

## Nucleobasen in der Gasphase\*\*

Walther Caminati\*

Elektronenbeugung · Laserablation · Nucleobasen ·  
Rotationsspektroskopie · Tautomerie ·  
Überschallexpansion

**B**ei der Aufklärung der konformen/tautomer Formen isolierter Biomoleküle sind in den letzten Jahren spektakuläre Ergebnisse erzielt worden. Die apparativen Methoden, die hierbei zum Einsatz kamen, umfassen: 1) kombinierte Verfahren aus resonanter Zweifarben-Zweiphotonen-Ionisation (2CR2PI), laserinduzierter Fluoreszenzanregung (LIF), resonanter Ion-Dip-IR-Spektroskopie (RIDIRS), Fluoreszenz-Dip-IR-Spektroskopie (FDIRS) und UV/UV-Lochbrennspektroskopie;<sup>[1]</sup> 2) rotationsaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenz;<sup>[2]</sup> 3) kombinierte Verfahren aus masseselektierender, konformerspezifischer UV- und IR-Doppelresonanz-Lochbrennspektroskopie und quantenchemischen Ab-initio-Rechnungen;<sup>[3]</sup> 4) IR/UV-Doppelresonanzspektroskopie;<sup>[4,5]</sup> 5) chirale Erkennung durch Massenspektrometrie;<sup>[6]</sup> 6) IR/UV-Lochbrennspektroskopie.<sup>[7]</sup>

Bei der Schwingungsspektroskopie biologischer Moleküle wurden Helium-Nanotröpfchen als Trägerphase eingesetzt,<sup>[8]</sup> wodurch eine Vereinfachung der Spektren gelingt, gleichzeitig aber ein Verlust an spektraler Information zu verzeichnen ist. Im Bereich der Rotationsspektroskopie, die ursprünglich der Untersuchung kleiner Moleküle vorbehalten war, wurden breit angelegte Untersuchungen an Biomolekülen mithilfe der Freistrahl-Millimeterwellenabsorptionstechnik durchgeführt.<sup>[9,10]</sup> In jüngerer Zeit wurde die Laserablationstechnik mit der Fourier-Transformations-Mikrowellenspektroskopie (FTMW-Spektroskopie) kombiniert,<sup>[11]</sup> um die Konformationsgleichgewichte einiger Aminosäuren<sup>[12]</sup> und die konformen/tautomer Formen von Nucleobasen aufzuklären.<sup>[13,14]</sup> Außerdem wurde über die Elektronenbeugung (ED) an verdampftem Uracil<sup>[15]</sup>, Cytosin<sup>[16]</sup> und Thymin<sup>[17]</sup> berichtet.

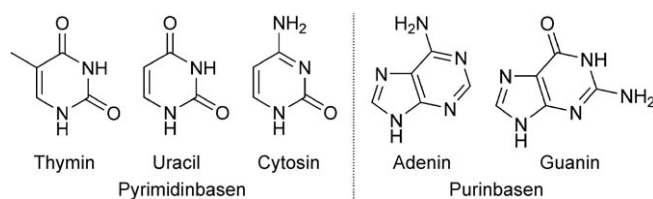
MW- und ED-Techniken liefern sicher die fundiertesten Informationen über die Struktur und Gestalt von Molekülen. Allerdings unterliegen große Biomoleküle leicht thermischen Reaktionen und Zersetzungen, wodurch sie sich einer detaillierten Untersuchung in wechselwirkungsfreien Umgebungen außerhalb der kondensierten Phase entziehen. In zwei neueren Untersuchungen der Tautomer-/Konformer-

Gleichgewichte von Nucleobasen konnte nun dieses Problem der thermischen Instabilität bei der Verdampfung durch den Einsatz der Laserablation bzw. -desorption überwunden werden. Gahlmann et al. ermittelten die Struktur von isoliertem Uracil und Guanin durch ultraschnelle Elektronenbeugung (UED)/Laserdesorption,<sup>[18]</sup> während Alonso et al. die Rotationsspektren der vier Guanintautomere mithilfe der FTMW-Spektroskopie in Verbindung mit Laserablation aufzeichneten.<sup>[13]</sup>

Die UED-Methode ist entwickelt worden, um die Strukturdynamik isolierter Moleküle in der Gasphase in räumlicher und zeitlicher Auflösung zu messen.<sup>[19]</sup> Sie wird bei der in Abbildung 1 gezeigten UED-4-Apparatur mit der Laserdesorption gekoppelt.

