

FTIR-spektroskopische Untersuchungen zur Aggregation von Nukleobasen in Lösung und zur rovibratorischen Spektrenstruktur organischer Moleküle in der Gasphase

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lars Biemann

aus Oldenburg

Düsseldorf, April 2011

Aus dem Institut für Physikalische Chemie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl Kleiner
Koreferent: PD. Dr. Michael Schmitt
Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2011

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ohne deren Beistand und Hilfe diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Karl Kleinermanns danken für die Betreuung und Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die fruchtbare Arbeitsatmosphäre, die erfolgreiche Publikationen und die vorliegende Arbeit überhaupt erst ermöglichte.

Herrn Priv. Doz. Dr. Michael Schmitt danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats, sowie für die Unterstützung durch den Einsatz evolutionärer Algorithmen bei der Analyse des Infrarotspektrums von Pyrazin und ebenso für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Klaus Schaper und Frau Dr. Daniela Maydt für die synthetischen Arbeiten bei der Derivatisierung von Adenin und Cytidin.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Thomas Häber nicht nur für die Entwicklung und Umsetzung der Methoden zur Spektreninterpretation in laufende Software sondern insbesondere für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Die vielen Anregungen und Ratschläge haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die Hilfe bei allen elektronischen Problemen oder wenn gerade wieder irgendetwas fehlte, danke ich Klaus Kelbert, Dieter Marx und Rolf Linder.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Mechanischen Werkstätten für die großen und kleinen technischen Bauteile, die dort Gestalt annahmen.

Meinen Kollegen in der Physikalischen Chemie I (Markus Böning, Christian Brand, Michaela Braun, Laura Buschhaus, Matthias Busker, Gernot Engler, Katharina Hunger, Olivia Oeltermann, Daniel Ogermann, Anna Pfeifer, Dominika Radziejewski, Benjamin Stuhlmann, Kai Seefeld und Thorsten Wilke) danke ich für das freundschaftliche Klima und die gute und kameradschaftliche Zusammenarbeit sowie für die vielen kleinen Dinge zwischen Büro und Labor, die den Alltag zu einer guten Zeit werden lassen.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie für ihre anhaltende Unterstützung und Liebe und meinen Freunden für ihre Anteilnahme und ihren Beistand auch in schwierigeren Zeiten. Ihr wisst, wer ihr seid.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Quantenmechanische Konzepte	5
2.1.1	Wellenfunktion und SCHRÖDINGER-Gleichung	5
2.1.2	Der molekulare HAMILTON-Operator	6
2.1.3	BORN-OPPENHEIMER Näherung	8
2.2	Molekülschwingungen	9
2.2.1	Zweiatomige Moleküle	10
2.2.2	Schwingungen mehratomiger Moleküle	12
2.2.3	Normalschwingungen	13
2.3	Quantenchemische Rechnungen	16
2.3.1	HARTREE-FOCK-Theorie und Molekülorbitale	17
2.3.2	Dichtefunktionaltheorie	23
2.3.3	Geometrieoptimierung und Normalkoordinatenanalyse	27
2.4	FTIR-Spektroskopie	29
2.4.1	Messprinzip eines MICHELSON-Interferometers	29
2.4.2	Evaluierung der IR-Spektren in Flüssigphase	33
3	Experimentelles	39
3.1	Apparativer Aufbau	39
3.2	Verwendete Chemikalien	44
4	Veröffentlichungen	47
4.1	α , ω -Diphenylpolyenes	48
4.1.1	Introduction	50

4.1.2	Experimental and theoretical methods	50
4.1.3	Results	52
4.1.4	Discussion	56
4.1.5	Conclusions	58
4.1.6	Supplementary material	59
4.2	Analysis of the FTIR spectrum of pyrazine	61
4.2.1	Introduction	63
4.2.2	Methods	64
4.2.3	Results and Discussion	65
4.2.4	Conclusions and Outlook	74
4.3	1-Cyclohexyluracil Aggregates in CDCl ₃	77
4.3.1	Introduction	79
4.3.2	Methods	79
4.3.3	Results	82
4.3.4	Discussion	86
4.3.5	Summary	87
4.4	Structural Assignment of Adenine Aggregates in CDCl ₃	88
4.4.1	Introduction	90
4.4.2	Experiment	91
4.4.3	Calculations	92
4.4.4	Results	94
4.4.5	Discussion	98
4.4.6	Conclusions	99
4.5	FT-IR Spectroscopy of 2'-Deoxycytidine in CDCl ₃	108
4.5.1	Introduction	110
4.5.2	Experimental Methods	112
4.5.3	Computational Methods	113
4.5.4	Results and Discussion	114
4.5.5	Conclusions	126
4.5.6	Supplementary material	126
5	Zusammenfassung und Ausblick	129
5.1	Zusammenfassung	129

INHALTSVERZEICHNIS

ix

5.2 Diskussion der Methode zur Spektrenzerlegung 133

5.3 Ausblick 135

Literaturverzeichnis

137

Kapitel 1

Einleitung

Infrarotspektroskopie stellt seit langen Jahren eine etablierte Technik zur Untersuchung von Molekülschwingungen und -rotationen dar, die insbesondere struktursensitiv ist. In Kombination mit Ergebnissen aus quantenchemischen Rechnungen lassen sich wertvolle Einsichten in die Strukturen sowohl einzelner Moleküle als auch von Molekülaggregaten gewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden spezielle experimentelle Methoden und theoretische Verfahren zur Datenanalyse aus dem Bereich der Infrarotspektroskopie vorgestellt. Diese wurden neu entwickelt und angewandt, um Systeme zu untersuchen, die bisher nicht zugänglich waren, oder um auf neuartige Weise Informationen aus Infrarotspektren zu gewinnen.

Da Messungen von Molekülen in der Gasphase nicht durch Wechselwirkungen mit Lösungsmittelmolekülen beeinflusst werden, stellen sie den direktesten Zugang zu den intrinsischen molekularen Eigenschaften wie den Frequenzen der Normalschwingungen oder den Trägheitsmomenten der Rotationen dar. Sie bilden damit auch ideale Referenzwerte für quantenchemische Methoden zur Geometrieoptimierung. Allerdings können nur thermisch stabile Moleküle, die gleichzeitig flüchtig genug sind, durch einfaches Erhitzen in ausreichenden Mengen ohne Zersetzung direkt in die Gasphase überführt werden. Häufige Zersetzungsmechanismen sind z.B. die Abspaltung von Kohlendioxid aus Carboxylgruppen, wie sie beim Erhitzen von Aminosäuren zu beobachten ist, oder das partielle Polymerisieren von Verbindungen, die eine große Anzahl ungesättigter Bindungen enthalten.

Eine Gruppe von Biomolekülen, die insbesondere aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften von großem Interesse ist, sind die Carotinoide.[1, 2, 3, 4, 5] Diese zeichnen sich allerdings durch ein langkettiges System konjugierter Doppelbindungen aus und sind gleichzeitig nicht flüchtig. Das prominenteste Beispiel für ein Carotinoid mit großer biologischer Relevanz ist das Retinal, das den lichtempfindlichen Chromophor des Rhodopsins im menschlichen Auge darstellt und über eine photoinduzierte *cis-trans*-Isomerisierung die Umwandlung eines Lichtsignals in einen Nervenreiz auslöst.[6, 7, 8, 9] Um die Eigenschaften und Funktionen komplexer Biomoleküle im Labor nachvollziehen und studieren zu können, werden häufig zunächst sogenannte Modellsysteme verwendet, die dem Biomolekül strukturell ähneln, jedoch weniger komplex und leichter zu handhaben sind. Für Carotinoide stellen z.B. α , ω -Diphenylpolyene ein solches Modellsystem dar.[10]

Neben *cis*- und *trans*-Stilben als einfachsten Vertretern dieser Verbindungsklasse werden im Rahmen dieser Arbeit auch die nachfolgenden Homologen Diphenylbutadien und Diphenylhexatrien, die nicht vollständig thermisch stabil sind, erstmals in der Gasphase mittels IR-Spektroskopie untersucht. Diese Messungen werden durch Verwendung einer evakuierbaren Messzelle ermöglicht, die speziell für die möglichst zersetzungsfreie sprunghafte Verdampfung organischer Moleküle konstruiert wurde.[11] Die Ergebnisse dieser Messungen ermöglichen es, im Vergleich mit theoretischen Frequenzrechnungen, IR-Absorptionen zu identifizieren, die charakteristisch für *cis*-Isomere sind, wie in Abschnitt 4.1 ausgeführt.

Zusätzlich zur reinen Schwingungsstruktur kann aus IR-Spektren eine Vielzahl weiterer Informationen abgeleitet werden, die in der Rotationssubstruktur der Banden enthalten sind. [12, 13, 14] Der Bandentyp spiegelt die Richtung der Änderung des Dipolmoments während der Schwingung wider und enthält somit Informationen über die Molekülstruktur. Die Kenntnis des Bandentyps kann folglich hilfreich sein für die Unterscheidung zwischen Konformeren, wenn diese lokale Schwingungen mit verschiedenen Bandentypen aufweisen.

Am Beispiel Pyrazin wird in der vorliegenden Arbeit für Moleküle mittlerer Größe gezeigt, dass das Auflösungsvermögen eines kommerziellen Standard-IR-Spektrometers, das keine vollständige Auflösung der Rotationslinien bietet, ausreichend ist, um derartige Informationen abzuleiten.[15] Hierzu wird auf automatisierte Zuordnungstechniken

zurückgegriffen, die sonst im Bereich der hochauflösenden Laserspektroskopie zum Einsatz kommen. [16, 17, 18] Dabei wird computergestützt das experimentelle Spektrum mit einem simulierten Spektrum verglichen, das unter Einsatz von evolutionären Algorithmen solange variiert wird, bis eine hinlängliche Übereinstimmung erreicht ist. Die Untersuchung von Pyrazin besitzt Modellcharakter, da aufgrund der hohen Symmetrie in der zugehörigen Punktgruppe D_{2h} nur reine a, b oder c-Typ Banden auftreten. Der Bandentyp kann mit Hilfe der Fitprozedur eindeutig bestimmt werden und ermöglicht eine Zuordnung von Fundamentalschwingungen und Kombinationsbanden basierend auf Symmetrie und Rotationskonstanten.

Trotz begrenzter Auflösung ist es möglich, eine Vielzahl intrinsischer molekularer Größen aus IR-Spektren abzuleiten, wie die Rotationskonstanten im Grund- und angeregten Zustand, die Absolutwerte der Winkel zwischen den Hauptträgheitsachsen und den Änderungen der Dipolmomente, sowie für einzelne Schwingungen die Zentrifugalverzerrungskonstanten.

Der größte Teil dieser Arbeit ist jedoch nicht intrinsischen Eigenschaften einzelner isolierter Moleküle in der Gasphase gewidmet, sondern den Wechselwirkungen zwischen gelösten Molekülen in der flüssigen Phase. Intermolekulare Wechselwirkungen spielen bei der Betrachtung von biologischen Systemen eine entscheidende Rolle und sind ein maßgeblicher Faktor für die Struktur von Proteinen [19, 20] und der Helix der Desoxyribonukleinsäure (DNS). [21, 9]

Die DNS stellt ein äußerst komplexes Makromolekül dar, dessen Struktur von einer Vielzahl von Parametern bestimmt wird, wie durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den gepaarten DNS-Basen, Stapelwechselwirkungen zwischen übereinander liegenden Basen, durch elektrostatische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen, entropische Effekte aber auch hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen mit dem umgebenden Lösungsmittel. Dabei nehmen die Wasserstoffbrückenbindungen, die im Fokus dieser Arbeit stehen, eine besondere Rolle ein. Sie sind für die biologische Funktion der DNS von Bedeutung, weil sie einerseits aufgrund ihrer mittleren Bindungsstärke unter physiologischen Bedingungen relativ leicht ausgebildet und wieder gebrochen werden können. [22] Andererseits handelt es sich bei der Wasserstoffbrückenbindung trotz ihrer relativen Schwäche um eine gerichtete Wechselwirkung, wie es sonst nur bei kovalenten chemischen Bindungen der Fall ist.

Eine wichtige Voraussetzung für ein Verständnis der Wechselwirkungen im Makromolekül DNS sind die Wechselwirkungen, die zwischen den einzelnen Nukleobasen auftreten. Daher wird der Ansatz verfolgt zu untersuchen, welche Strukturen ausgebildet werden, wenn freie Nukleobasen aggregieren, die nicht über ein Zucker-Phosphat-Rückgrat verbunden sind. Um die Bedingung zu simulieren, die innerhalb der DNS anzutreffen sind und um die Aggregation via Wasserstoffbrückenbindungen zu fördern, wird dabei deuteriertes Chloroform als Lösungsmittel eingesetzt. Während in der DNS in der Regel nur die WATSON-CRICK Anordnung [21] der Basenpaare möglich ist, können bei freien Nukleobasen eine Vielzahl von Strukturen nebeneinander vorliegen und auch die Bildung größerer Aggregate ist möglich. Aufgrund der zu erwartenden Komplexität wird im Rahmen dieser Arbeit zunächst nur die Homoaggregation der einzelnen Nukleobasen bzw. Nukleoside untersucht. Dazu wurde eine neuartige Methode zur Analyse der Spektrendaten aus Messungen bei unterschiedlichen Probenkonzentrationen entwickelt. Dabei werden die Spektrenanteile extrahiert, die jeweils von einer Aggregatgröße, d.h. von Monomeren, Dimeren, Trimeren etc. hervorgerufen werden, indem über den gesamten Spektralbereich der wellenlängenabhängige Extinktionskoeffizient für die jeweilige Aggregatgröße bestimmt wird. In einem zweiten Schritt erfolgt die Zuordnung der berechneten Aggregatstrukturen zu den extrahierten Spektren. Die dabei auftretenden Aggregatstrukturen kommen nicht in der korrekt gepaarten natürlichen DNS vor, jedoch können bei einer fehlerhaften Basenpaarung ähnliche Geometrien und Anordnungen von Wasserstoffbrückenbindungen auftreten. Auch für die Stabilisierung von RNA-Strängen über Haarnadelschleifen, bei denen nicht zwangsläufig WATSON-CRICK-Paarungen gebildet werden können, sind derartige Strukturen von Interesse. Das Auftreten solcher Strukturen ist des Weiteren nicht auf Einzelstränge beschränkt. Gepaarte DNS-Stränge können über die Ausbildung zusätzlicher nicht typischer Wasserstoffbrücken weitere Nukleobasen binden und dadurch sogenannte Triplexen bilden. Insbesondere für solche Triplexstrukturen sind Homo-Aggregate zwischen gleichen Nukleobasen von großer Bedeutung.[23, 24, 25, 26]

Kapitel 2

Grundlagen

Die theoretischen Grundlagen der Molekülschwingungen und -rotationen, die den in dieser Arbeit durchgeführten infrarot-spektroskopischen Untersuchungen zu Grunde liegen, sind in Lehrbüchern detailliert dargestellt.[14, 27, 28, 29] Daher sollen sie nachfolgend nur in Auszügen, d.h nur für rein harmonische Schwingungen, kurz wiedergegeben werden. Vorab sollen einige grundlegende quantenmechanische Konzepte vorgestellt werden, die zusätzlich insbesondere bei der Berechnung der elektronischen Gesamtenergie molekularer Systeme Anwendung finden.

2.1 Quantenmechanische Konzepte

2.1.1 Wellenfunktion und SCHRÖDINGER-Gleichung

Die Quantenmechanik berücksichtigt den Welle-Teilchen-Dualismus, der für kleine Teilchen wie z.B. Elektronen an Bedeutung gewinnt und basiert auf dem Postulat, dass ein Teilchen durch eine mathematische Funktion, die sogenannte Wellenfunktion Ψ repräsentiert werden kann. Dabei wird das Produkt der Wellenfunktion mit ihrem komplex konjugierten als räumliche Wahrscheinlichkeitsdichte interpretiert.

$$P(\vec{r}, t) = \Psi^*(\vec{r}, t) \cdot \Psi(\vec{r}, t) \quad (2.1)$$

Durch Integration über den Raum ergibt sich hieraus die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für das Teilchen im Bereich zwischen den Integrationsgrenzen. Die Eigenschaften wie z.B. der Impuls oder die Energie eines Teilchens werden ermittelt, indem diverse mathematische Operatoren auf die Wellenfunktion angewendet werden.

Der Operator der Gesamtenergie ist der HAMILTON-Operator $\hat{H}$, der in der zeitabhängigen SCHRÖDINGER-Gleichung verwendet wird.

$$\hat{H}\Psi = i\frac{\partial\Psi}{\partial t} \quad (2.2)$$

Der HAMILTON-Operator setzt sich aus der Summe von kinetischer Energie $\hat{T}$ und potentieller Energie V zusammen.

$$\hat{H} = \hat{T} + V \quad (2.3)$$

Ist die potentielle Energie V zeitunabhängig, lässt sich die Wellenfunktion in der SCHRÖDINGER-Gleichung in einem Produktansatz in einen zeitabhängigen und einen ortsabhängigen Anteil separieren:

$$\Psi(\vec{r}, t) = \Psi(\vec{r}) \cdot \Psi(t) \quad (2.4)$$

Wird die SCHRÖDINGER-Gleichung 2.2 auf den Ansatz 2.4 angewendet, ergeben sich zwei Gleichungen, von denen eine ortsabhängig und die andere zeitabhängig ist. Für die Berechnung der Energieeigenwerte E ist diese Separation gültig und das Lösen der zeitunabhängigen SCHRÖDINGER-Gleichung

$$\hat{H}\Psi(\vec{r}) = E\Psi(\vec{r}) \quad (2.5)$$

liefert die stationären elektronischen Zustände, wenn $\Psi(\vec{r})$ die ortsabhängige Wellenfunktion des Elektrons darstellt.

