ved dekarboksylering er også i en viss grad konsistent med maksimalretningene til β -tensorene l_{03+} og l_{07-} og potensielle C_{α} - H_{β} -retninger slik de kan beregnes fra data i appendiks A. Maksimalretningen til l_{07-} avviker $18,4^{\circ}$ fra retningen C2-H2C3. l_{03+} sin maksimalretning avviker $14,8^{\circ}$ fra retningen C2-H1N1 (se tabell 5.2).

5.2.8 DFT-beregninger på LII

Det viste seg at også for dekarboksyleringsradikalet var det vanskelig å kunne gjennomføre DFT-beregninger som ga resultater i noenlunde samsvar med de eksperimentelle tensorene for LII. Med tanke på at optimaliseringen gjøres for et isolert molekyl (gassfase), ble den presumptivt mest sannsynlige beregningen utført ved å låse atomkoordinatene til H2C3, C3, C4 samt resten av atomene i sidekjeden før optimalisering. Av de hyperfinkoblingstensorene som ble beregnet med disse begrensningene i optimaliseringen, er de viktigste listet i tabell 5.3.

Tabell 5.3: DFT-beregnete hyperfinkoblingstensorer for et radikal dannet ved dekarboksylering av C2, foreslått dannet i enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved 77 K.

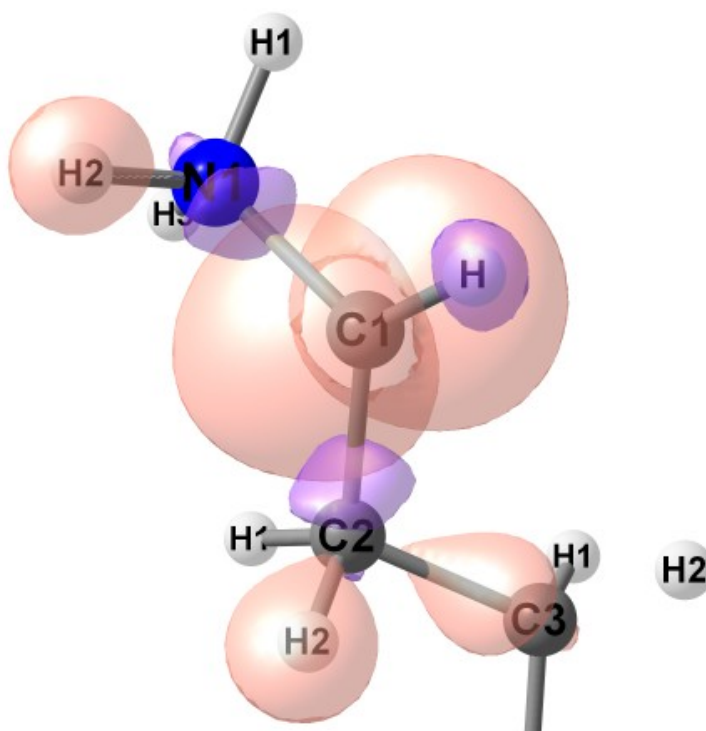
Kobling (type)	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Egenverdier (MHz)	Egenvektorer			Eksp. kobling ^a
				<a>		<c*>	
HC2 (DFT)	-61,36	-39,30	-100,66	-0,610	0,760	0,222	
		-1,45	-62,81	0,736	0,441	0,513	
		40,76	-20,60	-0,292	-0,477	0,829	
H1N1 (DFT)	24,91	11,67	36,58	-0,543	0,802	0,250	
		-5,46	19,45	0,817	0,573	-0,064	
		-6,21	18,70	0,194	-0,169	0,966	
H2N1 (DFT)	105,03	10,22	115,25	0,761	-0,561	0,326	
		-4,02	101,01	0,528	0,828	0,191	
		-6,20	98,83	-0,377	0,027	0,926	
H3N1 (DFT)	23,87	11,08	34,95	-0,192	0,847	-0,495	
		-5,04	18,04	0,302	0,531	0,792	
		-6,04	17,83	0,934	0,002	-0,358	
H1C3 (DFT)	9,56	8,97	18,53	-0,422	-0,021	0,906	
		-4,25	5,31	0,903	0,075	0,423	
		-4,72	4,84	-0,077	0,997	-0,016	
H2C3 (DFT)	132,54	10,37	142,91	-0,117	0,783	0,611	107-
		-3,49	129,05	0,691	0,506	-0,517	
		-6,88	125,66	0,714	-0,362	0,600	

^a Den eksperimentelle tensoren i tabell 5.2 som den DFT-beregnete tensoren er assosiert med.

Selv om hyperfinkoblingstensorene i tabell 5.3 er hentet fra det som ble vurdert å være den mest sannsynlige DFT-beregningen for LII, er samsvaret mellom de eksperimentelle og beregnede tensorene dårlig. Særlig gjelder dette egenvektorene. Det finnes imidlertid noen lyspunkter. Som det fremgår av tabell 5.3 er det til et dekarboksyleringsradikal knyttet mange koblinger, akkurat som det observeres for LII. Til C3 sine to hydrogenatomer gav DFT-beregningen en veldig stor kobling til H2C3 og en liten kobling til H1C3. Den største av de eksperimentelle koblingene ble også identifisert til sannsynligvis å skyldes H2C3 (se tabell 5.2). For aminogruppas tre hydrogenatomer ble det beregnet to mindre koblinger med isotropverdier på rundt 24 MHz samt en stor kobling med en isotropverdi på 105 MHz.

Eksperimentelt ble det til aminogruppas hydrogenatomer antatt å finnes to store koblinger på rundt 80 MHz samt en liten ikke-observert kobling.

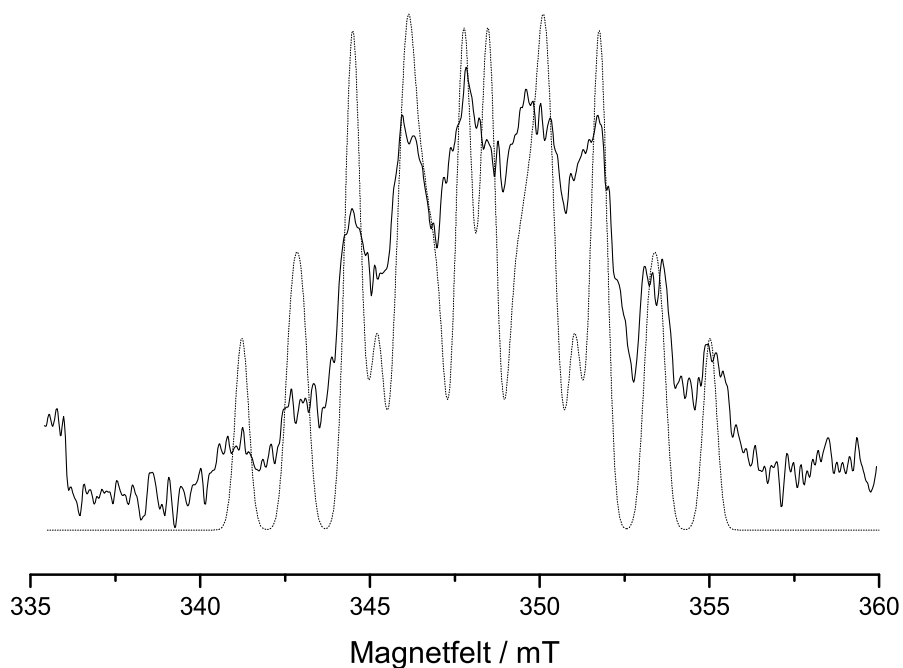
Fra DFT-beregningen kan man få oversikt over spinnfordelingen til radikalet. For DFT-beregningen som er beskrevet for LII er en figur av spinnfordelingen vist i figur 5.14. Denne figuren viser at mesteparten av spinnnet er lokalisert i et $2p^z$ -orbital på det sp^2 -hybridiserte C1-atomet. Den beregnede strukturen medfører også at en stor del av spinnnet er lokalisert til H2C2 og H2N2, noe som forklarer de store isotropverdier som ble beregnet for disse koblingene.



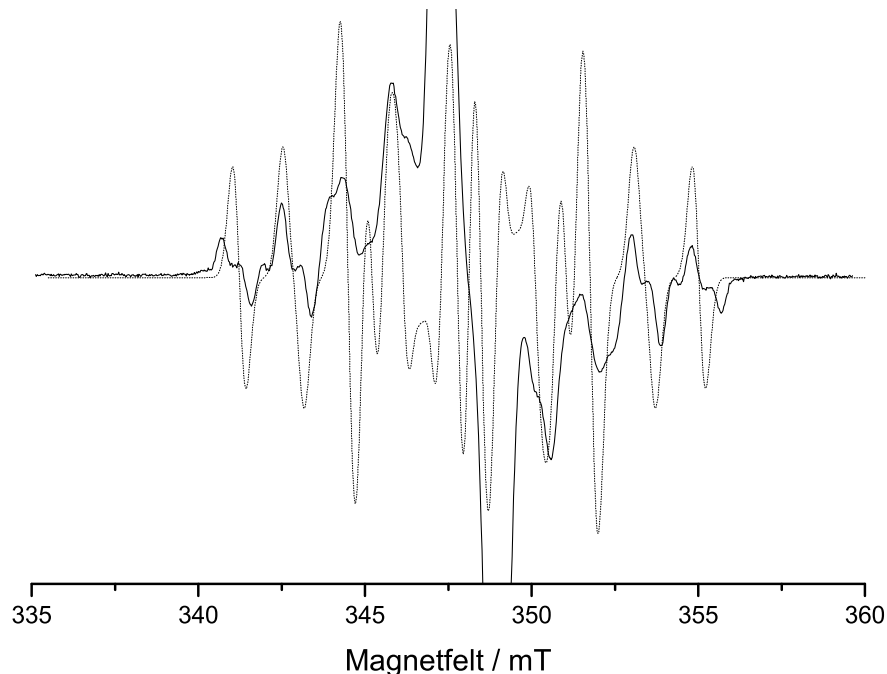
Figur 5.14: Spinnfordelingen for et radikal dannet ved en dekarboksylering av L-arginin i enkrystaller av LAP. De røde lobene representerer positiv spinnfordeling, mens de lilla lobene representerer negativ spinnfordeling. Fordelingen er hentet fra DFT-beregningen for LII (se teksten).

5.2.9 Simuleringer av LII

Simuleringene av radikal LIIa er gjort ut fra de to tensorene I_{03+} og I_{07-} , samt ved å legge til de spesifikke hyperfinsplittningene beregnet ut fra de posisjonene ENDOR-linjene b1+, b16+ og b27+ har ved den aktuelle krystallorienteringen. Linjeposisjonene til de ubestemte koblingene ved ulike orienteringer i rot****-planet, kan anslås fra figur 5.9. I figur 5.15 og 5.16 er de eksperimentelle spektrene sammenlignet med de simulerte spektrene for LII.



Figur 5.15: Eksperimentelt EIE-spekter for LIIa (heltrukken linje) sammenlignet med simulert EPR-absorpsjonsspekter (prikket linje) for koblingene som er assosiert med radikal LIIa. Orienteringen er som vist med stiplet linje i figur 5.6. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,7561 GHz



Figur 5.16 Eksperimentelt 1.derivert EPR-spekter (heltrukken linje) for enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved 77K, sammenlignet med simulert 1.deriverte EPR-spekter (prikket linje) for koblingene som er assosiert med radikal LIIa. Orienteringen er som vist med stiplet linje i figur 5.6. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,7561 GHz.

Figur 5.15 viser et etter forholdene godt samsvar mellom det eksperimentelle EIE-spekteret og det simulerte EPR-absorpsjonsspekteret for LIIa. Dette styrker antagelsen om at koblingene som er benyttet for å simulere LIIa-spekteret faktisk er assosiert med det radikale LIIa representerer. Figur 5.16 viser en sammenligning mellom det eksperimentelle 1. deriverte EPR-spekteret og et tilsvarende simulert spekter hvor de samme koblingene som i figur 5.15 er benyttet. Også her er det godt samsvar mellom linjeposisjonene til de ytre resonanslinjene i det simulerte og eksperimentelle spekteret. LII ble antatt å kunne eksistere i to ulike geometriske konformasjoner. Disse to konformasjonene vil kunne ha koblinger med litt forskjellig hyperfinsplittings. Dette kan forklare den ekstra oppsplittingen av resonanslinjene på flankene til det eksperimentelle EPR-spekteret i figur 5.16. Siden denne analysen bare har tatt for seg konformasjonsvarianten LIIa, er ikke denne ekstra oppsplittingen mulig å simulere. Denne ekstra oppsplittingen kan også være en liten nitrogenkobling eller representere andre mindre koblinger som det ikke er tatt hensyn til i de foreliggende simuleringene. I diskusjonen (se kap. 6.1.5) vil dette diskuteres nærmere.

5.2.10 Radikal LIII

Til radikal LIII var det kun mulig å knytte en hyperfinkoblingstensor, nemlig I_{12+} . Den Schonlandvarianten som har egenverdier på best gjenkjennelig form, er vist i tabell 5.4.

Tabell 5.4: Hyperfinkoblingstensor for koblingen I_{12+} assosiert til radikal LIII og beregnet på grunnlag av ENDOR-spektroskopi av enkrytaller av LAP bestrålt og observert ved 77 K. Tallet i parentes angir usikkerheten til siste siffer. I tillegg er noen referansevektorer listet, samt vinkelforskjell mellom referansevektorene og tilknyttede egenvektorer.

Kobling (type)	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Egenverdier (MHz)	Egenvektorer			$\Delta\phi^a$ (grader)
				<a>		<c*>	
I_{12+} (α)		-30,11 (11)	-81,43 (10)	-0,180 (1)	0,769 (1)	0,613 (2)	35,5 ₁ 50,4 ₂
	-51,32 (5)	1,55 (8)	-49,77 (6)	0,780 (1)	0,491 (1)	-0,387 (2)	
		28,55 (9)	-22,77 (7)	-0,599 (1)	0,409 (2)	-0,689 (1)	
Molekylære referansevektorer ^b :							
1 Retningsvektor C5 – H2C5				0,998	0,048	0,049	
2 Retningsvektor C5 – H1C5				0,230	0,584	-0,779	

^a Vinkelavviket mellom egenvektoren og den molekylære referansevektor hvis nummer er gitt som indeks.

^b Referansevektorer fra appendiks A.

EIE-spekteret til LIII har en halvverdibredde på 4,6 mT ved den krystallorienteringen som er vist med stiplet linje i figur 5.6. Hyperfinsplittingen til I_{12+} er på rundt 2,2 mT ved den samme orienteringen. Dermed mangler det koblinger på til sammen 2,4 mT for å kunne forklare den observerte bredden i EIE-spekteret. Ved den gitte krystallorienteringen ble det funnet en høyfrekvent linje i ENDOR-spekteret ved 33,6 MHz. Denne linja, som er markert med b_{17+} i figur 5.9, ble bestemt til å tilhøre LIII ved EIE-spekteranalyse. ENDOR-linja b_{17+} kunne følges ved rotasjon om både $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$, men ikke ved rotasjon om $\langle a \rangle$. Ei høyfrekvent ENDOR-linje på 33,6 MHz representerer en hyperfinsplitting på rundt 1,3 mT. De resterende koblingene på rundt 1,1 mT antas å kunne forklares med flere mindre koblinger som ikke er direkte observert i ENDOR-spektrene da de overlapper med andre mindre koblinger rundt friproton-frekvensen. Slike små koblinger vil kun gi bidrag for linjebredden til EPR-spekteret

Egenverdiene til tensoren I_{12+} assosieres til en typisk karbonsentrert α -kobling. McConnellrelasjonen (ligning 3.2) med $Q = -72,8$ MHz [49] gir en spinntetthet til C_{α} på 0,71 ved bruk av isotropverdien til I_{12+} . Gordys relasjon (ligning 3.3) gir, ved å bruke den maksimale anisotrope egenverdien til I_{12+} , en spinntetthet til C_{α} på 0,74. Likheten i spinntetthetene beregnet ved disse to metodene tyder på en sp^2 -hybridisering av det sentrale karbonatom til LIII.

Den andre koblingen som ble bestemt å tilhøre LIII, b_{17+} , har liten anisotrop variasjon i rot $\langle b \rangle$ -planet og gjenkjennes trolig som en β -kobling. b_{17+} ser fra figur 5.9 ut til å ligge på rundt 36 MHz. Dersom denne verdien benyttes kan det anslås at b_{17+} har en isotrop hyperfinsplitting på rundt 42 MHz. I rotasjonsplanet om b-aksen har b_{17+} sin maksimale splitting med magnetfeltet rettet tilnærmet langs c-aksen.

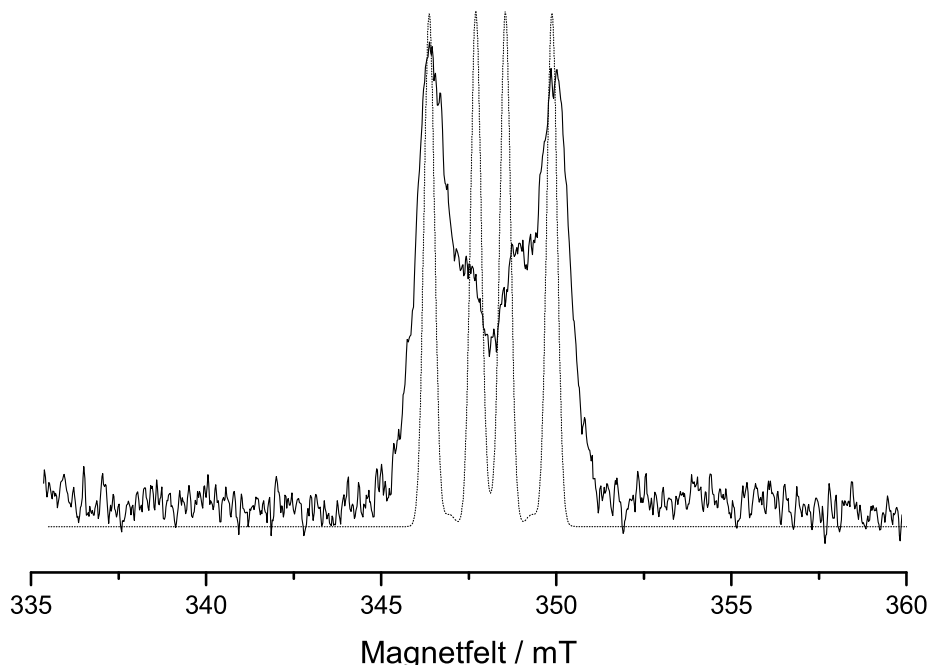
Tensoren I_{12+} har egenverdier som nesten er identiske med egenverdiene til romtemperaturtensoren r_{12+} . r_{12+} ble bestemt til å tilhøre radikal RIV. Det er imidlertid noe forskjell mellom egenvektorene til de to tensorene. Forskjellen utgjør $9,2^\circ$, $26,8^\circ$ og $25,2^\circ$ for henholdsvis maksimal-, intermediær- og minimalretningene til I_{12+} og r_{12+} . På grunnlag av disse observasjonene blir den videre arbeidshypotesen at LIII er det samme radikalet som romtemperaturradikalet RIV, et radikal dannet ved en netto hydrogenabstraksjon av H_{2C5} i sidekjeden til L-arginin. Strukturen til RIV er vist i figur 4.10.

5.2.11 DFT-beregninger på LIII

Siden det ble antatt at LIII representerte det samme radikalet som romtemperaturredikalet RIV, ble DFT-beregningen i kapittel 4.4.7 med de beregnede hyperfinkoblingstensorene i tabell 4.6 også benyttet for radikal LIII. Den eneste tensoren som ble beregnet for LIII var α -tensoren I_{12+} . Samsvaret mellom I_{12+} og den DFT-beregnete α -tensoren til H1C5 i tabell 4.6 er dårlig. Isotropverdien til I_{12+} ligger i tallverdi rundt 10 MHz lavere enn isotropverdien til den beregnede α -tensoren. I tillegg er I_{12+} mindre anisotrop enn den DFT-beregnete koblingen til H1C5.

5.2.12 Simuleringer av LIII

Simuleringen av EPR-spekteret til radikal LIII ble gjort ut fra tensoren I_{12+} samt ved å legge til en hyperfinsplitting beregnet ut fra den linjeoposisjonen b_{17+} har ved den aktuelle orienteringen. Linjeoposisjonen til b_{17+} ved ulike orienteringer kan anslås fra figur 5.9. I figur 5.17 er det eksperimentelle EIE-spekteret til LIII sammenlignet med det simulerte EPR-absorpsjonsspekteret.



