

Spektroskopische Strukturaufklärung in der Gasphase

◆ Die Spektroskopie molekularer Systeme in der Gasphase ist ein aktuelles Forschungsgebiet, das mit Lasertechnik erstaunlich detaillierte Einblicke in die Gestalt von freien Molekülen und Molekülaggregaten liefert.

Folgende technische und methodische Neuerungen haben die Erkenntnisse ermöglicht:

- stabile Lasersysteme mit hoher spektraler oder zeitlicher Auflösung,
- intensive, durchstimmbare Lichtquellen für den IR-Bereich,
- die Kopplung von IR- und UV-Laseranregung,
- die Kombination von UV-Anregung und Massenspektrometrie,
- die Laserverdampfung und die Molekularstrahl-Technik zur Bereitstellung und Abkühlung von Proben in der Gasphase.

Dazu kommt das hohe Niveau von Ab-initio-Berechnungen, das entscheidend für Analyse und Zuordnung der Spektren ist.

Mit diesem Instrumentarium lassen sich nun Fragen an bioaktiven Molekülen bearbeiten, die noch vor zehn Jahren als utopisch für die Gasphase galten: Welche intrinsischen Sekundärstrukturelemente haben Peptide, wie bilden sich intermolekulare Strukturen, und auf welchen Prinzipien beruht molekulare Er-

kennung? Welchen Einfluss haben ein oder wenige Solvatmoleküle, und wo liegen die Bindungsstellen? Welches sind die stabilsten Konformere, und welche dynamischen Prozesse sind möglich?

Genetik und hochauflösende Spektroskopie

◆ Wie passen die komplexen Prozesse der Weitergabe des Erbguts und die reduktionistische Herangehensweise rotationsauflösender Spektroskopie zusammen? Zum einen hat die Anwendung genetischer Algorithmen (GA), also mathematischer Verfahren, welche die genetische Evolution nachbilden, die Analyse rotationsaufgelöster UV-Spektren entscheidend beschleunigt und die Zuordnung sehr dichter Spektren erst ermöglicht.¹⁾ Zum anderen rücken zunehmend die molekularen Bausteine der DNA und der codierten Peptide ins Licht dieser Methode.

Mit einem durchstimmbaren CW-Ring-Farbstofflaser wurde das Fluoreszenz-Anregungsspektrum eines Aggregates aus Tryptamin (Tryptophan-Analog) und H₂O im Molekularstrahl bei ca. 1 K aufgenommen. Im Vergleich zum reinen Tryptamin, für das sechs Konformationen gefunden wurden, kollabiert beim Wasser-Komplex der Konformationsraum, und nur die Gpy(out)-Konformation ist zu beobachten.^{2a)} Das Spektrum des Phenol-Dimers wurde ebenfalls durch einen GA interpretiert, obwohl es viele Bereiche mit überlappenden Rotationslinien enthält (siehe auch Abschnitt zur zeitaufgelösten Rotation, S. 290).^{2b)}

Dieselbe Methode wurde dazu verwendet, die Strukturänderung nach elektronischer Anregung von 4,4'-Dimethylaminobenzonitril (DMABN) zu untersuchen. Dieses Nitril ist das klassische Modellsystem für intramolekularen Ladungstransfer, manifestiert durch die anomale Fluoreszenz in Lösung. Es ergab sich eine Verdrillung und leichte Pyramidalisierung der Methylamino-Gruppe im elektronisch angeregten Zustand, was den TICT-Mechanismus (Twis-

ted Intramolecular Charge Transfer) unterstützt.³⁾

Die Kombination von schonender Laserdesorption mit Fourier-Transform-Mikrowellen-Spektroskopie öffnet den Zugang zur Untersuchung schwer verdampfbarer organischer Substanzen. So ließen sich präzise Strukturdaten verschiedener im Molekularstrahl „ausgefrorener“ Konformere des 4(S)- und 4(R)-Hydroxy-Proline bestimmen.⁴⁾