Das von Alonso et al.<sup>[13]</sup> eingesetzte Überschallstrahl-expansions-FTMW-Spektrometer besteht aus einem Fabry-Pérot-Resonator mit einer coaxial ausgerichteten Strahlresonatoranordnung (COBRA),<sup>[20,21]</sup> das eine Auflösung von einigen Kilohertz und eine um mehrere Größenordnungen höhere Empfindlichkeit als konventionelle MW-Spektrometer erreicht.<sup>[22]</sup> Die Resonatoren und Details zur Laserablation sind in Abbildung 2 dargestellt.

Den beiden Studien ist es gelungen, die strukturelle Charakterisierung der fünf in Schema 1 dargestellten Nuc-

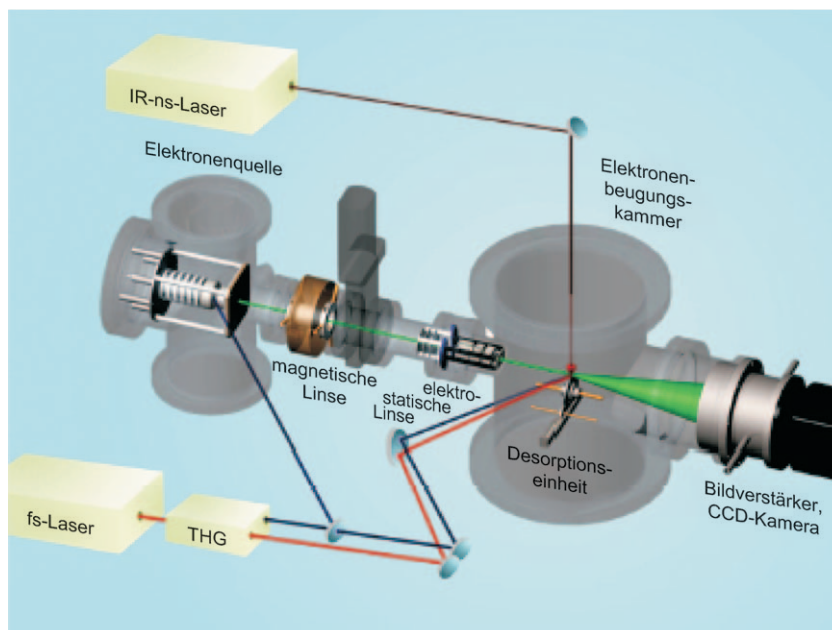


**Schema 1.** Die stabilsten Formen der fünf Nucleobasen.

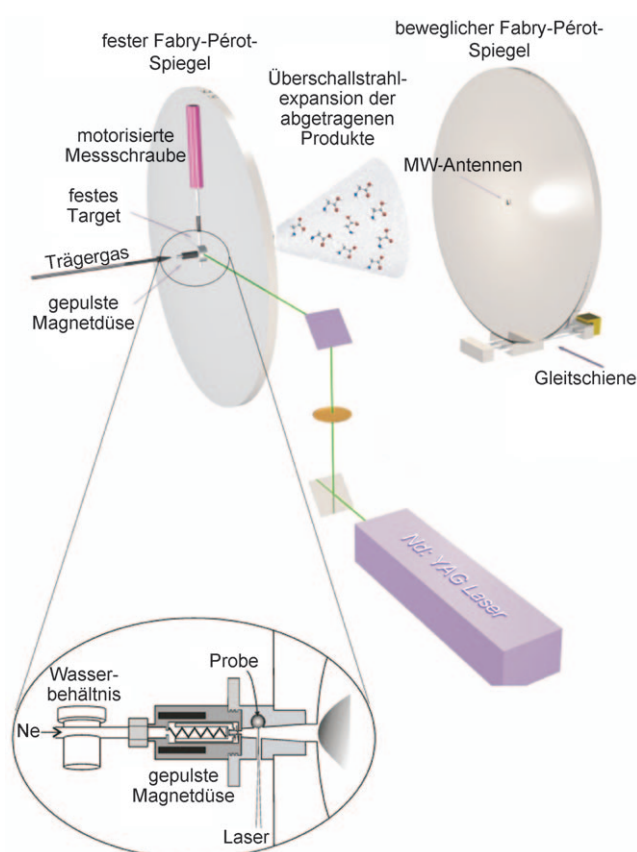
leobasen zu vervollständigen (nur die stabilsten Formen sind hier dargestellt). Diese teilen sich in zwei Gruppen: 1) Uracil, Thymin und Cytosin, die einen Pyrimidin-Kern haben, sowie 2) Adenin und Guanin mit einem Purin-Kern. Allen gemeinsam ist ein Pyrimidinring. Die Nucleobasen unterliegen einem Keto-Enol-Gleichgewicht zwischen der C<sub>Ring</sub>-OH- bzw. C<sub>Ring</sub>-NH<sub>2</sub>-Gruppe und den entsprechenden Keto- (C=O) und Iminospezies (C=NH). Der Prototyp für diese Art von Gleichgewicht ist das System 2-Hydroxypyridin/2-Pyridinon,