Figur 5.17: Sammenligning mellom eksperimentelt observert EIE-spekter (heltrukken linje) for LIII og simulert EPR-absorpsjonsspekter (prikket linje) for LIII ved den krystallorienteringen som er markert med stiplet linje i figur 5.6. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,7561 GHz.

Figur 5.17 viser et godt samsvar mellom det eksperimentelle EIE-spekteret til LIII og det simulerte EPR-absorpsjonsspekteret, bortsett fra intensitetene til de to midterste absorpsjonslinjene i det simulerte spekteret. Disse linjene er betydelig svakere i det eksperimentelle EIE-spekteret. Det er imidlertid kun resonanslinjenes posisjoner som er direkte sammenlignbare mellom et EIE-spekter og et EPR-absorpsjonsspekter. Resonanslinjenes intensiteter er ikke sammenlignbare. Faktisk kan ofte resonanslinjer i midten av EIE-spektre ha en såpass liten intensitet at det vil kunne se ut som om linjene er borte. Trolig er dette tilfelle for EIE-spekteret i figur 5.17. Simuleringen styrker dermed antagelsen om at koblingene I_{12+} og b_{17+} er de viktigste koblingene for radikal LIII.

5.2.13 Radikal LIV

Til radikal LIV er det knyttet to observerte koblinger gjennom deres like EIE-spektrene. I tabell 5.5 vises hyperfinkoblingstensorene for disse to koblingene. I begge tilfeller er den Schonlandvarianten valgt som gir egenverdier av samme generelle form som kjente koblingstyper.

Tabell 5.5: Hyperfinkoblingstensorer for koblinger assosiert til radikal LIV funnet ved ENDOR-spektroskopi av enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved 77 K. Tallet i parentes angir usikkerheten til siste siffer.

Variant	Kobling (type)	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Egenverdier (MHz)	Egenvektorer		
					<a>		<c*>
LIVa	I_{02+} (β)	71,81 (1)	6,84 (2)	78,65 (2)	0,671 (1)	0,726 (4)	0,150 (1)
			-2,45 (2)	69,36 (2)	0,138 (1)	-0,321 (3)	0,937 (2)
			-4,39 (2)	67,42 (2)	0,729 (2)	-0,608 (2)	-0,315 (5)
LIVb	I_{08+} (β)	77,66 (1)	6,66 (2)	84,32 (2)	0,554 (1)	0,809 (5)	0,199 (2)
			-2,15 (2)	75,51 (2)	0,340 (1)	-0,002 (4)	-0,940 (1)
			-4,52 (2)	73,14 (2)	0,760 (3)	-0,588 (2)	0,276 (6)

Hyperfinkoblingene som knyttes til tensorene I_{02+} og I_{08+} har veldig like orienteringsvariasjoner, hvilket også fremgår tydelig av figur 5.6. Det kan synes lite sannsynlig at et radikal kan ha to så like koblinger til to forskjellige protoner. Det er derfor mye mulig at I_{02+} og I_{08+} skyldes vekselvirkninger mellom den uparede spinntettheten og det samme protonet, men i to ulike geometriske konformasjoner. At I_{02+} er en meget intens

ENDOR-linje, mens I_{08+} er en svakere linje kan støtte en slik hypotese. Tensoren I_{02+} antas å tilhøre den dominerende radikalkonformasjonen LIV_a , og vektlegges derfor i den videre analysen.

Ved den krystallorienteringen som er vist med stiplet linje i figur 5.6, har EIE-spekteret til LIV en halvverdibredde på rundt 6,8 mT. Hyperfinsplittingen til I_{02+} utgjør 2,5 mT ved den samme orienteringen. For å kunne forklare bredden til EIE-spekteret må det følgelig finnes flere koblinger til LIV som ikke er observert i dette arbeidet.

Tensoren I_{02+} har egenverdier på form av en β -tensor. Det har blitt gjort forsøk på å sammenligne maksimalretningen til I_{02+} med krystallstrukturen i appendiks A. Det er imidlertid ingen åpenbare sentralatom – H_β -retninger som peker seg ut for en slik sammenligning. Det viser seg derfor at bare en β -type tensor gir for lite informasjon til at det kan etableres en troverdig modell for de to radikalkonformasjonene til LIV .

5.2.14 Radikal LV

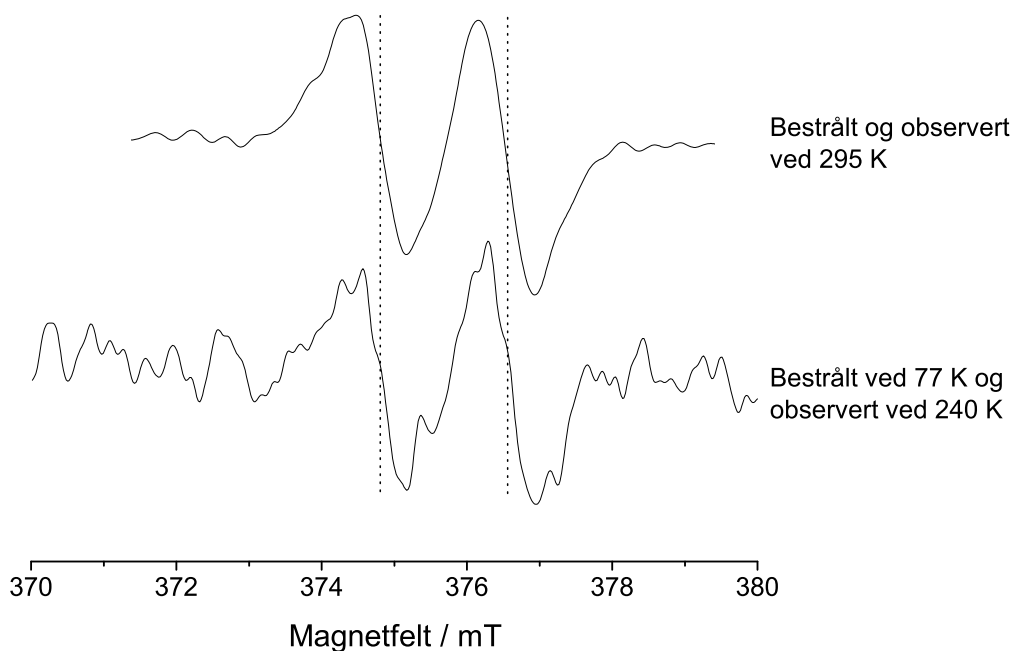
Under analysen av EIE-spektrene i figur 5.5 kunne ikke ENDOR-linja b_{14+} knyttes til noen av radikalene $LI - LIV$, slik at b_{14+} antas å tilhøre et eget radikal (LV). Fra figur 5.9 ser man at linja b_{14+} er sentrert om fri-protonfrekvensen og har en anisotrop oppførsel som minner om en β -kobling. Det var ikke mulig å følge b_{14+} ved rotasjon om alle tre plan. Derfor var det heller ikke mulig å beregne noen hyperfinkoblingstensor for den koblingen som resonanslinja b_{14+} representerer. På grunn av den begrensede informasjonen har det ikke vært mulig å etablere noe hypotese for radikalstrukturen til LV.

5.3 Oppvarmingseksperimenter

Oppvarmingseksperimentene foregikk på den måten at enkrystaller av LAP ble bestrålt ved 77 K, for deretter trinnvis og kontrollert å bli varmet opp til romtemperatur. EPR-spektre ble tatt opp for hvert trinn i denne oppvarmingsprosessen.

5.3.1 Fosfatradikaler

Det ble ikke observert resonanslinjer som kunne knyttes til fosfatradikaler i lavtemperaturbestrålte enkrystaller av LAP. Derfor ble det besluttet å doble bestrålingstiden til 5 timer. Dette tilsvarer en dose på rundt 70 kGy. Heller ikke da ble fosfatradikaler observert. Krystallen ble så varmet opp til 240 K. Da fremkom det linjer i EPR-spekteret som kunne knyttes til de fosfatradikalene som ble observert i romtemperaturstudiet. På grunn av at kvartettstrukturene, beskrevet i kapittel 5.1, delvis overlappet med eventuelle resonanslinjer tilhørende fosfatradikaler på lavfeltsiden av spekteret, var det kun resonanslinjene på høyfeltsiden av sentralresonansen som ble benyttet for denne analysen.



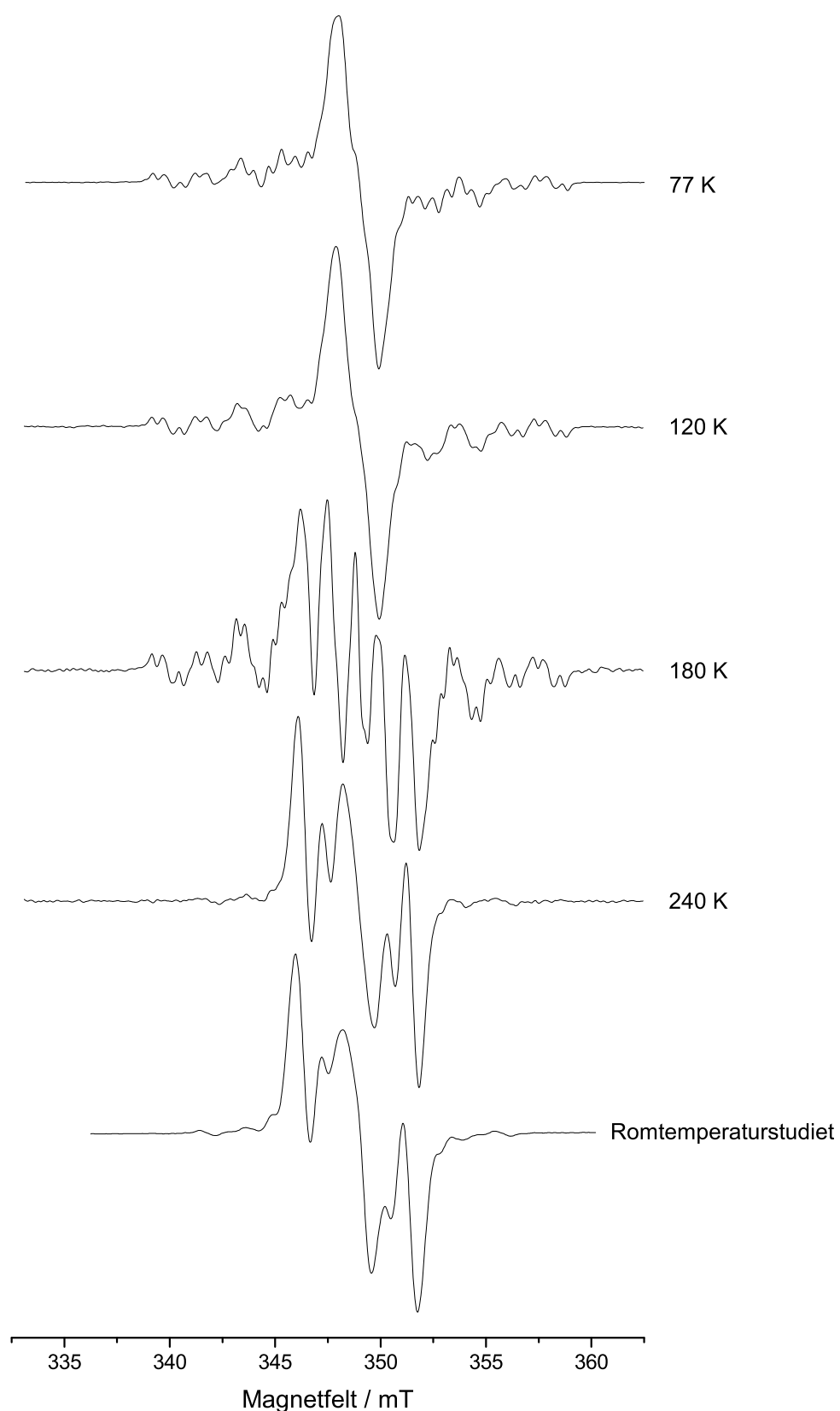
Figur 5.18: 1. deriverte EPR høyfeltlinjer for fosfatradikalene RI og RII dannet i bestrålte enkrystaller av LAP. Målingen er gjort med magnetfeltet B rettet parallelt med c -aksen. Det øverste spekteret viser fosfatradikalresonansene observert ved romtemperaturbestråling og det nederste spekteret viser de resonansene som fremkom ved oppvarming av lavtemperaturbestrålt krystall. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,7502 GHz. Linjeintensitetene i spektrene er ikke sammenlignbare.

Figur 5.18 viser to 1. deriverte EPR-spektre. Det øverste spekteret viser (høyfelt-) resonanslinjene til fosfatradikalene RI og RII dannet i enkrystaller av LAP bestrålt og observert ved romtemperatur. Disse sammenfaller klart med tilsvarende resonanslinjer

observert ved oppvarming av lavtemperaturbestrålt krystall til 240 K. Likheten i de to spektrene indikerer at de skyldes de samme radikalerne.

5.3.2 Sentralresonansene

Det ble også gjort oppvarmingsforsøk med fokus på sentralresonansene i EPR-spekteret. Figur 5.19 viser EPR-spektrene som fremkom ved oppvarming av en lavtemperaturbestrålt LAP-krystall. Magnetfeltet er i alle spektrene rettet parallelt med a^* -aksen. Det øverste EPR-spekteret fremkom umiddelbart etter bestråling av krystallen ved 77 K. Det neste spekteret ble tatt opp etter at krystallen var varmet opp til 120 K. Det har da skjedd en liten endring mellom flankeresonansene og den sterke sentrallinja i spekteret. Ved en videre oppvarming av krystallen til 180 K ser man av figuren at den sterke sentrallinja er borte og sentraldelen av spekteret synes nå å bestå av fem ganske skarpe resonanslinjer. Flankeresonansene synes å være uforandret. Den sterke sentrallinja ble tidligere knyttet til radikal LI. Når krystallen så varmes videre opp til 240 K forsvinner også flankeresonansene. Formen til de sentrale resonanslinjene i EPR-spekteret har også da endret seg. Flankeresonansene ble koblet til radikal LII. Ved å sammenligne EPR-spekteret som fremkom ved oppvarming fra lavtemperaturbestråling til 240 K med EPR-spekteret fra romtemperaturstudiet ser man at disse er tilnærmet identiske.



Figur 5.19: De fire øverste 1.deriverte EPR-spektrene tilhører enkrystaller av LAP bestrålt ved 77 K og observert ved henholdsvis 77K, 120 K, 180 K og 240 K. Det nederste 1.deriverte EPR-spekteret tilhører romtemperaturbestrålte LAP-krystaller. Alle spektrene er tatt opp med krystallorienteringen $B \parallel \langle a^* \rangle$. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrequens på 9,5318 GHz.

Tabell 6.1: Avstander for hydrogenbindinger mellom molekyler i enkrystaller av LAP. Usikkerheten for avstandene (D)...(A) er $\pm 0,014$ Å og for avstandene H-(D)...(A) er usikkerheten $\pm 0,2$ Å. Posisjonene til molekylene har følgende notasjon: I er posisjonen x, y, z og II representerer posisjonen 1-x, -1/2+y, 1-z. [10]

Donor (D)	Akseptor (A)	Til molekyl	Avstand (Å) (D)...(A)	Avstand (Å) H-(D)...(A)
O4	O1	II	2,554	*
O3	O6	II	2,586	2,1
N1	O1	I	2,827	1,9
N1	O2	II	2,773	1,8
N1	O2	I	2,787	1,8
N2	O6	I	3,058	2,3
N2	OW	II	3,058	2,4
N3	O2	I	2,954	*
N3	O6	I	2,900	2,1
N4	O3	II	2,866	2,2
N4	OW	I	2,874	1,8
OW	O5	II	2,753	2,3
OW	O5	I	2,779	2,0

* Avstanden er ikke bestemt.

6.1 Diskusjon av radikalstrukturer

Det ble totalt funnet fem romtemperaturradikaler i dette studiet, to fosfatradikaler og tre radikaler assosiert til L-arginin. Av disse er det foreslått modeller for fosfatradikalene og to av L-arginin-radikalene. Ved lavtemperaturstudiet ble det totalt funnet fem radikaler. For tre av disse er det foreslått modeller. Det er de foreslåtte radikalmodellene som er grunnlaget for denne diskusjonen.

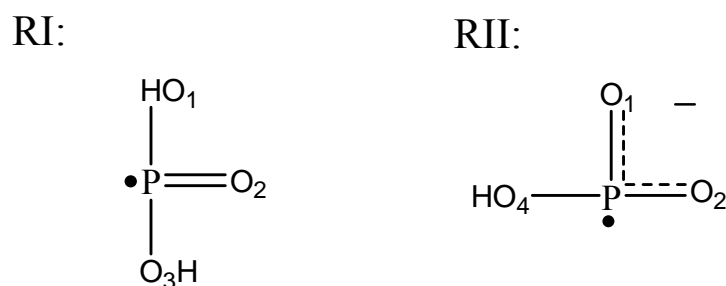
6.1.1 RI og RII – PO_3^{2-} -varianter (H_2PO_3 og HPO_3^-)

Det ble i kapittel 4.3.3 antatt at RI og RII var radikalet PO_3^{2-} eller varianter av dette. Videre ble det sannsynliggjort at RI var dannet ved brudd i bindingen P – O4 og at RII var dannet ved brudd i bindingen P – O3. Det ble også påpekt at både O3 og O4 i utgangspunktet er protonerte atomer. Fra tabell 6.1 ser man at O4 kun inngår i en hydrogenbinding. En enslig hydrogenbinding kan man anta vil bety mindre for stabiliteten til fosfatgruppa. Et brudd i bindingen P – O4 vil derfor ikke nødvendigvis føre til noen større reorganisering av fosfatgruppas struktur. Eksperimentelt ble det for RI funnet at LEO bare avviker 6,2° med

bindingsretningen P – O4. For RII skjedde det derimot en større reorganisering. Avviket mellom LEO og bindingsretningen P – O3 ble bestemt til $36,5^\circ$. O3 deltar i hydrogenbindinger med både O6 i karboksylgruppa ($-\text{COO}^-$) og N4 i guanidylgruppa ($-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)_2$). Dermed er O3 kanskje en viktigere stabiliseringsfaktor for fosfatgruppas struktur. Et brudd i bindingen P – O3 vil derfor også kunne tenkes å medføre en større reorganisering av fosfatgruppa.

Radikaler som ligner PO_3^{2-} , men hvor ett eller flere av oksygenatomene protonerte, kan ha en hyperfinkoblingstensor til fosfor som ligner den til PO_3^{2-} . Fra arbeider av Sanderud og Sagstuen [53] og Nelson og Symons [54] kan det se ut som om egenverdien A_{maks} øker med en økende grad av protonering for PO_3^{2-} . Dette er bekreftet av DFT-beregninger som er foretatt på fosfatradikaler i dette arbeidet. For radikalene PO_3^{2-} , HPO_3^- og H_2PO_3 ble det beregnet A_{maks} -verdier på henholdsvis 48,9 mT, 64,5 mT og 79,0 mT. DFT-beregninger på fosfatradikaler kan være problematiske* så det bør ikke festes lit til de nøyaktige verdiene, men trenden verdiene imellom er klar.

På grunnlag av disse betraktningene, foreslås det at RI er radikalet H_2PO_3 og at RII er radikalet HPO_3^- . De antatte radikalstrukturene er vist i figur 6.2. Teoretisk skulle disse radikalene kunne gi opphav til vekselvirkninger med OH-protonene. Slike OH-koblinger er ikke observert i dette arbeidet. Grunnen kan være at de tilhørende hyperfinsplittingene gjerne er små og derfor vanskelige å observere. Særlig gjelder dette under de rådende eksperimentelle forhold, med blant annet høy mikrobølgeeffekt.



Figur 6.2: Strukturene til de antatte fosfatradikalene som RI og RII representerer.

* Det viser seg at den brukte exchange-korrelasjonsfunksjonalen B3LYP antagelig ikke godt nok beskriver spinnpolarisasjonene mellom s-orbitalene til fosfor [55].

I lavtemperaturstudiet ble det etter en bestrålingstid på 5 timer (estimert dose på cirka 70 Gy) ikke observert spor av fosfatradikaler ved 77 K. Derimot når LAP-krystallen ble varmet opp dukket resonanslinjer knyttet til fosfor opp en gang mellom 77 K og 240 K. Disse linjene ble i analysen i kapittel 5.3.1 knyttet til radikalene RI og RII som ble observert i romtemperaturstudiet.