2.1.2 Der molekulare HAMILTON-Operator

Bei der Untersuchung molekularer Systeme muss die SCHRÖDINGER-Gleichung um die Koordinaten aller beteiligten Elektronen $\vec{r}_i$ und Atomkerne $\vec{R}_K$ erweitert werden.

$$\hat{H}\Psi(\vec{r}_i, \vec{R}_K) = E\Psi(\vec{r}_i, \vec{R}_K) \quad (2.6)$$

Gleichzeitig muss der HAMILTON-Operator neben dem Operator für die kinetische Energie $\hat{T}$:

$$\hat{T} = -\frac{h^2}{8\pi} \sum_{j=1}^p \frac{1}{m_j} \left(\frac{\partial^2}{\partial x_j^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_j^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_j^2} \right) \quad (2.7)$$

h : PLANCKsches Wirkungsquantum

p : Anzahl der Teilchen

alle paarweisen COULOMB-Wechselwirkungen zwischen den geladenen Elektronen und Kernen als Operator der potentiellen Energie V berücksichtigen:

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_j^p \sum_{l>j}^p \frac{z_j z_l}{D_{jl}}. \quad (2.8)$$

ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante

z : Ladungszahl des jeweiligen Teilchens

D_{jl} : Teilchenabstand

Um die Darstellung quantenmechanischer Gleichungen zu erleichtern, werden diese häufig in atomaren Einheiten ausgedrückt, so dass sich die fundamentalen Konstanten herauskürzen. Damit ergibt sich für den gesamten HAMILTON-Operator in atomaren Einheiten, wobei sich groß geschriebene Variablen auf die Kerne beziehen und klein geschriebene auf die Elektronen:

$$\begin{aligned} \hat{H} = & \underbrace{\sum_{K=1}^N -\frac{1}{2}\nabla_K^2}_{\hat{T}_K} + \underbrace{\frac{1}{2} \sum_K^N \sum_{L \neq K}^N \frac{Z_K Z_L}{|\vec{R}_K - \vec{R}_L|}}_{V_{KK}} \\ & + \underbrace{\sum_{i=1}^n -\frac{1}{2}\nabla_i^2}_{\hat{T}_e} + \underbrace{\frac{1}{2} \sum_i^n \sum_{j \neq i}^n \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|}}_{V_{ee}} \\ & - \underbrace{\sum_K^N \sum_i^n \frac{Z_K}{|\vec{R}_K - \vec{r}_i|}}_{V_{Ke}}. \end{aligned} \quad (2.9)$$

∇ : NABLA-Operator

$\vec{R}, \vec{r}$: Ortskoordinaten

N, n : Anzahl

Er setzt sich also zusammen aus der kinetischen Energie der Kerne $\hat{T}_K$, der potentiellen Energie V_{KK} der Kern-Kern-Wechselwirkung, der kinetischen Energie $\hat{T}_e$ der Elektronen, der potentiellen Energie V_{ee} , die aus der Elektron-Elektron-Abstoßung hervorgeht und der Kern-Elektron-Wechselwirkung V_{Ke} .

2.1.3 BORN-OPPENHEIMER Näherung

Das Lösen der SCHRÖDINGER-Gleichung ist in der Regel jedoch nur im Rahmen der BORN-OPPENHEIMER-Näherung sinnvoll möglich. Diese besteht in der Separation von Kern- und Elektronenbewegung, d.h. die Auswirkung des kinetischen Energieoperators der Kerne auf die Elektronenbewegung wird vernachlässigt. Anschaulich bewegen sich die Elektronen aufgrund ihrer geringeren Masse so viel schneller als die Kerne, dass bei der Berechnung der Elektronen-Bewegung näherungsweise starre Kernkoordinaten zugrunde gelegt werden können.

Im Rahmen dieser Näherung wird ein elektronischer HAMILTON-Operator konstruiert, der den Term für die kinetische Energie der Kerne vernachlässigt:

$$\begin{aligned} \hat{H}_e = & \sum_K^N \sum_{L>K}^N \frac{Z_K Z_L}{|\vec{R}_K - \vec{R}_L|} \\ & - \frac{1}{2} \sum_i^n \nabla^2 + \sum_i^n \sum_{j>i}^n \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \\ & - \sum_K^N \sum_i^n \frac{Z_K}{|\vec{R}_K - \vec{r}_i|}. \end{aligned} \quad (2.10)$$

Durch Anwenden dieses elektronischen HAMILTON-Operators in der Schrödingergleichung lässt sich die Bewegung der Elektronen im Potentialfeld der fixen Atomkerne beschreiben, wobei die Kernkoordinaten nur noch als Parameter und nicht mehr als Variablen auftreten.

$$\hat{H}_e \Psi_e(\vec{r}, \vec{R}) = E^{eff}(\vec{R}) \Psi_e(\vec{r}, \vec{R}) \quad (2.11)$$

Das Lösen der elektronischen SCHRÖDINGER-Gleichung 2.11 liefert das effektive Kernpotential E^{eff} , das eine Funktion der Kernkoordinaten ist. Die Kernpotentialfunktion $E^{eff}(\vec{R})$, die sich durch Variation der Kernkoordinaten ergibt, beschreibt die Potentialhyperfläche des untersuchten Systems und stellt das effektive Potential im nuklearen

HAMILTON-Operator dar. Dieser nukleare HAMILTON-Operator wird in die SCHRÖDINGER-Gleichung eingesetzt, um die Translations-, Vibrations- und Rotationsbewegungen der Kerne zu beschreiben.

$$\hat{H}_K(\vec{R}) = \hat{T}_K(\vec{R}) + E^{eff}(\vec{R}) \quad (2.12)$$

Für die Simulation eines Schwingungsspektrums eines Moleküls muss dieser HAMILTON-Operator zumindest näherungsweise berechnet werden.

2.2 Molekülschwingungen

Die Schwingungszustände von Molekülen sind quantisiert und durch Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung aus dem Spektralbereich des Infraroten werden Übergänge zwischen diesen Zuständen angeregt. Dabei wird die korrespondierende Wellenlänge der Infrarotstrahlung absorbiert, woraus Infrarotspektren resultieren. Die einfachste Form einer Molekülschwingung ist die gekoppelte Bewegung der beiden Atome eines zweiatomigen Moleküls. Für nicht lineare N-atomige Moleküle entfallen von den $3N$ Freiheitsgraden nach Abzug der jeweils drei Translations- und Rotationsfreiheitsgrade $3N - 6$ Freiheitsgrade auf die Schwingungsmoden, d.h. auf die verschiedenen Arten, wie das Molekül schwingen kann. Für jede Mode i erfahren die Atome eine Auslenkung x und schwingen mit einer jeweils charakteristischen Frequenz ν_i um ihre Ruhelage, was sich näherungsweise mit dem Modell eines harmonischen Oszillators mit der potentiellen Energie $V(x)$ beschreiben lässt. In dieser Näherung kann die Energie des Schwingungszustands V_i für jede einzelne Mode berechnet werden nach:

$$V_{iv} = h\nu_i \left(v_i + \frac{1}{2} \right). \quad (2.13)$$

h : PLANCKsches Wirkungsquantum

ν_i : Fundamentale Frequenz der Schwingungsmode

v_i : Schwingungsquantenzahl der i -ten Mode ($v_i = 0, 1, 2, \dots$)

Die Bewegung der Atome während einer Schwingung wird in der Regel mit Hilfe der Normalkoordinaten Q_i ausgedrückt (Vgl. Gl. 2.35). Das Molekül wird nur in den angeregten Schwingungszustand überführt, wenn sich sein Dipolmoment μ während der

Schwingung ändert (d.h. wenn gilt: $\partial\mu/\partial Q_i \neq 0$). Abhängig von der Symmetrie des Moleküls können einige Schwingungsmoden entartet sein, so dass mehr als eine Mode die gleiche Schwingungsfrequenz besitzen, während andere komplett verboten sind. Aufgrund dieser Entartung treten in Infrarotspektren in der Regel weniger als $3N - 6$ fundamentale Schwingungsbanden auf. Führt man den Entartungsgrad d_i ein, so kann der Termwert eines beliebigen Schwingungszustands als Summe der Terme der angeregten Normalschwingungen ausgedrückt werden.

$$G(v_k) = \sum_{i=1}^{3N} \omega_i (v_i + d_i/2) \quad (2.14)$$

Ein schwingendes Molekül kann also als Überlagerung harmonischer Oszillatoren betrachtet werden, von denen jeder einzelne durch Absorption von Strahlung zu Schwingungsübergängen angeregt werden kann, die jeweils wie Schwingungsübergänge in zweiatomigen Molekülen behandelt werden können. (Vgl. Abs. 2.2.1)

Im Rahmen der BORN-OPPENHEIMER Näherung (s. Abs. 2.1.3) werden die Wellenfunktionen der Kernbewegung $\chi_{n,m}(R)$ für den Schwingungsrotationszustand (Index m) im jeweiligen elektronischen Zustand (Index n) von den elektronischen Lösungswellenfunktionen ϕ_n^{el} bei einem festen Kernabstand R separiert. Für die Bewegung der Kerne im Potential E_n^0 gilt:

$$(\hat{H}' + E_n^0) \chi_{n,m} = E_{n,m} \chi_{n,m}. \quad (2.15)$$

2.2.1 Zweiatomige Moleküle

Im Falle eines zweiatomigen Moleküls ergibt sich mit der Kernwellenfunktion $\chi_{n,m}$ für den m -ten Schwingungsrotationszustand:

$$\left[\frac{-\hbar^2}{2M_1} \nabla_1^2 - \frac{\hbar^2}{2M_2} \nabla_2^2 + E_n^0(R) \right] \chi_{n,m}(R) = E_{n,m} \chi_{n,m}(R). \quad (2.16)$$

$$\hbar: \hbar = \frac{h}{2\pi}$$

Nach Abspaltung der Translation durch Übergang zum Schwerpunktsystem und Einführung der reduzierten Masse μ erhält man:

$$\left[\frac{-\hbar^2}{2\mu} \nabla^2 + E_p^0(R) \right] \chi_{n,m}(R) = E_{n,m} \chi_{n,m}(R). \quad (2.17)$$

μ_i : reduzierte Masse $\mu = \frac{M_1 M_2}{M_1 + M_2}$

In dieser Gleichung ist die potentielle Energie $E_p^0(R)$ kugelsymmetrisch, da sie nur noch vom Kernabstand $R = |R_1 - R_2|$ abhängt. Somit entspricht Gleichung 2.17 formal der SCHRÖDINGER-Gleichung für das Wasserstoffatom [28, 29] und kann in Analogie zu diesem Problem bei Verwendung von Kugelkoordinaten in einen Radialteil und einen winkelabhängigen Teil separiert werden. Als Separationsansatz dient hier genau wie beim H-Atom ein Produktansatz:

$$\chi(R, \theta, \phi) = S(R) \cdot Y(\theta, \phi). \quad (2.18)$$

$S(R)$: Radialfunktion

$Y(\theta, \phi)$: Kugelflächenfunktion

Anders als beim H-Atom handelt es sich beim Potential $E_p^0(R)$ nicht um ein COULOMB-Potential, so dass sich die Radialfunktionen $S(R)$ von den LAGUERRE-Funktionen, die für Wasserstoff gefunden werden, unterscheiden. Wird dieser Produktansatz in Gleichung 2.3 eingesetzt und dabei der LAPLACE-Operator ($\Delta = \nabla^2$) in Kugelkoordinaten

$$\Delta = \frac{1}{R^2} \frac{\partial}{\partial R} \left(R^2 \frac{\partial}{\partial R} \right) + \frac{1}{R^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{R^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} \quad (2.19)$$

verwendet, so erhält man nach Multiplikation mit R^2/χ die Gleichung:

$$\frac{1}{S} \frac{\partial}{\partial R} R^2 \frac{\partial S}{\partial R} + \frac{2\mu R^2}{\hbar^2} [E - E_n^0(R)] = \frac{1}{Y} \left[\frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial Y}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2 Y}{\partial \phi^2} \right]. \quad (2.20)$$

Weil die linke Seite nicht von θ oder ϕ abhängig ist und die rechte Seite unabhängig von R ist, müssen beide Seiten gleich einer Konstanten C sein, was eine Separation in zwei Teilgleichungen erlaubt. Die erste Gleichung, die nur von R abhängt, beschreibt die Radialbewegung der Kerne und somit die Schwingung des Moleküls.

$$\frac{1}{R^2} \frac{\partial}{\partial R} \left(R^2 \frac{\partial S}{\partial R} \right) + \frac{2\mu}{\hbar^2} \left[E - E_n^0(R) - \frac{C \cdot \hbar^2}{2\mu R^2} \right] S = 0 \quad (2.21)$$

Die Funktionen S sind vollständig bestimmt, sobald die Potentialkurve $E_n^0(R)$ für den n -ten Elektronenzustand bekannt ist. Die zweite Gleichung beschreibt die Azimutalbewegung, also die Rotation und ist von θ und ϕ abhängig.

$$\frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial Y}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2 Y}{\partial \phi^2} + C \cdot Y = 0 \quad (2.22)$$

Die Separationskonstante für die beiden Gleichungen ergibt sich zu $C = J(J+1)$, mit J als Quantenzahl des Gesamtdrehimpulses.

2.2.2 Schwingungen mehratomiger Moleküle

Hier soll zunächst eine klassische Betrachtung erfolgen. Zur Vereinfachung der Darstellung werden anstelle der Auslenkungen $\Delta x_i = x_i - x_{i0}$ massengewichtete Koordinaten (q_i) eingeführt.

$$q_i = \sqrt{m_i} \cdot \Delta x_i \quad (2.23)$$

Die kinetische Energie T lässt sich mit Hilfe dieser internen Koordinaten ausdrücken als:

$$T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N} \dot{q}_i^2. \quad (2.24)$$

Für die potentielle Energie V kann der Ansatz einer TAYLOR-Reihenentwicklung gewählt werden:

$$V = V_0 + \sum_{i=1}^{3N} \left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right)_0 q_i + \frac{1}{2!} \sum_{i,j=1}^{3N} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j + \dots \quad (2.25)$$

Dabei bildet die Ruhelage den Nullpunkt, d.h. bei diesem Ansatz ist der erste Term V_0 eine Konstante, die für den Grundzustand (S_0) gleich Null gesetzt wird. Da die TAYLOR-Reihenentwicklung um ein Minimum herum erfolgt, bei dem auch die ersten Ableitungen gleich Null sind, besitzt der zweite Term ebenfalls den Wert Null, so dass die ersten beiden Terme wegfallen. Der dritte Term ist der gesuchte harmonische Beitrag. Alle höheren Glieder fallen bei der Vernachlässigung anharmonischer Effekte ebenso weg, was in der Regel zulässig ist, solange nur kleine Auslenkungen q_i behandelt werden.

Somit folgt für die potentielle Energie in harmonischer Näherung:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{3N} b_{ij} q_i q_j \quad (2.26)$$

mit den Kraftkonstanten:

$$b_{ij} = \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 \quad (2.27)$$

Zur Bestimmung der Bewegungsgleichungen kann auf den LAGRANGE-Formalismus zurückgegriffen werden. Dabei wird die Dynamik des Systems mit Hilfe einer einzigen skalaren Funktion beschrieben, wodurch gleichzeitig eine Invarianz gegen Koordinatentransformationen gewährleistet wird. Mit der LAGRANGE-Funktion der klassischen

Mechanik ($L = T - V$) bilden die LAGRANGE-Gleichungen:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{q}_i} \right) - \frac{\partial L}{\partial q_i} = 0 \quad (2.28)$$

ein System gewöhnlicher Differentialgleichungen, die den NEWTONschen Bewegungsgleichungen für die schwingenden Massen m_i entsprechen:

$$\ddot{q}_i + \sum_{j=1}^{3N} b_{ij} q_j = 0 \text{ mit } b_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) \text{ und } i = 1, 2 \dots 3N. \quad (2.29)$$

Dieses System von Differentialgleichungen beschreibt die Bewegung von $3N$ gekoppelten Oszillatoren mit den zugehörigen Auslenkungen:

$$q_i = A_i \cos(\omega_i \cdot t + \varphi_i). \quad (2.30)$$

Im allgemeinen Fall bewirken die Nichtdiagonalterme b_{ij} eine Kopplung zwischen den Schwingungen und nur unter speziellen Bedingungen kann erreicht werden, dass alle Kerne mit gleicher Frequenz ω_n und Phase φ_n schwingen. Derartige Schwingungszustände werden als Normalschwingungen bezeichnet.