[\*] Prof. W. Caminati  
Department of Chemistry, University of Bologna  
Via Selmi 2, 40126 Bologna (Italien)  
Fax: (+39) 051-209-9456  
E-Mail: walther.caminati@unibo.it  
Homepage: <http://www.ciam.unibo.it/free-jets/>

[\*\*] Ich danke der Universität von Bologna für finanzielle Unterstützung.



**Abbildung 1.** Aufbau der Elektronenbeugungs-Laserdesorptions-Apparatur UED-4, die in dem in Lit. [18] beschriebenen Experiment eingesetzt wurde. CCD = ladungsgekoppeltes Bauelement (charge-coupled device), THG = Frequenzverdreifacher (third-harmonic generator).



**Abbildung 2.** Aufbau des COBRA-Überschallstrahlexpansions-FTMW-Spektrometers, das in dem in Lit. [13] beschriebenen Experiment eingesetzt wurde. Der Fabry-Pérot-Resonator und Einzelheiten der Laserablation sind dargestellt.

wobei die OH-Form um  $3.2(4) \text{ kJ mol}^{-1}$  stabiler ist.<sup>[23]</sup> Im System 4-Hydroxypyrimidin/4-Pyrimidinon ist hingegen die Ketoform um  $2.0(9) \text{ kJ mol}^{-1}$  günstiger, was bedeutet, dass die Einführung einer zweiten N/NH-Gruppe in den aromatischen Ring die Ketoform stabiler macht.<sup>[24]</sup> Das Vorhandensein einer zusätzlichen  $\text{C}_{\text{Ring}}\text{-OH/C=O}$ -Gruppe im Uracilring steigert die Stabilität der Ketoform so weit, dass im MW-Spektrum ausschließlich die Diketoform nachweisbar ist.<sup>[25]</sup>

Die drei Pyrimidinbasen waren in früheren Arbeiten von Brown et al. durch Freistrah-Millimeterwellenabsorptionsspektroskopie untersucht worden.<sup>[9,25,26]</sup> Wie im Fall des Uracils wurde im Rotationsspektrum des Thymins ausschließlich das Diketotautomer gefunden,<sup>[26]</sup> das offenbar beträchtlich stabiler ist als die Monoketoform. Beim Cytosin wurden hingegen drei Tautomere nachgewiesen: Ketamino-, Ketimino- und Hydroxyaminoform.<sup>[9]</sup> Die beiden Ketoformen sind fast isoenergetisch und um  $6 \text{ kJ mol}^{-1}$  stabiler als die Hydroxyaminospezies.