6.1.2 RIII – deaminering

I kapittel 4.4.3 ble det forslått at radikal RIII ble dannet ved et brudd i bindingen C2 – N1, en såkalt deaminering. Det ble også vist ved å sammenligne eksperimentelle data med krystalldata for den uskadde molekylstrukturen (fra appendiks A) at en større geometrisk reorganisering av deamineringsradikalet må til for å kunne forklare de eksperimentelle dataene.

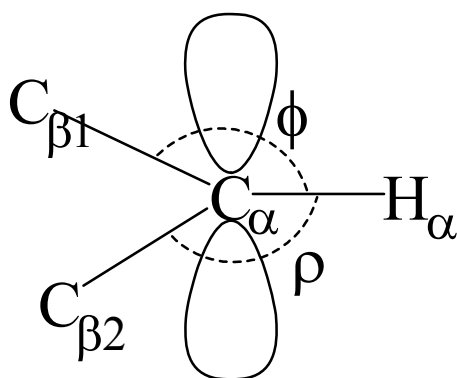
Simuleringen av EPR-absorpsjonsspekteret til RIII i kapittel 4.4.5 viste en meget god overensstemmelse med det observerte EIE-spekteret. Dette betyr at vekselvirkningene til RIII i all hovedsak er identifisert. Simuleringene av de 1.deriverte EPR-spektrene i kapittel 4.4.10 viste også at det er RIII som gir opphavet til de sterkeste linjene i EPR-spektrene til romtemperaturbestrålte enkrystaller av LAP.

DFT-beregningene til radikal RIII reproduserte ikke de eksperimentelle tensorene, selv om det fantes flere likhetstrekk. DFT-beregningene i dette arbeidet gjøres for isolert molekyler. For å simulere krystalliske forhold ble enkelte atomkoordinater låst i beregningen for RIII. Fra figur 6.1 ser man at karboksylgruppas oksygenatomer inngår i hydrogenbindinger med nærliggende molekyler. Dette vil ved en reorganisering begrense frihetsgraden til O5 og O6. Det viste seg at ved å låse oksygenatomene i karboksylgruppa samtidig som deler av sidekjeden ble låst, hindret dette at bindingsstrukturen til C2 kunne rehybridisere til sp^2 . Den eksperimentelle analysen viste en sp^2 -hybridisering rundt RIII's sentralatom. Av denne grunn måtte karboksylgruppa holdes fri i DFT-beregningene. Dette gir imidlertid molekylet en unaturlig stor grad av frihet og denne ekstra frihetsgraden vil dermed kunne medføre en unaturlig organisering av radikalstrukturen.

En reorganisering av L-arginin ved radikaldannelse vil være påvirket av hydrogenbindinger med omkringliggende molekyler. Aminogruppa har tre hydrogenatomer som alle inngår i hydrogenbindinger med omkringliggende molekyler. N1 donerer sine tre hydrogenatomer i

hydrogenbindinger til både O1 og O2 i fosfatgruppa. Aminogruppa er dermed viktig for stabiliseringen av L-arginin-molekylets struktur. Når aminogruppa abstraheres mister molekylet et viktig anker og en større reorganisering synes sannsynlig.

Guanidylgruppa ($-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)_2$) inngår i hele seks hydrogenbindinger med nærliggende molekyler. Dette gjør guanidylgruppa til en svært viktig stabiliseringsfaktor for L-arginin-molekylet. Det er derfor sannsynlig å anta at også etter en deaminering vil guanidylgruppa være tilnærmet fastlåst. I tillegg er altså karboksylgruppa stabilisert av de to oksygenatomenes tre hydrogenbindinger til omgivelsene. Det kan tenkes at det i sidekjeden vil kunne skje en reorganisering etter radikaldannelse. I den videre analysen antas det imidlertid at sidekjedens struktur er fast og at størstedelen av reorganiseringen skjer ved C2 og HC2.



Figur 6.3: Et sp^2 -hybridisert C_α -atom med et uparet spinn i et $2p^\pi$ -orbital. Vinklene mellom bindingene $H_\alpha-C_\beta$ er markert og navngitt som henholdsvis ϕ og ρ .

Egenvektoren som tilhører en α -tensors A_{maks} vil ha en retning vinkelrett på både retningen til det uparede elektronets orbital og retningen $C_\alpha-H_\alpha$. Det er blitt vist at for RIII er C_α sp^2 -hybridisert. Hvis man antar et sp^2 -hybridisert C_α -atom med vinklene ϕ og ρ , illustrert i figur 6.3, hvor $\phi \sim \rho$, vil egenvektoren til A_{maks} ha retning nær summen av bindingsretningene $C_{\beta1}-C_\alpha$ og $C_\alpha-C_{\beta2}$, eller nær den direkte retningen mellom $C_{\beta1}$ og $C_{\beta2}$. Dersom restruktureringen skjer ved at C2 og HC2 forflyttes mens C1 og C3 ligger fast, vil det medføre at egenvektoren til A_{maks} vil ha en retning parallelt med retningen $C3 - C1$. Ved bruk av bindingsretninger for den uskadde molekylstrukturen (appendiks A), finner man at retningen $C3 - C1$ er $(-0,054\mathbf{i} +$

McConnell-relasjonen (ligning 3.4) gir sammenhengen mellom en β -koblings isotropverdi og dihedralvinkel. Det kan tenkes at med en begrensning i friheten til karboksylgruppa ville rotasjonen i bindingen C2 – C3 kunne bli slik at også orbitalet til H1C3 ville få noe overlapp med LEO. Dermed vil et spinn sentrert til C2 kunne få koblinger med isotrope bidrag som de som er bestemt eksperimentelt til H2C3 og H1C3.

For RIII ble spinntettheten til C_α beregnet til rundt 0,8. Dersom det benyttes verdier for $B_0 = 0$ MHz og $B_2 = 126$ MHz [56] samt de eksperimentelt bestemte isotropverdiene som er knyttet til H2C5 ($a_{iso}^\beta = 40,36$ MHz) og H1C5 ($a_{iso}^\beta = 25,36$ MHz) gir Heller-McConnell-relasjonen (ligning 3.4) dihedralvinkler på henholdsvis 48° og 60° . Fra DFT-beregningene ble isotropverdien til H2C3(DFT) bestemt til 76,51 MHz. Dette representerer en dihedralvinkel på rundt 30° . En reduksjon fra 48° til 30° for H2C5 vil gi en økning til 78° for dihedralvinkelen til H1C5. Isotropverdien til koblingen H1C5 kan da beregnes til 4 MHz, tilnærmet det samme som DFT-beregningen gir. Dermed vil en rotasjon på rundt 18° mellom C2 og C3 i forholdt til figur 4.8 kunne reprodusere de eksperimentelle isotropverdiene for β -koblingene til H1C3 og H2C3.

Mye tyder dermed på at et radikal dannet ved en deaminering av C2 er en god modell for radikal RIII.

6.1.3 RIV – en netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden

Det ble i kapittel 4.4.6 antatt at RIV er et radikal i to konformasjoner. Ved hjelp av blant annet eksperimenter med deutrerete krystaller og ved å studere egenverdiene til α -tensorene ble det antatt som mest sannsynlig at RIV representerer en netto hydrogenabstraksjon for et av karbonatomene i sidekjeden, enten C3, C4 eller C5. Ved å sammenligne de eksperimentelle tensorene med bindingsretninger fra appendiks A, ble det fastslått at et radikal dannet ved en netto hydrogenabstraksjon av H2C5 var det beste alternativet for RIV.

Simuleringene av RIVa og RIVb viste en bra overensstemmelse mellom de eksperimentelle spektrene og spektrene simulert ved å benytte tensorene i tabell 4.5. Dette tyder på at de viktigste koblingene til radikalene er identifisert og sortert til rett konformasjon. Den manglende linjebredden i simuleringene kan tilskrives små koblinger som ikke har blitt identifisert.

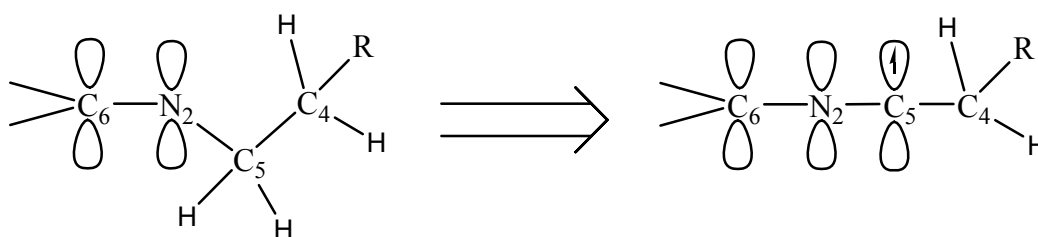
DFT-beregningen i kapittel 4.4.7 viste likhetstrekk med de eksperimentelle tensorene for RIV. Spesielt gjaldt dette for radikalkonformasjon RIVb. De to koblingene som ble knyttet til RIVb stemte ganske bra overens med to av de DFT-beregnete tensorene. Fra DFT ble det beregnet en kobling til HN2 med en isotropverdi på cirka 30 MHz. En slik tensor er ikke funnet for RIVb. EPR-eksperimenter med d-LAP-krystaller viste dessuten at en slik kobling var usannsynlig. I DFT-beregningen ble imidlertid strukturoptimaliseringen gjort med ett fritt HN2-atom. I virkeligheten inngår HN2 i hydrogenbindinger mellom N2 og O6, samt mellom N2 og OW (vann). Det er dermed trolig at disse hydrogenbindingene vil endre orienteringen til HN2 i forhold til den for en fri optimalisering. Det kan tenkes at hydrogenbindingene som HN2 deltar i medfører at HN2 blir liggende nærmere nodalplanet til LEO, og av den grunn vil gi bare en liten isotrop hyperfinkobling.

Den andre radikalkonformasjonen RIVa har en α -tensor med 10 MHz lavere isotropverdi enn α -tensoren som ble beregnet i tabell 4.6. De eksperimentelle koblingene r_{08+} og r_{06+} ble i analysen assosiert henholdsvis med protonene H2C4 og H1C4. Sammenligningen av egenverdiene til de eksperimentelle tensorene r_{08+} og r_{06+} og de DFT-beregnete tensorene knyttet til H2C4 og H1C4, viste enkelte like trekk, men avvikene var allikevel relativt store.

C5 er lokalisert omtrent midt i L-arginin-molekylet, som er stabilisert av hydrogenbindinger fra nærliggende molekyler til både guanidylgruppa, karboksylgruppa og aminogruppa. Imidlertid er C5 del av en flerleddet alifatisk kjede med et potensial for reorganisering etter radikaldannelse. Hvis man allikevel antar at L-arginin-molekylet i all hovedsak vil være fastlåst etter en netto hydrogenabstraksjon på C5, vil en eventuell reorganisering først og fremst omfatte H1C5 og LEO. Således vil retningen N2 – C4 for en uskadet struktur være parallell med α -tensorenes maksimalretninger. Fra appendiks A finner man retningen N2 – C4 til å være $(0,027\mathbf{i} + 0,824\mathbf{j} + 0,566\mathbf{k})$. Sammenlignet med egenvektoren til A_{maks} er avviket bare $4,6^\circ$ for r_{12+} og $8,2^\circ$ for r_{03+} . Et så lite avvik bekrefter hypotesen om at restruktureringen etter hydrogenabstraksjonen for begge konformasjonene skjer uten at C4 og N2 forflyttes vesentlig.

Dersom C5 etter radikaldannelse ved abstraksjon av H2C5 ikke forflyttes vil bindingene N2 – C5 og C5 – C4 for den uskadde molekylstrukturen utspenne nodalplanet. Videre vil retningen for bindingen C5 – H1C5 være tilnærmet parallell med summen av bindingsretningene C4 – C5 og N2 – C5. For en uskadet struktur er den normaliserte

summen $C4-C5 + N2-C5 = (0,916\mathbf{i} + 0,196\mathbf{j} - 0,351\mathbf{k})$. Hvis denne vektorsummen så sammenlignes med α -tensorenes egenvektor for A_{min} finner man et avvik på $77,9^\circ$ for r_{12+} og $102,1^\circ$ for r_{03+} . Dette tyder på at det skjer en større forflytning av $C5$ ved restruktureringen etter radikaldannelse. Størst forflytning er det for konformasjonen RIVb. Det samme ville man funnet dersom man hadde sett på kryssproduktet til bindingsvektorene $C4-C5$ og $C5-N2$, og sammenlignet disse med egenvektoren til A_{int} (som representerer retningen til LEO). En kan tenke seg at restruktureringen av $C5$ skjer som følge av at det vil være energimessig gunstig for LEO å være nær parallelt med $2p_z$ -orbitalene i guanidylgruppa. Siden en slik restrukturering vil kunne skje uten større forflytning av $N2$ og $C4$, må $C5$ vippes opp i planet til guanidylgruppa. Dette er illustrert i figur 6.5.



Figur 6.5: Restrukturering etter radikaldannelse ved en netto hydrogenabstraksjon av $C5$. $C5$ vippes opp i planet til guanidylgruppa. På den måten vil LEO kunne være nær parallell med guanidylgruppas $2p_z$ -orbitaler. H-atomet til $N2$ og gjenværende H-atom til $C5$ etter dehydrogenering er ikke tegnet inn i figuren da disse står rett ut av planet til guanidylgruppa.

I den uskadde strukturen er fragmentet $-NH-C(NH_2)_2$ (guanidylgruppa) tilnærmet plant. Altså har guanidylgruppas atomer en stor del sp^2 -hybridkarakter. Som nevnt kan det spekuleres at LEO på $C5$ vil innrette seg etter guanidylgruppas $2p_z$ -orbitaler. Retningen til $N2$ sitt $2p_z$ -orbital estimert fra data i appendiks A (bindingsretningene $C5 - N2 \times N2 - HN2$) blir $(0,893\mathbf{i} - 0,289\mathbf{j} - 0,345\mathbf{k})$. Sammenlignet med intermediaæretningen til r_{12+} og r_{03+} er avviket henholdsvis på $14,9^\circ$ og $11,9^\circ$ (her brukes tensorvarianten fra tabell 4.5, men med motsatte fortegn på $\langle b \rangle$ -elementene). Slike avvik mellom LEO og $N2s$ $2p_z$ -orbital vil, såfremt $N2$ har sp^2 -hybridkarakter, medføre en dihedralvinkel mellom LEO og $HN2$ på mellom 72° og 108° . Dette vil igjen medføre en svært liten overlapp mellom LEO og $HN2$

sitt 1s-orbital, altså en kobling med liten isotropverdi (>9 MHz^{*}). En så liten kobling vil være overskygget av andre linjer nær friprotonfrekvensen i ENDOR-spekteret. Dette kan være grunnen til hvorfor det ikke eksperimentelt er observert koblinger tilhørende vekselvirkninger med HN2.

Tensoren r_{02+} , som ble knyttet til en kobling til H2C4, har en isotropverdi på 81,61 MHz. Dersom Heller-McConnell-relasjonen (ligning 3.4) benyttes med $B_0 = 0$ MHz og $B_2 = 126$ MHz [56] og med en spinn tetthet på 0,75, tilsvarer r_{02+} sin isotropverdi en dihedralvinkel til LEO på 26°. Fra den DFT-beregnete optimale strukturen (se figur 4.11) er vinkelen H1C4-C4-H2C4 beregnet til rundt 106°. Dermed blir dihedralvinkelen mellom LEO og H1C4 på cirka 80°, noe som tilsvarer en isotropverdi (beregnet fra Heller-McConnell, ligning 3.4) på noe over 3 MHz. En så liten kobling vil det ikke være mulig å skille ut fra ENDOR-spektrene.

For radikalkonformasjonen RIVa hadde koblingene knyttet til H1C4 og H2C4 isotropverdier på henholdsvis 24,54 MHz og 46,02 MHz. Med en $B_0 = 0$ MHz og $B_2 = 126$ MHz [56], og med en spinn tetthet på 0,75 gir Heller-McConnell-relasjonen (ligning 3.4) dihedralvinkler mellom LEO og H1C4 og mellom LEO og H2C4 på 59° og 46°, respektivt. Dersom forskjellen mellom konformasjonene RIVa og RIVb utgjøres av en vridning i bindingen C4-C5 burde summen av de beregnede dihedralvinklene på 59° + 46° = 105° være omtrent den samme som vinkelen mellom bindingene H1C4-C4-H2C4 (som ble beregnet til 106° i avsnittet over), noe som viser seg å stemme bra.

Mye tyder dermed på at et radikal dannet ved en hydrogenabstraksjon av H2C5 er en god modell for RIV.

6.1.4 LI – karboksylanion?

Det ble i kapittel 5.2.4 foreslått at radikal LI kan være et karboksylanion, altså med det uparede elektronet lokalisert til C1. En slik radikalmodell viste en god overensstemmelse mellom tensorenes maksimalretninger og de respektive molekylære retninger for den uskadde molekylstrukturen gitt i appendiks A. Spesielt gjaldt dette for maksimalretningen til

* Beregnet med Heller-McConnell-relasjonen (ligning 3.4) med $B_0 = 0$ MHz og $B_2 = 126$ MHz [56], og med en spinn tetthet på 0,75.

I_{01+} som bare avvek rundt 2° fra retningen C1 – HC2. Imidlertid stemte de anisotrope egenverdiene til I_{01+} dårlig overens med koblinger av typen C_α - C_β - H_β for kjente karboksylanioner.

Det har i dette arbeidet dessverre ikke lyktes å gjøre DFT-beregninger for karboksylanionet. En DFT-beregning for en antatt radikalmodell vil kunne gi viktig informasjon som kan sammenholdes med eksperimentelle data og dermed si noe om holdbarheten til den antatte radikalmodellen. Når en slik beregning ikke foreligger for karboksylanionet i LAP, er det vanskeligere å angi hvilken troverdighet karboksylanionet utgjør som modell for LI.

Det er ikke observert noen koblinger med protoner bundet til oksygenatomene i karboksylgruppa. I den uskadde L-arginin-strukturen er ikke oksygenatomene i karboksylgruppa bundet til hydrogen, men de deltar som akseptorer i hydrogenbindinger med nærliggende atomer. Etter en restrukturering som følge av dannelsen av et anion på C1 kan det ikke utelukkes at O5 eller/og O6 skulle kunne stjele et proton fra de respektive hydrogenbindingsdonorene. At ingen slike koblinger er observert må enten bety at verken O5 eller O6 blir protonerte ved radikaldannelsen, eller at eventuelle hydrogenatomer bundet til O5 og/eller O6 vil bli liggende tilnærmet i LEOs nodalplan, slik at koblingenes isotropverdi blir liten.

Dersom LEOs retning estimeres med kryssproduktet mellom C2 – C1 og C1 – O5 blir dihedravinkelen til HC2 på rundt 58° . Ved bruk av Heller-McConnell-relasjonen (ligning 3.4) med $B_0 = 0$, $B_1 = 126$ MHz [56] og en antatt spinn tetthet på $0,8^*$ gir en dihedravinkel på 58° en isotropverdi på 28,3 MHz. Dette stemmer godt overens med den observerte isotropverdien til I_{01+} på 29,48 MHz. Ut fra den anisotrope tensoren kan man anslå avstanden mellom C_α og H_β fra ligning 3.6. Ved å ta utgangspunkt i at den maksimale anisotrope egenverdien er nær $2a_d$ beregnes avstandene C_α – H_β for koblingene assosiert til LI. De beregnede avstandene er oppgitt i tabell 6.2. I samme tabell er også de samme avstandene i den uskadde molekylstrukturen (appendiks A) oppgitt.

* En spinn tetthet på mellom 0,7 og 0,8 synes vanlig for karboksylanioner [57].

Tabell 6.2: Sammenligning av den beregnede avstanden $C_{\alpha} - H_{\beta}$ for de koblingene som er assosiert med radikal LI og de samme avstandene for et uskadd L-arginin-molekyl fra (appendiks A).

Kobling	Assosiert med v.v. mellom C1-sentrert LEO og	Beregnet avstand (Å)	Avstand fra appendiks A (Å)
$I01+$	HC2	2,0	2,3
$I04+$	H1C3	3,3	2,9
$I05+$	H2C3	2,3	3,4

Fra tabell 6.2 ser man en forholdsvis rimelig overensstemmelse for avstandene $C_{\alpha} - H_{\beta}$ til koblingene $I01+$ og $I04+$. Derimot har koblingen $I05+$ samme avstand som funnet for C1 – HC2 i den uskadede molekylstrukturen. Det ble i analysen vurdert om $I05+$ kunne tilskrives en vekselvirkning med samme proton som for $I01+$, men i to ulike radikalkonformasjoner. Dataene i tabell 6.2 styrker en slik antagelse. Dersom det er tilfelle at LI forekommer i to konformasjoner vil dette ha lite å si for simuleringen av EPR-absorpsjonsspekteret i kapittel 5.2.6 siden koblingen $I05+$ har en isotropverdi på bare 11,91 MHz og derfor kun gir bidrag til linjebredden i EPR-spekteret.