Im IR-Bereich (C-O-Streckschwingung) wurde zum ersten Mal das Schwingungs-Rotations-Spektrum des (DCOOH)₂ aufgenommen und zugeordnet. Das Ameisensäure-Dimer gilt seit den 30er Jahren als das fundamentale System für Mehrfach-Wasserstoffbrückenbindungen. Erst die neuen experimentellen Daten haben aus der Aufspaltung der Rotationslinien die Tunnelfrequenz geliefert. Sie liegt im Bereich weniger Nanosekunden, was eine Vielzahl neuer theoretischer Betrachtungen angeregt hat.⁵⁾

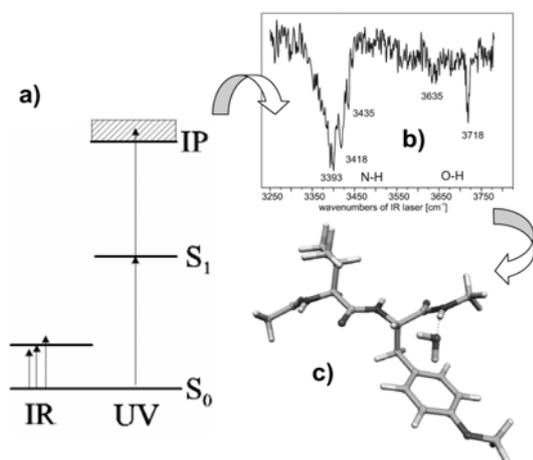
Nicht immer ist Laserspektroskopie für die Analyse molekularer Strukturen in der Gasphase erforderlich. Die FTIR-Spektroskopie eignet sich auch ohne Rotationsauflösung dazu, die H-Brücken-Topologie gemischter und großer Aggregate (bis zu nanoskaligen Systemen) aufzuklären.⁶⁾

Der IR-Fingerabdruck von Biomolekülen

◆ Die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel oder die spezifische Komplexbildung können charakteristische Verschiebungen von Schwingungsfrequenzen im IR induzieren. Große Bedeutung kommt dabei der Analyse von Wasserstoffbrückenbindungen zu. Es liegt also nahe diesen Frequenzbereich auch für die Gasphasen-Laserspektroskopie zu nutzen.

Da direkte Absorptionsmessungen aufwändig sind, hat sich ein Verfahren weit verbreitet, das IR-Absorption mit resonanter UV-Zweiphotonen-Ionisation (R2PI) über einen aromatischen Chromophor und massenspektrometrischen Nachweis kombiniert (Abbildung 1a). Die IR/R2PI-Methode ist

Abb. 1.
a) IR/R2PI-Methode,⁷⁾
b, c) IR/R2PI-Spektrum und Struktur des (Ac-Val-Tyr(Me)-NHMe)-H₂O-Komplexes.^{14b)}