Diese Ergebnisse wurden kürzlich durch zwei Berichte über das FTMW-Spektrum des Uracils (nach Verdampfung durch Laserablation) mit präzisen  $^{14}\text{N}$ -Quadrupolkopplungskonstanten bestätigt.<sup>[27,28]</sup> Hierbei legten Brünken et al. verbesserte spektroskopische Daten für eine radioastronomische Suche vor,<sup>[27]</sup> während Vaquero et al.<sup>[28]</sup> über die Untersuchung diverser Isotopologen zu neuen Strukturinformationen gelangten. In beiden Studien wurde ausschließlich die Diketoform beobachtet. Auch Thymin wurde durch FTMW-Spektroskopie untersucht, wobei Struktureinheiten, die  $^{14}\text{N}$ -Quadrupolkopplungskonstanten und die  $\nu_3$ -Barriere der inneren Rotation der Methylgruppe ermittelt wurden.<sup>[29]</sup> Das Rotationsspektrum von Adenin (6-Aminopurin) wurde in einem geimpften Überschallstrahl durch Continuous-Wave-MW-Spektroskopie untersucht; die Übergänge wurden dem N9H-Tautomer zugeordnet.<sup>[30]</sup>

In FTMW-spektroskopischen Untersuchungen an Cytosin, die López et al. durchführten, erhöhte sich die Zahl der beobachteten Konformere/Tautomere dieser Nucleobase auf fünf.<sup>[14]</sup> ED-Analysen von Uracil,<sup>[15]</sup> Cytosin<sup>[16]</sup> und Thymin,<sup>[17]</sup> die konventionell verdampft worden waren, lieferten die Strukturen der stabilsten Spezies dieser Verbindungen.

Frühere Versuche, das Rotationsspektrum und das ED-Diagramm von Guanin aufzuzeichnen, waren wegen der thermischen Instabilität dieser Nucleobase bisher nicht erfolgreich. Die in der Arbeitsgruppe Zewail konstruierte Apparatur zur ultraschnellen Elektronenbeugung/Laserdesorption (UED-4; die Ziffer 4 bezeichnet die vierte Generation dieser Geräteform)<sup>[18]</sup> bedeutet eine beträchtliche technische Innovation, die nun die Strukturbestimmung der RNA-Nucleobase Uracil und der DNA-Nucleobase Guanin ermöglicht hat. Für die Ermittlung der unterschiedlichen konformen/tautomer Formen der Nucleobasen scheint diese Technik jedoch weniger gut befähigt zu sein als die Laserablations-FTMW-Methode. Insbesondere konnte mit UED-4 nur eines der Guanin-Konformere bestimmt werden, während mit der FTMW-Technik die vier stabilsten Formen einzeln charakterisierbar waren.

Die UED-4-Apparatur könnte nach Einschätzung der Autoren zur Erforschung von Konformationsänderungen und Gesamtstrukturmotiven in anderen isolierten Biomolekülen wie Polypeptiden oder gar funktionellen Proteinen eingesetzt werden. Dies erscheint sehr ambitioniert, zumal im Fall des Guanins im relevanten Energiefenster zwischen 0 und 400 cm<sup>-1</sup> lediglich eine von vier Molekülspezies strukturell zu charakterisieren war.

Demgegenüber ermöglichte die von Alonso et al. beschriebene Laserablations-FTMW-Technik die Charakterisierung der Schwingungsgrundzustände der vier stabilsten Formen des Guanins<sup>[13]</sup> bzw. fünf stabilsten Formen des Cytosins.<sup>[14]</sup> Im Fall des Cytosins konnten die einzelnen Formen anhand ihrer charakteristischen <sup>14</sup>N-Quadrupolkopplungskonstanten, die als „Fingerabdruck“ der jeweiligen Konformere/Tautomere dienen, zugeordnet werden. Die Effizienz dieser Methode wurde in weiteren eindrucksvollen Konformationsstudien mehrerer Aminosäuren illustriert, so wurden z. B. sieben Konformere des Serins charakterisiert.<sup>[12]</sup> Ein weiterer Vorteil der MW-Methoden besteht darin, dass ein bestimmtes Rotationsspektrum aus einer Mischung hunderter Rotationsspektren herausgefiltert werden kann, während etwa ED-Methoden relativ schwer zwischen chemischen Spezies unterscheiden können.<sup>[18]</sup>

Abschließend sei die kürzliche Entwicklung eines Breitband-FTMW-Spektrometers erwähnt, das einen bedeutenden Durchbruch im Bereich der Rotationsspektroskopie darstellt.<sup>[31]</sup> Mit dieser Technik ist es z. B. gelungen, die Rotationsspektren von 15 Konformeren des 1-Octens aufzunehmen.<sup>[32]</sup>