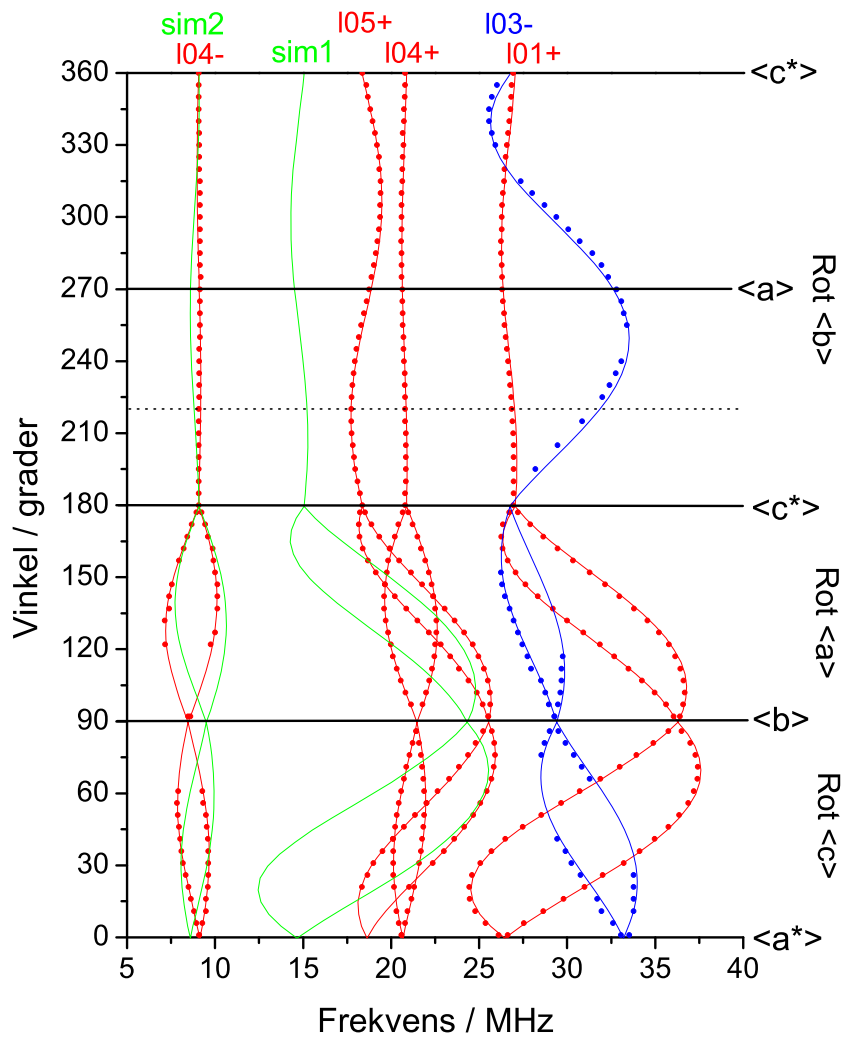
Simuleringen av LI ble utført ved å benytte alle de tre tensorene $I01+$, $I04+$ og $I05+$. Det simulerte EPR-absorpsjonsspekteret viste et godt samsvar med det eksperimentelle EIE-spekteret til ENDOR-linja $I04+$. Samsvaret var derimot noe dårligere for EIE-spekteret til $I01+$. Hovedgrunnen til denne forskjellen ligger i at EIE-spekteret til $I01+$ ser ut til å ha en større dublettsplitting enn i EIE-spekteret til $I04+$. En sammenligning av de to EIE-spektrene er vist i figur 5.10. Det er vurdert om $I04+$ og $I01+$ kanskje kan tilhøre to ulike radikaler, eventuelt to ulike konformasjoner av det samme radikalet. Ved å vurdere bredden til de to ENDOR-linjenes EIE-spektre ble det konkludert med at $I04+$ og $I01+$ sannsynligvis tilhører samme radikal. Det viser seg også at dublettsplittingen til EIE-spekteret for $I04+$ er på om lag det samme som hyperfinsplittingen tensoren $I01+$ har ved den gitte orientering. Derfor er det bemerkelsesverdig at ikke også denne splittingen observeres i EIE-spekteret til nettopp $I01+$. Det har ikke blitt observert ENDOR-linjer med større hyperfinsplitting enn $I01+$ for radikal LI.

Et viktig argument for at LI representerer et karboksylanion er at koblingen $I01+$ har en maksimalretning som stemmer bra overens med retningen C1 – HC2. Imidlertid stemmer de

anisotrope egenverdiene til tensor I_{01+} dårlig overens med tilsvarende koblinger for kjente karboksylanioner. Kjente karboksylanioner av typen C_{α} - C_{β} - H_{β} har anisotrope egenverdier på formen (10, -4, -6) MHz [58]. Det ble av den grunn vurdert hvorvidt koblingene I_{01+} og I_{04+} kunne tilhøre andre radikaler enn et karboksylanion og dermed kanskje også at I_{01+} og I_{04+} kunne representere koblinger til andre kjerner enn protoner.

Ved romtemperaturstudiet ble fosfatradikalene RI og RII observert. Disse ble ikke funnet i lavtemperaturarbeidet. Det kan derfor tenkes at det i lavtemperaturbestrålte enkrystaller av LAP dannes andre fosfat-type radikaler som kan være forløperne til RI og RII. Fosfor har som kjent kjernespin $I = 1/2$. Dublettsplittingen til LI var på 1-2 mT. Det finnes kjente fosfatradikaler med såpass små splittinger. Bershov har observert to fosfatradikaler, PO_2^{2-} og PO_2 , som har hyperfinkoblinger til fosfor på 9 mT og under 1 mT [59]. Radikaler av typen PO_4^{2-} har fosfatkoblinger på typisk 3 mT avhengig av protoneringstilstanden [60].

Nye koblingstensorer basert på de samme målepunktene som I_{04+} og I_{01+} ble beregnet under forutsetning av at disse skyldes vekselvirkninger med fosfor. Derfor ble frikjerneresonansen til fosfor benyttet. Basert på de nyetablerte tensorene, ble de tilsvarende lavfrekvente linjevariasjonene beregnet. Disse to simuleringene er vist som sim1 for datapunktene til I_{01+} og sim2 for datapunktene til I_{04+} i figur 6.6.



Figur 6.6: ENDOR-linjevariasjonen som funksjon av krystallorientering i det ytre magnetfeltet. De røde linjene er basert på tensorene til radikal LI i tabell 5.1. Punktene er ENDOR-linjenes målte verdier. De to grønne linjene, sim1 og sim2, representerer de simulerte lavfrekventgrenene til datapunktene for henholdsvis I01+ og I04+, slik de ville sett ut dersom disse tilhørte koblinger til fosfor. ENDOR er tatt opp med et ytre magnetfelt på rundt 348 mT som gir en frifosforfrekvens på 6,003 MHz.

Som det fremgår av figur 6.6 er det en viss likhet mellom den simulerte lavfrekvenslinja til fosfor, sim2, og de eksperimentelt målte verdiene til I04-. Forskjellene er imidlertid av en slik karakter at det kan utelukkes at I04+ og I04- representerer koblinger til fosfor. Spesielt gjelder dette i området rundt b-aksen. Det har heller ikke blitt observert ENDOR-linjer som stemmer overens med den fosforsimulerte lavfrekventlinja til I01+, slik at også I01+ utelukkes som et resultat av en vekselvirkning med fosfor.

Tilbake blir karboksylanionmodellen stående. Problemet med denne modellen var at de anisotrope egenverdiene til I_{01+} ikke passet til en standard C_{α} - C_{β} - H_{β} -kobling. Derimot stemmer de anisotrope egenverdiene til I_{01+} godt overens med koblinger av typen C_{α} - O_{β} - H_{β} . Slike OH-koblinger har for karboksylanioner typiske anisotrope egenverdier på (17, -7, -10) [58]. Eksperimenter med deutrerete krystaller viste at I_{01+} ikke skyldes protoner som er utskiftbare. Selv om det ble antatt at OH- og NH-protonene var betydelig utskiftet med deuterium i de deutrerete LAP-krystallene, må imidlertid denne antagelsen tas med et visst forbehold da protonutskiftningen i d-LAP-krystallene ikke kunne fastslås med sikkerhet (se kap. 3.2.3).

Tensoren I_{05+} har anisotrope egenverdier på formen (10, -4, -6) MHz, slik som for kjente koblinger C_{α} - C_{β} - H_{β} tilhørende karboksylanioner [58], men maksimalretningen til I_{05+} avviker med $22,3^{\circ}$ mot retningen C1-HC2 (appendiks A). Avviket er imidlertid ikke større en at det er mulig at I_{05+} representerer en vekselvirkning med HC2 i karboksylanionet.

Det har ikke vært mulig på bakgrunn av resultatene dette arbeidet å trekke noen ytterligere konklusjoner med hensyn på hvilket radikal LI skulle kunne representere. Denne diskusjonen kan således summeres opp i følgende punkter:

- LI representerer ikke et fosfatradikal.
- LI kan være et karboksylanion i to konformasjoner hvor I_{01+} og I_{05+} tilhører vekselvirkning med det samme proton, men hvor konformasjonen til I_{01+} har en uvanlig struktur som gir opphav til uvanlige anisotrope egenverdier.
- LI er et karboksylanion og I_{01+} representerer en kobling av typen C_{α} - O_{β} - H_{β} , hvor H_{β} ikke har blitt skiftet ut i de deutrerete krystallene som er benyttet i studiet av d-LAP-krystaller.
- LI er kanskje ikke et karboksylanion, men et annet radikal.

6.1.5 LII – dekarboksylering

Analysen av LII i kapittel 5.2.7 slo fast at LII var et radikal i to konformasjoner. Siden det viste seg at den ene radikalkonformasjonen, LIIa, så ut til å gi opphav til sterkere ENDOR-linjer enn den andre konformasjonen, ble analysen utført hovedsakelig på grunnlag av LIIa.

Det ble argumentert for at LII måtte være en dekarboksylering av C2 blant annet på grunnlag av at hele tre store β -koblinger var assosiert til LIIa.

Simuleringen i kapittel 5.2.9 knyttet flankeresonansen i EPR-spekteret til LII. Samsvaret var bra mellom det eksperimentelle EIE-spekteret til LIIa og det simulerte EPR-absorpsjonsspekteret av koblingene assosiert til LIIa. Det ble også gjengitt en simulering av det 1.deriverte EPR-spekteret til LIIa sammenlignet med det eksperimentelle 1.deriverte EPR-spekteret til bestrålte enkrystaller av LAP. Også denne sammenligningen viste et godt samsvar for linjeposisjoner til flakeresonansene. Denne sammenligningen styrket også mistanken om at LII er et radikal i to konformasjoner. Alternativt ble det pekt på muligheten av at splittingen av flankeresonansene kunne være et resultat av en liten nitrogenkobling. En vekselvirkning med nitrogen vil normalt gi opphav til en triplettstruktur i EPR-spekteret, men dersom koblingen er liten vil ikke tripletten oppløses. Dermed kan man få en struktur som minner om formen flankeresonansene har i det eksperimentelle EPR-spekteret i figur 5.16. Denne observasjonen utelukker ikke et radikal dannet ved en dekarboksylering av C2. Tvert imot så åpner denne modellen opp for en liten nitrogenkobling til atomet N1.

Av de fem koblingene som ble knyttet til LIIa i simuleringen, kunne det bare beregnes hyperfinkoblingstensorer for to, nemlig I_{03+} og I_{07-} . Begge tensorene tilhørte β -koblinger. Tensoren I_{07-} ble knyttet til protonet H2C3, mens I_{03+} ble assosiert til et av protonene bundet til N1. Observasjoner fra eksperimenter med deutrerete krystaller (kap. 5.2.3) indikerte at I_{07-} skyldes et ikke-utskiftbart proton. DFT-beregningen knyttet også koblingen med størst isotropverdi til vekselvirkningen med H2C3. Eksperimenter med deutrerete krystaller ga opphav til EPR-spektre som sammenlignet med EPR-spektrene til ikke-deutrerete krystaller viste de samme linjeposisjonene for flankeresonansen (figur 5.7). I deutrerete krystaller skulle man forvente at alle aminoprotonene skulle vært skiftet ut med deuteriumkjerner. Det er i analysen antatt at to større β -koblinger skyldes vekselvirkninger med to av aminoprotonene. Dersom aminoprotonene var skiftet ut med deuteriumkjerner vil man forvente at dette skulle gi et smalere EPR-spekter. Imidlertid viser figur 5.7 at flankeresonansen har en betydelig mindre intensitet i spekteret for deutrerete krystaller enn flankeresonansen har i spekteret for ikke-deutrerete krystaller. Dette kan tyde på at utskiftningen av aminoprotonene ikke er fullstendig, men betydelig i den deutrerete krystallen. Diskusjonene av deutrereringen i LAP-krystallene i kapittel 3.2.2 og 3.2.3 konkluderte med at det var sannsynlig at en betydelig del av protonene var blitt skiftet ut i de

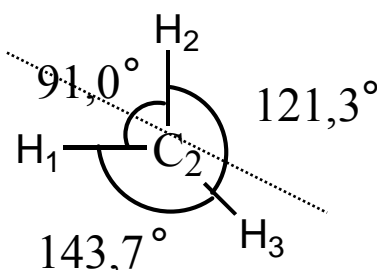
deutrerete krystallene. Imidlertid kunne ikke NMR-analysene som ble utført, gi absolutte svar på verken graden av deutreringsen i krystallene eller spesifikt hvilke NH- og OH-protoner som lot seg skiftet ut. Det kan derfor ikke på grunnlag av eksperimentene med deutrerete krystaller konkluderes med at en dekarboksylering er en usannsynlig modell for radikal LII.

DFT-beregningene for dekarboksyleringsradikalet gav en stor kobling på 105 MHz samt to mindre koblinger på rundt 24 MHz til protonene i aminogruppa, mens det eksperimentelt ble antatt at to koblinger på rundt 90 MHz hver skyldes protonene til N1. DFT-beregningen er imidlertid gjort for et isolert molekyl. Aminogruppa derimot er bundet opp til nærliggende molekyler gjennom hydrogenbindinger. Dermed vil en fri optimalisering av aminogruppa være urealistisk.

Koblingen b_{27+} som er knyttet til radikal LIIa, ble på grunnlag av en stor anisotropi antatt å være en α -kobling. At det ikke kunne beregnes hyperfinkoblingstensorer for denne α -koblingen vanskeliggjør lokaliseringen av det enslige elektronet, særlig siden man da ikke har informasjon om retningen til LEO. Aminogruppa og guanidylgruppa er hydrogenbundet til nærliggende molekyler. Dermed er frihetsgraden til aminogruppa og guanidylgruppa begrenset med hensyn på mulige reorienteringer etter radikaldannelse ved dekarboksylering av C2. En kan derfor gå ut ifra at en reorientering først og fremst omfatter C2 og HC2. Hvis man antar at en slik reorganisering ikke vil medføre en forflytning av aminogruppa, sidekjeden eller C2, så må LEO ha retning nær vinkelrett på planet utspent av N1-C2-C3. Beregnet fra krystalldata gitt i appendiks A, blir da LEOs retning $(-0,162\mathbf{i} + 0,739\mathbf{j} - 0,654\mathbf{k})$. Dihedralvinkelen mellom beregnet LEO og hydrogenatomene til C3 blir da $8,7^\circ$ for H1C3 og $110,7^\circ$ for H2C3, dersom krystalldata fra appendiks A benyttes. Heller-McConnell-relasjonen (ligning 3.4) sier at en β -koblings isotropverdi avhenger av cosinus til dihedralvinkelen, kvadrert. En dihedralvinkel for H1C3 på $8,7^\circ$ gir dermed en tilhørende stor isotropverdi, mens dihedralvinkelen til H2C3 på $110,7^\circ$ vil gi en liten isotropverdi. Fra eksperiment ble imidlertid den største koblingen knyttet til H2C3. Dermed kan ikke LEO ha en retning vinkelrett på planet utspent av N1-C2-C3 og det kan antas at også C2 forflyttes under restruktureringen.

Den DFT-beregnete strukturen i figur 5.14 viser at H2N1 har ett stort overlapp med LEO og får følgelig en stor isotropverdi (rundt 105 MHz). Heller-McConnell-relasjonen (ligning 3.4)

med $B_0 = -4,3$ MHz og $B_2 = 117,6$ MHz [61] og hvor spinntettheten til C2 antas å være $0,9^*$, gir en dihedralvinkel til H2N1 som må være på tilnærmet 0° . Dersom aminogruppas protoner var upåvirket av omgivelsene ville vinkelforskjellen mellom N1 – H-bindingsretningene være lik. Sett fra retningen C2 – N1 ville vinkelforskjellene være på 120° . Dersom det ene protonet i aminogruppa hadde en dihedralvinkel på nær 0° , ville de to andre protonene ha dihedralvinkler på rundt 60° . Heller-McConnell-relasjonen med $B_0 = -4,3$ MHz og $B_2 = 117,6$ MHz [61] og hvor spinntettheten til C2 er antatt å være $0,9^*$, gir for en dihedralvinkel på 60° en isotropverdi på 22,6 MHz. Fra DFT-beregningen ble det til H1N1 og H3N1 bestemt nettopp en isotropverdi på rundt 25 MHz. Fra krystallstrukturen i appendiks A viser det seg imidlertid at vinkelforskjellen mellom N1 – H-bindingene ikke er den samme. Sett fra retningen C2 – N1 er forskjellen som vist i figur 6.7.



Figur 6.7: Vinkelforskjellen mellom bindingsretningene N1-H1N1, N1-H2N1 og N1-H3N1 sett fra retningen C2-N1.

Dersom LEO antas å være parallell med den stiplede linjen i figur 6.7, vil dihedralvinkelen til H1N1 og H3N1 hver være på rundt 18° . En dihedralvinkel på 18° gir ved ligning 3.4 og parametere som tidligere, en isotropverdi på cirka 92 MHz. Dette er svært nært det som ble funnet eksperimentelt, hvor det ble antatt at to koblinger med isotropverdi på rundt 90 MHz tilhørte vekselvirkninger med protoner i aminogruppa. Etter radikaldannelse kan selvsagt restrukturering føre til at vinkelen H1N1-N1-H3N1 vil kunne endres noe og dermed er det rom for også mindre endringer av isotropverdien til koblingene med H1N1 og H3N1.

I de betraktninger som er gjennomgått angående vekselvirkninger mellom aminogruppas protoner og det uparede spinnnet, er det antatt at aminogruppa står i ro. Ved romtemperatur er

* En spinntetthet på rundt 0,9 synes vanlig for radikaler dannet ved dekarboksylering [57].

det vanlig for aminosyrer i krystallstruktur at aminogruppa roterer. Dette gjelder blant annet for aminosyra glysin [62]. Dersom temperaturen senkes, bremses denne rotasjonen for til slutt å stoppe helt opp. Ved hvilken temperatur aminogruppa sluttet å rotere, er individuelt fra system til system. Ved 77 K, som er bruk i lavtemperaturarbeidet i dette studiet, er det gjerne vanlig at aminogruppa ikke roterer. Dermed kan antagelsen om at aminogruppa til L-arginin i krystaller av LAP ikke roterer ved 77 K, være gyldig.

Det kanskje beste argumentet for at LII representerer en dekarboksylering er at det vanskelig kan tenkes et annet alternativ som skulle kunne ha så mange koblinger, og hele tre store β -koblinger på 90 MHz og mer, enn nettopp et radikal dannet ved en dekarboksylering av C2. Diskusjonen av LII oppsummeres dermed med at den antatte radikalmodell for LII synes styrket.

6.1.6 LIII – en netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden

I kapittel 5.2.10 ble det foreslått at radikal LIII var det samme som romtemperaturredikaleet RIV. Den ene hyperfinkoblingstensen som kunne etableres for LIII, I_{12+} , ble sammenlignet med RIVs α -tensor r_{12+} . Det ble funnet en god overensstemmelse mellom egenverdiene til begge α -tensorene, men for egenvektorene var det avvik på opp mot 27° .