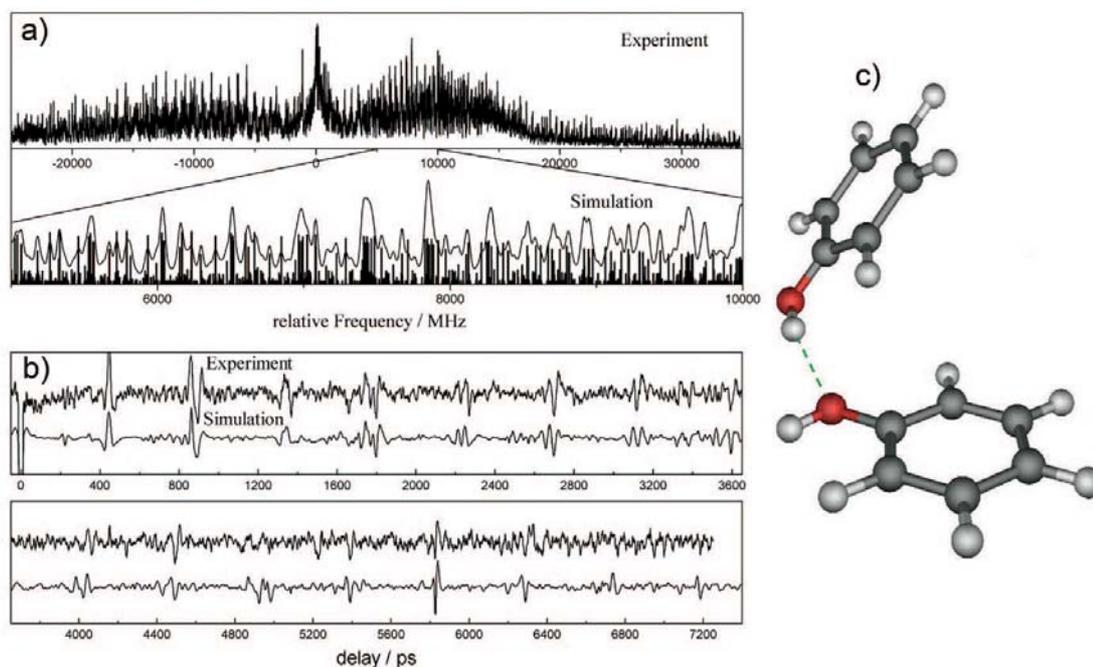


Abb. 2. Rotationsauflösende laserinduzierte Fluoreszenz (a)^{2b)} und Rotationskohärenz-Spektroskopie (b)¹⁹⁾ wurden zur Strukturuntersuchung des Phenol-Dimers (c) eingesetzt.

konformer- und massenselektiv und basiert auf der Abschwächung eines über den resonanten UV-Übergang eingestellten Ionensignals.⁷⁾ Diese Abschwächung wird durch Anregung mit einer durchstimmbaren IR-Quelle erzielt, wodurch der Grundzustand entvölkert wird. In Kombination mit dem schonenden Verfahren der Laserdesorption aus einer Graphitmatrix lassen sich schwer verdampfbare Biomoleküle in die Gasphase bringen und in einer Gasexpansion auf wenige Kelvin abkühlen.⁸⁾

Neutrale

◆ Mit der IR/R2PI-Methode wurden bereits Nucleobasen, Nucleotide, Aminosäuren und Neurotransmitter im O-H-, N-H- und C-H- Streckungsbereich (2600–3800 cm⁻¹) untersucht. In letzter Zeit stehen Komplexe dieser Bausteine im Vordergrund.

Der 2-Aminopyridin/2-Pyridon-Komplex wurde zur Nachbildung der Adenin-Thymin-Wechselwirkung in der Watson-Crick-Topologie verwendet.⁹⁾ Die N-H-Streckungsschwingung wurde für sieben deuterierte Isotopomere untersucht und zeigt teilweise eine komplizierte Struktur. Mit Dichtefunktional-Rechnungen ließen sich die Spektren aber zuordnen.

Die Mikrosolvatation eines Nucleobasenpaares (Guanin-Dimer) mit einem und zwei Wassermolekülen wurde erstmals untersucht.¹⁰⁾ Während für das freie Guanin-Dimer zwei isomere Strukturen gefunden wurden, bilden die Komplexe mit Wasser jeweils nur das Isomer mit einer dreifachen H-Brücke. Die weitere Erhöhung des Wasseranteils soll die Bildung von gestapelten Dimeren induzieren.¹⁰⁾

Die über Mehrfach-Wasserstoffbrücken verknüpfte Struktur der Nucleobasenpaare gilt als Voraussetzung für eine interne Energierelaxation nach UV-Anregung. Dieser natürliche Lichtschutzfaktor der DNA basiert auf einer Kopplung der Potentialenergieflächen des elektronisch angeregten Zustands und des Grundzustands, moduliert durch die Bewegung der Protonen in den Wasserstoffbrücken. Der Mechanismus wurde kürzlich in Experimenten am Modellsystem 2-Aminopyridin-Dimer nachgewiesen.¹¹⁾ Für Oligonucleotide in Lösung nimmt man auch eine Excimer-Bildung entlang der Nucleobasenstapel als Relaxationsmechanismus an.¹²⁾