2.2.3 Normalschwingungen

Unter Verwendung der Vektorschreibweise $\vec{q} = q_1, q_2 \dots, q_{3N}$ vereinfacht sich Gleichung 2.29 zu:

$$\ddot{\vec{q}} + \underline{\underline{B}} \cdot \vec{q} = 0, \quad (2.31)$$

wobei die Komponenten b_{ij} in der Matrix $\underline{\underline{B}}$ enthalten sind. Diese Schreibweise stellt nur dann ein System aus $3N$ entkoppelten Schwingungsgleichungen dar, wenn $\underline{\underline{B}}$ eine Diagonalmatrix ist, die sich aus einer Multiplikation der Einheitsmatrix $\underline{\underline{E}}$ mit Eigenwerten λ ergibt, die letztendlich die zugehörigen Schwingungsfrequenzen enthalten.

$$\underline{\underline{B}} = \lambda \cdot \underline{\underline{E}} \quad (2.32)$$

Es ist folglich das Ziel, ein System von Schwingungskordinaten zu finden, in dem $\underline{\underline{B}}$ diagonal wird.

$$\underline{\underline{B}} \cdot \vec{q} = \lambda \cdot \underline{\underline{E}} \cdot \vec{q} \Rightarrow (\underline{\underline{B}} - \lambda \cdot \underline{\underline{E}}) \cdot \vec{q} = 0 \quad (2.33)$$

Dies ist äquivalent zu einer Hauptachsentransformation und Gleichung 2.33 besitzt genau dann nicht triviale Lösungen, wenn gilt:

$$\text{Det} |\underline{\underline{B}} - \lambda \cdot \underline{\underline{E}}| = 0. \quad (2.34)$$

Für jede der n Normalschwingungen erhält man eine Lösung λ_n und somit einen Satz von $3N$ Schwingungskomponenten ($q_{n,k}$ $k = 1, 2 \dots 3N$), die die Auslenkung der N Kerne als Funktion der Zeit wiedergeben. Diese $q_{n,k}$ können wiederum als ein Vektor $\vec{Q}_n$ geschrieben werden.

$$\vec{Q}_n = A_n \sin [\omega_n(t) + \varphi_n] \quad \text{mit} \quad \omega_n = \sqrt{\lambda_n} \quad (2.35)$$

Dieser Vektor beschreibt die gleichzeitige Bewegung aller Kerne im Verlauf der n -ten Normalschwingung, die mit der jeweiligen Kreisfrequenz $\omega_n = \sqrt{\lambda_n}$ erfolgt. Der Betrag dieses Vektors wird als Normalkoordinate Q_n bezeichnet. Bei Vernachlässigung höherer Terme der potentiellen Energie führt das Molekül im Normalkoordinatensystem harmonische Schwingungen aus. Die Auslenkung aller Kerne erfolgt dabei für jede einzelne Normalschwingung i nicht nur mit einer einheitlichen Kreisfrequenz ω_i sondern auch mit gleicher Phase φ_i .

Quantenmechanische Darstellung

Aufgrund der Entkopplung der Schwingungen, die mit Hilfe der Schreibweise in Normalkoordinaten erreicht wird, ergeben sich für die kinetische und potentielle Energie rein quadratische Ausdrücke ohne gemischte Kopplungsterme wie noch in Gleichung 2.25. Für die Schwingungsenergie E_v in Normalkoordinaten (Q_i) gilt:

$$E_v = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \dot{Q}_i^2 + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \lambda_i Q_i^2. \quad (2.36)$$

Beachtet man, dass die Massen über die massengewichteten Normalkoordinaten berücksichtigt werden, entspricht dies einem HAMILTON-Operator der Form:

$$\hat{H}_v = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \frac{\partial^2}{\partial Q_i^2} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \lambda_i Q_i^2. \quad (2.37)$$

Die Wellenfunktion Ψ in der SCHRÖDINGER-Gleichung $\hat{H}\Psi = E\Psi$ kann aufgrund der Entkopplung der Normalschwingungen in einem Produktansatz separiert werden.

$$\Psi_v = \Psi_{v1}(Q_1) \cdot \Psi_{v2}(Q_2) \dots \cdot \Psi_{v3N-6}(Q_{3N-6}) \quad (2.38)$$

Als Lösungen der SCHRÖDINGER-Gleichung in dieser Form ergeben sich die Eigenwerte V_{iv} der Schwingungsenergie, d.h. hier die Eigenwerte des harmonischen Oszillators, wie sie bereits zu Beginn in Gleichung 2.13 vorgestellt wurden. Die Schwingungseigenfunktionen $\Psi_{vi}(Q_i)$ ergeben sich in Analogie zu den Eigenfunktionen für zweiatomige Moleküle zu:

$$\Psi_{vi}(Q_i) = N_{vi} H_{vi}(\xi_i) e^{-\xi_i^2/2} \quad (2.39)$$

mit $\xi_i = Q_i \sqrt[4]{\lambda_i/\hbar^2}$, H_{vi} = HERMITESches Polynom und N : Normierungsfaktor

2.3 Quantenchemische Rechnungen

Durch die Verfügbarkeit schneller Computer und einfach zu bedienender Programmpakete wie GAUSSIAN oder TURBOMOLE haben quantenchemische Methoden eine enorme Verbreitung in allen Bereichen der Chemie gefunden. Als Teil der angewandten theoretischen Chemie sind sie zu einem wichtigen Hilfsmittel bei der Charakterisierung und Identifizierung molekularer Strukturen geworden. Eine Vielzahl der Eigenschaften von Atomen, Molekülen oder Clustern, wie zum Beispiel elektrische und magnetische Momente, Ladungsverteilungen, Gleichgewichtsgeometrien oder Schwingungsfrequenzen können berechnet werden. Somit sind quantenchemische Rechnungen ein wichtiges Werkzeug für die Interpretation von Infrarotspektren. Die Ergebnisse ergänzen die durchgeführten spektroskopischen Untersuchungen indem sie theoretische Vergleichswerte bilden und ermöglichen beim Einsatz geeigneter Methoden eine Zuordnung von Strukturen zu den aufgenommenen Spektren.

Das Hauptaugenmerk bei den durchgeführten Rechnungen liegt bei der Aufklärung der jeweils vorliegenden molekularen Strukturen, d.h. spezifischer Konformere eines Moleküls bzw. charakteristischer Geometrien von Aggregaten bestehend aus mehreren Molekülen. Die unterschiedlichen Geometrien, die durch Strukturkoordinaten wie Bindungsabstände und Winkel charakterisiert werden können, bilden zusammen mit der jeweils zugehörigen elektronischen Energie eine sogenannte Potentialhyperfläche. Eine Geometrieoptimierung entspricht folglich der Suche nach den Minima auf der Potentialhyperfläche, die die stabilsten Konformere und Anordnungen repräsentieren.

Eine Zuordnung zu experimentellen Infrarotspektren kann mit Hilfe einer Normalkoordinatenanalyse und einer Berechnung der Frequenzen der Molekülschwingungen erfolgen. Auf der Grundlage der optimierten Geometrie werden die Atome systematisch entlang der Bindungen ausgelenkt, wobei der Potentialgradient betrachtet wird. Dieser Gradient entspricht der Kraft, die für diese Auslenkung aufgewendet werden muss. Zusammen mit der reduzierten Masse für die jeweilige Schwingung, die sich aus der Geometrie ergibt, lässt sich die Schwingungsfrequenz berechnen. Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen und die verwendeten Methoden mit ihren jeweiligen Näherungen kurz vorgestellt.

Grundsätzlich wird in der Quantenchemie zwischen *ab initio*- (lat.: von Anfang an) und semiempirischen Verfahren unterschieden. Im Gegensatz zu semiempirischen Verfahren verwenden *ab initio*-Verfahren keine Parameter zur Anpassung an experimentelle Daten sondern fußen allein auf den Postulaten der Quantenmechanik.

2.3.1 HARTREE-FOCK-Theorie und Molekülorbitale

Das Problem der elektronischen SCHRÖDINGER-Gleichung ist selbst im Rahmen der BORN-OPPENHEIMER-Näherung nur für Systeme mit nur einem einzelnen Elektron analytisch exakt lösbar. Für Mehrteilchensysteme werden weitere Näherungen, die zusätzlich die Wellenfunktion betreffen, gemacht. Viele der Näherungsmethoden nutzen dabei das RITZsche Variationsprinzip.

Variationsprinzip

Der Energie-Erwartungswert $E(\Phi)$, der mit dem HAMILTON-Operator für eine beliebige, normierte und antisymmetrische Funktion Φ berechnet wird, ist immer größer oder gleich dem kleinsten Eigenwert E_0 der exakten Wellenfunktion Ψ .

$$E(\Phi) \geq E(\Psi_{\text{exakt}}) \text{ mit } \Phi \neq \Psi_{\text{exakt}} \quad (2.40)$$

Somit stellt der Eigenwert der exakten Funktion den unteren Grenzwert für die mit Hilfe von Näherungen berechneten Energien dar. Die Approximationsverfahren variieren systematisch die Parameter der Funktion Φ , um einen Koeffizientensatz zu erhalten, der die Energie minimiert.

Das HARTREE-FOCK-Verfahren

Ein weit verbreitetes Verfahren, das zur Bestimmung von Wellenfunktionen und Energieniveaus von Systemen mit mehreren Elektronen verwendet wird, ist die HARTREE-FOCK-Methode.

Die Näherung besteht im Wesentlichen darin, dass die Effekte der Elektronenkorrelation vernachlässigt werden, die dann auftreten, wenn sich zwei Elektronen nahe kommen. Im Rahmen dieser Näherung bewegt sich ein Elektron stattdessen im gemittelten Feld aller übrigen Elektronen.

Die elektronische Struktur wird dabei nach dem Energievariationsprinzip solange iterativ optimiert, bis sich der Energiewert innerhalb vorgegebener Grenzen nicht mehr ändert. Jedes Elektron bewegt sich dann in einem selbstkonsistenten Feld der übrigen Elektronen, weshalb auch von *Self-Consistent-Field*-Verfahren (SCF-Verfahren) gesprochen wird. Das HARTREE-FOCK-Verfahren nähert somit den Erwartungswert der SCHRÖDINGER-Gleichung an.

Einen einfachen Ansatz, um die n-Teilchen-Wellenfunktion mit Hilfe von Ein-Teilchen-Wellenfunktionen, den sogenannten Molekülorbitalen (Φ_i) zu nähern, stellt das HARTREE-Produkt dar.

$$\psi(\vec{r}) = \Phi_1(\vec{r}_1) \Phi_2(\vec{r}_2) \dots \Phi_n(\vec{r}_n) \quad (2.41)$$

Dieser Ansatz erfüllt jedoch nicht das PAULI-Prinzip, das besagt, dass die Wellenfunktion antisymmetrisch bezüglich der Vertauschung der Koordinaten von zwei beliebigen Elektronen (allgemeiner: Fermionen) sein muss, um eine adequate Lösung des Problems darzustellen. Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeit zu überwinden besteht darin, die n-Teilchen-Wellenfunktion in Form einer sogenannten SLATER-Determinanten anzusetzen.

$$\Psi(\vec{r}) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \Phi_1(\vec{r}_1)\alpha(1) & \Phi_1(\vec{r}_1)\beta(1) & \dots & \Phi_{n/2}(\vec{r}_1)\beta(1) \\ \Phi_1(\vec{r}_2)\alpha(2) & \Phi_2(\vec{r}_2)\beta(2) & \dots & \Phi_{n/2}(\vec{r}_2)\beta(2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \Phi_1(\vec{r}_i)\alpha(i) & \Phi_1(\vec{r}_i)\beta(i) & \dots & \Phi_{n/2}(\vec{r}_i)\beta(i) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \Phi_1(\vec{r}_n)\alpha(n) & \Phi_1(\vec{r}_n)\beta(n) & \dots & \Phi_{n/2}(\vec{r}_n)\alpha(n) \end{vmatrix} \quad (2.42)$$

Eine solche Determinante erfüllt das Kriterium der Antisymmetrie, weil die Vertauschung zweier Elektronen der Vertauschung zweier Zeilen der Determinanten entspricht und für Determinanten allgemein gilt, dass bei einer Vertauschung zweier Spalten oder Zeilen das Vorzeichen wechselt. Des Weiteren berücksichtigt diese SLATER-Determinante den Elektronenspin, der die Einstellungen $+1/2(\alpha)$ oder $-1/2(\beta)$ annehmen kann.

Während im einfachen Produktansatz 2.41 davon ausgegangen wird, dass jedem Molekülorbital ein Elektron zugeordnet wird, werden die meisten Rechnungen für geschlossene Schalen (engl.: *closed shells*) durchgeführt. Dabei ist jedes Molekülorbital mit zwei Elektronen besetzt, die im Einklang mit dem PAULI-Prinzip entgegengesetzte Spins

aufweisen. In der SLATER-Determinanten wird dies durch Einführung der Spinfunktionen α und β ausgedrückt, die wie folgt definiert sind:

$$\alpha(\uparrow)=1, \alpha(\downarrow)=0, \beta(\uparrow)=0, \beta(\downarrow)=1 \quad (2.43)$$

Die sogenannten Spinorbitale, die als Produkt aus Molekülorbitalen und Spinfunktionen erhalten werden, bleiben orthogonal und normiert. Beim Aufstellen der *closed shell* Wellenfunktionen muss noch berücksichtigt werden, dass für ein n-Elektronen-System nur noch $n/2$ Molekülorbitale benötigt werden, denen je zwei Elektronen mit antiparallelem Spin zugeordnet sind. Bei der Darstellung der Wellenfunktion als Determinante werden im molekularen System alle Molekülorbitale aller Elektronen gemischt.

Basissätze

Als Wellenfunktion dient beim HARTREE-FOCK-Verfahren ein Produkt aus antisymmetrischen Einelektronenfunktionen, den sogenannten Orbitalen. Diese Funktionen werden dabei jedoch durch einen Satz bekannter Basisfunktionen angenähert. Unter dem Basissatz versteht man folglich den Satz von Funktionen (Basisfunktionen), nach dem atomare oder molekulare Einelektronenfunktionen (Atomorbitale bzw. Molekülorbitale) entwickelt werden.

Ausgehend von den analytischen Lösungen für das Wasserstoffatom finden zwei unterschiedliche Arten von Basisfunktionen Anwendung, entweder SLATER-Funktionen (*Slater Type Orbitals*, STOs), die eine e^{-r} -Abhängigkeit zeigen und das asymptotische Verhalten für einen Kernabstand $r \rightarrow 0$ richtig wiedergeben, oder GAUSS-Funktionen (*Gauß Type Orbitals*, GTOs), die eine e^{-r^2} -Abhängigkeit zeigen mit der allgemeinen Form:

$$g(\kappa, \vec{r}) = c \cdot x^l y^m z^n \cdot e^{-\kappa r^2}. \quad (2.44)$$

Hierbei bestimmt κ die radiale Ausdehnung, d.h. die Größe der Funktion, während c den Normierungsfaktor darstellt, mit dessen Hilfe die Forderung der Quantenmechanik zu erfüllen ist, dass gilt:

$$\int_{\tau} g^2 = 1. \quad (2.45)$$

Für $r \rightarrow 0$ besitzen GTOs keine „Spitze“ bei $r = 0$, sondern ein Maximum mit der Steigung Null, so dass kernnahe Wellenfunktionen schlechter beschrieben werden. Gleichzeitig werden auch die kernfernen Bereiche durch das zu schnelle Abfallen der Funktionswerte ungenau wiedergegeben.

Dennoch werden bei quantenchemischen Rechnungen häufig Basissätze eingesetzt, die GTOs verwenden, weil diese leichter zu integrieren sind. Die Diskontinuität der Spitze der STOs bei $r = 0$ führt dazu, dass Drei- und Vierzentren Zweielektronenintegrale nicht mehr analytisch lösbar sind. Zur Korrektur des Verhaltens in Richtung eines STOs werden Linearkombinationen (Kontraktionen χ_{μ}) von (in der Regel drei, $p = 3$) GTOs (g) als Basisfunktionen eingesetzt.

$$\chi_{\mu} = \sum_p d_{\mu p} g_p \quad (2.46)$$

Für einen bestimmten Basissatz stellen die $d_{\mu p}$ -Terme hierbei unveränderliche Konstanten dar. Als Ausdruck für die Molekülorbitale ϕ_i erhält man mit Hilfe dieses Vorgehens letztlich Terme der Form:

$$\phi_i = \sum_{\mu} c_{\mu i} \chi_{\mu} = \sum_{\mu} c_{\mu i} \left(\sum_p d_{\mu p} g_p \right) \quad (2.47)$$

Um den Rechenaufwand zusätzlich zu verringern, werden häufig sogenannte *split-valence*-Basissätze benutzt, bei denen die inneren und äußeren Atomorbitale durch unterschiedliche Basissätze beschrieben werden. Dies ermöglicht es, die Valenzorbitale, die den stärksten Einfluss auf die chemischen Bindungen haben, genauer zu beschreiben, während die Rumpfelektronen mit geringerer Genauigkeit dargestellt werden. Der Basissatz 6-311G(d, p) verwendet z.B. eine Basisfunktion mit sechs GTOs für jedes Orbital der inneren Schalen. Für die Orbitale der Valenzschale werden drei unabhängige Sätze als Basisfunktion verwendet (Triple Zeta Basissatz), von denen zwei aus jeweils einem und der andere aus einer Linearkombination von drei GTOs besteht. Zusätzlich wird für alle Atome außer den Wasserstoffatomen ein diffuses Orbital (d) sowie ein Satz von Polarisationsorbitalen (p) berücksichtigt. Neben diesem Basissatz, der bei den Rechnungen am Pyrazin zum Einsatz kam, wurde für den größten Teil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Rechnungen der *Triple Zeta Valence Plus Polarization* (TZVP)-Basissatz [30, 31] verwendet.