Simuleringen av LIII ble utført på grunnlag av tensoren I_{12+} samt koblingen b_{17+} . For b_{17+} kunne ikke tilhørende tensor beregnes, men hyperfinsplittingen kunne anslås ut fra linjeposisjonen i ENDOR-rotasjonsplanet om b-aksen (se figur 5.9). Det simulerte EPR-absorpsjonsspekteret viste et godt samsvar med det eksperimentelle EIE-spekteret til LIII, bortsett fra at de to resonanslinjene i midten av det simulerte spekteret nesten var borte i det observerte EIE-spekteret. Det ble imidlertid pekt på at resonanslinjenes intensiteter nødvendigvis ikke er sammenlignbare mellom EIE- og EPR-spektre.

Siden LIII ble antatt å være det samme radikalet som RIV, ble DFT-beregningen med tensorer som gjengitt i tabell 4.6, også benyttet til sammenligning med de eksperimentelle resultatene for LIII. Denne sammenligningen viste et dårlig samsvar mellom DFT-beregningen og eksperimentelle data. Et slikt dårlig samsvar mellom eksperimentelle og DFT-beregnete hyperfinkoblingstensorer må bety at enten er den antatte radikalmodellen feil, eller så er det en dårlig approksimasjon å gjøre DFT-beregninger på et isolert molekyl.

Bakgrunnen for at LIII ble antatt å være det samme radikalet som romtemperaturredikalalet RIV var at tensorene I_{12+} og r_{12+} (som tilhører konformasjonen RIVa) har svært mye til felles. Egenverdiene til I_{12+} og r_{12+} er nesten helt like. Dette medfører selvsagt at også de beregnede spinn tetthetene for LIII og RIVa er nær like. Derimot for egenvektorene er det forskjeller mellom de to tensorene. Spesielt gjaldt dette tensorenes intermediærretning og minimalretning som avvok med rundt 26° . En α -tensors intermediærretning representerer som kjent LEOs retning, mens α -tensorens minimalretning representerer retningen $C_\alpha - H_\alpha$. I diskusjonen av strukturen til RIV ble det pekt på at guanidylgruppa ($-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)_2$) er nær plan. Dermed skulle guanidylgruppas atomer ha en stor del sp^2 -hybridkarakter og det er tenkelig at også et LEO på C5 vil innstille seg etter guanidylgruppas $2p_z$ -orbitaler. Retningen til $N2s$ $2p_z$ -orbital ble beregnet til $(0,893\mathbf{i} - 0,289\mathbf{j} - 0,345\mathbf{k})$ fra krystalldata i appendiks A (bindingsretningene $C5-N2 \times N2-HN2$). Dersom retningen beregnet for $2p_z$ -orbitalet til N2 sammenlignes med intermediærretningen til I_{12+} er avviket på $13,5^\circ$ (bruker tensorvariant fra tabell 5.5, men med motsatt fortegn på $\langle b \rangle$ -elementene) noe som er et godt samsvar.

I diskusjonen til RIV ble det pekt på at dersom C5 ikke forflyttet seg under restrukturering etter radikaldannelsen ville $H1C5$ ha en retning nær summen av bindingsretningene $C4 - C5$ og $N2 - C5$. Beregnet med data fra appendiks A blir denne summen lik $(0,916\mathbf{i} + 0,196\mathbf{j} - 0,351\mathbf{k})$. Sammenlignet med egenverdien for A_{min} finner man et avvik på $103,1^\circ$ for I_{12+} . Dette tyder på at det skjer en større forflytning av C5 ved restruktureringen etter abstraksjon av $H2C5$. For RIV ble det også funnet et tilsvarende stort avvik. Avviket ble forklart med at C5 måtte vippes opp i guanidylgruppas plan, for at LEO og $2p_z$ -orbitalene til guanidylgruppas atomer skulle kunne bli nær parallelle.

Til radikal RIVa ble det i tillegg til en α -kobling funnet to β -koblinger med isotropverdier på rundt 25 MHz (r_{06+}) og 46 MHz (r_{08+}). Til LIII er det knyttet en β -kobling, b_{17+} , som ut fra rotasjonsplanet om b -aksen (se figur 5.9) ble antatt å ha en isotropverdi på cirka 37 MHz. Maksimalverdien til b_{17+} er nær c -aksen, mens minimalverdien er nær a -aksen i rotasjonsplanet om $\langle b \rangle$. Koblingen r_{08+} har også maksimal- og minimalverdier henholdsvis nær $\langle c \rangle$ og $\langle a \rangle$ i rotasjonsplanet om b -aksen (se figur 4.6). Likhetene i orienteringsvariasjonen i rot $\langle b \rangle$ -planet for b_{17+} og r_{08+} , sammen med at disse koblingene har ganske like isotropverdier, styrker en antagelse om at b_{17+} og r_{08+} er vekselvirkninger mellom samme LEO og proton, den ene ved 77 K og den andre ved 295 K. Den begrensede

eksperimentelle informasjonen tilhørende b17+, gjør imidlertid at disse betraktningene i hovedsak må betraktes som spekulasjoner.

Det er ikke identifisert flere koblinger til LIII. På den annen side må det eksistere flere koblinger dersom LIII og RIVa skal representere samme radikal. Den andre koblingen til RIVa, r06+, har en isotropverdi på rundt 25 MHz. Splittings av denne størrelsesord vil normalt være oppløst i et EPR-spekter, men gjerne ikke i et EIE-spekter hvor koblingen bare bidrar til linjebredden. I ENDOR-spekteret ved 77 K vil en kobling på 25 MHz ha sin høyfrekvente linje liggende på rundt 20 MHz. I ENDOR-spekteret vist i figur 5.9 finnes det flere linjer rundt den aktuelle frekvensen, men ingen av dem er blitt knyttet til LIII. Dette kan imidlertid ha sin årsak at ENDOR-linjene til LIII er svake og dermed lett blir overskygget av de mer intense linjene som finnes på rundt 20 MHz i ENDOR-spektrene.

Et molekyls struktur vil kunne påvirkes av temperaturen. Dermed er det mulig at avvikene mellom RIVa og LIII kan forklares med temperaturpåvirkede endringer av radikalstrukturene. Derfor, med den begrensede eksperimentelle informasjonen som er etablert for LIII, er det vanskelig å finne alternativer for radikalstruktur utover de betraktningene som er gjennomført.

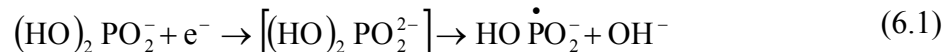
6.2 Forslag til dannelsesmekanismer

I dette delkapittelet vil det foreslås mekanismer for dannelse av de radikalene som er behandlet i kapittel 6.1. Forslagene baserer seg på de observasjonene som er gjort i dette studiet ved romtemperatur, lavtemperatur og ved oppvarming av krystaller bestrålt ved 77 K sammenholdt med hva som er kjent fra litteraturen for tilsvarende forbindelser [48].

Oppvarmingseksperimentene som er utført i dette studiet er begrenset og baserer seg kun på EPR-spektre. Av den grunn må de dannelsesmekanismene som foreslås i dette delkapittelet kun anses som nettopp forslag.

6.2.1 Fosfatradikalene – RI og RII

På bakgrunn av sammenligning av krystalldata (appendiks A) og hyperfinkoblingenes egenvektorer, ble det i kapittel 4.3.3 foreslått at RI representerer et radikal dannes ved brudd i bindingen P – O4 og at RII representerer et radikal dannet ved brudd i bindingen P – O3. Disse bruddene kan tenkes komme som en følge av dissociativ elektroninnfangning (DEC). Det tenkes at dette kan skje på følgende måte:



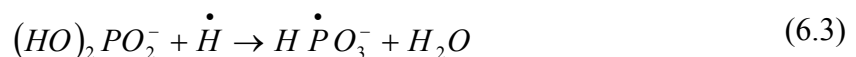
Det framkommer av ligning 6.1 at RII kan dannes direkte ved innfangning av sekundærelektroner ved bestråling. For at RI skal kunne dannes må RII reagere videre med et proton som vist i ligning 6.2:



DEC er en måte å danne fosfatradikaler som er beskrevet tidligere [54].

Lavtemperatursperimentene avslørte imidlertid at det ikke dannes fosfatradikaler ved 77 K, men at disse først oppsto ved oppvarming en gang mellom 77 K og 240 K. Denne observasjonen utelukker DEC som dannelsesmekanisme for RI og RII. Det antas derfor at fosfatradikalene dannes som følge av sekundærreaksjoner mellom L-arginin-molekylet og fosfatgruppa.

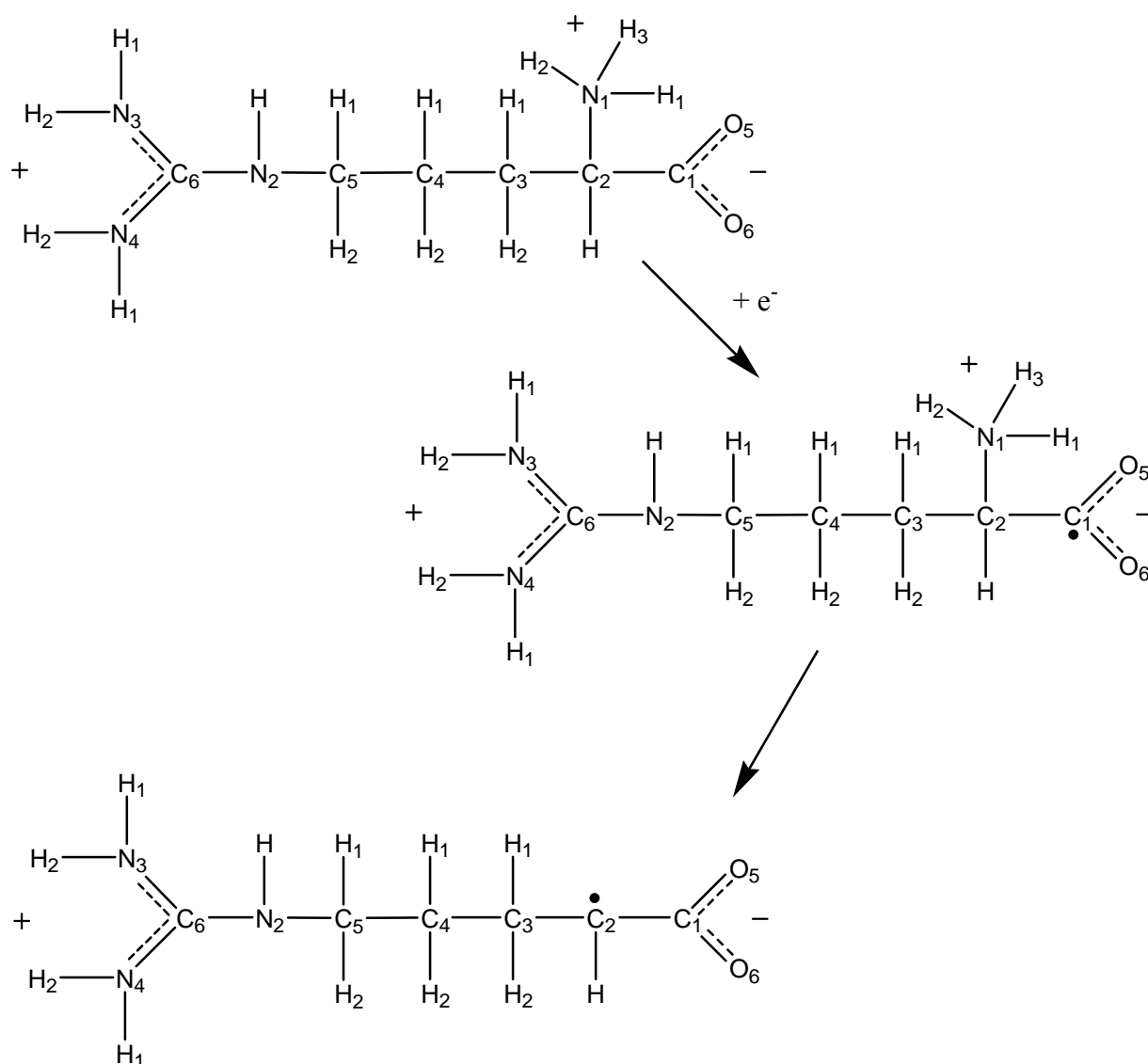
Hydrogenering er en måte man kan tenke seg at fosfatradikalene kan ha blitt dannet. Et hydrogenatom dannet for eksempel ved en hydrogenabstraksjon fra L-arginin, vekselvirker med fosfatgruppa med det resultat at et H₂O-molekyl abstraheres. Resultatet blir et HPO₃⁻-radikal. Prosessen beskrives i ligning 6.3.



Slik kan radikal RII ha blitt dannet. Ved å la RII protoneres som i ligning 6.2 kan radikal RI dannes.

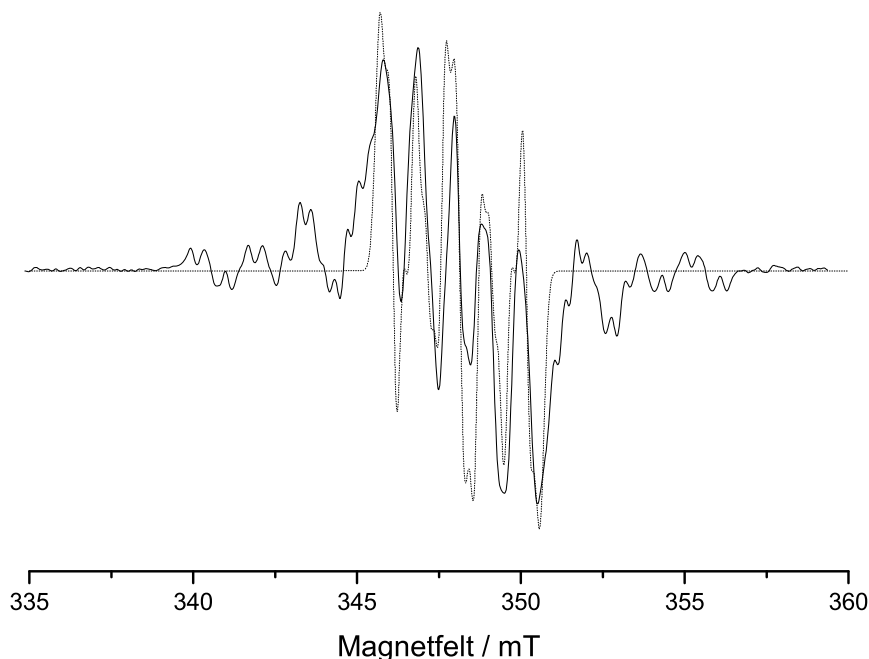
6.2.2 Et karboksylanion som deaminerer – LI og RIII

I kapittel 6.1.2 ble det funnet sannsynlig at RIII representerer et radikal dannet ved en deaminering av C2 i L-arginin. Det ble i kapittel 6.1.4 diskutert om radikal LI kunne være et karboksylanion. Dette kunne imidlertid ikke med sikkerhet påvises. Det er kjent at karboksylanioner dannet ved 77 K gjerne fører til en deaminering når systemet varmes opp [48]. Dersom LI antas å representere et karboksylanion er det sannsynlig at LI er forløperen til deamineringsradikalet RIII. Reaksjonsforløpet til en slik prosess er beskrevet i figur 6.8.



Figur 6.8: Foreslått reaksjonsforløp for dannelsen av de radikalene LI og RIII antas å representere. L-arginin fanger inn et elektron og det dannes et karboksylanion (LI) som siden fører til en deaminering og dannelsen av radikal RIII.

Oppvarmingseksperimenter (se kap 5.3.2) viste at den sterke resonansen som er knyttet til radikal LI, var forsvunnet i EPR-spekteret tatt opp ved 180 K. I stedet kunne det observeres fem resonanslinjer i EPR-spekteret. Disse fem resonanslinjene kan knyttes til radikalet som RIII representerer. Figur 6.9 viser en sammenligning av EPR-spekteret som fremkom ved oppvarming til 180 K og et simulert EPR-spekter basert på koblingen som er knyttet til RIII i tabell 4.3. Det synes dermed sannsynlig at radikal LI gir opphav til radikal RIII ved oppvarming en gang mellom 120 K og 180 K.



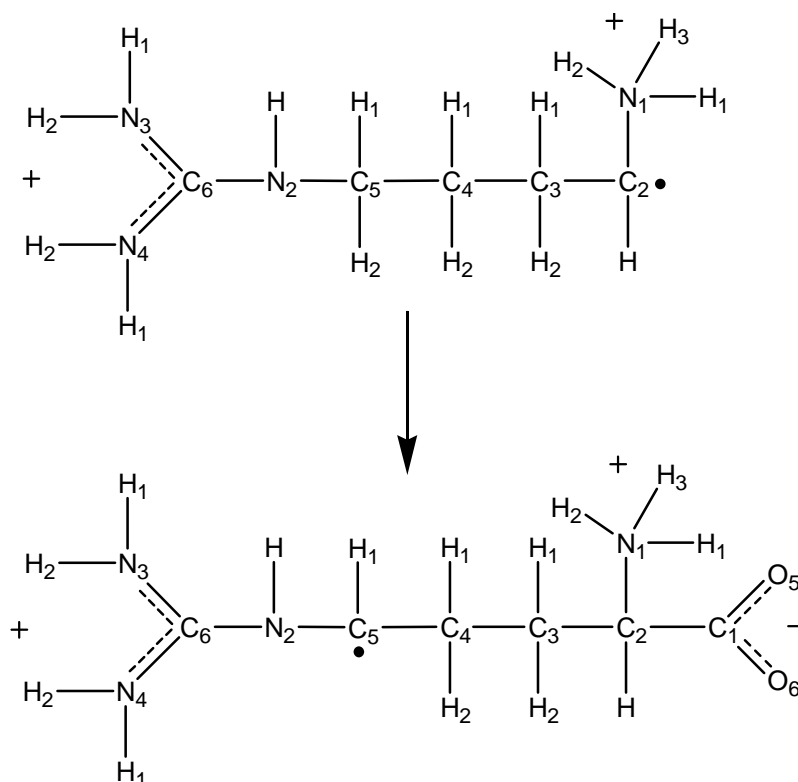
Figur 6.9: 1.derivert EPR-spekter for enkrystaller av LAP bestrålt ved 77 K og observert ved 180 K (heltrukken linje) sammenlignet med simulert 1.derivert EPR-spekter for koblingene knyttet til radikal RIII i tabell 4.3 (prikket linje). Krystallorienteringen er $B \parallel \langle a^* \rangle$ og magnetfeltet tilsvarer en mikrobølgefrequens på 9,7565 GHz.

Det er tidligere vist karboksylanioner som deaminerer ved 150-160 K [33]. Dette stemmer bra med de observasjonene som er gjort for LI og RIII i dette studiet, såfremt det viser seg at LI faktisk representerer et karboksylanion.

6.2.3 Dekarboksylering som gir hydrogenabstraksjon – LII og RIVb

Det ble i kapittel 6.1.5 og 6.1.3 argumentert for at LII representerte et radikal dannet ved dekarboksylering av C2 og at RIVb representerte en av to ulike konformasjoner av et radikal

dannet ved en netto hydrogenabstraksjon av C5. Det er kjent at radikaler dannet ved en dekarboksylering er ustabile ved romtemperatur [48], noe også dette studiet viser. Flankeresonansene i EPR-spektrene for krystaller bestrålt og observert ved 77 K ble antatt å skyldes radikal LII. I figur 5.19 ser man at flankeresonansen er forsvunnet i EPR-spekteret som er tatt opp ved 240 K. I det samme spekteret har også den sentrale resonansdelen endret seg og EPR-spekteret har fått en form nær identisk til EPR-spekteret som ble observert fra romtemperaturbestrålte krystaller. Det er kjent at dekarboksyleringsradikaler gjerne gir opphav til radikaler som dannes ved en netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden [48]. Det foreslås derfor at radikal LII gir opphavet til radikal RIVb. Et slikt reaksjonsforløp er beskrevet i figur 6.10.