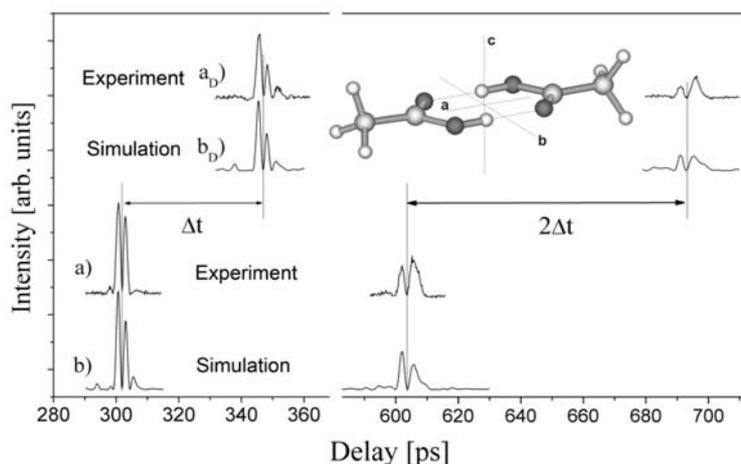
In Modellpeptiden mit bis zu drei Aminosäuren wurden Strukturelemente wie β - und γ -Schleifen sowie helikale Strukturen durch charakteristische IR-Verschiebungen nach-

gewiesen. Die Struktur der 3_{10} -Helix konkurriert schon bei Tripeptiden mit anderen möglichen intramolekularen Bindungsmustern.^{13,14)}

Detaillierte Studien wurden an den Phenyl- und Benzyl-substituierten Kohlenhydraten Mannose, Galactose, Glucose und Lactose sowie ihren Komplexen mit einem H₂O-Molekül durchgeführt. Daraus wurde ein Modell zur induzierten Kooperativität der H-Brücken sowie dem Einfluss von Glykosiden und H₂O auf den molekularen Erkennungsprozess abgeleitet.¹⁵⁾

Die Erweiterung der IR/R2PI-Spektroskopie in den Bereich der Amid-I- und -II-Bande (C-O-Streck-, N-H-Biege-Schwingung) ist entscheidend für die präzise strukturelle Untersuchung von geschützten Modellpeptiden, insbesondere für die Aufklärung von β -Faltblattstrukturen.^{16a)} Zum ersten Mal wurde ein Peptid-Wasser-Komplex untersucht (Abbildung 1b,c).^{16b)} Aus den spektroskopischen Daten zusammen mit Berechnungen der Struktur lassen sich molekulare Template, wie substituierte Amino-Pyrazole zur Blockierung der β -Faltblatt-Bildung entwickeln und im Gasphasen-Experiment testen. Diese Substanzen können möglicherweise als Medikamente gegen Alzheimer oder ähnliche Erkrankungen eine Rolle spielen.^{16a,b)} →

Abb. 3.
Femtosekunden-
Vierwellenmisch-
Spektren des Essig-
säure-Dimers bei
Raumtemperatur.



Ionen

◆ Von ionischen, biologisch aktiven Substanzen kann man ebenfalls IR-Spektren in der Gasphase aufnehmen. So gelang es, das Spektrum eines Proteins mit 104 Aminosäuren, des Rinderherz-Cytochrom c, im Bereich der Amid-I- und -II-Bande zu messen.¹⁷⁾ Dazu wurde das Protein mit K^+ beladen, in einer ESI-Quelle verdampft und in einem FT-ICR-Massenspektrometer gespeichert. Nach Beschuss mit kontinuierlich durchstimmbarer IR-Strahlung aus einem Freien Elektronenlaser konnte die Wellenlängenabhängigkeit der Dissoziation der K^+ -Ionen als Indikator für die IR-Absorption verwendet werden.¹⁷⁾