ROOTHAN-HALL-Gleichungen

Das numerische Lösen der HARTREE-FOCK-Gleichungen dient der Bestimmung der optimalen Spinorbitale in der SLATER-Determinanten. Um die Raumorbitale zu berechnen, die zu einer Minimierung der Energie führen, werden die sogenannten ROOTHAN-HALL-Gleichungen benötigt. In diesem Schritt werden nicht die Wellenfunktionen optimiert, sondern lediglich die Koeffizienten der Atomorbitale, weshalb man von *linear combination of atomic orbitals* (engl.: Linearkombination der Atomorbitale) oder kurz vom LCAO-Ansatz spricht. In Matrix-Schreibweise ergibt sich der Ausdruck:

$$\underline{\underline{F}} \underline{\underline{C}} = \underline{\underline{S}} \underline{\underline{C}} \epsilon \quad (2.48)$$

bei dem jedes Element eine $m \times m$ -dimensionale Matrix darstellt, wobei m die Anzahl an Basisfunktionen wiedergibt. Dabei werden die zu optimierenden Molekülorbitalexpansionskoeffizienten $c_{\nu i}$ in der Matrix $\underline{\underline{C}}$ zusammengefasst während die Matrix $\underline{\underline{S}}$ die Überlappungsintegrale $\underline{\underline{S}}_{\mu\nu}$ zwischen den jeweiligen Atomorbitalen mit den Indices μ und ν enthält.

$$\underline{\underline{S}}_{\mu\nu} = \langle \phi_\mu | \phi_\nu \rangle \quad (2.49)$$

Die Einelektronenorbitalenergien ϵ_i für das jeweilige Molekülorbital sind als Diagonalmatrix $\underline{\underline{\epsilon}}$ zusammengefasst. Die Matrix $\underline{\underline{F}}$ stellt die eigentlichen FOCK-Operatoren $\underline{\underline{F}}_{\mu\nu}$ dar, die für geschlossenschalige Moleküle die folgende Form annehmen:

$$\underline{\underline{F}}_{\mu\nu} = \underline{\underline{H}}_{\mu\nu}^K + \sum_{\lambda=1}^N \sum_{\sigma=1}^N \underline{\underline{P}}_{\lambda\sigma} \left[(\mu\nu|\lambda\sigma) - \frac{1}{2} (\mu\lambda|\nu\sigma) \right]. \quad (2.50)$$

Hierbei repräsentiert die Matrix $\underline{\underline{H}}_{\mu\nu}^K$ die Energien der einzelnen Elektronen im reinen Feld des Kerns. Die Elemente der sogenannten Dichtematrix $\underline{\underline{P}}$ mit den Indices λ und σ für die jeweiligen Molekülorbitale sind wie folgt definiert:

$$\underline{\underline{P}}_{\lambda\sigma} = 2 \sum_{i=1}^k c_{\lambda i}^* c_{\sigma i}. \quad (2.51)$$

Die Orbitalkoeffizienten werden über alle k besetzten Orbitale summiert und aufgrund der Doppelbesetzung der Orbitale mit einem Faktor zwei multipliziert.

Da sowohl die Orbitale selbst als auch die FOCK-Matrix über die Dichtematrix von den zu optimierenden Molekülorbitalexpansionskoeffizienten abhängen, ist die Gleichung 2.48 nicht linear und kann daher nur iterativ gelöst werden. Dieses Vorgehen stellt das eigentliche, bereits oben erwähnte *Self-Consistent Field (SCF)*-Verfahren dar. Dieses iterative Verfahren wird solange wiederholt, bis die errechnete Energie nur noch im Rahmen eines zuvor festgelegten Konvergenzintervalls variiert. Bei echter Konvergenz generieren die Orbitale ein Feld, dass wieder Orbitale mit identischen Koeffizienten hervorbringt, wobei gleichzeitig die Energie das Minimum erreicht hat.

Der Term $(\mu\nu|\lambda\sigma)$ stellt das Zweielektronenabstoßungsintegral dar. Das einzelne Elektron wechselwirkt mit einer mittleren Verteilung aller anderen Elektronen, so dass eine direkte Wechselwirkung zwischen einzelnen Elektronen nicht berücksichtigt wird. Aufgrund der Vernachlässigung dieser expliziten Elektronenkorrelation stellt das ermittelte Energieminimum nicht die exakte nichtrelativistische Energie des Systems dar, sondern

weicht auch bei Verwendung unendlich vieler Basisfunktionen um die Korrelationsenergie ab. Mit dieser Methode kann nur das sogenannte HARTREE-FOCK-Limit der Energie berechnet werden.

2.3.2 Dichtefunktionaltheorie

Die Dichtefunktionaltheorie (DFT) geht einen anderen Weg und basiert im Gegensatz zum HARTREE-FOCK Verfahren nicht auf einer detaillierten Kenntnis der n -Teilchen-Wellenfunktionen. Stattdessen wird davon ausgegangen, dass sich alle Eigenschaften eines Systems aus der Elektronendichte herleiten lassen. Wie bereits aus dem Namen ersichtlich, liegt ein Funktional $\rho(r)$ zu Grunde, das die Elektronendichte, d.h. die zeitlich gemittelte Aufenthaltswahrscheinlichkeit aller Elektronen, als Funktion des Ortes darstellt. Somit müssen statt der $3n$ Variablen, die sich aus den Elektronenkoordinaten ergeben, nur noch die 3 Variablen der Raumkoordinaten zu Grunde gelegt werden. Ihren Ursprung verdankt diese Methode dem Theorem von HOHENBERG und KOHN aus dem Jahre 1964.[32]

Das HOHENBERG-KOHN-Theorem

Die Gesamtenergie eines wechselwirkenden n -Elektronen-Systems kann (im nicht-entarteten Grundzustand) durch ein eindeutiges Funktional der Elektronendichte beschrieben werden.

$$E = E(\rho) \quad (2.52)$$

Dieses Energiefunktional $E(\rho)$ nimmt im Falle eines nicht-entarteten Grundzustands bei der Variation der Elektronendichte $\rho(r)$ für die Elektronendichte des Grundzustands $\rho_0(r)$ sein Minimum an.

In ihrer Arbeit konnten HOHENBERG und KOHN zeigen, dass ein eindeutiges Funktional existiert, das diese Postulate erfüllt.

Die Schwierigkeit besteht nun darin, ein solches Funktional zu konstruieren. In den approximierten Funktionalen aktueller DFT-Methoden, wird die elektronische Energie in der Regel in verschiedene Terme aufgeteilt.

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC} \quad (2.53)$$

KOHN und SHAM konnten zeigen, dass sich diese Terme zur Berechnung des elektronischen Grundzustands (Index 1) für den Fall eines *closed shell* n -Elektronen Systems

wie folgt darstellen lassen. Der Term E^T , der für die kinetische Energie der Elektronen steht, hat folgende Form:

$$E^T = -\frac{\hbar}{2m_e} \sum_{i=1}^n \int \psi_i^*(r_1) \nabla_1^2 \psi_i(r_1) dr_1. \quad (2.54)$$

Bei der Bestimmung der kinetischen Energie werden n Einelektronenraumorbitale ψ_i mit $(i = 1, 2, \dots, n)$, die sogenannten KOHN-SHAM-Orbitale verwendet. Die Elektronendichte ρ^0 im Grundzustand ergibt sich, indem über alle besetzten KOHN-SHAM-Orbitale summiert wird.

$$\rho^0(r) = \sum_{i=1}^n |\psi_i^0(r)|^2 \quad (2.55)$$

Der zweite Term E^V in Gleichung 2.53 beinhaltet sowohl die Kern-Elektron-Anziehung als auch die Abstoßung zwischen zwei Kernen, wofür über alle N Kerne mit dem Index I und der Kernladungszahl Z_I summiert wird.

$$E^V = - \sum_{I=1}^N \int \frac{Z_I e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{I1}} \rho(r_1) dr_1 \quad (2.56)$$

Der dritte Ausdruck E^J ist der Term, der die Elektron-Elektron Abstoßung repräsentiert, in Form der COULOMB-Wechselwirkung zwischen der Gesamtladungsverteilung an zwei verschiedenen Orten r_1 und r_2 .

$$E^J = \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r_1) \rho(r_2) e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} dr_1 dr_2 \quad (2.57)$$

Alle nicht klassischen Wechselwirkungen zwischen den Elektronen des Systems werden im Term E^{xc} berücksichtigt, der für die Austausch-Korrelations-Energie steht. Es wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um die Austausch-Korrelations Energie näherungsweise zu berechnen und dabei das HOHENBERG-KOHN-Theorem, das besagt, dass E und somit auch E^{xc} vollständig von der Elektronendichte ρ bestimmt werden, zu berücksichtigen. Dabei wird für gewöhnlich in ein Austauschfunktional E_X und ein Korrelationsfunktional E_C separiert. Dies bezieht sich auf die Spin-Spin-Wechselwirkung einerseits zwischen Elektronen gleichen Spins und andererseits zwischen Elektronen unterschiedlichen Spins.

$$E^{XC}(\rho) = E^X(\rho) + E^C(\rho) \quad (2.58)$$

Beide Anteile können jeweils entweder durch lokale Funktionale, die nur von der Elektronendichte ρ abhängig sind oder durch gradientenkorrigierte Funktionale, die zusätzlich vom Gradienten der Elektronendichte $\nabla\rho$ abhängen, angenähert werden.

Für bestimmte einfache Modellsysteme wie das homogene, spin polarisierte Elektronengas mit konstanter Dichte, kann die Austausch-Korrelations-Energie exakt beschrieben werden. In diesem Modell bewegen sich unendlich viele Elektronen in einem unendlich großen Raum, so dass sich eine gleichmäßige Ladungsverteilung ergibt. Zur Wahrung der Elektroneutralität steht den Elektronen eine gleichmäßige Verteilung positiv geladener Kerne gegenüber. Das hierfür entwickelte Austauschfunktional entstammt der Lokaldichtenäherung (*local density approximation*, LDA).

$$E_{LDA}^X(\rho) = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \int \rho^{\frac{4}{3}} dr \quad (2.59)$$

Aufgrund des sehr einfachen Modells hat dieses Funktional Schwächen bei der Beschreibung molekularer Systeme, weshalb von BECKE ein gradienten-korrigiertes Austauschfunktional (BECKE88) entwickelt wurde, das auf dem LDA-Austauschfunktional basiert und häufig genutzt wird.

$$E_{Becke88}^X = E_{LDA}^X + \Delta E_{B88}^X = E_{LDA}^X - \gamma \int \frac{\rho^{\frac{4}{3}} x^2}{1 + 6 \gamma \sinh^{-1} x} dr \quad (2.60)$$

Die Gradienten-Korrektur ist dabei in der Variablen $x = \rho^{-\frac{4}{3}} |\nabla\rho|$ enthalten. Zusätzlich wurde der empirische Anpassungsparameter γ eingeführt, der mit Hilfe der bekannten Austauschenergien der Edelgase bestimmt wurde und auch für Moleküle eingesetzt werden kann. Dieses von Becke (B) formulierte Austauschfunktional wird heutzutage meist in Verbindung mit dem ebenfalls gradienten-korrigierten Korrelationsfunktional nach LEE, YANG und PARR (LYP) zum sogenannten B-LYP Funktional kombiniert.

$$E_{LYP}^C = -a \int \frac{\rho}{1 + d\rho^{-\frac{1}{3}}} dr - ab \int \omega \rho^2 \left[C_F \rho^{\frac{8}{3}} + |\nabla\rho|^2 \left(\frac{5}{12} - \delta \frac{7}{12} \right) - \frac{11}{24} \rho^2 |\nabla\rho|^2 \right] dr$$

$$\text{mit } \omega = \frac{e^{-c\rho^{-1/3}}}{1 + d\rho^{-1/3}} \rho^{-1/3} \quad \text{und} \quad \delta = c\rho^{-1/3} + \frac{-d\rho^{-1/3}}{1 + d\rho^{-1/3}} \quad (2.61)$$

Die empirischen Parameter a, b, c und d entstammen in diesem Fall der Anpassung an die Energie des Heliumatoms.

Das B3LYP-Hybridfunktional

Für den überwiegenden Teil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten DFT-Rechnungen wurde das 3-Parameterfunktional (B3LYP) nach BECKE, LEE, YANG und PARR verwendet. Allgemein werden bei Hybridfunktionalen empirisch Anteile von DFT-Austausch- und Korrelations-Termen E_{DFT}^{XC} mit der nicht lokalen Austauschenergie E_{HF}^X , die der HARTREE-FOCK-Theorie entnommen wird, gemischt.

$$E_{hybrid}^{XC} = c_{HF} E_{HF}^X + c_{DFT} E_{DFT}^{XC}, \quad (2.62)$$

Im Falle des B3LYP-Funktional wird die HARTREE-FOCK-Austauschenergie E_{HF}^X gemischt mit dem Korrelationsfunktional E_{LYP}^C nach LEE, YANG und PARR, dem Korrekturterm ΔE_{B88}^X für das LDA-Funktional nach BECKE sowie mit einem weiteren lokalen Korrelationsfunktional E_{VWN}^C , das von VOSKO, WILK und NUSAIR parametrisiert wurde.

$$E_{B3LYP}^{XC} = E_{LDA}^X + c_0 (E_{HF}^X - E_{LDA}^X) + c_X \Delta E_{B88}^X + E_{VWN}^C + c_C (E_{LYP}^C - E_{VWN}^C) \quad (2.63)$$

Der Parameter c_0 macht das Mischungsverhältnis zwischen HARTREE-FOCK und lokalen LDA-Austauschfunktionalen variabel und nimmt im B3LYP-Funktional den Wert 0.2 an. Das lokale LDA-Austauschfunktional wird mit Hilfe der Gradienten-Korrektur von Becke, die mit dem Parameter $c_x = 0.72$ skaliert wird, erweitert. Der Korrelationsterm ist analog aufgebaut und das lokale VWN-Korrelationsfunktional wird mit dem LYP-Korrelationsterm [33] und einem Parameter $c_C = 0.81$ korrigiert.

2.3.3 Geometrieoptimierung und Normalkoordinatenanalyse

Die bisher vorgestellten Berechnungen der elektronischen Energie E eines Moleküls werden jeweils für eine feste Geometrie durchgeführt. Die Gesamtenergie ergibt sich als Summe der jeweiligen elektronischen Energie und der Kernabstoßungsenergie V_{KK}

$$V_{KK} = \sum_{I=1}^N \sum_{J>I}^N \left(\frac{Z_I Z_J e^2}{\Delta \vec{R}_{IJ}} \right), \quad (2.64)$$

mit Z als Ladung und $\Delta \vec{R}_{IJ}$ als Abstand der Atomkerne. Um zuverlässige Schwingungsanalysen durchführen zu können, ist die Struktur zu ermitteln, deren Gesamtenergie ein Minimum darstellt. Dies bedeutet, daß eine Geometrieoptimierung so lange durchgeführt werden muss bis der Energiegradient entlang aller inneren (oder kartesischen) Kernkoordinaten annähernd gleich Null wird. Das für die Geometrieoptimierung verwendete Gradientenverfahren wird als BERNY-Optimierung [34] bezeichnet und greift auf die HESSE-Matrix zurück, in der die zweiten Ableitungen der Energie nach den Ortskoordinaten, d.h. die Kraftkonstanten, enthalten sind. Auf Grund des hohen Zeitaufwandes, mit dem eine vollständige Bestimmung der Kraftkonstanten über das analytische zweifache Differenzieren der SCF-Energien nach den Ortskoordinaten verbunden wäre, werden die Elemente der HESSE-Matrix in der Regel zunächst mit Hilfe von Kraftfeldrechnungen abgeschätzt. Die Optimierung der Geometrie wird so lange fortgesetzt bis sich die Energiegradienten nur noch im Rahmen zuvor festgelegter Konvergenzgrenzen (z.B. ein maximaler Energiegradient von 1×10^{-8} hartree/Bohr) verändern.

Mit einer derart optimierten Geometrie als Grundlage kann eine Frequenzanalyse erfolgen, bei der alle Kraftkonstanten durch zweifache analytische Ableitung der *ab initio* Potentialfläche gewonnen werden. Enthalten die untersuchten Moleküle weder VAN DER WAALS- noch Wasserstoffbrückenbindungen, so erfüllen häufig auch die *ab initio* Kraftkonstanten die für die Optimierung gewählten Konvergenzbedingungen. Anderenfalls wird der Geometrie-Optimierungsschritt mitsamt der anschließenden erneuten Berechnung der *ab initio* Kraftkonstanten in der Regel einfach wiederholt durchgeführt.

Mit Hilfe der so ermittelten Kraftkonstanten kann eine Normalkoordinatenanalyse durchgeführt werden. Diese dient der Interpretation von Infrarot-Schwingungsspektren N-atomiger Moleküle und basiert auf der Theorie zu Molekül- und Normalschwingun-

gen (Vgl. Abs. 2.2.3). Bei der Normalkoordinatenanalyse werden die Moleküle klassisch mechanisch behandelt und dabei als Systeme aus einzelnen Massepunkten betrachtet. Hierbei wird zusätzlich die Schwingungsbewegung von der Translation und der Rotation separiert. Daher finden weder Zentrifugaldehnung noch Coriolis-Kopplung Berücksichtigung. Des Weiteren wird die potentielle Energie als ein harmonisches Potential angenähert, so dass für Schwingungen mit stark anharmonischem Potential die Übereinstimmung mit den berechneten Schwingungsfrequenzen abnimmt.

Die eigentliche Normalkoordinatenanalyse entspricht der Diagonalisierung der Matrix $\underline{\underline{B}}$ gemäß Gleichung 2.34.

Klassische Normalkoordinatenanalysen in inneren Koordinaten benötigen Startwerte für die Kraftkonstanten und Parameter zur Beschreibung der Änderungen der Bindungslängen und -winkel. Diese können empirisch aus den Schwingungsanalysen verschiedener verwandter Modell-Moleküle entnommen werden.

Die Kraftkonstanten können wie beschrieben durch zweifache analytische Ableitung der potentiellen Energie mit Hilfe quantenmechanischer Rechenprogramme erhalten werden.