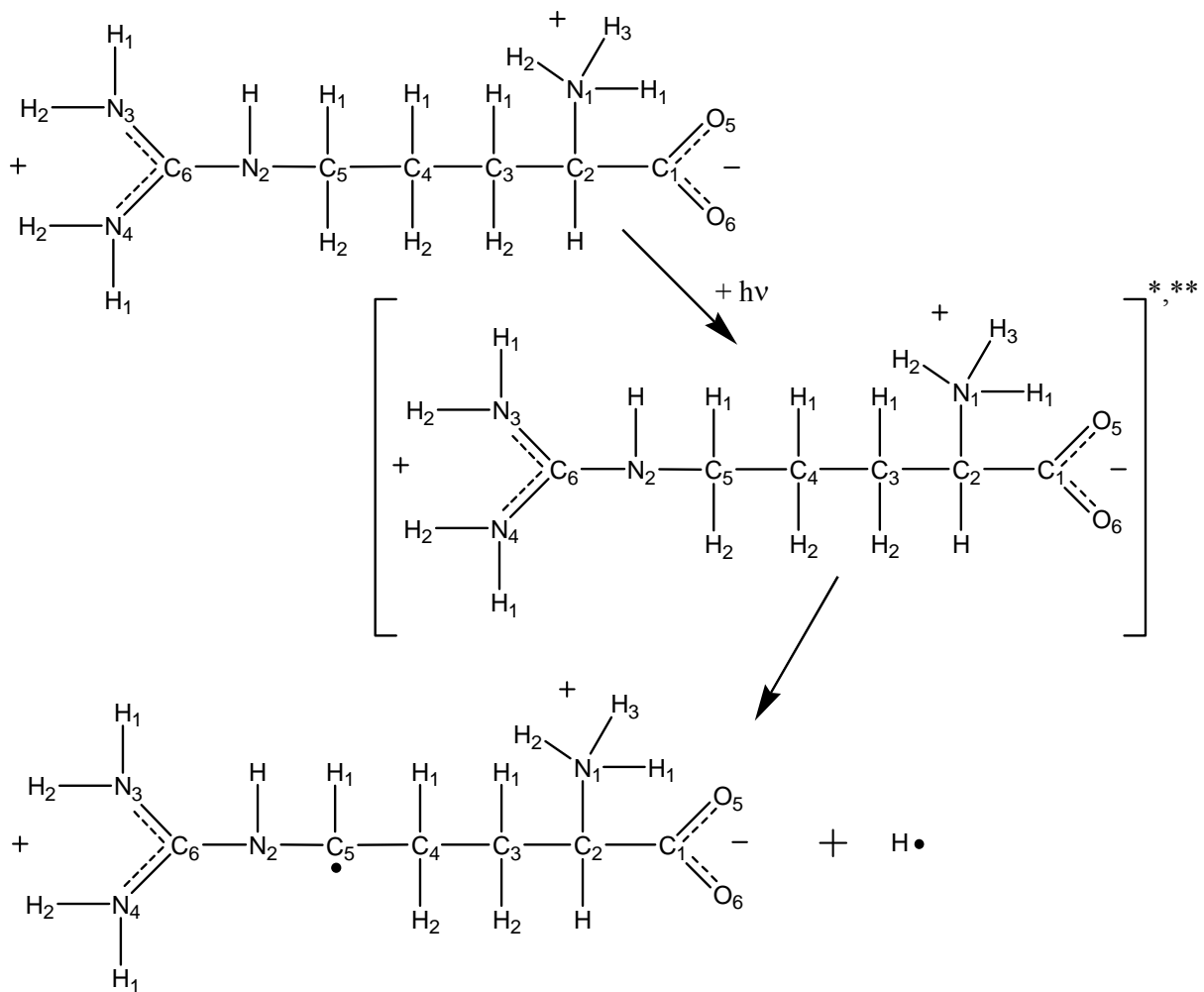


Figur 6.10: Foreslått reaksjonsforløp for dannelse av radikal RIVb.

Hvorledes dekarboksyleringsradikalet LII kan ha blitt dannet gir dette studiet ingen forutsetninger for å kunne besvare. RV ble i kapittel 4.4.9 også mistenkt for å representere et radikal dannet ved en netto hydrogenabstraksjon i sidekjeden. Manglende informasjon om dette romtemperaturproduktet førte dessverre til at en slik hypotese ikke kunne stadfestes. Dersom RV skulle representere et slikt radikal i L-arginins sidekjede, vil RV være et alternativt sluttprodukt for dekarboksyleringsradikalet LII.

6.2.4 Dehydrogenering i sidekjeden – LIII og RIVa

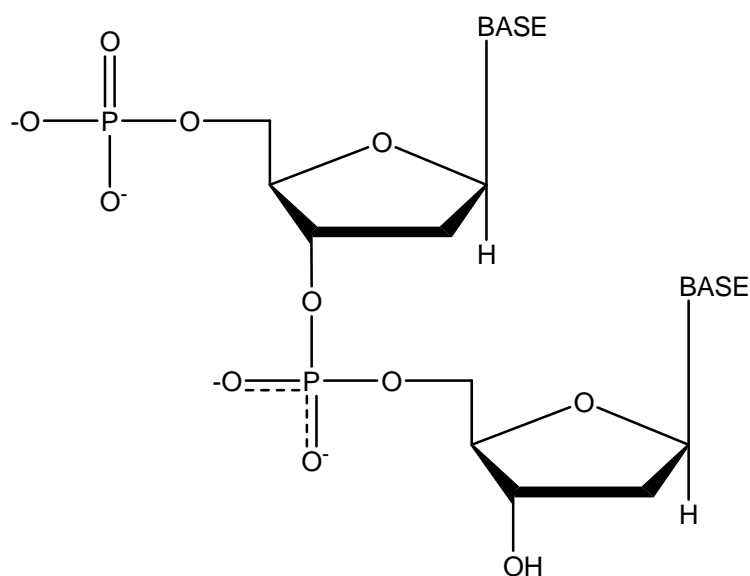
Det ble i kapittel 6.1.5 argumentert for at LIII og RIVa er det samme radikalet observert ved henholdsvis 77 K og 295 K. Radikalet ble antatt å være dannet ved en netto hydrogenabstraksjon av C5 i sidekjeden til L-arginin. Siden det samme radikalet antas observert både ved 77 K og ved 295 K kan LIII og RIVa være dannet ved at L-arginin vekselvirker med innkommende stråling, danner en eksitert /supereksitert tilstand som siden dehydrogenerer. Et slikt reaksjonsforløp er beskrevet i figur 6.11.



Figur 6.11: Reaksjonsforløp for dannelse av radikalet som LIII og RIVa representerer. L-arginin absorberer innkommende stråling som siden fører til radikaldannelse ved en dehydrogenering i sidekjeden til L-arginin.

6.3 Konsekvenser for DNA

Romtemperaturstudiet vist at det ved røntgenbestråling av enkrystaller av LAP dannes to fosfatradikaler. Lavtemperaturstudiet og oppvarmingsforsøkene viste videre at fosfatradikalene må ha blitt dannet ved en sekundærreaksjon. I kapittel 6.2.1 ble det foreslått at fosfatradikalene ble dannet som følge av en vekselvirkning mellom fosfatgruppa og et H-radikal. Dette H-radikalet ble antatt å ha sitt opphav fra et L-arginin-radikal. I kapittel 1 ble det pekt på at enkrystaller av LAP var et interessant modellsystem nettopp for å kunne observere vekselvirkninger mellom fosfatgruppa og L-arginin-molekylet med hensyn på strålingsresponsen. Bortsett fra at det kan spekuleres i at fosfatradikalene dannes ved hydrogenatominduserte P – O-bindingsbrudd, har ikke dette arbeidet konklusivt bestemt mekanismen. Men dersom tilsvarende prosesser faktisk finner sted i nukleosomet er konsekvensen for DNA klar.



Figur 6.12: To nukleotider satt sammen på samme måte som polynukleotidtråden i DNA. To av fosfatkjedens oksygenatomer binder sammen to sukker-base-elementer. De to andre oksygenatomene er negativt ladet og kan binde DNA til kjernehistonene blant annet ved hydrogenbindinger til L-arginins sidekjede. Ladningene til fosfatgruppa i DNA nøytraliseres også ved positivt ladde ioner og hydrogenbindinger til vannmolekyler.

Som nevnt i kapittel 1, utgjøres DNA-tråden av kjeder av sukker-fosfat-elementer. Figur 6.12 viser en illustrasjon av to nukleotider satt sammen på samme måte som polynukleotidtråden i DNA er bygget opp. De to fosfatradikalene som er påvist i dette arbeidet ble antatt dannet som følge av brudd i bindingene mellom fosfor og OH-gruppene.

For fosfatgruppa i DNA vil tilsvarende radikaldannelse bety brudd i bindingene mellom fosfatgruppa og sukkergruppa, altså et DNA-trådbrudd. I nukleosomer er det imidlertid bare sidegruppa til L-arginin-molekylet (guanidylgruppa) som har kontakt med fosfatgruppa i DNA, mens det i enkrystaller av LAP finnes flere kontaktpunkter. Følgelig er det nødvendig med mer inngående kjennskap til de radikalene som dannes ved bestråling av LAP-krystaller, samt deres dannelsesmekanismer, for å kunne si noe om også stråleskader i L-arginin i kjernehistonene kan overføres til fosfatgruppa i DNA.

6.4 Forslag til videre arbeider

I dette arbeidet har muligheten for at det i enkrystaller av LAP kan skje en overføring av stråleskader fra L-arginin-molekylet og til fosfatgruppa blitt diskutert basert på de foreliggende eksperimentelle resultater. Et mål for videre studier av LAP må være å få oversikt over hvorledes denne overføringen av stråleskader skjer. For å få til dette er det viktig å ha kunnskap om de radikaler som dannes i LAP-krystaller samt deres dannelsesmekanismer. I dette delkapittelet vil det foreslås arbeid til videre studier av LAP.

6.4.1 Bestemme RV

Radikalet som RV representerer lot seg ikke bestemme fra resultatene i dette arbeidet. Imidlertid skulle en slik oppgave være mulig. Da magnetfeltet ble låst til flankeresonansen i EPR-spekteret under ENDOR-opptak viste det seg at alle de sterke linjene til RIII og RIV forsvant. Ved å ta opp fullstendige rotasjonsplan om alle tre krystallografiske aksene er det svært sannsynlig at det kan bestemmes flere hyperfinkoblingstensorer for RV enn den ene som er bestemt i dette arbeidet. Dermed vil det antagelig foreligge nok informasjon til å kunne bestemme en radikalmodell for RV som kan etterprøves med DFT-beregninger.

6.4.2 Bestemme flere lavtemperaturredikaler

Det ble i kapittel 5 observert hele fem lavtemperaturredikaler knyttet til L-arginin. Dessverre var det ikke mulig å få beregnet hyperfinkoblingstensorer for mer en 11 av totalt 28 observerte ENDOR-linjer. Det var hovedsakelig rotasjonsplanet om a-aksen som satte begrensningen i antall tensorer som kunne beregnes. Grunnen til dette lå i at LAP-

krystallenes flate form medførte at de krystallene som ble brukt i rot $\langle a \rangle$ -planet var betydelig mindre enn krystallene brukt i de to andre planene. Dette gav et dårligere signal-til-støy-forhold og svake ENDOR-linjer ble overskygget av støy. En måte å kunne få bedre data fra rotasjonsplan om a-aksen er derfor å prøve å dyrke frem krystaller som er betydelig tykkere i a^* - og a -retning (se figur 3.2).

6.4.3 Eksperimenter ved 4 K

Eksperimenter med enkrystaller av LAP som bestråles ved 4 K vil muligens kunne gi mer konkret informasjon om de primærradikalene som dannes. Dermed vil man også kunne få muligheter for en større oversikt over dannelsesmekanismene til radikalene.

6.4.4 Oppvarmingseksperimenter

Oppvarmingseksperimentene som er utført i dette arbeidet er av meget begrenset omfang. Ved å varme opp lavtemperaturbestrålte krystaller og ta opp både EPR-spektre og ENDOR-spektre jevnlig vil man ha muligheter for å mer presist kunne fastslå ved hvilke temperaturer hvilke radikaler gir opphav til neste radikal i reaksjonskjeden. Spesielt interessant er det i så henseende å finne ut hvilket L-arginin-radikal som gir opphav til de fosfatradikalene denne oppgaven har påvist.

6.4.5 Polymolekylære DFT-beregninger

DFT-beregningene som er utført i dette arbeidet har ikke gitt særlig godt samsvar med eksperimentelle resultatene. Dette kan bety at de radikalmodellene som er antatt og som DFT-beregningene er utført for, er feil. Imidlertid er alle DFT-beregninger i dette arbeidet utført på isolerte L-arginin-molekyler. Det er sannsynlig at det er denne approksimasjonen som bidrar vesentlig til det dårlige samsvaret mellom DFT-beregningene og de eksperimentelle resultatene. For å bedre approksimere krystallignende omgivelser for radikalet kan man legge til flere molekyler rundt den radikalstrukturen optimaliseringen foretas for. Dermed vil optimaliseringen bli mer realistisk. Ved å gjøre slike DFT-beregninger på de radikalmodellene som er foreslått i denne oppgaven vil det beregnes mer nøyaktige hyperfinkoblingstensorer. Disse kan så sammenlignes med eksperimentelle resultater og således gi et bedre svar på hvor gode de antatte radikalmodellene er.

Referanser

- [1] F. H. Attix. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co (2006).
- [2] E. J. Hall. *Radiobiology for the Radiologist 5th ed.* J. B. Lippincott Co, Philadelphia (2000).
- [3] J. D. Watson og F. H. C. Crick: *Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid*. *Nature* **171**, 737-738 (1953).
- [4] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts og P. Walter. *Molecular biology of the cell, 4th ed.* Garland Science, New York (2002).
- [5] P. Alexander, J. T. Lett og M. G. Ormerod: *Energy transfer in irradiated deoxyribonucleic acid and nucleoprotein*. *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 207-209 (1961).
- [6] B. Weiland og J. Hüttermann: *Spin transfer from protein to DNA in x-irradiated 'dry' and hydrated chromatin: An electron spin resonance investigation of spectral components between 77 K and room temperature*. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 1075-1084 (2000).
- [7] R. Vågane: *Energioverføring mellom histoner og DNA. ESR-studier av radikaldannelse i komplekskrystaller av glysin og cytosin*. Hovedoppgave i fysikk, Fysisk Institutt, Universitetet i Oslo (2002).
- [8] M. H. Eliassen: *Radikaldannelse i Cytosin:N-benzoylglycin. En modell for strålingsindusert ladningstransport i DNA-proteinkomplekser*. Masteroppgave i fysikk, Fysisk Institutt, Universitetet i Oslo (2005).
- [9] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent og T. J. Richmond: *Crystal structure of the nucleosome core particles at 2.8 Å resolution*. *Nature* **389**, 251-260 (1997).

-
- [10] K. Aoki, K. Nagano og Y. Iitaka: *The Crystal Structure of L-Arginine Phosphate Monohydrate*. Acta Cryst. **B27**, 11-23 (1971).
- [11] N. M. Atherton. *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood PTR Prentice Hall (1993).
- [12] E. Zavoiski: *Paramagnetic relaxation of liquid solution for perpendicular fields*. J. Phys. USSR **9**, 211-216 (1945).
- [13] O. Øgrim og B. E. Lian. *Fysiske størrelser og enheter - Navn og symboler*. Universitetsforlaget (2000).
- [14] A. J. Stone: *Gauge invariance of the g tensor*. Proc. Roy. Soc. (London). **Ser A**, 424-434 (1963).
- [15] W. Friedrich, P. Knipping og M. Laue: *Interferenz-Erscheinungen bei Röntgenstrahlen*. Sitzungberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der Königlichen Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München, 303-322 (1912).
- [16] W. L. Bragg: *The diffraction of short electromagnetic waves by a crystal*. Proc. Camb. Phil. Soc. **17**, 43-57 (1913).
- [17] J. P. Glusker, M. Lewis, M. Rossi. *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists*. Wiley-VCH (1994).
- [18] E. Sagstuen. Subrutine **KRYSTMOD** fra programvarebiblioteket **ESRLIB**. Fysisk Institutt, Universitet i Oslo.
- [19] E. Liepinsh og G. Otting: *Proton Exchange Rates from Amino Acid Side Chains – Implications for Image Contrast*. Magnetic Resonance in Medicine **35**, 30-42 (1996).
- [20] D. Eimerl, S. Velsko, L. Davis, F. Wang, G. Loiacono og G. Kennedy: *Deuterated L-Arginine Phosphate: A New Efficient Nonlinear Crystal*. J. of Quantum Electronics **25**, 179-193 (1989).
- [21] Biological Magnetic Resonance Data Bank:
http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/gen_metab_summary_5.php?molName=L-arginine (19. november 2007).

-
- [22] EPR-laboratoriet ved Fysisk Institutt, Universitetet i Oslo: *Overview of the low-temperature X-band EPR/ENDOR cavity for in situ X-irradiation*. www.fys.uio.no/biofysikk/eee/cavity.htm (28. november 2007).
- [23] D. S. Schonland: *On the Determination of the Principal g-values in Electron Spin Resonance*. Proc. Phys. Soc. (London) **73**, 788-792 (1958).
- [24] E. Sagstuen. Regnemaskinprogrammet **TRIORD**. Fysisk Institutt, Universitet i Oslo (1989).
- [25] W.H. Nelson: *Estimation of errors in eigenvectors and eigenvalues from magnetic resonance results using linear data-fitting techniques*. J. Magn. Reson. **38**, 71 (1980).
- [26] B. Bungum: *Strålingsinduserte radikaler i glukose-1-fosfat studert ved ESR- og ENDOR-teknikker*. Hovedoppgave i fysikk, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo (1992).
- [27] H. M. McConnell og D. B. Chesnut: *Theory of isotropic hyperfine interactions in π -electron radicals*. J. Chem. Phys. **28**, 107-117 (1958).
- [28] C. Heller og H. M. McConnell: *Radiation damage in organic crystals. II. Electron spin resonance of $(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})$ in β -succinic acid*. J. Chem. Phys. **32**, 1535-1539 (1960).
- [29] W. Gordy. *Theory and Application of Electron Spin Resonance*. John Wiley & Sons, New York (1980).
- [30] W. A. Bernhard: *The use of alpha hyperfine couplings tensors as a measure of unpaired spin density and free radical geometry*. J. Chem. Phys. **81**, 5928-5936 (1984).
- [31] P. A. Erling og W. H. Nelson: *Dependence of α -Proton Hyperfine Couplings on Free Radical Geometry*. J. Phys. Chem. A **108**, 7591-7595 (2004).
- [32] W. A. Bernhard: *Solide-State Radiation Chemistry of DNA: The Bases*. Advances in Radiation Biology **9**, 199-280 (1981).

-
- [33] K. T. Øhman: *Strålingsindusert radikaldannelse i énkrystaller av l-o-serinfosfat ved 77 K og 10 K – EPR, ENDOR, EIE og DFT studier*. Masteroppgave i fysikk, Fysisk Institutt, Universitetet i Oslo (2005).
- [34] K. Eldevik: *Radikaldanning i røntgenbestrålte einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin ved 295 K og 77 K*. Masteroppgave i fysikk, Fysisk Institutt, Universitetet i Oslo (2006).
- [35] J. R. Morton, J. R. Rowlands og D. H. Whiffen: National Physical Laboratory (U.K.) Report No. BPR 13 (1962).
- [36] J. R. Morton og K. F. Preston: *Atomic Parameters for Paramagnetic Resonance Data*. J. of Mag. Res. **30**, 577-582 (1978).
- [37] J. A. J. Fitzpatrick, F. R. Manby og C. M. Western: *The interpretation of molecular magnetic hyperfine interactions*. J. of Chem. Phys. **122**, 084312 (2005).
- [38] P. Hohenberg og W. Kohn: *Inhomogeneous electron gas*. Phys. Rev. B **136**, 864-871 (1964).
- [39] C. J. Cramer. *Computational Chemistry, Theory and Models*. Academic Press Inc., New York (2004).
- [40] A. D. Becke: *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. J. Chem. Phys. **98**, 5648-5652 (1993).
- [41] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr: *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Phys. Rev. B, **37**, 785-789 (1988).
- [42] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Peterson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Kox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V.