Durch Elektronenstoßionisation mit Gasexpansion können organische Ionen und Clusterionen in ihrem niedrigsten Energiezustand präpariert werden. Nach Massenfilterung stehen unterschiedliche Komplex-Ionen zur IR-Untersuchung zur Verfügung. Systematische Studien an A^+L_n (A^+ : Aromat, wie Benzol, Phenol, Indol; L: Ligand, wie Argon, Methanol, Wasser) brachten wertvolle Informationen zur Ionen-Ligand-Bindungsenergie und zu den unterschiedlichen intermolekularen Bindungsmotiven (H-Brücken, π - oder Ladungs-Dipol-Bindungen).¹⁸⁾ Im Vergleich zu den Strukturen neutraler Komplexe ändert sich durch die Ionisation das Verhalten des Aromaten A von hydrophob zu hydrophil. Dieses Prinzip, das dem Konzept der Reaktivitäts-Umpolung ähnelt, gilt als wichtig für den molekularen Erkennungsprozess.¹⁸⁾

Von der zeitaufgelösten Rotation zur Struktur

◆ Einen anderen Ansatz, um hochaufgelöste (Doppler-frei) spektroskopische Informationen zu erhalten, verfolgt die zeitaufgelöste Rotationskohärenz-Spektroskopie (RCS). Sie beruht auf der kohärenten Anregung vieler Rotationszustände und der folgenden Beobachtung der periodischen Bewegung (Rotationsrekurrenzen) des entsprechenden Rotationswellenpaketes in der Zeitdomäne.¹⁹⁾ Die Rotationszeiten liegen im Bereich von 10 ps bis mehrere 100 ps und werden mit ultrakurzen Laserpulsen in Form eines Anregungs-Abfrage-Experimente (Pump-Probe) abgetastet. Diese charakteristischen Zeiten sind proportional zur Molekülgröße, womit die Spektren bei zunehmender Größe zeitlich gestreckt und einfacher zu analysieren sind, im Gegensatz zu denen in der Frequenzdomäne.

In den letzten Jahren gab es hier methodische Durchbrüche, was Anwendbarkeit und Steigerung des Informationsgewinns betrifft.²⁰⁾ Moderne Festkörper-Ultrakurzzeit-Laser haben die relative Genauigkeit um eine Größenordnung auf ca. 10^{-6} verbessert, so dass Messungen für den Grundzustand und den elektronisch angeregten Zustand möglich sind. Ein massenselektives Verfahren mit Photoionisation wurde demonstriert. Neben den Rotationskonstanten können auch die Zentrifugalverzerrung, die Lage des Über-

gangsdipolmomentes und die Anisotropie der Polarisierbarkeit ermittelt werden.²⁰⁾

RCS ist komplementär zu frequenzauflösenden Methoden. Sie führt die Methode der Messung von Rotationskonstanten und der daraus resultierenden Strukturermittlung zu komplexeren Systemen fort, allerdings bei reduzierter Genauigkeit. Die Ergebnisse können zur Vorbereitung von Experimenten in der Frequenzdomäne dienen oder den Startpunkt für die Analyse von stark überlagerten Spektren definieren. Ein instruktives Beispiel ist das Phenol-Dimer. Es wurde mit Pikosekunden-Fluoreszenz-Abschwächung in einem Überschallstrahl bei 8 K (Abbildung 2b) aufgenommen.²¹⁾ Neueste Ergebnisse mit rotationsaufgelöster Fluoreszenz verfeinern und vervollständigen die Daten (Abbildung 2a). Insbesondere die Strukturänderung nach elektronischer Anregung wurde anhand von sechs Isotopomeren detailliert untersucht.^{2b)}

Durch ein neues nicht-resonantes Verfahren, das Femtosekunden entartete Vierwellenmischen,^{21, 22a,b)} ist es möglich, die Rotationskohärenz sowohl in einer Gaszelle bei Raumtemperatur als auch in einer Düsenstrahllexpansion bei wenigen 10 K zu untersuchen.^{23a,b)} Ein Beispiel ist das Dimer der Essigsäure, dessen Rotationskonstanten so erstmals



Christoph Riehn, Jahrgang 1964, studierte Chemie in Göttingen. 1992 promovierte er an der FU Berlin bei Helmut Baumgärtel und Bernd Brutschy.