Die Normalkoordinatenanalyse, d.h. die Diagonalisierung der $\underline{\underline{B}}$ -Matrix liefert zunächst die Quadrate der Kreisfrequenzen $\lambda_n = \omega_n^2$, die über die Beziehung $\nu_n = \frac{\sqrt{\omega_n^2}}{2\pi}$ direkt mit den Normalschwingungsfrequenzen ν_n verknüpft sind.

Für nicht lineare Moleküle nehmen bei der Schwingungsanalyse sechs Eigenwerte den Wert Null an. Dies ergibt sich daraus, dass für die Analyse 3N Koordinaten herangezogen wurden, während für nicht lineare Moleküle nur 3N-6 Schwingungen auftreten können. Folglich können diese Eigenwerte, die gleich Null sind, den Translations- und Rotationsbewegungen zugeordnet werden.

Alle Frequenz- und quantenchemischen *ab initio*-Rechnungen in dieser Arbeit wurden mit den Programmen GAUSSIAN03 [35] und TURBOMOLE 5.9 [36, 37, 38, 39, 40, 41] ausgeführt.

2.4 FTIR-Spektroskopie

2.4.1 Messprinzip eines MICHELSON-Interferometers

Für alle infrarot-spektroskopischen Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist ein FOURIER-Transformations-Infrarot-(FTIR)-Spektrometer eingesetzt worden, das im Gegensatz zu einem herkömmlichen IR-Spektrometer nicht über ein dispersives Element (Monochromator) zur Wellenlängen-Selektion, sondern über ein Interferometer verfügt. Im nachfolgenden Abschnitt wird kurz die Funktionsweise eines klassischen MICHELSON-Interferometers [42] beschrieben.

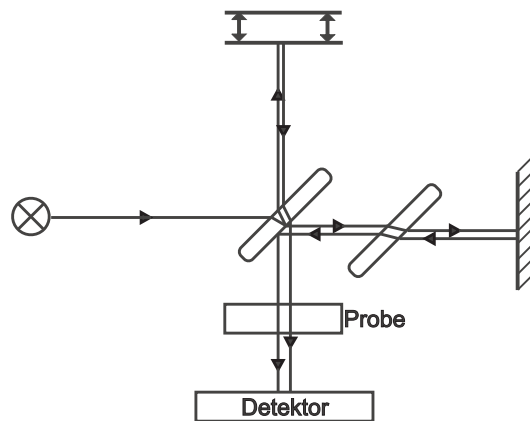


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines klassischen MICHELSON-Interferometers.

Fällt Licht auf den Strahlteiler, wird eine Hälfte reflektiert, während die zweite den Strahlteiler passiert. Der reflektierte Anteil wird von einem beweglichen Spiegel, der durchgelassene Anteil von einem festen Spiegel zurück über den Strahlteiler, durch die Probe und auf den Detektor gelenkt.

Des Weiteren ist eine Kompensationsplatte integriert, die aus dem gleichen Material wie der Strahlteiler besteht und aufgrund gleicher Stärke sicherstellt, dass die Teilstrahlen jeweils denselben Weg durch das Material des Strahlteilers zurücklegen. Beim Erreichen des Detektors haben die zwei Teilstrahlen unterschiedliche Wege zurückgelegt. Der Weglängenunterschied δ , der auch als Retardation bezeichnet wird, hängt dabei von der Stellung des beweglichen Spiegels ab. Beträgt der Wegunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge des Lichtes, so interferieren die Teilstrahlen

konstruktiv. Bei halbzahligen Vielfachen der Wellenlänge findet genau destruktive Interferenz statt.

Zunächst wird von einem ideellen Interferometer und einer monochromatischen Lichtquelle ausgegangen, die bei der Wellenzahl $\tilde{\nu}_0$ Licht mit der Intensität $I(\tilde{\nu}_0)$ abstrahlt. Wird die Retardation δ nun von Null an gleichmäßig vergrößert, so ergibt sich für die Intensität $I'(\delta)$, die den Detektor erreicht ein Verlauf gemäß folgender Funktion:

$$I'(\delta) = \frac{1}{2} I(\tilde{\nu}_0) [1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}_0\delta)]. \quad (2.65)$$

Da der statische Anteil $\frac{1}{2}I(\tilde{\nu}_0)$ keine Information über den Frequenzraum enthält, ist für die Spektroskopie nur der oszillierende Anteil $I(\delta)$ relevant, der als Interferogramm bezeichnet wird.

$$I(\delta) = \frac{1}{2} I(\tilde{\nu}_0) \cos(2\pi\tilde{\nu}_0\delta) \quad (2.66)$$

Der veränderliche Anteil des Signals $S(\delta)$, der am Detektor gemessen wird, hängt zusätzlich von den Charakteristika des Spektrometers, wie z.B. der Empfindlichkeit des Detektors ab. Da diese Faktoren konstant sind, lassen sie sich berücksichtigen, indem die von der Quelle abgestrahlte Intensität $I(\tilde{\nu}_0)$ ersetzt wird durch das sogenannte Einkanalspektrum $B(\tilde{\nu}_0)$, das die Einflüsse durch das Spektrometer beinhaltet.

$$S(\delta) = \frac{1}{2} B(\tilde{\nu}_0) \cos(2\pi\tilde{\nu}_0\delta) \quad (2.67)$$

Bei der FTIR-Spektroskopie wird allerdings eine polychromatische Lichtquelle verwendet, die ein breites Spektrum an Wellenlängen emittiert. Den Detektor erreicht somit eine Überlagerung vieler Kosinus-Funktionen. Für $\delta = 0$ sind alle Wellen unterschiedlicher Wellenlänge in Phase, so dass hier das Signal (*center burst*) sehr groß ist. Für andere Werte der Retardation können sich die Wellen durch destruktive Interferenz teilweise oder vollständig auslöschen. Das Interferogramm kann für den Fall einer kontinuierlichen Strahlungsquelle als ein Integral über die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ dargestellt werden:

$$S(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\tilde{\nu}. \quad (2.68)$$

Mathematisch stellt das Detektorsignal $S(\delta)$ (d.h. das Interferogramm) die Kosinus-FOURIER-Transformierte des Einkanalspektrums $B(\tilde{\nu}_0)$ dar. Die Funktionen für Interferogramm und Spektrum bilden ein sogenanntes FOURIER-Paar, so dass umgekehrt

das Spektrum durch entsprechende FOURIER-Transformation aus dem Interferogramm als Detektorsignal berechnet werden kann.

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\delta) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\delta \quad (2.69)$$

Da es sich beim Interferogramm $S(\delta)$ um eine gerade Funktion mit Spiegelsymmetrie zur Y-Achse handelt, lässt sich hierfür auch schreiben:

$$B(\tilde{\nu}) = 2 \int_0^{+\infty} S(\delta) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\delta. \quad (2.70)$$

Das Interferogramm wird im Idealfall mit unendlicher Weglängendifferenz δ in unendlich kleinen Abständen aufgenommen. In der Praxis ist das nicht möglich, so dass über die Auswahl der Datenpunkte der detektierte Wellenlängenbereich und die Auflösung bestimmt werden. Ein Spektrum, das mit einer bestimmten Anzahl dicht beieinander liegender Messpunkte aufgenommen wird, deckt einen großen Wellenlängenbereich ab, besitzt aber nur eine niedrige Auflösung. Werden bei gleicher Anzahl an Datenpunkten die Messpunkte so gewählt, dass sie weit auseinander liegen, ergibt sich daraus ein Spektrum über einen kleineren Wellenlängenbereich jedoch mit höherer Auflösung. Die Größe des Bereichs, der vom Interferogramm gemessen wird, bestimmt damit die Auflösung $\Delta\tilde{\nu}$. Wie groß dieser Bereich ist, hängt seinerseits vom maximalen Weglängenunterschied $\delta_{\max}$ ab.

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{\delta_{\max}} \quad (2.71)$$

Mit dem verwendeten Spektrometer NICOLET 5700 kann eine Auflösung von bis zu $0,125 \text{ cm}^{-1}$ erzielt werden.

Die maximale Frequenz bzw. Wellenzahl $\tilde{\nu}_{\max}$, die noch eindeutig detektiert werden kann, hängt vom Abstand Δx zwischen zwei Punkten im Interferogramm ab (NYQUIST-Kriterium).

$$\tilde{\nu}_{\max} = \frac{1}{2 \cdot \Delta x} \quad (2.72)$$

Die Einstrahltechnik der FTIR-Spektrometer macht es notwendig, für jedes Spektrum zunächst ohne Probe ein Hintergrundspektrum $I_0(\tilde{\nu})$ zu messen. Da im Experiment nicht die Emission der Strahlungsquelle, sondern die Absorption durch die eingebrachten Substanzen untersucht wird, wird der Quotient der Einkanalspektren von Proben-

und Hintergrundmessung gebildet, der auch als Transmission T bezeichnet wird.

$$T(\tilde{\nu}) = \frac{I(\tilde{\nu})}{I_0(\tilde{\nu})} \quad (2.73)$$

In der Regel wird das Transmissionsspektrum in ein Absorbanzspektrum umgerechnet.

$$A(\tilde{\nu}) = \log_{10} \frac{I_0(\tilde{\nu})}{I(\tilde{\nu})} \quad (2.74)$$

Trotz des rechnerischen Aufwands hat sich die Technik der FOURIER-Transformation etabliert, da sie von mehreren Vorteilen profitiert. Während in Spektrometern, die ein dispersives Element einsetzen, über Monochromatorspalten nur ein geringer Anteil der Strahlung, die von der Strahlungsquelle abgegeben wird, genutzt werden kann, können bei der FTIR-Spektroskopie zylindrische Lichtstrahlen eingesetzt werden. Dadurch ist der Lichtfluss um ca. zwei Größenordnungen erhöht (JACQUINOT- oder Durchsatz-Vorteil).

Der zweite wichtige Vorteil ist, dass zu jedem Zeitpunkt der Messung alle Wellenlängen detektiert werden (FELGETT- oder Multiplex-Vorteil). Dies führt im Vergleich zu dispersiven Techniken dazu, dass Spektren ähnlicher Qualität in kürzerer Zeit aufgenommen werden können. Die relativ kurze Messdauer des eingesetzten Spektrometers NICOLET 5700 ist insbesondere bei Untersuchungen mit eingeschränkter Messdauer, wie Messungen an den thermisch labilen Polyenen [10] (s. Abs. 4.1) vorteilhaft.

2.4.2 Evaluierung der IR-Spektren in Flüssigphase

Für kleine Konzentrationen c folgt die Absorbanz $A(\tilde{\nu})$ (s. Gl. 2.74) dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz.

$$A(\tilde{\nu}) = \epsilon(\tilde{\nu}) \cdot c \cdot d \quad (2.75)$$

$\epsilon(\tilde{\nu})$: Wellenzahlabhängiger dekadischer Extinktionskoeffizient

d : Schichtdicke

Dieser Zusammenhang bildet die Grundlage für quantitative Analysen von Infrarotspektren, wie sie zur Interpretation der Spektren der DNS-Basen in Lösung (s. Abs. 4.3 und folgende) angestellt wurden.[14]

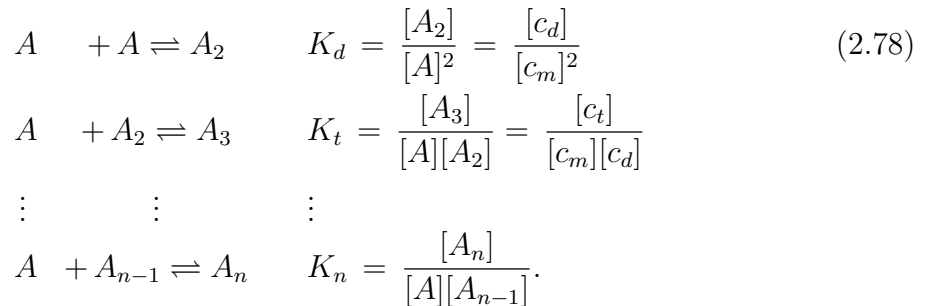
Wird eine einzige Substanz bei konstanter Schichtdicke gemessen, so ist die Absorption bei einer festen Wellenzahl direkt proportional zur Konzentration der Substanz mit dem Extinktionskoeffizienten als Proportionalitätskonstante. Zur Konzentrationsbestimmung ist es daher grundsätzlich notwendig, den Extinktionskoeffizienten zu kennen. Tragen in einem Probengemisch N verschiedene Spezies zur Absorption bei einer bestimmten Wellenzahl $\tilde{\nu}$ bei, so ergibt sich die Absorbanz an dieser Stelle als Summe der einzelnen Beiträge.

$$A(\tilde{\nu}) = \sum_{i=1}^N \epsilon_i(\tilde{\nu}) \cdot c_i \cdot d \quad (2.76)$$

Bei der Aggregation der DNS-Basen werden neben den Monomeren mit zunehmender Konzentration die Aggregate als weitere Spezies gebildet. Die anfänglich eingewogene Ausgangskonzentration c_0 entspricht einer Anzahl Probenmoleküle A , die in Form von Monomeren (c_m), Dimeren (c_d), Trimeren (c_t) etc. vorliegen können.

$$c_0 = c_m + 2c_d + 3c_t + \dots \quad (2.77)$$

Bei einer schrittweisen Aggregation können folgende Gleichgewichte formuliert werden:



c_m : Monomerkonzentration

c_d : Dimerkonzentration

c_t : Trimerkonzentration

K_d : Gleichgewichtskonstante für die Dimerisierung

K_t : Gleichgewichtskonstante für die Trimerisierung

Unter Verwendung der Gleichgewichtskonstanten, kann die Ausgangskonzentration (Gl. 2.77) als ein Polynom der Monomerkonzentration dargestellt werden.

$$c_0 = c_m + 2c_d + 3c_t + \dots = c_m + 2K_d c_m^2 + 3K_d K_t c_m^3 + \dots \quad (2.79)$$

Die verwendete Analysenmethode basiert nun darauf, dass mindestens eine Absorptionsbande im Spektrum vorhanden ist, die allein dem Monomer zuzuordnen ist.

Eine solche Bande kann für die untersuchten Moleküle im Bereich der N-H Streck-schwingungen gefunden werden. Im Zuge der Aggregation werden die entsprechenden Wasserstoffatome in Wasserstoffbrückenbindungen eingebunden, was mit einer starken Rotverschiebung der Schwingungsfrequenz einhergeht. Hierdurch liegen die Absorptionsbanden der Aggregate an einer anderen spektralen Position als die N-H Streck-schwingungen der Monomere.

Da die Absorptionsbanden in flüssiger Phase jedoch stark verbreitert sind, kann es insbesondere bei hohen Konzentrationen dennoch zu einer Überlagerung der Monomerbande mit benachbarten Aggregatbanden kommen. Um diese störenden Einflüsse zu berücksichtigen, wurden an die Monomerbande und an die benachbarten Aggregatbanden VOIGT-Profilen angepasst, die geeignet sind um sowohl LORENTZ- als auch GAUSS-förmige Verbreiterungen zu berücksichtigen. Diese Anpassung erfolgte in einem globalen Fit, bei dem die Bandenpositionen und Halbwertsbreiten für die bei verschiedenen Konzentrationen aufgenommenen Spektren konstant gehalten wurden. Ein Vergleich zwischen experimentellen Spektren und angepassten Profilen ist für das Beispiel 1-Cyclohexyluracil in Abbildung 2.2 gezeigt.