- G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzales og J. A. Pople: *Gaussian 03, Revision C. 02*. Gaussian Inc., Wallingford, CT (2004).
- [43] J. W. Gault, L. A. Eriksson og L. Radom: *Assessment of procedures for calculating radical hyperfine structures*. J. of Phys. Chem. A, **101**, 1352-1359 (1997).
- [44] J. A. Weil og P. S. Rao: *EPR/ENDOR Frequency Table*. Bruker Almanac 1999, Bruker (1999).
- [45] A. Horsfield, J. R. Morton og D.H. Whiffen: *Electron spin resonance and structure of the ionic radical $\cdot OP_3^{2-}$* . Mol. Phys. **4:6**, 475-480 (1961).
- [46] M. C. R. Symons. *Chemical & Biochemical Aspects of Electron-Spin Resonance Spectroscopy*. Van Nostrand Reinhold Company Ltd., Berkshire (1978).
- [47] E. O. Hole, W. H. Nelson, E. Sagstuen og D. M. Close: *Free Radical Formation in Single Crystals of 2'-Deoxyguanosine 5'-Monophosphate Tetrahydrate Disodium Salt: An EPR/ENDOR Study*. Rad. Res. **129**, 119-138 (1992).
- [48] E. Sagstuen, A. Sanderud og E. O. Hole: *The Solid-State Radiation Chemistry of Simple Amino Acids, Revisited*. Rad. Res. **162**, 112-119 (2004).
- [49] W. A. Bernhard: *Solid-State Radiation Chemistry of DNA: The Bases*. Advances in Radiation Biology **9**, 199-280 (1981).
- [50] E. Sagstuen, E. O. Hole, S. R. Haugerud, A. Lund, O. I. Eid and R. Erickson: *EPR and ENDOR analysis of X-irradiated L-Alanine and NaHC2O4·H2O. Simulation of microwave power dependence of satellite lines*. Nukleonika **42**, 85-104 (1997).
- [51] E. Sagstuen, A. Lund, Y. Itagaki and J. Maruani: *Weakly coupled proton interactions in the malonic acid radical: Single crystal ENDOR analysis and EPR simulations at microwave saturation*. J. Phys. Chem. A **104**, 6362 - 6371 (2000).

- [52] R. Biyik og R. Tapramaz: *EPR spectra of Cu^{2+} in KH_2PO_4 single crystals*. *Spectrochimica Acta Part A* **69**, 174-177 (2008).
- [53] A. Sanderud og E. Sagstuen: *EPR study of X-irradiated hydroxyalkyl phosphate esters; Phosphate radical formation in polycrystalline glucose phosphate, ribose phosphate and glycerol phosphate salts at 77 and 295 K*. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **92**, 995-999 (1996).
- [54] D. Nelson og M. C. R. Symons: *Unstable Intermediates. Part 169.¹ Electron Capture Processes in Organic Phosphates: an Electron Spin Resonance Study*. *J. C. S. Perkin II*, 286-293 (1977).
- [55] K. Kobayashi, S. Nagase og K. P. Dinse: *A theoretical study of spin density distributions and isotropic hyperfine couplings of N and P atoms in $\text{N}@C_{60}$, $\text{P}@C_{60}$, $\text{N}@C_{70}$, $\text{N}@C_{60}$, $\text{N}@C_{60}(\text{CH}_2)_6$, and $\text{N}@C_{60}(\text{SiH}_2)_6$* . *Chem. Phys. Letters* **377**, 93-98 (2003).
- [56] J. R. Morton: *Electron Spin Resonance of Oriented Radicals*. *J. Chem. Rev.* **64**, 453-471 (1964).
- [57] K. T. Øhman og E. Sagstuen: *Free Radical Conformations and Conversions in X-Irradiated Single Crystals of L-Cysteic Acid by Electron Magnetic Resonance and DFT-Studies*. (Forventet publisert i løpet av 2008.)
- [58] A. Lund og M. Shiotani. *Radikal Ionic Systems. Properties in Condensed Phases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1991).
- [59] Landolt-Börnstein. *Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology. 11/9. Magnetical Properties of Free Radicals*. Springer Verlag, Berlin (1977).
- [60] S. Subramanian, M. C. R. Symons og H. W. Wardale: *Oxides and oxyions of the non-metals. Part XIII. Electron spin resonance studies of the PO_4^{2-} radical and related species in γ -irradiated phosphates*. *J. Chem. Soc. A*, 1239-1242 (1970).

-
- [61] E. Sagstuen, E. O. Hole, S. R. Haugedal og W. Nelson: *Alanine Radicals: Structure Determination by EPR and ENDOR of Single Crystals X-Irradiated at 295 K*. J. Phys. Chem. A **101**, 9763-9772 (1997).
- [62] A. Sanderud og E. Sagstuen: *EPR and ENDOR Studies of Single Crystals of α -Glycine X-ray Irradiated at 295 K*. J. Phys. Chem. B **102**, 9353-9361 (1998).
- [63] W. H. Nelson. Regnemaskinprogrammet **MAGCALC**. Georgia State University (Modifisert av E. Sagstuen, Universitetet i Oslo, 1987).

Appendiks

A Krystallografiske data

Nedenfor listes en omregning av atomposisjonene for enkrystaller av L-arginin monofosfat monohydrat (LAP) til de ortogonale koordinatsystemene a b c* og a* b c. Krystalldata er hentet fra krystallografisk artikkel [10]. Omregninger er gjort med programmet KRYSTMOD fra ESRLIB [18]. Programmet regner også ut avstander og retninger mellom atomene.

L-ARGININ MONOFOSFAT
MONOHYDERAT

ANTALL ATOMER ER 35

KRYSTALLAKSER

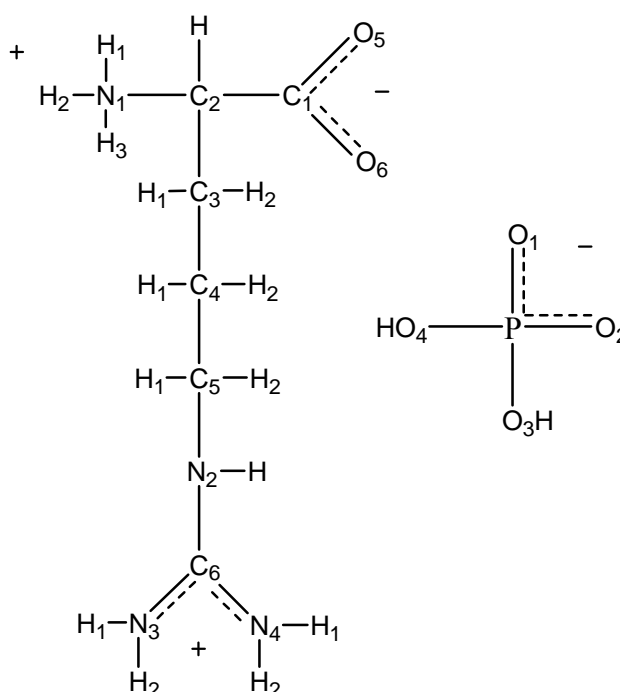
<a> = 10.850 Å

 = 7.910 Å

<c> = 7.320 Å

DEN MONOKLINE VINKEL β ER

98.000 GRADER



INPUTDATA FOR LAP

Atomets nummer	x	y	z	Atomets symbol
1	-.0117	.7500	.1764	P
2	.0155	.8405	.0076	O1
3	.0130	.8537	.3513	O2
4	-.1546	.6965	.1355	O3
5	.0640	.5824	.2089	O4
6	.3614	.8351	.9206	O5
7	.2374	.9497	.6859	O6
8	.4750	.5851	.1527	OW
9	.0762	.6832	.6837	N1
10	.3703	.2243	.4938	N2
11	.2316	.0633	.3070	N3

12	.3184	.2953	.1866	N4
13	.2740	.8280	.7924	C1
14	.2119	.6546	.7538	C2
15	.2692	.5572	.6074	C3
16	.3944	.4790	.6847	C4
17	.4487	.3700	.5472	C5
18	.3056	.1956	.3291	C6
19	.2040	.5600	.8630	HC2
20	.0500	.6910	.8220	H1N1
21	.0230	.5740	.6510	H2N1
22	.0750	.7560	.5690	H3N1
23	.2830	.5900	.4970	H1C3
24	.2270	.4530	.5580	H2C3
25	.4530	.5640	.7180	H1C4
26	.3950	.4240	.8400	H2C4
27	.4580	.4320	.4570	H1C5
28	.5410	.3760	.5540	H2C5
29	.3770	.1220	.5700	HN2
30	.2390	-.0020	.4050	HN3
31	.3590	.4240	.1740	H1N4
32	.3150	.2700	.0720	H2N4
33	.5180	.5150	.1260	H1OW
34	.4570	.5840	.0310	H2OW
35	-.1710	.6900	.2650	HO3

KOORDINATSYSTEM A B C*

Atomets nummer	x	y	z	Atomets symbol
1	-.3067	5.9325	1.2787	P
2	.1604	6.6484	.0551	O1
3	-.2168	6.7528	2.5465	O2
4	-1.8155	5.5093	.9822	O3
5	.4816	4.6068	1.5143	O4
6	2.9833	6.6056	6.6732	O5
7	1.8770	7.5121	4.9719	O6
8	4.9982	4.6281	1.1069	OW
9	.1303	5.4041	4.9560	N1
10	3.5147	1.7742	3.5794	N2
11	2.2001	.5007	2.2254	N3
12	3.2645	2.3358	1.3526	N4
13	2.1656	6.5495	5.7439	C1
14	1.5312	5.1779	5.4641	C2
15	2.3020	4.4075	4.4029	C3
16	3.5817	3.7889	4.9632	C4
17	4.3109	2.9267	3.9665	C5
18	2.9805	1.5472	2.3856	C6
19	1.3342	4.4296	6.2557	HC2
20	-.2949	5.4658	5.9585	H1N1
21	-.4137	4.5403	4.7189	H2N1

22	.2341	5.9800	4.1245	H3N1
23	2.5642	4.6669	3.6026	H1C3
24	1.8945	3.5832	4.0448	H2C3
25	4.1836	4.4612	5.2046	H1C4
26	3.4300	3.3538	6.0890	H2C4
27	4.5037	3.4171	3.3127	H1C5
28	5.3055	2.9742	4.0158	H2C5
29	3.5098	.9650	4.1318	HN2
30	2.1806	-.0158	2.9357	HN3
31	3.7179	3.3538	1.2613	H1N4
32	3.3444	2.1357	.5219	H2N4
33	5.4919	4.0736	.9133	H1OW
34	4.9269	4.6194	.2247	H2OW
35	-2.1253	5.4579	1.9209	HO3

BINDINGSAVSTANDER OG RETNINGSKOSER (a, b, c*)

BINDING	AVSTAND	X	Y	Z	
O1 - P	(2- 1)	1.4926	-.3129	-.4796	.8198
O2 - P	(3- 1)	1.5127	-.0594	-.5423	-.8381
O3 - P	(4- 1)	1.5948	.9461	.2653	.1859
O4 - P	(5- 1)	1.5602	-.5052	.8497	-.1510
N1 - P	(9- 1)	3.7407	-.1168	.1413	-.9831
H2N1- P	(21- 1)	3.7128	.0288	.3750	-.9266
H3N1- P	(22- 1)	2.8972	-.1866	-.0164	-.9823
H1C3- P	(23- 1)	3.9044	-.7353	.3241	-.5952
HO3 - P	(35- 1)	1.9863	.9156	.2389	-.3233
O2 - O1	(3- 2)	2.5220	.1496	-.0414	-.9879
O3 - O1	(4- 2)	2.4619	.8026	.4627	-.3766
O4 - O1	(5- 2)	2.5299	-.1269	.8070	-.5768
HO3 - O1	(35- 2)	3.1817	.7184	.3742	-.5864
O3 - O2	(4- 3)	2.5590	.6247	.4859	.6113
O4 - O2	(5- 3)	2.4816	-.2814	.8647	.4159
O6 - O2	(7- 3)	3.2930	-.6359	-.2306	-.7365
N1 - O2	(9- 3)	2.7830	-.1247	.4846	-.8658
C1 - O2	(13- 3)	3.9926	-.5967	.0509	-.8008
C2 - O2	(14- 3)	3.7481	-.4664	.4202	-.7784
C3 - O2	(15- 3)	3.9104	-.6441	.5998	-.4747
H1N1- O2	(20- 3)	3.6475	.0214	.3528	-.9354
H2N1- O2	(21- 3)	3.1069	.0633	.7121	-.6992
H3N1- O2	(22- 3)	1.8141	-.2486	.4260	-.8699
H1C3- O2	(23- 3)	3.6333	-.7654	.5741	-.2907
HO3 - O2	(35- 3)	2.3896	.7987	.5419	.2618
O4 - O3	(5- 4)	2.5247	-.9098	.3575	-.2107
H3N1- O3	(22- 4)	3.7811	-.5421	-.1245	-.8311
HO3 - O3	(35- 4)	.9899	.3130	.0519	-.9483
N1 - O4	(9- 5)	3.5503	.0990	-.2246	-.9694
N4 - O4	(12- 5)	3.5956	-.7740	.6316	.0450
C3 - O4	(15- 5)	3.4202	-.5323	.0583	-.8446
H2N1- O4	(21- 5)	3.3280	.2690	.0200	-.9629

H3N1- O4	(22- 5)	2.9598	.0836	-.4639	-.8819
H1C3- O4	(23- 5)	2.9500	-.7060	-.0204	-.7079
H2C3- O4	(24- 5)	3.0737	-.4597	.3330	-.8233
H1N4- O4	(31- 5)	3.4796	-.9301	.3601	.0727
H2N4- O4	(32- 5)	3.9098	-.7322	.6320	.2538
HO3 - O4	(35- 5)	2.7723	.9403	-.3070	-.1467
O6 - O5	(7- 6)	2.2226	.4977	-.4078	.7654
N1 - O5	(9- 6)	3.5401	.8059	.3394	.4851
C1 - O5	(13- 6)	1.2391	.6599	.0453	.7500
C2 - O5	(14- 6)	2.3684	.6131	.6028	.5105
C3 - O5	(15- 6)	3.2327	.2108	.6800	.7023
C4 - O5	(16- 6)	3.3491	-.1787	.8411	.5106
HC2 - O5	(19- 6)	2.7621	.5971	.7878	.1512
H1N1- O5	(20- 6)	3.5436	.9251	.3217	.2017
H3N1- O5	(22- 6)	3.8007	.7233	.1646	.6706
H1C3- O5	(23- 6)	3.6555	.1146	.5304	.8400
H1C4- O5	(25- 6)	2.8628	-.4193	.7490	.5130
H2C4- O5	(26- 6)	3.3339	-.1340	.9754	.1752
N1 - O6	(9- 7)	2.7377	.6380	.7700	.0058
C1 - O6	(13- 7)	1.2673	-.2277	.7596	-.6092
C2 - O6	(14- 7)	2.4105	.1435	.9684	-.2042
C3 - O6	(15- 7)	3.1849	-.1334	.9748	.1787
HC2 - O6	(19- 7)	3.3830	.1605	.9112	-.3795
H1N1- O6	(20- 7)	3.1429	.6911	.6511	-.3139
H2N1- O6	(21- 7)	3.7607	.6091	.7902	.0673
H3N1- O6	(22- 7)	2.4010	.6843	.6381	.3529
H1C3- O6	(23- 7)	3.2315	-.2127	.8805	.4237
H1C4- O6	(25- 7)	3.8317	-.6020	.7962	-.0607
N4 - OW	(12- 8)	2.8846	.6010	.7947	-.0852
C5 - OW	(17- 8)	3.3978	.2023	.5008	-.8416
C6 - OW	(18- 8)	3.8985	.5176	.7903	-.3280
H1C3- OW	(23- 8)	3.4863	.6981	-.0111	-.7159
H1C5- OW	(27- 8)	2.5645	.1928	.4722	-.8601
H2C5- OW	(28- 8)	3.3603	-.0914	.4922	-.8657
H1N4- OW	(31- 8)	1.8130	.7062	.7029	-.0852
H2N4- OW	(32- 8)	3.0479	.5426	.8178	.1919
H1OW- OW	(33- 8)	.7673	-.6435	.7227	.2522
H2OW- OW	(34- 8)	.8851	.0806	.0098	.9967
C1 - N1	(13- 9)	2.4649	-.8258	-.4647	-.3197
C2 - N1	(14- 9)	1.5073	-.9294	.1501	-.3371
C3 - N1	(15- 9)	2.4527	-.8855	.4063	.2255
C4 - N1	(16- 9)	3.8107	-.9057	.4239	-.0019
HC2 - N1	(19- 9)	2.0220	-.5954	.4820	-.6428
H1N1- N1	(20- 9)	1.0907	.3898	-.0566	-.9192
H2N1- N1	(21- 9)	1.0479	.5190	.8243	.2262
H3N1- N1	(22- 9)	1.0167	-.1021	-.5664	.8178
H1C3- N1	(23- 9)	2.8808	-.8449	.2559	.4698
H2C3- N1	(24- 9)	2.6941	-.6548	.6759	.3382
HO3 - N1	(35- 9)	3.7818	.5964	-.0142	.8025
N3 - N2	(11-10)	2.2767	.5774	.5594	.5947

N4 - N2	(12-10)	2.3101	.1083	-.2431	.9639
C3 - N2	(15-10)	3.0137	.4024	-.8737	-.2732
C4 - N2	(16-10)	2.4451	-.0274	-.8240	-.5660
C5 - N2	(17-10)	1.4533	-.5479	-.7930	-.2663
C6 - N2	(18-10)	1.3275	.4024	.1710	.8993
H1C3- N2	(23-10)	3.0449	.3121	-.9500	-.0076
H2C3- N2	(24-10)	2.4727	.6552	-.7316	-.1882
H1C4- N2	(25-10)	3.2107	-.2083	-.8369	-.5062
H2C4- N2	(26-10)	2.9665	.0286	-.5325	-.8460
H1C5- N2	(27-10)	1.9361	-.5108	-.8486	.1378
H2C5- N2	(28-10)	2.1994	-.8142	-.5456	-.1984
HN2 - N2	(29-10)	.9798	.0050	.8259	-.5638
HN3 - N2	(30-10)	2.3235	.5742	.7704	.2770
H1N4- N2	(31-10)	2.8125	-.0722	-.5616	.8242
H2N4- N2	(32-10)	3.0835	.0552	-.1172	.9916
N4 - N3	(12-11)	2.2940	-.4640	-.8000	.3805
C5 - N3	(17-11)	3.6569	-.5772	-.6634	-.4761
C6 - N3	(18-11)	1.3152	-.5933	-.7957	-.1218
H2C3- N3	(24-11)	3.5925	.0851	-.8581	-.5065
H1C5- N3	(27-11)	3.8723	-.5949	-.7532	-.2808
HN2 - N3	(29-11)	2.3591	-.5552	-.1968	-.8081
HN3 - N3	(30-11)	.8785	.0222	.5879	-.8086
H1N4- N3	(31-11)	3.3725	-.4501	-.8460	.2859
H2N4- N3	(32-11)	2.6238	-.4361	-.6231	.6492
C3 - N4	(15-12)	3.8108	.2526	-.5436	-.8004
C4 - N4	(16-12)	3.9049	-.0812	-.3721	-.9246
C5 - N4	(17-12)	2.8769	-.3637	-.2054	-.9086
C6 - N4	(18-12)	1.3303	.2135	.5928	-.7765
H1C3- N4	(23-12)	3.3147	.2113	-.7033	-.6788
H2C3- N4	(24-12)	3.2682	.4192	-.3817	-.8238
H1C5- N4	(27-12)	2.5586	-.4843	-.4226	-.7661
H2C5- N4	(28-12)	3.4155	-.5976	-.1869	-.7797
HN2 - N4	(29-12)	3.1085	-.0789	.4410	-.8940
HN3 - N4	(30-12)	3.0351	.3572	.7748	-.5216
H1N4- N4	(31-12)	1.1181	-.4054	-.9105	.0817
H2N4- N4	(32-12)	.8582	-.0931	.2332	.9680
H1OW- N4	(33-12)	2.8591	-.7791	-.6078	.1536
H2OW- N4	(34-12)	3.0414	-.5466	-.7508	.3708
C2 - C1	(14-13)	1.5369	.4128	.8924	.1821
C3 - C1	(15-13)	2.5309	-.0539	.8464	.5299
C4 - C1	(16-13)	3.1993	-.4426	.8629	.2440
HC2 - C1	(19-13)	2.3339	.3562	.9083	-.2193
H1N1- C1	(20-13)	2.6972	.9123	.4018	-.0796
H2N1- C1	(21-13)	3.4264	.7528	.5864	.2991
H3N1- C1	(22-13)	2.5841	.7475	.2204	.6267
H1C3- C1	(23-13)	2.8789	-.1385	.6539	.7438
H2C3- C1	(24-13)	3.4292	.0791	.8650	.4955
H1C4- C1	(25-13)	2.9536	-.6832	.7070	.1826
H2C4- C1	(26-13)	3.4539	-.3661	.9252	-.0999
C3 - C2	(15-14)	1.5212	-.5067	.5065	.6976