Durch die Kopplung der molekularen Rotationsspektroskopie mit einer abstimmbaren Laseranregung ist es auch möglich, die Kinetik von Isomerisierungen im Pikosekundenbereich zu messen.<sup>[33]</sup> In Verbindung mit der Laserablation sollte diese Methode für dynamische Untersuchungen von radikalischen Zwischenstufen, Molekülkomplexen und

konformativ/tautomer flexiblen Biomolekülen einsetzbar sein.<sup>[34]</sup>

Eingegangen am 3. Juni 2009,

veränderte Fassung am 10. August 2009

Online veröffentlicht am 23. Oktober 2009

- [1] B. C. Dian, A. Longarte, T. S. Zwier, *Science* **2002**, 296, 2369.
- [2] D. W. Pratt, *Science* **2002**, 296, 2347–2348.
- [3] P. Çarçabal, 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, 11414–11425.
- [4] W. Chin, F. Piuze, J.-P. Dognon, I. Dimicoli, B. Tardivel, M. Mons, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11900–11901.
- [5] J. M. Bakker, C. Plützer, I. Hünig, T. Häber, I. Compagnon, G. von Helden, G. Meijer, K. Kleinermanns, *ChemPhysChem* **2005**, 6, 120–128.
- [6] G. Fago, A. Filippi, A. Giardini, A. Laganà, A. Paladini, M. Speranza, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4175–4178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4051–4054.
- [7] A. Abo-Riziq, L. Grace, E. Nir, M. Kabelac, P. Hobza, M. S. de Vries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 20–23.
- [8] F. Dong, R. E. Miller, *Science* **2002**, 298, 1227–1230.
- [9] Siehe z. B.: R. D. Brown, P. D. Godfrey, D. McNaughton, A. P. Pierlot, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2308–2310, zit. Lit.
- [10] Siehe z. B.: W. Caminati, G. Maccaferri, P. G. Favero, L. B. Favero, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, 251, 189–192, zit. Lit.
- [11] A. Lesarri, S. Mata, J. C. López, J. L. Alonso, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, 74, 4799–4804, zit. Lit.
- [12] S. Blanco, M. E. Sanz, J. C. López, J. L. Alonso, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 20183–20188.
- [13] J. L. Alonso, I. Peña, J. C. López, V. Vaquero, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 6257–6259; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6141–6143.
- [14] I. Peña, V. Vaquero, J. L. Alonso, J. C. López, 64th International Symposium on Molecular Spectroscopy, The Ohio State University, Columbus, Ohio (USA), 22.–26. Juni 2009, Lecture TA02.
- [15] G. Ferenczy, L. Harsányi, B. Rozsondai, I. Hargittai, *J. Mol. Struct.* **1986**, 140, 71–77.
- [16] D. Shorokhov, Dissertation, Universität Oslo, **2000**.
- [17] N. Vogt, L. S. Khaikin, O. E. Grikin, A. N. Rykov, J. Vogt, *J. Phys. Chem. A* **2008**, 112, 7662–7670.
- [18] A. Gahlmann, S. T. Park, A. H. Zewail, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2806–2808.
- [19] S. T. Park, A. Gahlmann, A. H. Zewail, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9638–9641; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9496–9499.
- [20] J.-U. Grabow, W. Stahl, *Z. Naturforsch. A* **1990**, 45, 1043–1044.
- [21] J.-U. Grabow, W. Stahl, H. Dreizler, *Rev. Sci. Instrum.* **1996**, 67, 4072–4084.
- [22] „Microwave Spectroscopy: Experimental Techniques“: J.-U. Grabow, W. Caminati in *Frontiers of Molecular Spectroscopy* (Hrsg.: J. Laane), Elsevier, Dordrecht, **2008**, Kap. 15.
- [23] L. D. Hatherley, R. D. Brown, P. D. Godfrey, A. P. Pierlot, W. Caminati, D. Damiani, S. Melandri, L. B. Favero, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 46–51.
- [24] R. Sanchez, B. M. Giuliano, S. Melandri, L. B. Favero, W. Caminati, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6287–6290.
- [25] R. D. Brown, P. D. Godfrey, D. McNaughton, A. P. Pierlot, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2329–2330.
- [26] R. D. Brown, P. D. Godfrey, D. McNaughton, A. P. Pierlot, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 37–38.
- [27] S. Brünken, M. C. McCarthy, P. Thaddeus, P. D. Godfrey, R. D. Brown, *Astron. Astrophys.* **2006**, 459, 317–320.
- [28] V. Vaquero, M. E. Sanz, J. C. López, J. L. Alonso, *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 3443–3445.