Die mit Hilfe des Fits ermittelten Flächen der Monomerbanden, die der integrierten Absorption des Monomers (A_{int}^m) entsprechen, können nun herangezogen werden,

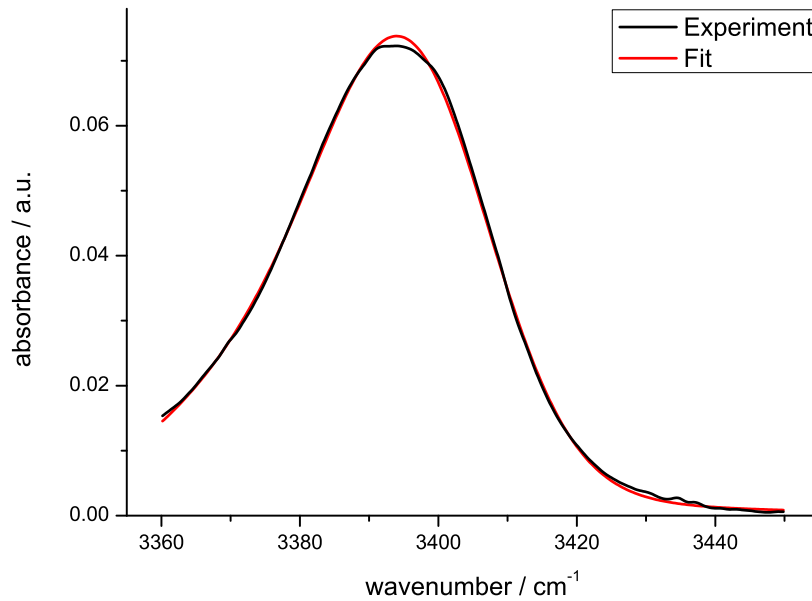


Abbildung 2.2: Experimentelles FT-IR Spektrum (schwarz) der N-H Streckschwingung von 1-Cyclohexyluracil (80 mM in CDCl_3) und angepasstes Linienprofil (rot)

um den integrierten Absorptionskoeffizienten (α) zu bestimmen. Durch Umformen von Gleichung 2.75 ergibt sich bei Verwendung der integrierten Größen:

$$\alpha = \frac{A_{int}^m}{c_m \cdot d} \quad (2.80)$$

α : integrierter Absorptionskoeffizient

A_{int}^m : integrierte Absorption der Monomerbande

c_m : aktuelle Monomerkonzentration

d : Schichtdicke

Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die tatsächliche, aktuell vorliegende Konzentration an monomeren Molekülen zunächst nicht bekannt ist, weil ein Teil stets in Form von Aggregaten vorliegt. Wird in Gleichung 2.80 die bekannte, eingewogene Anfangskonzentration c_0 eingesetzt, ergibt sich ein scheinbarer Absorptionskoeffizient α_{app} :

$$\alpha_{app} = \frac{A_{int}^m}{c_0 \cdot d} \quad (2.81)$$

Da die Bildung der Aggregate von der Konzentration abhängt, geht der scheinbare Absorptionskoeffizient jedoch in den tatsächlichen über, wenn die Konzentration immer weiter verringert wird. Wird der scheinbare Absorptionskoeffizient als Funktion der Ausgangskonzentration aufgetragen, so kann der tatsächliche Absorptionskoeffizient des Monomers durch eine Extrapolation zu unendlicher Verdünnung ($c_0 = 0$) bestimmt werden. Aus jedem Infrarotspektrum, das bei verschiedenen Ausgangskon-

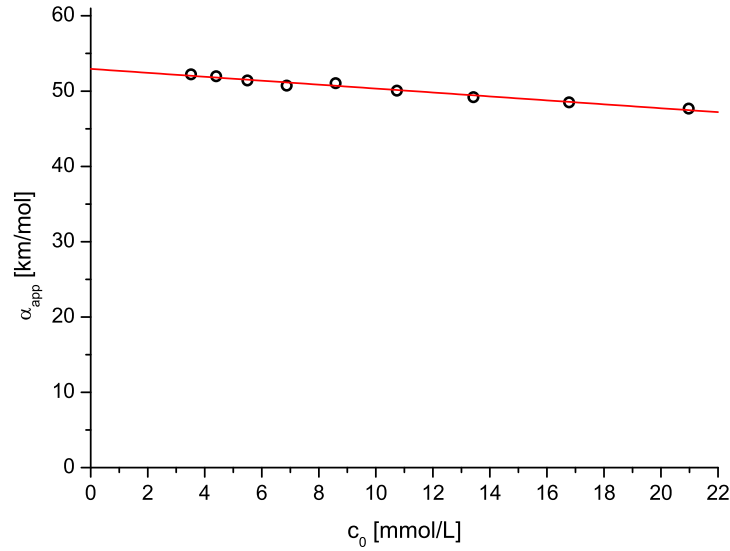


Abbildung 2.3: Bestimmung des integrierten Absorptionskoeffizienten des 1-Cyclohexyluracil-Monomers mittels einer Extrapolation zu unendlicher Verdünnung ($c_0 = 0$).

zentrationen c_0 aufgenommen wird, kann mit diesem Wert die aktuelle Monomerkonzentration bestimmt werden.

$$A_{int}^m = \alpha \cdot c_m \cdot d \Leftrightarrow c_m = \frac{A_{int}^m}{\alpha \cdot d} \quad (2.82)$$

Mit den errechneten Monomerkonzentrationen wird nun ein Polynomfit gemäß Gleichung 2.79 durchgeführt (s. Kap. 4). Dabei werden schrittweise Terme mit höheren Exponenten in c_m hinzugefügt, d.h. wenn die experimentellen Daten sich mit einer quadratischen Funktion nur schlecht simulieren lassen, wird ein kubischer Term addiert usw. bis keine signifikante Verbesserung mehr erreicht wird. Der höchste benötigte Exponent entspricht der im vorliegenden Konzentrationsbereich gebildeten maximalen Clustergröße. Für 9-Ethyladenin und 2'-Desoxy-3',5'-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-cytidin kann

eine Aggregation über das Dimer hinaus beobachtet werden. Bei den größeren Aggregaten handelt es sich wahrscheinlich um Trimere, während noch größere Cluster nicht nachgewiesen werden können.

Aus den Fitparametern können die Gleichgewichtskonstanten für die Aggregation errechnet werden. Diese werden für die eigentliche Separation der IR-Spektren, die aus einer Überlagerung von Monomer- und Aggregatspektren resultieren, herangezogen.

Sind in der Probenlösung Monomere, Dimere und Trimere vorhanden, setzt sich die Absorption bei einer beliebigen Wellenzahl $\tilde{\nu}$ entsprechend der Gleichung 2.76 aus den Absorptionen von Monomer, Dimer und Trimer an dieser Stelle zusammen.

$$A(\tilde{\nu}) = A_m + A_d + A_t = \epsilon_m(\tilde{\nu}) \cdot d \cdot c_m + \epsilon_d(\tilde{\nu}) \cdot d \cdot K_d \cdot c_m^2 + \epsilon_t(\tilde{\nu}) \cdot d \cdot K_d K_t \cdot c_m^3 \quad (2.83)$$

$\epsilon_i(\tilde{\nu})$: Wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient für die jeweilige Clustergröße i (separiertes Infrarotspektrum der jeweiligen Clustergröße)

Wie stark Monomer, Dimer und Trimer zu den experimentellen Infrarotspektren beitragen, wird erneut über einen Polynomfit ermittelt.

Wenn Spektren bei verschiedenen Konzentrationen aufgenommen werden, kann an jeder Stelle des Spektrums ein Fit entsprechend Gleichung 2.83 erfolgen. Es wird die Absorption als Funktion der aktuellen Monomerkonzentration bei einer festen Wellenzahl ($\tilde{\nu}_i$) betrachtet.

$$A^{\tilde{\nu}_i}(c_m) = \epsilon_m^{\tilde{\nu}_i} \cdot d \cdot c_m + \epsilon_d^{\tilde{\nu}_i} \cdot d \cdot K_d \cdot c_m^2 + \epsilon_t^{\tilde{\nu}_i} \cdot d \cdot K_d K_t \cdot c_m^3 \quad (2.84)$$

Da K_d und K_t bekannt sind, können aus den Fitparametern die Extinktionskoeffizienten für Monomer, Dimer und Trimer errechnet werden. Wird ein solcher Fit bei jeder Wellenlänge durchgeführt, erhält man die wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten für jede Clustergröße über den gesamten untersuchten Spektralbereich. Diese wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten stellen das Infrarotspektrum für die jeweilige Clustergröße dar.

Diese Methode, die für 1-Cyclohexyluracil sowie für die Adeninderivate zum Einsatz kam, ist für die Untersuchung des Cytidinderivats leicht abgewandelt worden. Hier wurde der Absortionskoeffizient α nicht vorab durch eine Extrapolation sondern direkt im Polynomfit der umgeformten Gleichung 2.79 mit angepasst.

$$c_0 = c_m + 2K_d \cdot c_m^2 + 3K_d K_t \cdot c_m^3 \quad \text{mit} \quad c_m = \frac{A_{int}^m}{\alpha d}$$

$$\begin{aligned}
c_0 &= \left(\frac{A_{int}^m}{\alpha d} \right) + 2K_d \left(\frac{A_{int}^m}{\alpha d} \right)^2 + 3K_d K_t \left(\frac{A_{int}^m}{\alpha d} \right)^3 \\
\frac{c_0}{A_{int}^m/d} &= \frac{1}{\alpha} + \frac{2K_d}{\alpha^2} \left(\frac{A_{int}^m}{d} \right) + \frac{3K_d K_t}{\alpha^3} \left(\frac{A_{int}^m}{d} \right)^2
\end{aligned} \tag{2.85}$$

Der Ausdruck $\frac{c_0}{A_{int}^m/d}$ ist ein Polynom in $\frac{A_{int}^m}{d}$ und aus den angepassten Fitparametern kann neben den Gleichgewichtskonstanten auch der Absorptionskoeffizient bestimmt werden.

Bei beiden Verfahren ist jedoch zu berücksichtigen, dass keine Unterscheidung zwischen verschiedenen Isomeren innerhalb einer Clustergröße erfolgt. Um eine Zuordnung der individuellen Schwingungsbanden zu konkreten Geometrien treffen zu können, ist ein Vergleich mit Ergebnissen aus Frequenzrechnungen (s. Abs. 2.3.3) erforderlich.

Die Ergebnisse der Spektrenseparation und die Zuordnung zu Aggregatgeometrien sind in den entsprechenden Veröffentlichungen (s. Kap. 4) ausführlich dargestellt.

Kapitel 3

Experimentelles

3.1 Apparativer Aufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aggregation von DNS-Basen bzw. Nukleosiden via Wasserstoffbrückenbindungen sowie die Schwingungsstruktur von Diphenylpolyenen und die Rotationsschwingungsstruktur von Pyrazin mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Obwohl für diese drei Bereiche jeweils unterschiedliche Aspekte im Vordergrund stehen, konnten alle Messungen mit demselben FTIR-Spektrometer, NICOLET 5700 der Firma FISHER ELECTRON durchgeführt werden (siehe Abb. 3.1). Hierbei handelt es sich um ein klassisches Einstrahlspektrometer, das als zentrales Bauelement ein MICHELSON-Interferometer enthält. Zur Detektion der Infrarotstrahlung wurde ein schneller Detektor aus *Mercury Cadmium Telluride* (MCT, *engl.*: Quecksilber-Kadmium-Tellurid) verwendet, der eine erhöhte Scan-Geschwindigkeit ermöglicht. Dies ist insbesondere vorteilhaft für die Untersuchung der Diphenylpolyene, da diese bei den zur Verdampfung bzw. zur Sublimation notwendigen hohen Temperaturen nur eine geringe Zeit thermisch stabil sind.

Zur Untersuchung der Rotationsstruktur der Schwingungsbanden des gasförmigen Pyrazins konnte die Scan-Geschwindigkeit herabgesetzt werden, dafür wurde im Gegenzug die spektrale Auflösung auf den Maximalwert von $0,125\text{ cm}^{-1}$ eingestellt.

Um die störenden Einflüsse wie die Absorptionen durch Kohlenstoffdioxid und Wasser aus der umgebenden Luft so gering wie möglich zu halten, wurde bei allen Messungen der Probenraum kontinuierlich mit Luft, die über einen Adsorptionsfilter gereinigt wurde, gespült.

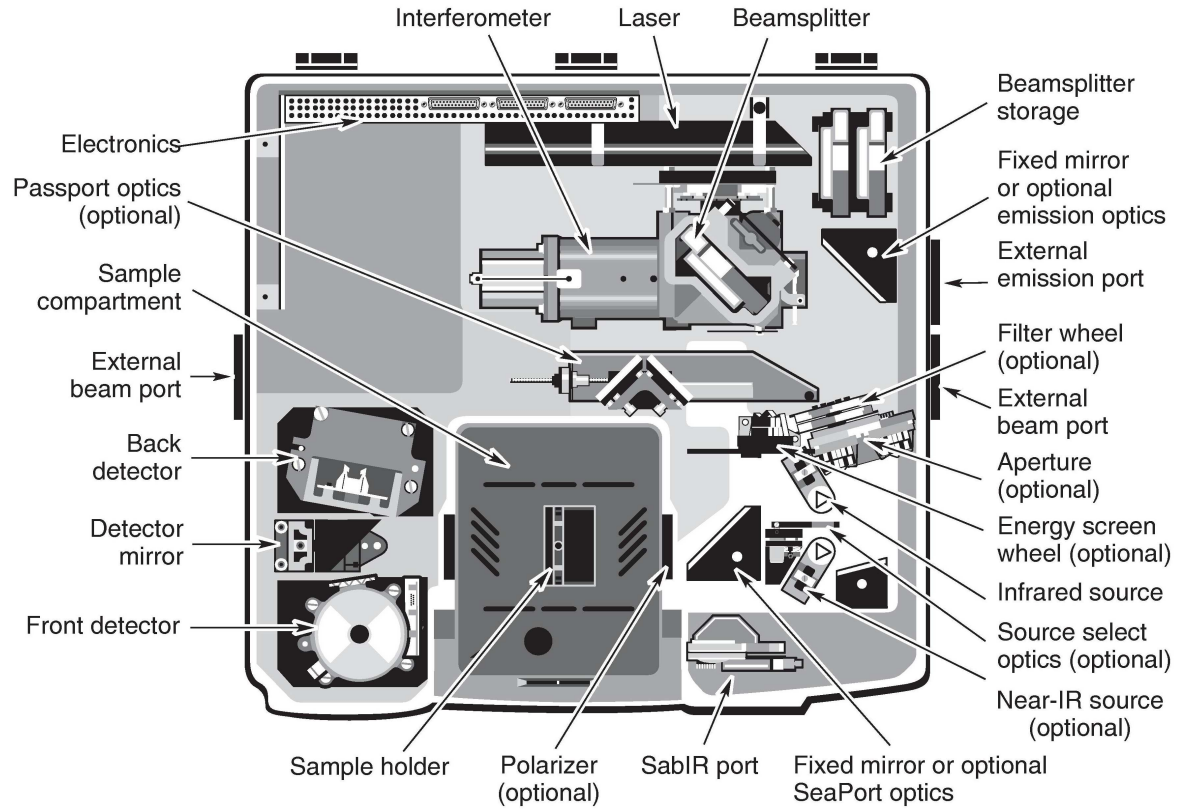


Abbildung 3.1: Aufbau des verwendeten FTIR-Spektrometers NICOLET 5700. [43]

Aufbau für Messungen in der Gasphase

Zur Aufnahme der Gasphasenspektren der Diphenylpolyene und von Pyrazin diente eine spezielle Messzelle, die konstruiert wurde, um eine zersetzungsfreie sprunghafte Verdampfung bzw. Sublimation der Probensubstanzen zu gewährleisten (s. Abb.3.2).[44] Die Gaszelle besteht aus einem Aluminiumkörper, der mit Hilfe einer Drehschieber-

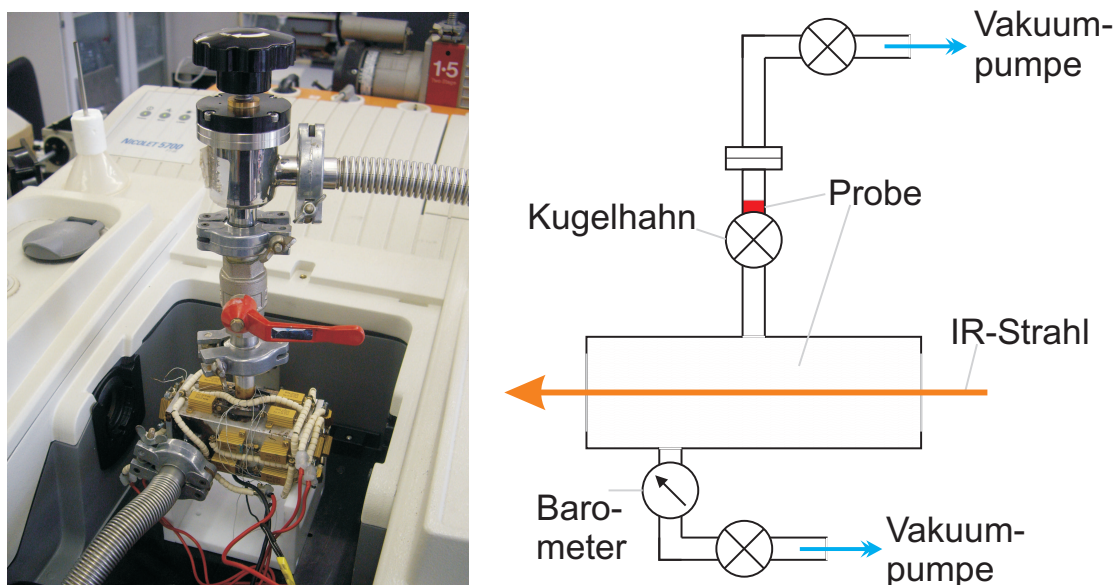


Abbildung 3.2: Fotografie und schematische Darstellung der Messzelle zur sprunghaften Verdampfung organischer Moleküle

pumpe über einen Hahn evakuiert werden kann. Zur Einkopplung des Infrarotstrahls dienen zwei Fenster aus Natriumchlorid (NaCl) die unter Einsatz von Viton O-Ringen vakuumdicht an den Zellkörper gepresst werden. Das Heizen der Zelle erfolgt über Heizwiderstände ($8 \times 1 \Omega$ für die Fensterhalterung und $16 \times 3,3 \Omega$ für den Zellkörper); zur Temperaturmessung werden zwei Messwiderstände (PT 1000) verwendet. Des Weiteren sitzt auf der Zelle ein Kugelhahn auf, über den die Probenzufuhr erfolgt. Am Boden der Zelle befindet sich direkt unter dem Probeneinlass ein keramischer Einsatz der dazu dient, eine katalytische Zersetzung der Probensubstanz am Aluminiumkörper der Zelle zu verhindern. Nach außen hin wird die Messzelle mit einer zusätzlichen Teflonumhüllung abgeschirmt, um das Infrarotspektrometer vor der Hitzeeinwirkung zu schützen.

Aufbau für Messungen in der Flüssigphase

Zur Untersuchung der Aggregation von DNS-Basen wurden Konzentrationsreihen in deuteriertem Chloroform als Lösungsmittel aufgenommen. Dieses Lösungsmittel ist weniger polar als Wasser und simuliert somit die Verhältnisse, die innerhalb der DNS vorliegen. Gleichzeitig wird aufgrund der Deuterierung eine Überlagerung der Absorptionsbanden der Probensubstanzen mit intensiven Banden des Lösungsmittels weitestgehend vermieden.