1994-95 war er Postdoc bei Curt Wittig an University of Southern California. 2003 habilitierte er sich bei Bernd Brutschy in Frankfurt am Main über Rotationskohärenzspektroskopie großer Moleküle. Seit 2005 hat er eine Vertretungsprofessur für Biophysik in Frankfurt inne. Seine Arbeitsgebiete sind: IR/R2PI-Spektroskopie molekularer Aggregate, Rotationskohärenz, Femtosekunden-Vierwellenmischen, zeitaufgelöstes Photoelektronen-Imaging, Laser-Ausrichtung von Molekülen, Grenzflächenspektroskopie an Mikrotröpfchen.

spektroskopisch bestimmt wurden (Abbildung 3). Die Anwendung auf biologische Modellsysteme wird es in Zukunft erlauben, deren bevorzugte Konformation unter Gleichgewichtsbedingungen bei Raumtemperatur zu ermitteln. Zudem handelt es sich um eine Grundzustandsmethode, so dass auch Systeme mit kurzlebigen elektronischen Zuständen strukturell charakterisiert werden können.

Eine Untersuchung der oben besprochenen Protonen-Tunnel-Dynamik von Carbonsäuren bietet sich an, da die Zeitskalen der RCS-Messungen den Tunnelzeiten entsprechen und zudem die Möglichkeit besteht, Tunnelaufspaltungen innerhalb eines Zustandes zu ermitteln.

Zusammenfassung

◆ Die spektroskopische Aufklärung der intrinsischen Eigenschaften von Molekülen und Aggregaten in der Gasphase ist ein dynamisches Forschungsfeld, das sich vor allem durch das Aufgreifen von Fragen aus den Biowissenschaften fruchtbar entwickelt. Die Möglichkeit, immer komplexere Systeme zu untersuchen, schlägt die Brücke zur kondensierten Phase. So werden die Phänomene der spezifischen Solvation und Aggregation auf molekularem Niveau zugänglich.

Für die Zukunft steht für die Untersuchung von Konformeren der Schritt von der energetischen Klassifizierung zur Bestimmung der Freien Enthalpie an. Des Weiteren ist eine Entwicklung von der reinen Beobachtung von Strukturen zu deren Manipulation, z. B. der Präparation von Konformeren, vorstellbar.²⁴⁾

Christoph Riehn, Frankfurt am Main

- 1) J. A. Hageman, R. Wehrens, R. de Gelder, W. L. Meerts, L. M. C. Buydens, *J. Chem. Phys.* 2000, 113, 7955.
- 2) a) M. Schmitt, M. Böhm, C. Ratzer, C. Vu, I. Kalkman, W. L. Meerts, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 10356; b) M. Schmitt, M. Böhm, C. Ratzer, D. Krüger, K. Kleinermanns, I. Kalkman, G. Berden, W. L. Meerts, 2006, unveröffentlicht.