- [29] J. C. López, M. I. Peña, M. E. Sanz, J. L. Alonso, *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 191103.
- [30] R. D. Brown, P. D. Godfrey, D. McNaughton, A. P. Pierlot, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *156*, 61–63.
- [31] G. G. Brown, B. C. Dian, K. O. Douglass, S. M. Geyer, S. T. Shipman, B. H. Pate, *Rev. Sci. Instrum.* **2008**, *79*, 053103.
- [32] J. M. Fisher, L.-H. Xu, R. D. Suenram, B. H. Pate, K. Douglass, *J. Mol. Struct.* **2006**, *795*, 143–154.
- [33] B. C. Dian, G. G. Brown, K. O. Douglass, B. H. Pate, *Science* **2008**, *320*, 924–928.
- [34] **Anmerkung bei der Korrektur:** Eine jüngste Studie beschreibt die eindeutige Identifizierung zweier tautomerer Guaninspezies in den Core-Level-Photoemissions- und Nahkanten-Röntgen-photoabsorptionsspektren: O. Plekan, V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, G. Vall-Ilosera, K. C. Prince, A. B. Trofimov, I. L. Zaytseva, T. E. Moskovskaya, E. V. Gromov, J. Schirmer, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 9376–9385.

## Analysieren Sie richtig!



### VERONIKA R. MEYER Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie

10., vollst. überarb. u. erw. Aufl.

ISBN: 978-3527-32046-2  
Februar 2009 396 S. mit 211 Abb. Broschur  
€ 59,90

Der Klassiker unter den HPLC Büchern jetzt in 10. Auflage. Mit vielen aktuellen Themen und Ergänzungen ein Muss für alle Anwender.

Anwender der HPLC benötigen ein breites theoretisches und praktisches Wissen. In diesem Standardwerk wird beides vermittelt. Es erklärt Theorie, apparative Grundlagen, die verschiedenen HPLC-Prinzipien. In der neuen Auflage wurden viele neue Techniken der letzten Jahre, z.B. Laser Induced Fluorescence, Hydrophilic Interaction Chromatography und Comprehensive 2D-Chromatography, aufgenommen.

#### Rezensionen zur neunten Auflage:

Hier findet man auf einen Blick das Praxiswissen, was man sich sonst mühsam zusammensuchen muss.“  
[www.chemieonline.de](http://www.chemieonline.de)



### VERONIKA R. MEYER Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern

3., überarb. u. erw. Aufl.

ISBN: 978-3527-31268-9  
2006 194 S. mit 94 Abb. Broschur € 49,90

Wer mit der HPLC arbeitet, hat mit einer Vielzahl von Fallstricken und Fehlerquellen zu tun. Mit 13 neuen Beispielen schildert Veronika Meyer in dieser dritten Auflage fast 100 dieser Probleme.

Alle Beispiele werden mit einem knappen, aussagekräftigem Text und einer informativen Abbildung dargestellt. Jeder Anwender findet so schnell heraus, wie er Fehlerquellen beseitigen und Fallstricken aus dem Weg gehen kann.

„Eine praxisnahe Hilfe für zuverlässige und richtige Analysenergebnisse!“ *sicher ist sicher*

#### Engl. Ausgabe:

VERONIKA R. MEYER  
**Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures**  
2., überarb. u. erw. Aufl.

ISBN: 978-3527-31372-3  
2006 199 S. mit 87 Abb. Broschur € 47,90



Wiley-VCH, Kundenservice, Postfach 10 11 61, D-69451 Weinheim, Germany  
Tel.: +49 (0) 6201 606-400, Fax: +49 (0) 6201 606-184  
E-Mail: [service@wiley-vch.de](mailto:service@wiley-vch.de), [www.wiley-vch.de](http://www.wiley-vch.de)

**WILEY-VCH**