Da die Absorptionsbanden in flüssiger Phase ohnehin verbreitert erscheinen, wurden diese Spektren standardmäßig mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen. Um einen möglichst großen Konzentrationsbereich abdecken zu können, wurde eine Messzelle (s. Abb. 3.3) eingesetzt, die (über austauschbare Abstandshalter) Messungen bei unterschiedlicher Schichtdicke ermöglicht. Hierbei waren in der Regel 32 Scans pro Spektrum ausreichend, um ein gutes Signal zu Rausch Verhältnis zu erreichen.

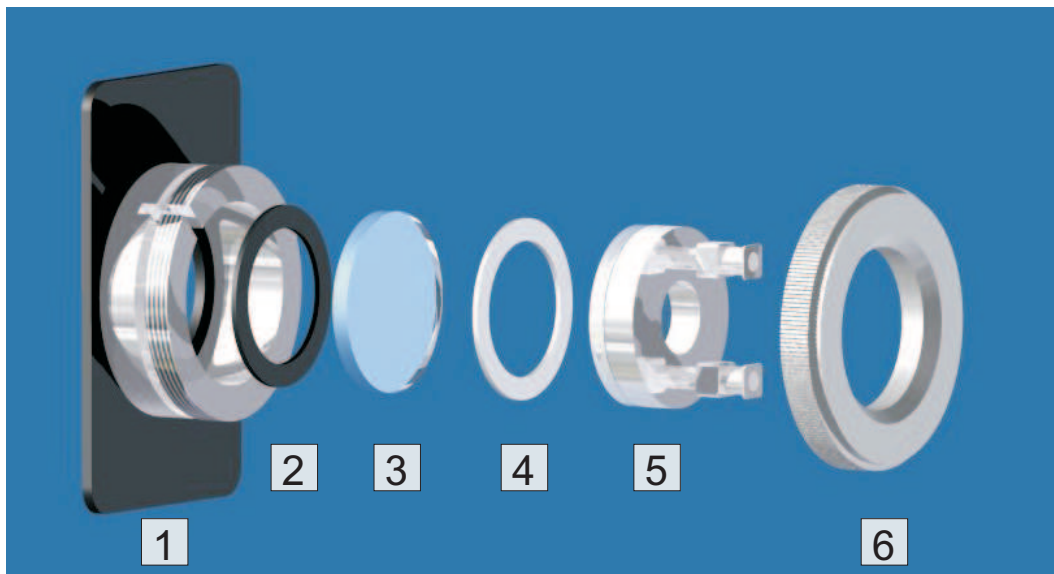


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau der verwendeten Flüssigkeitszelle:
 1) Bodenplatte und Aluminiumgehäuse mit Außengewinde 2) Dichtungsring (Viton) 3) Fenster (CaF_2) 4) Abstandshalter (Teflon) 5) Fenster (CaF_2) mit zwei Bohrungen; fest verbunden mit Deckplatte mit Adaptern zur Zuleitung 6) Klemmring mit Innengewinde

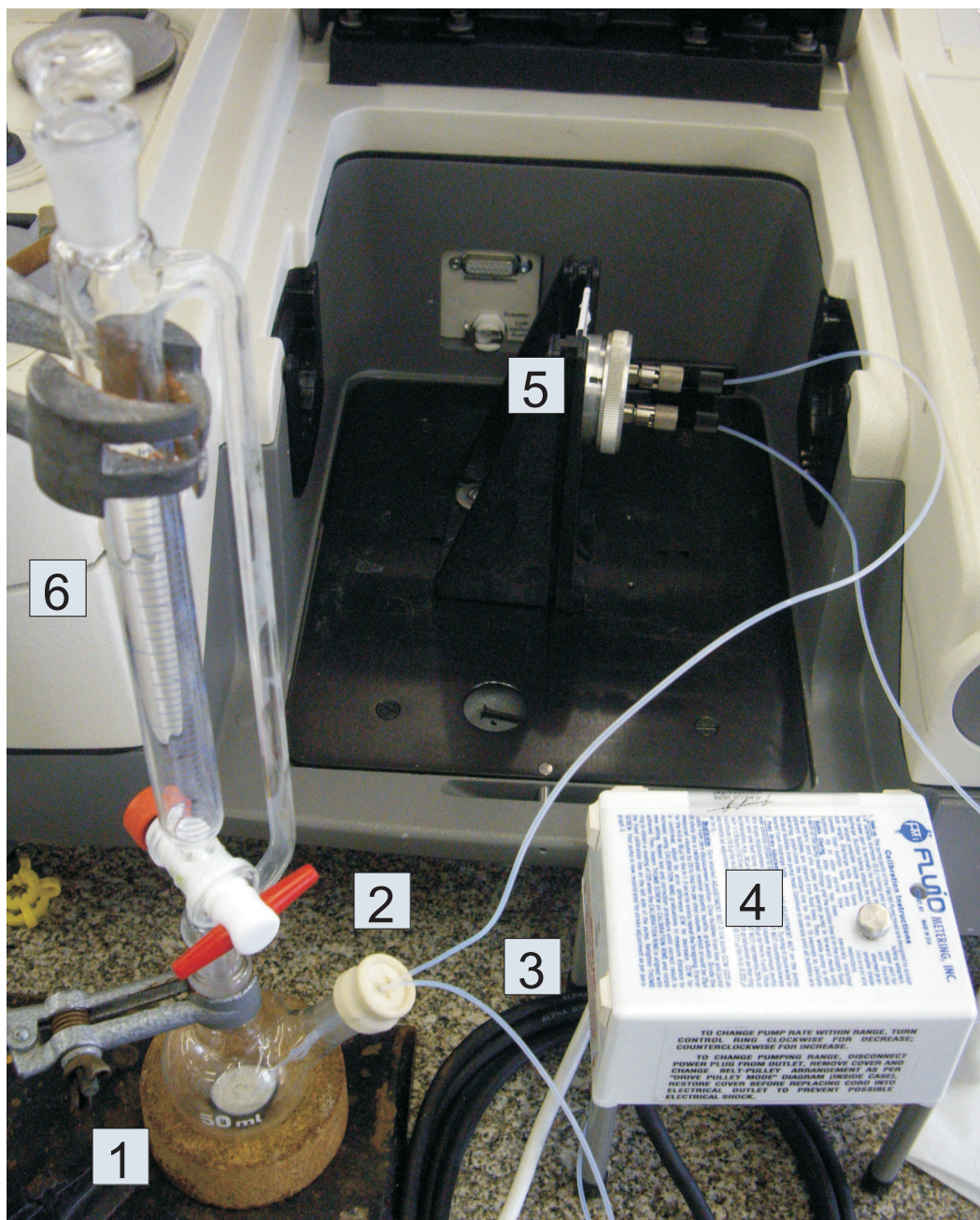


Abbildung 3.4: Durchflusssystem: 1) Vorratsgefäß 2) Septum 3) Zuleitungen 4) Präzisionspumpe 5) Messzelle (s. Abb. 3.3) 6) Tropftrichter

Für die Messreihen am Nukleosid 2'-Desoxycytidin wurde der Messaufbau zu einem geschlossenen Durchflusssystem erweitert, das wie folgt betrieben wurde:

In einem Glaskolben (1) wird ein Volumen von 4 *ml* reinen Lösungsmittels vorgelegt. Diese Menge ist notwendig, um das Totvolumen von Messzelle und Zuleitungen zu füllen und somit den Einschluss von Luftblasen zu verhindern. Über ein Septum (2) können definierte Volumina einer hochkonzentrierten Lösung der Probensubstanz mit Hilfe einer gasdichten Spritze (nicht abgebildet) zugegeben werden. Die Probenlösung wird durch Zuleitungen aus Teflon (3) unter Einsatz einer Präzisionskolbenpumpe ICL PRECISION DISPENSER der Firma MICRO FLUIDS (4) mit einer Durchflussrate von etwa 80 $\mu\text{L/s}$ zyklisch durch die Messzelle (5) gepumpt.

Damit die höchsten Konzentrationen nahe der Sättigung erreicht werden, können im Durchflusssystem Probe und Lösungsmittel vertauscht werden, d.h. es wird eine Probenlösung mit maximaler Konzentration vorgelegt, die dann über eine schrittweise Zugabe von reinem Lösungsmittel verdünnt wird. Da hierzu mitunter größere Mengen Lösungsmittel notwendig werden, ist ein Tropftrichter (6) als Vorratsgefäß zur kontrollierten Zugabe installiert.

Die Durchmischung von Probe und Lösungsmittel wird dabei spektral mit dem Infrarotspektrometer überwacht. Sobald keine Intensitätsänderung zwischen zwei Spektren, die im Abstand von einigen Minuten aufgenommen werden, mehr festzustellen ist, kann von einer hinlänglichen Homogenisierung ausgegangen werden.

3.2 Verwendete Chemikalien

Alle Substanzen, die im Verlauf dieser Arbeit in der Gasphase untersucht wurden, sind kommerziell erhältlich und wurden ohne vorherige Aufarbeitung direkt in den Experimenten eingesetzt. Für die Messungen in flüssiger Phase wurde deuteriertes Chloroform eingesetzt, das unmittelbar vor der Präparation der Probenlösungen über basisches Aluminiumoxid gefiltert wurde. Eine Übersicht über die Substanzen und die vom jeweiligen Hersteller angegebene Reinheit ist in Tab. 3.1 gegeben.

Die geringe Löslichkeit von Adenin und Cytidin in Chloroform macht eine Derivatisierung dieser Substanzen notwendig. Diese konnte in Kooperation mit der Abteilung von Prof. Klaus Schaper aus dem Institut für Organische Chemie durchgeführt werden.

Da das genaue Vorgehen in der Dissertation von Frau Dr. Maydt detailliert dargelegt ist, soll hier nur ein schematischer Überblick über die Synthesen gegeben werden.[45] Dabei werden die Substanzen zunächst mittels einer Base deprotoniert bevor ein hydrophober Alkylrest beim Adenin bzw. *tert*-Butyldimethylsilyl(TBDMS)-Schutzgruppen beim Cytidin eingeführt werden.(s. Abb. 3.5) Die Löslichkeit in Chloroform wird durch diese Derivatisierung um Größenordnungen erhöht.

Name der Substanz	Abkürzung	Hersteller	Reinheit
<i>cis</i> -Stilben	cSb	Sigma Aldrich	≈ 97 %
<i>trans</i> -Stilben	tSb	Sigma Aldrich	96 %
<i>trans,trans</i> -1,4-Diphenyl-1,3-butadien	DPB	Sigma Aldrich	≥ 99 %
1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene	DPH	Sigma Aldrich	≥ 98 %
Pyrazin	Py	Sigma Aldrich	≥ 99 %
Chloroform-d, stabilisiert mit Silberfolie	CDCl ₃	Sigma Aldrich	99,8 at %
1-Cyclohexyluracil	1CHU	Sigma Aldrich	≈ 98 %

Tabelle 3.1: Eingesetzte Substanzen und vom Hersteller angegebene Reinheiten.

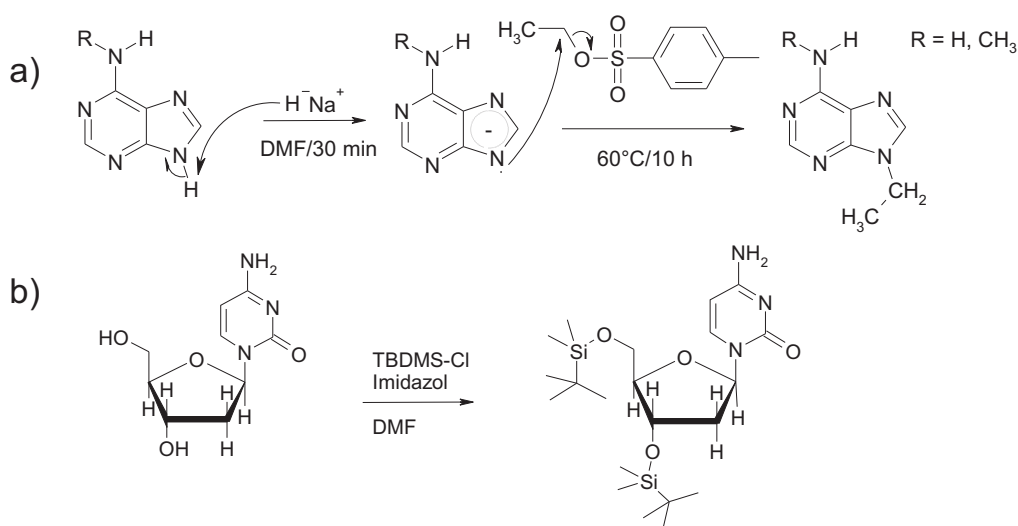


Abbildung 3.5: Erhöhung der Löslichkeit der Probensubstanzen durch chemische Derivatisierung. a) Alkylierung von Adenin/N-Methyladenin b) Silylierung von Cytidin

Kapitel 4

Veröffentlichungen

4.1 α , ω -Diphenylpolyenes

Gas phase infrared spectra and corresponding DFT calculations of α , ω -diphenylpolyenes

Lars Biemann, Michaela Braun and Karl Kleinermanns

*Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
40225 Düsseldorf, Germany.*

Journal of Molecular Spectroscopy, 2010, **259**(1):11-15

Abstract

We present gas phase Fourier Transform InfraRed (FTIR) spectra of the homologue series of α , ω -diphenylpolyenes consisting of *trans*- and *cis*-stilbene, diphenylbutadiene (DPB) and diphenylhexatriene (DPH) obtained by a fast thermal heating technique that enables vaporization without decomposition. Infrared marker bands for the *cis*-isomers of the polyenes have been identified by density functional calculations at the B3LYP/TZVP level of theory. The all trans isomers of DPB and DPH do not interconvert to the *cis*-isomers in the gas phase at 200 °C.

4.1.1 Introduction

The aim of this work is to provide reference data for interaction free vibrational frequencies in the gas phase derived from FTIR spectra of a homologous series of α , ω -diphenylpolyenes starting with stilbene. The vibrational spectra of unsubstituted polyenes and especially of buta-1,3-diene[46] and hexa-1,3,5-triene[47, 48] have extensively been studied and normal coordinate analyses have been carried out by many authors which are cited and discussed in Refs.[49, 50, 51, 52, 53]. In the field of α , ω -diphenylpolyenes the molecular structures of *trans*-stilbene (tSB) and *cis*-stilbene (cSB) in the gas phase have been studied theoretically[54, 55, 56, 57] and by electron diffraction[58, 59]. The stilbenes have been investigated by Infrared-[60, 61, 62, 57, 63, 64, 65, 66] and Raman-[67, 68, 69, 62, 57, 64, 65] spectroscopy in the solid state and in solution by many authors. Band assignments and normal coordinate analysis have been performed with the help of quantum chemical methods at various levels[70, 67, 71, 72, 69, 73, 74, 75, 76] and isomerization pathways have been examined[56, 77, 78]. As gas phase infrared spectra are free from solvent interactions and therefore suitable as benchmarks to indicate the performance of ab initio calculations of harmonic and anharmonic vibrational frequencies[79, 80] we here present reference gas phase data using FTIR spectroscopy. In earlier experiments we reported the first gas phase FTIR spectra of several nucleobases,[81] amino acids,[11, 82] the plant pigment flavone and several of its derivatives[83]. We used a technique of rapid heating of the solid sample to about 250 to 300 °C, followed by fast condensation of the vapor, so that the molecules did not have enough time to decompose. In this paper we extend our measurements to the model systems *trans*- and *cis*-stilbene, diphenylbutadiene (DPB) and diphenylhexatriene (DPH).

4.1.2 Experimental and theoretical methods

The experimental set up has been described in detail before[11]. A stainless steel tube of 10 cm length is sealed at both ends with NaCl windows and connected to a vacuum pump. Both, the tube and the windows are heated using heat resistors to minimize condensation. The sample is placed above a closed ball bearing valve. By turning the valve the sample falls down into the heated stainless steel tube and starts to sublime leading to a time window of about 20 to 60 seconds with sufficient partial pressure for detection. During that time the pressure in the tube rises from $< 10^{-2}$ to about 1-2 mbar. At later times the pressure starts to decrease again to about 5×10^{-2} mbar indicating a condensation of the sample in colder regions of the gas cell. Typically 100-150 mg of sample are used for a single measurement at a tube temperature of about 120 °C (cSB and tSB) and 200 °C (DPB, DPH). The NaCl cell windows were heated to a temperature approximately 20 °C higher than the cell body to avoid condensation[83]. All spectra were recorded with a spectral resolution of 2 cm^{-1} using a Nicolet 5700 FTIR

spectrometer equipped with a liquid-nitrogen cooled MCT detector. Using the series measurement option, a set of spectra (about one scan per second) was recorded. The corresponding interferograms were averaged in the time range between 10-30 seconds after turning the valve to let the sample fall down into the heated cell. Before averaging we checked for the absence of decomposition products by comparing the spectra at different times. The IR intensities generally decrease due to condensation at the cell body after the evaporated sample has passed through the observation volume. The observation of new bands at later times would, therefore, indicate decomposition. In the case of the investigated diphenylpolyenes no bands belonging to decomposition products were discernable.