C4 - C2	(16-14)	2.5268	-.8115	.5497	.1982
C5 - C2	(17-14)	3.8778	-.7168	.5805	.3862
HC2 - C2	(19-14)	1.1069	.1779	.6760	-.7151
H1N1- C2	(20-14)	1.9136	.9543	-.1505	-.2583
H2N1- C2	(21-14)	2.1781	.8929	.2927	.3421
H3N1- C2	(22-14)	2.0298	.6390	-.3951	.6599
H1C3- C2	(23-14)	2.1894	-.4718	.2334	.8502
H2C3- C2	(24-14)	2.1655	-.1678	.7364	.6554
H1C4- C2	(25-14)	2.7597	-.9611	.2597	.0940
H2C4- C2	(26-14)	2.7061	-.7017	.6740	-.2309
C4 - C3	(16-15)	1.5278	-.8376	.4049	-.3668
C5 - C3	(17-15)	2.5335	-.7929	.5845	.1722
C6 - C3	(18-15)	3.5652	-.1903	.8023	.5658
HC2 - C3	(19-15)	2.0904	.4630	-.0106	-.8863
H1N1- C3	(20-15)	3.2069	.8098	-.3300	-.4851
H2N1- C3	(21-15)	2.7372	.9921	-.0485	-.1155
H3N1- C3	(22-15)	2.6128	.7915	-.6018	.1065
H1C3- C3	(23-15)	.8812	-.2976	-.2944	.9082
H2C3- C3	(24-15)	.9867	.4130	.8353	.3629
H1C4- C3	(25-15)	2.0459	-.9197	-.0263	-.3919
H2C4- C3	(26-15)	2.2859	-.4935	.4609	-.7376
H1C5- C3	(27-15)	2.6489	-.8312	.3739	.4116
H2C5- C3	(28-15)	3.3503	-.8965	.4278	.1155
HN2 - C3	(29-15)	3.6582	-.3301	.9410	.0741
H1N4- C3	(31-15)	3.6034	-.3929	.2924	.8718
C5 - C4	(17-16)	1.5062	-.4842	.5724	.6617
C6 - C4	(18-16)	3.4686	.1733	.6463	.7431
HC2 - C4	(19-16)	2.6706	.8416	-.2399	-.4840
H1C3- C4	(23-16)	1.9124	.5320	-.4591	.7114
H2C3- C4	(24-16)	1.9320	.8733	.1065	.4754
H1C4- C4	(25-16)	.9341	-.6443	-.7198	-.2584
H2C4- C4	(26-16)	1.2164	.1247	.3577	-.9255
H1C5- C4	(27-16)	1.9268	-.4785	.1929	.8566
H2C5- C4	(28-16)	2.1290	-.8096	.3827	.4450
HN2 - C4	(29-16)	2.9446	.0244	.9590	.2824
H1N4- C4	(31-16)	3.7299	-.0365	.1166	.9925
C6 - C5	(18-17)	2.4845	.5355	.5553	.6363
H1C3- C5	(23-17)	2.4923	.7008	-.6982	.1460
H2C3- C5	(24-17)	2.5053	.9645	-.2621	-.0312
H1C4- C5	(25-17)	1.9758	.0645	-.7767	-.6266
H2C4- C5	(26-17)	2.3374	.3769	-.1827	-.9081
H1C5- C5	(27-17)	.8398	-.2296	-.5840	.7786
H2C5- C5	(28-17)	.9969	-.9976	-.0476	-.0494
HN2 - C5	(29-17)	2.1254	.3769	.9230	-.0778
HN3 - C5	(30-17)	3.7762	.5642	.7792	.2730
H1N4- C5	(31-17)	2.8022	.2116	-.1524	.9654
H2N4- C5	(32-17)	3.6640	.2638	.2159	.9401
H1OW- C5	(33-17)	3.4687	-.3405	-.3307	.8802
H1C3- C6	(23-18)	3.3745	.1234	-.9245	-.3607
H2C3- C6	(24-18)	2.8422	.3821	-.7164	-.5838

H1C5- C6	(27-18)	2.5839	-.5895	-.7237	-.3588
H2C5- C6	(28-18)	3.1780	-.7316	-.4490	-.5130
HN2 - C6	(29-18)	1.9153	-.2763	.3040	-.9117
HN3 - C6	(30-18)	1.8400	.4347	.8495	-.2990
H1N4- C6	(31-18)	2.2521	-.3274	-.8022	.4992
H2N4- C6	(32-18)	1.9880	-.1831	-.2960	.9375
H1OW- C6	(33-18)	3.8546	-.6515	-.6554	.3819
H1N1- HC2	(20-19)	1.9535	.8340	-.5304	.1521
H2N1- HC2	(21-19)	2.3300	.7502	-.0475	.6595
H3N1- HC2	(22-19)	2.8558	.3852	-.5429	.7462
H1C3- HC2	(23-19)	2.9339	-.4192	-.0809	.9043
H2C3- HC2	(24-19)	2.4327	-.2303	.3479	.9088
H1C4- HC2	(25-19)	3.0372	-.9382	-.0104	.3461
H2C4- HC2	(26-19)	2.3616	-.8874	.4555	.0706
H2N1- H1N1	(21-20)	1.5515	.0765	.5965	.7989
H3N1- H1N1	(22-20)	1.9767	-.2676	-.2601	.9278
H1C3- H1N1	(23-20)	3.7899	-.7544	.2108	.6216
H2C3- H1N1	(24-20)	3.4641	-.6320	.5435	.5524
H3N1- H2N1	(22-21)	1.6868	-.3840	-.8534	.3524
H1C3- H2N1	(23-21)	3.1828	-.9356	-.0398	.3507
H2C3- H2N1	(24-21)	2.5881	-.8918	.3698	.2605
HO3 - H2N1	(35-21)	3.4060	.5025	-.2694	.8215
H1C3- H3N1	(23-22)	2.7251	-.8551	.4818	.1915
H2C3- H3N1	(24-22)	2.9168	-.5693	.8217	.0273
HO3 - H3N1	(35-22)	3.2704	.7214	.1596	.6738
H2C3- H1C3	(24-23)	1.3485	.4967	.8036	-.3279
H1C4- H1C3	(25-23)	2.2871	-.7080	.0899	-.7004
H2C4- H1C3	(26-23)	2.9420	-.2943	.4463	-.8451
H1C5- H1C3	(27-23)	2.3254	-.8340	.5374	.1247
H2C5- H1C3	(28-23)	3.2481	-.8439	.5211	-.1272
HN2 - H1C3	(29-23)	3.8572	-.2451	.9597	-.1372
H1N4- H1C3	(31-23)	2.9218	-.3948	.4494	.8013
H1C4- H2C3	(25-24)	2.7122	-.8440	-.3237	-.4276
H2C4- H2C3	(26-24)	2.5669	-.5982	.0894	-.7963
H1C5- H2C3	(27-24)	2.7151	-.9610	.0612	.2696
H2C5- H2C3	(28-24)	3.4650	-.9844	.1758	.0084
HN2 - H2C3	(29-24)	3.0776	-.5248	.8507	-.0283
HN3 - H2C3	(30-24)	3.7769	-.0757	.9529	.2936
H1N4- H2C3	(31-24)	3.3355	-.5467	.0688	.8345
H2C4- H1C4	(26-25)	1.6051	.4695	.6899	-.5510
H1C5- H1C4	(27-25)	2.1845	-.1466	.4780	.8661
H2C5- H1C4	(28-25)	2.2098	-.5077	.6729	.5380
HN2 - H1C4	(29-25)	3.7187	.1812	.9402	.2885
H1C5- H2C4	(27-26)	2.9773	-.3606	-.0213	.9325
H2C5- H2C4	(28-26)	2.8212	-.6648	.1346	.7348
HN2 - H2C4	(29-26)	3.0892	-.0258	.7733	.6335
H2C5- H1C5	(28-27)	1.1547	-.6943	.3836	-.6089
HN2 - H1C5	(29-27)	2.7698	.3589	.8853	-.2957
H1N4- H1C5	(31-27)	2.1977	.3576	.0288	.9334
H2N4- H1C5	(32-27)	3.2825	.3532	.3904	.8502

H1OW- H1C5	(33-27)	2.6766	-.3692	-.2453	.8964
H2OW- H1C5	(34-27)	3.3407	-.1267	-.3599	.9244
HN2 - H2C5	(29-28)	2.6972	.6658	.7449	-.0430
H1N4- H2C5	(31-28)	3.2019	.4958	-.1186	.8603
H1OW- H2C5	(33-28)	3.2968	-.0566	-.3335	.9411
HN3 - HN2	(30-29)	2.0395	.6517	.4809	.5865
H1N4- HN2	(31-29)	3.7403	-.0556	-.6387	.7675
H2N4- HN2	(32-29)	3.7986	.0435	-.3082	.9503
H2N4- HN3	(32-30)	3.4366	-.3387	-.6261	.7024
H2N4- H1N4	(32-31)	1.4731	.2535	.8269	.5019
H1OW- H1N4	(33-31)	1.9459	-.9117	-.3699	.1788
H2OW- H1N4	(34-31)	2.0342	-.5943	-.6222	.5096
H1OW- H2N4	(33-32)	2.9190	-.7357	-.6639	-.1341
H2OW- H2N4	(34-32)	2.9600	-.5346	-.8391	.1004
H2OW- H1OW	(34-33)	1.0447	.5409	-.5224	.6592

KOORDINATSYSTEM A* B C

Atomets nummer	x	y	z	Atomets symbol
1	-.1257	5.9325	1.3089	P
2	.1665	6.6484	.0322	O1
3	.1397	6.7528	2.5519	O2
4	-1.6611	5.5093	1.2253	O3
5	.6876	4.6068	1.4325	O4
6	3.8830	6.6056	6.1931	O5
7	2.5507	7.5121	4.6623	O6
8	5.1036	4.6281	.4005	OW
9	.8187	5.4041	4.8896	N1
10	3.9787	1.7742	3.0555	N2
11	2.4884	.5007	1.8975	N3
12	3.4210	2.3358	.8851	N4
13	2.9440	6.5495	5.3866	C1
14	2.2767	5.1779	5.1978	C2
15	2.8924	4.4075	4.0397	C3
16	4.2376	3.7889	4.4164	C4
17	4.8210	2.9267	3.3280	C5
18	3.2835	1.5472	1.9475	C6
19	2.1919	4.4296	6.0091	HC2
20	.5372	5.4658	5.9415	H1N1
21	.2471	4.5403	4.7306	H2N1
22	.8058	5.9800	4.0518	H3N1
23	3.0407	4.6669	3.2107	H1C3
24	2.4390	3.5832	3.7418	H2C3
25	4.8672	4.4612	4.5717	H1C4
26	4.2440	3.3538	5.5523	H2C4
27	4.9209	3.4171	2.6536	H1C5
28	5.8127	2.9742	3.2384	H2C5
29	4.0506	.9650	3.6031	HN2
30	2.5679	-.0158	2.6037	HN3

31	3.8572	3.3538	.7316	H1N4
32	3.3845	2.1357	.0514	H2N4
33	5.5656	4.0736	.1401	H1OW
34	4.9102	4.6194	-.4632	H2OW
35	-1.8373	5.4579	2.1980	HO3

BINDINGSAVSTANDER OG RETNINGSKOSER (a*, b, c)

BINDING	AVSTAND	X	Y	Z
O1 - P (2- 1)	1.4926	-.1958	-.4796	.8554
O2 - P (3- 1)	1.5127	-.1754	-.5423	-.8217
O3 - P (4- 1)	1.5948	.9627	.2653	.0524
O4 - P (5- 1)	1.5602	-.5213	.8497	-.0792
N1 - P (9- 1)	3.7407	-.2525	.1413	-.9572
H2N1- P (21- 1)	3.7128	-.1004	.3750	-.9216
H3N1- P (22- 1)	2.8972	-.3215	-.0164	-.9468
H1C3- P (23- 1)	3.9044	-.8110	.3241	-.4871
HO3 - P (35- 1)	1.9863	.8617	.2389	-.4476
O2 - O1 (3- 2)	2.5220	.0107	-.0414	-.9991
O3 - O1 (4- 2)	2.4619	.7424	.4627	-.4846
O4 - O1 (5- 2)	2.5299	-.2060	.8070	-.5535
HO3 - O1 (35- 2)	3.1817	.6298	.3742	-.6807
O3 - O2 (4- 3)	2.5590	.7037	.4859	.5184
O4 - O2 (5- 3)	2.4816	-.2208	.8647	.4511
O6 - O2 (7- 3)	3.2930	-.7322	-.2306	-.6409
N1 - O2 (9- 3)	2.7830	-.2440	.4846	-.8400
C1 - O2 (13- 3)	3.9926	-.7024	.0509	-.7100
C2 - O2 (14- 3)	3.7481	-.5702	.4202	-.7059
C3 - O2 (15- 3)	3.9104	-.7039	.5998	-.3805
H1N1- O2 (20- 3)	3.6475	-.1090	.3528	-.9293
H2N1- O2 (21- 3)	3.1069	-.0346	.7121	-.7012
H3N1- O2 (22- 3)	1.8141	-.3672	.4260	-.8268
H1C3- O2 (23- 3)	3.6333	-.7985	.5741	-.1813
HO3 - O2 (35- 3)	2.3896	.8273	.5419	.1481
O4 - O3 (5- 4)	2.5247	-.9303	.3575	-.0821
H3N1- O3 (22- 4)	3.7811	-.6524	-.1245	-.7475
HO3 - O3 (35- 4)	.9899	.1780	.0519	-.9827
N1 - O4 (9- 5)	3.5503	-.0369	-.2246	-.9738
N4 - O4 (12- 5)	3.5956	-.7602	.6316	.1522
C3 - O4 (15- 5)	3.4202	-.6446	.0583	-.7623
H2N1- O4 (21- 5)	3.3280	.1324	.0200	-.9910
H3N1- O4 (22- 5)	2.9598	-.0399	-.4639	-.8850
H1C3- O4 (23- 5)	2.9500	-.7976	-.0204	-.6028
H2C3- O4 (24- 5)	3.0737	-.5698	.3330	-.7513
H1N4- O4 (31- 5)	3.4796	-.9109	.3601	.2014
H2N4- O4 (32- 5)	3.9098	-.6898	.6320	.3532
HO3 - O4 (35- 5)	2.7723	.9108	-.3070	-.2761

B Liste over benyttede dataprogrammer

Dette er en liste med en kort beskrivelse over diverse dataprogrammer som er benyttet i denne masteroppgaven.

BJSIMPRO

Program som enkelt simulerer EPR-spektre ut fra gitte hyperfinkoblinger, skrevet av B. Jansen og E. Sagstuen, Fysisk Institutt, Universitet i Oslo (1989; 1996).

Chemcraft 1.4 beta

Program som kan vise og redigere 3-dimensjonale molekylstrukturer, skrevet av G. A. Zhurko. www.chemcraftprog.com

ChemDraw Std 7.0

Et Camebridge Soft Corporation program som gjør det enkelt å tegne kjemiske strukturformler. www.camebridgesoft.com

Elexys 560

Et program som konverterer eksperimentelle datafiler til datafiler for WinEPR, skrevet av T. Wasowicz (2004).

Gaussian03

En kvantekjemisk programpakke som blant annet inneholder DFT-algoritmer. Gaussian, Inc [42]. www.gaussian.com

GaussView

Et 3-D molekylprogram som viser Gaussian03-filer. www.gaussian.com

KVASAT

Program som kan simulerer EPR-spektre ut fra gitte hyperfinkoblings- og g-tensorer [50, 51].

KRYSTMOD fra ESRLIB

Program som beregner diverse krystallkoordinater [18].

 MAGCALC

MAGCALC beregner teoretiske resonanslinjevariasjoner ut fra beregnede hyperfinkoblingstensorer [63].

 MAGRES

MAGRES beregner hyperfinkoblingstensorer med prinsipalverdier og egenvektorer [25].

 MATLAB

Matematisk programpakke. www.mathworks.com

 Microsoft Office 2003

Word er tekstbehandlingsprogrammet denne oppgaven er skrevet i. Excel er et nyttig og brukervennlig regnearkprogram. www.microsoft.com

 Origin

Et hendig plotteprogram fra OriginLab Corporation. www.originlab.com

 TextPad

Hendig enkelt tekstprogram. www.text-pad.com

 TRIORD

Program som beregner g- og hyperfinkoblingstensorer til tredje ordens perturbasjonsteori [24].

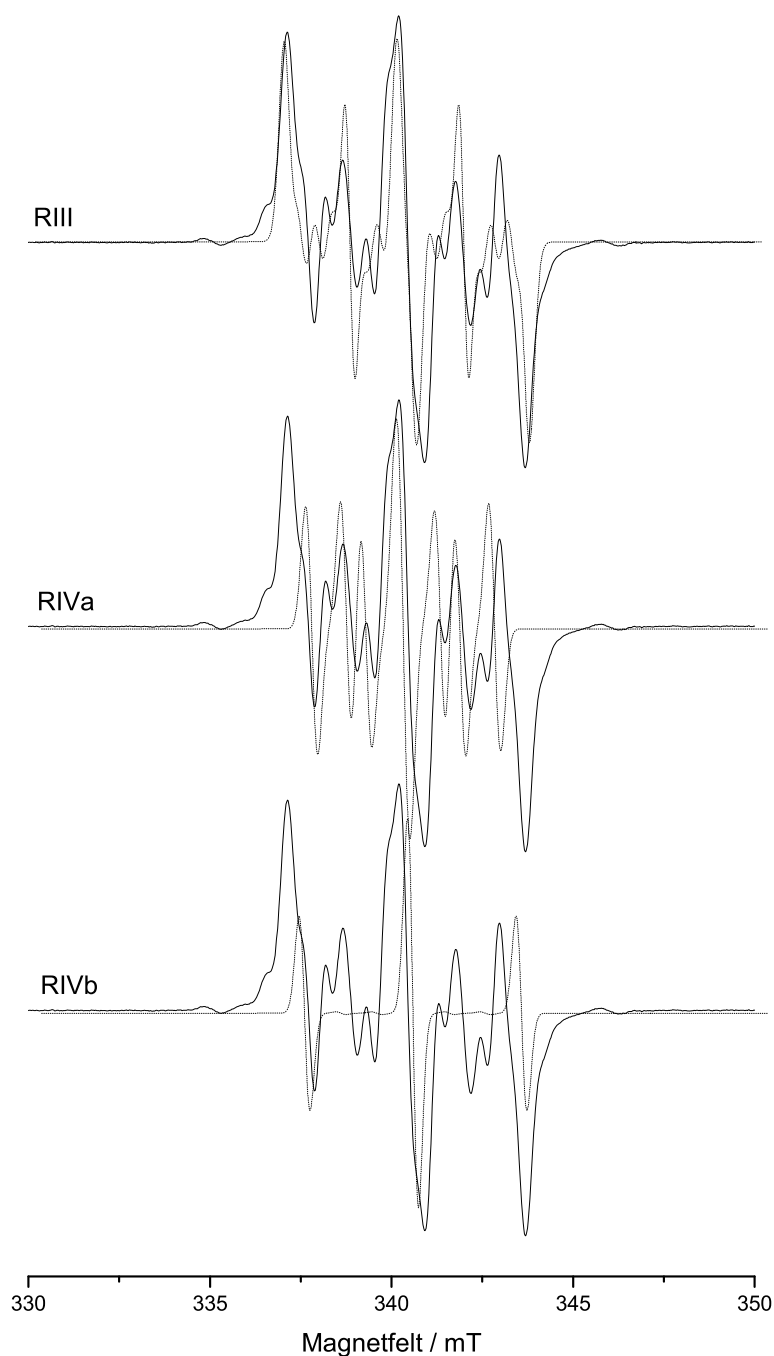
 WebLab ViewerPro 3.7

Program som tegner 3-D molekylstrukturer, fra Molecular Simulations Inc.

WinEPR

Program fra BRUKER hvor innsamlede EPR-, ENDOR- og EIE-spektre kan viderebehandles og listes som datafiler. Bruker-Frantzen Analytik GmbH (1996).

C Vedlegg



Figur V1: Eksperimentelt EPR-spekter (heltrukken linje) sammenlignet med simulerte 1.deriverte EPR-spektre (stiplet linje) for koblingene assosiert til radikalene RIII, RIVa og RIVb. Orienteringen er ved $B \parallel \langle b \rangle$. Magnetfeltskalaen tilsvarer en mikrobølgefrekvens på 9,5346 GHz. Midtpunktet for de simulerte spektrene varierer for de ulike radikalene. Med utgangspunkt i det simulerte spekteret for RIII kan man se at g -verdien for det simulerte spekteret til RIVb er litt mindre, mens g -verdien til det simulerte spekteret til RIVa er enda litt mindre igjen. Det kan dermed tenkes at noe forskjellig g -verdi for de ulike romtemperaturredikalene er grunnen til den noe dårlige tilpassningen mellom simulert og eksperimentelt EPR-spekter ved $B \parallel \langle b \rangle$ i figur 4.16.