- 3) A. E. Nikolaev, G. Myszkiewicz, G. Berden, W. L. Meerts, J. F. Pfanstiel, D. W. Pratt, *J. Chem. Phys.* 2005, 122, 084309.
- 4) A. Lesarri, E. J. Cocinero, J. C. Lopez, J. L. Alonso, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 2572.
- 5) F. Madeja, M. Havenith, *J. Chem. Phys.* 2002, 117, 7162.
- 6) C. A. Rice, N. Borho, M. A. Suhm, *Z. Phys. Chem.* 2005, 219, 379.
- 7) a) R. H. Page, Y. R. Shen, Y. T. Lee, *J. Chem. Phys.* 1988, 88, 4621; b) C. Riehn, C. Lahmann, B. Wassermann, B. Brutschy, *Chem. Phys. Lett.* 1992, 197, 443; c) S. Tanabe, T. Ebata, M. Fujii, M. Mikami, *Chem. Phys. Lett.* 1993, 215, 347; d) R. N. Pribble, T. S. Zwier, *Science* 1994, 265, 75.
- 8) E. Nir, K. Kleinermanns, M. S. de Vries, *Nature* 2000, 408, 949.
- 9) J. A. Frey, A. Müller, H.-M. Frey, S. Leutwyler, *J. Chem. Phys.* 2004, 121, 8237.
- 10) A. Abo-Riziq, B. Crews, L. Grace, M. S. de Vries, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 2375.
- 11) T. Schultz, E. Samoylova, W. Radloff, I. V. Hertel, A. L. Sobolewski, W. Domcke, *Science* 2004, 306, 1765.
- 12) C. E. Crespo-Hernandez, B. Cohen, B. Kohler, *Nature* 2005, 436, 1141.
- 13) I. Hünig, K. Kleinermanns, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004, 6, 2650.
- 14) W. Chin, F. Piuze, J.-P. Dognon, I. Dimicoli, B. Tardivel, M. Mons, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 11900.
- 15) P. Carcabal, R. A. Jockusch, I. Hünig, L. C. Snoek, R. T. Kroemer, B. G. Davis, D. P. Gamblin, I. Compagnon, J. Oomens, J. P. Simons, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 11414.
- 16) a) M. Gerhards in *Principles of Mass Spectrometry Applied to Biomolecules*, Hrsg. Julia Laskin, Wiley, New York 2006, im Druck; b) H. Fricke, A. Gerlach, C. Unterberg, P. Rzepecki, T. Schrader, M. Gerhards, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004, 6, 4636.
- 17) J. Oomens, N. Polfer, D. T. Moore, L. van der Meer, A. G. Marshall, J. R. Eyler, G. Meijer, G. von Helden, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005, 7, 1345.
- 18) O. Dopfer, *Z. Phys. Chem.* 2005, 219, 125.
- 19) P. M. Felker, J. S. Baskin, A. H. Zewail, *J. Phys. Chem.* 1986, 90, 724.
- 20) C. Riehn, *Chem. Phys.* 2002, 283, 297.
- 21) A. Weichert, C. Riehn, B. Brutschy, *J. Phys. Chem. A*, 2001, 105, 5679.
- 22) a) H. M. Frey, P. Beaud, T. Gerber, B. Mischler, P. P. Radi, A. P. Tzannis, *Appl. Phys. B*, 1999, 8, 735; b) E. J. Brown, Q. Zhang, M. Dantus, *J. Chem. Phys.* 1999, 110, 5772.
- 23) a) V. V. Matyilitsky, C. Riehn, M. F. Gelin, B. Brutschy, *J. Chem. Phys.*, 2003, 119, 10553; b) C. Riehn, V. V. Matyilitsky, M. F. Gelin, B. Brutschy, *Mol. Phys.* 2005, 103, 1615.
- 24) J. R. Clarkson, E. Baquero, V. A. Shubert, E. M. Myshakin, K. D. Jordan, T. S. Zwier, *Science* 2005, 307, 1443.

GDCh

GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER



Karriereservice und Stellenmarkt

- ✗ Informationen rund um Arbeitsmarkt und Beruf
- ✗ Stellenmarkt in den „Nachrichten aus der Chemie“ und im Internet
- ✗ Bewerberdatenbank für Fach- und Führungskräfte aus der Chemie
- ✗ Bewerbungseminare und -workshops
- ✗ Jobbörsen
- ✗ Rechtsberatung
- ✗ Gehaltsumfrage

GDCh-Karriereservice und Stellenmarkt

Postfach 90 04 40
60444 Frankfurt am Main

Tel. 069 7917-665
Fax 069 7917-322
E-Mail karriere@gdch.de

www.gdch.de/karriere