Tabelle 4.1: Experimental infrared frequencies (in cm^{-1}) and relative intensities (peak heights) of spectra of *cis*-stilbene (cSB), *trans*-stilbene (tSB), 1,4-diphenylbutadiene (DPB) and 1,6-diphenylhexatriene (DPH) in the gas phase. Only the most intense bands are listed. The marked (bold) frequencies are the *cis*-marker band of *cis*-stilbene (cSB) and the $\delta(\text{C-H})$ out-of-plane deformation mode of the all-*trans*-isomers, which is the only band that exhibits a systematic trend of its frequency as a function of the chain length of the polyene

No.	cSB		tSB		DPB		DPH	
	freq	rel. int.	freq.	rel. int.	freq.	rel. int.	freq.	rel. int.
1	3087.8	26.5	3086.6	23.2	3088.0	41.2	-	-
2	3070.0	42.4	3070.7	49.3	3069.4	94.2	3068.7	51.5
3	3026.5	40.8	3035.0	52.1	3030.3	100.0	3025.6	100.0
4	1605.0	10.8	1603.1	31.2	1597.0	33.9	1601.9	42.7
5	1498.4	16.6	1495.6	41.8	1496.2	42.3	1498.7	51.4
6	1450.0	14.0	1451.0	27.2	1446.6	12.7	-	-
7	1404.9	11.6	-	-	-	-	-	-
8	1181.9	4.8	-	-	-	-	-	-
9	1072.7	8.5	1069.1	24.8	1071.5	10.7	-	-
10	1031.3	9.6	1029.8	26.8	1030.8	17.7	1028.9	20.9
11	925.0	19.6	958.7	60.6	981.3	68.6	988.4	77.2
12	860.1	6.4	-	-	824.2	10.3	-	-
13	776.2	50.4	758.6	95.4	736.9	83.5	748.7	59.9
14	697.4	100.0	690.4	100.0	690.6	64.0	692.1	48.4

Calculations were performed employing the valence triple zeta basis set with polarization functions (d,p) from the TURBOMOLE library. [84, 85] The equilibrium geometry was determined for a restricted closed shell KS determinant using the B3-LYP densityfunctional [86, 87]. Harmonic frequencies, obtained through analytical second derivatives using the aoforce module[88, 89] implemented in the Turbomole package, were scaled by 0.9693. In order to check for the formation of isomerization products, the most stable *cis*-, *trans*- and *gauche*-isomers[56] of the investigated molecules have been simulated as well.

4.1.3 Results

Fig. 4.1 shows the Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra of *cis*-stilbene(a), *trans*-stilbene(b), DPB(c) and DPH(d). Below each experimental spectrum a simulated spectrum of the corresponding all-*trans*-geometry is shown. The spectra are obtained from harmonic frequency calculations at the B3LYP/TZVP level. The resulting stick spectra were convoluted using Gaussian profiles with a linewidth of 15 cm^{-1} (FWHM) to facilitate comparison with the experimental bands which typically exhibit a width of $14\text{--}22\text{ cm}^{-1}$. In each experimental and calculated IR spectrum the intensities (peak heights) are scaled to the most intense vibration (intensity 100). In designated spectral regions (dashed boxes) the intensities were multiplied by a fixed factor of 2 and 3, respectively. The observed experimental vibrational frequencies are summarized in Table 4.1. For DPB, two additional conformers have been calculated besides the all-*trans*-geometry. The first conformer (Fig. 4.2 d)) which is the second lowest in energy according to an earlier study at RHF/6-31G(d) level of theory ($\Delta E = 10.6\text{ kJ/mol}$) by Freile et al.[56] exhibits one double bond in *cis*- and one in *trans*-configuration. The second conformer (Fig. 4.2 c)) has *gauche*-geometry and is generated by rotation around the central single bond (dihedral $\Psi = 156.5^\circ$), still having both double bonds in *trans*-configuration. The corresponding calculated spectra are reproduced in Fig. 4.2 together with the geometries and their relative energies. The calculations at the B3LYP/TZVP level of theory result in only slightly higher energies for the *gauche*-geometries than the respective all-*trans*-structures for both, DPB and DPH which leads to an altered order of relative energies compared with the earlier study[56]. The calculated infrared spectra of the five isomers of DPH with the lowest calculated energies are presented in Fig. 4.3.

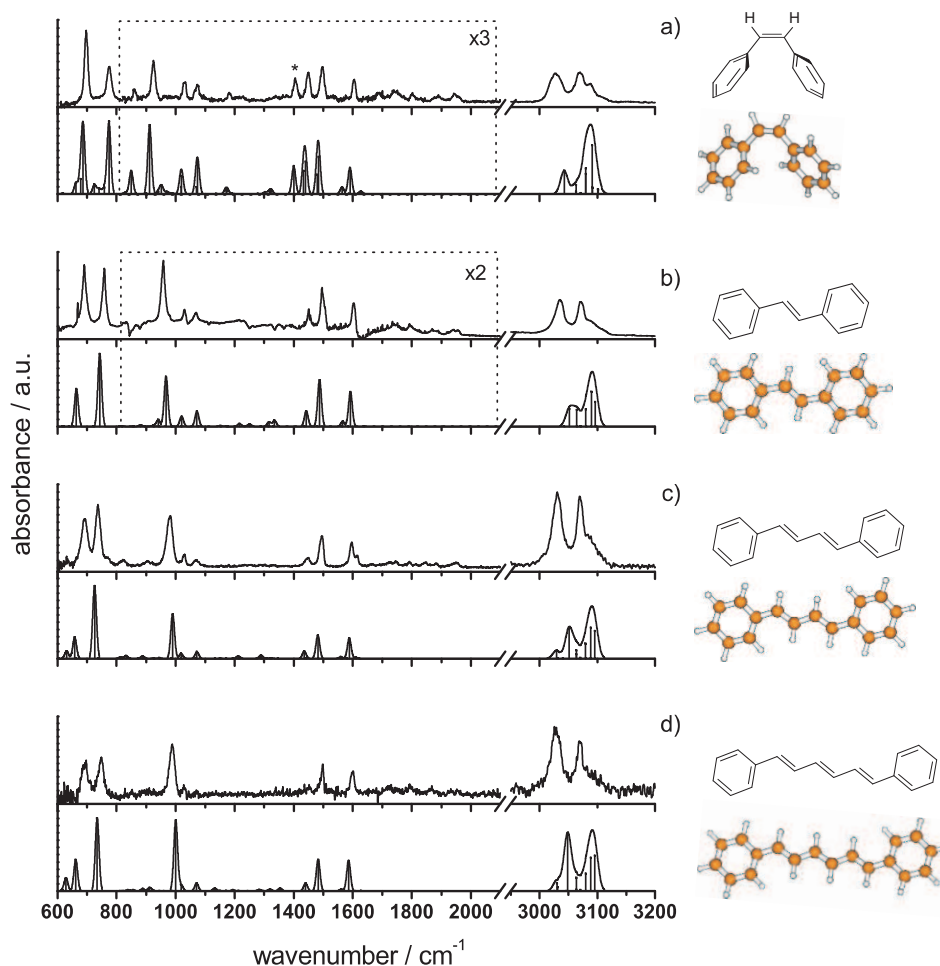


Abbildung 4.1: Experimental gas phase FTIR spectra of *cis*-stilbene(a) and *trans*-stilbene(b) measured at 120 °C and of DPB(c) and DPH(d) at 200 °C compared with simulated spectra from B3LYP/DFT calculations with scaled frequencies ($f = 0.9693$). The band at 1404.9 cm^{-1} in the spectrum of *cis*-stilbene that is marked with an asterisk is the assigned *cis*-marker band which is absent in the spectra of the all-*trans* species.

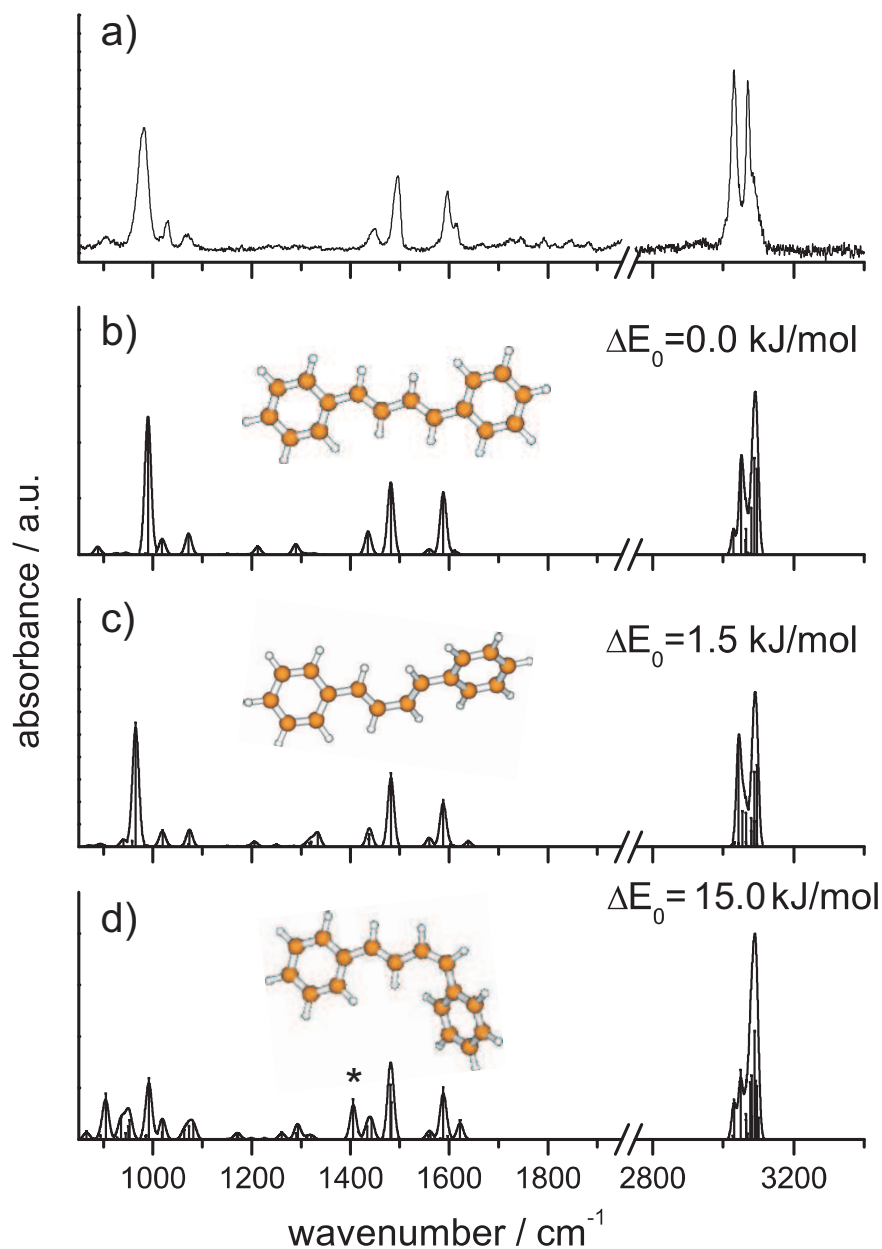


Abbildung 4.2: Experimental gas phase FTIR spectrum of diphenylbutadiene (DPB) measured at 200 °C (a) and simulated spectra of the most stable isomers (b) all-*trans*, c) *gauche* and d) 2,3-*cis*) from B3LYP/DFT calculations with scaled frequencies ($f = 0.9693$). The band marked with an asterisk in spectrum d) is characteristic for a *cis*-geometry.

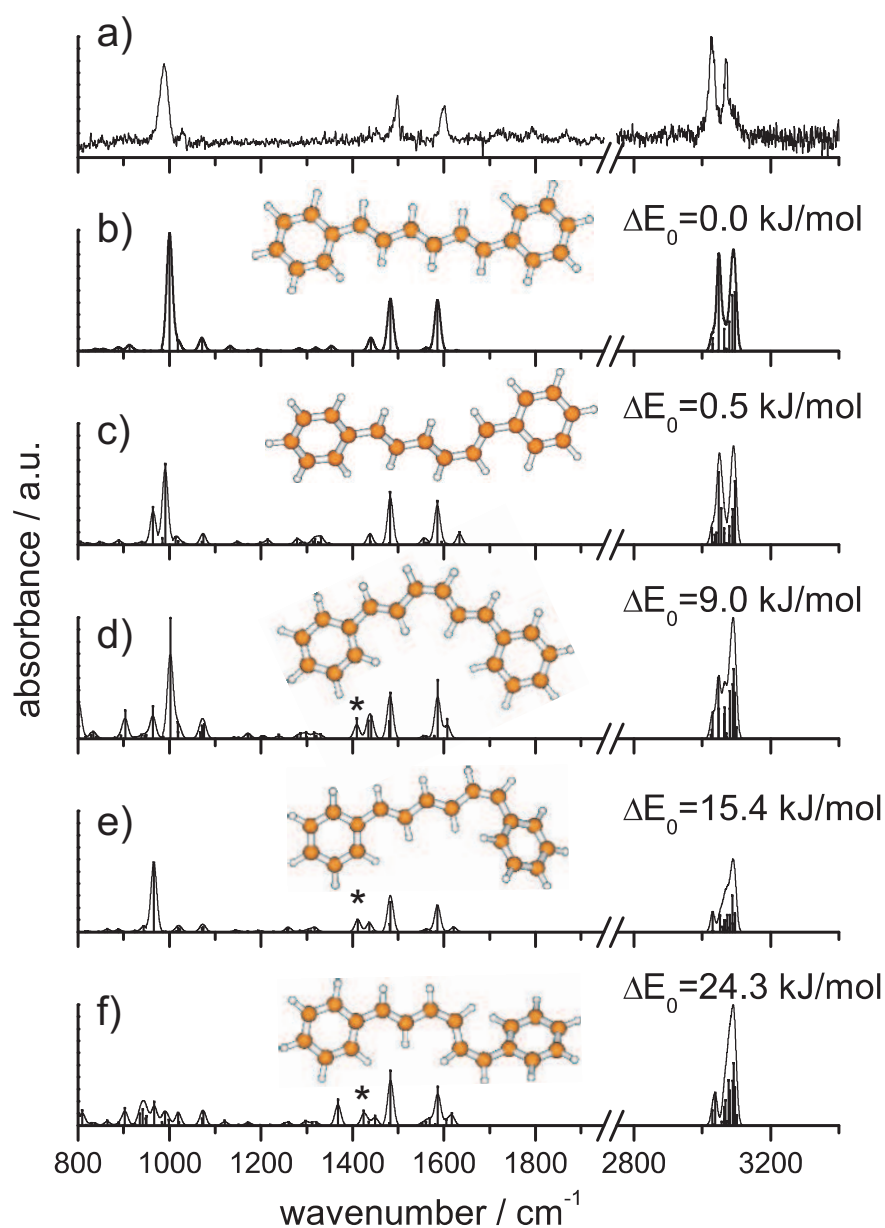


Abbildung 4.3: Experimental gas phase FTIR spectrum of diphenylhexatriene (DPH) measured at 200 °C (a) and simulated spectra of the most stable isomers (b) all-*trans*, (c) *gauche*, (d) 4,5-*cis*, (e) 2,3-*cis* and (f) 2,3- and 4,5-*cis*) from B3LYP/DFT calculations with scaled frequencies ($f = 0.9693$). The bands marked with an asterisk in spectra d), e) and f) are characteristic for *cis*-geometries.

4.1.4 Discussion

The infrared spectra of the homologous series of diphenylpolyenes are very similar. Due to the low vapor pressure which further decreases with chain length, the predicted bands with low intensities are too weak to be decernable from noise (see Table 4.1). Nevertheless the experimental spectra match remarkably well with the calculated spectra and no additional bands arise, proving that the sample molecules could be transferred to the gas phase without decomposition. The observed frequencies for C=C stretch and C-H bend vibrations differ only by up to 5 cm^{-1} from the values measured for *trans*-stilbene in solid phase[90, 65] and *cis*-stilbene as a neat liquid[57] as well as for diphenylbutadiene (DPB) in CCl_4 solution[91, 92].

Two strong absorptions at about 3030 cm^{-1} and 3069 cm^{-1} are present in all spectra, accompanied by a shoulder at the blue side of the spectrum which is most prominent in *cis*-stilbene at 3088 cm^{-1} . According to DFT calculations the band at about 3030 cm^{-1} corresponds to CH stretching modes within the polyene chain while the band at about 3069 cm^{-1} , which is almost unaffected by chain length, can be attributed to the aromatic phenyl groups in agreement with solution spectra[92].

The spectra of the *cis*- and *trans*-isomers can be clearly assigned because of a marker band at 1404.9 cm^{-1} that is present only in the spectrum of *cis*-stilbene (marked with an asterisk in Fig. 4.1). In agreement with liquid phase data[62, 57, 64], this band is assigned to an asymmetric in plane C-H deformation vibration of both C-H groups in the ethylenic double bond in *cis*-configuration: $\delta(\text{C-H})$, which is of B symmetry for *cis*-stilbene (C_2 symmetry)[59]. An analogous band in DPB, predicted at 1405.6 cm^{-1} for the $\delta(\text{C-H})$ vibration located at the *cis*-double bond of DPB, is absent in the experimental spectrum. According to the B3LYP/TZVP calculations, the all-*trans*-DPB is 15.0 kJ/mol lower in energy than the *cis*-isomer. Hence, no *cis*-configuration of DPB is formed in the gas phase experiment and the spectrum is in very good agreement with the calculated all-*trans*-isomer. The *gauche*-structure can not be distinguished because the calculated frequencies differ only slightly from those of the all-*trans*-isomer and the *cis*-marker band is absent. The same holds true for DPH.

An overview of the calculated vibrational frequencies of the five *cis*-, *trans*- and *gauche*-isomers of DPH with the lowest energy[56] is given in Fig. 4.3. The pattern of the bands belonging to C-H stretching vibrations matches the experimental gas phase spectrum only in the case of the two isomers with the lowest energies, the all-*trans*- and the *gauche*-isomer. Furthermore, all geometries containing *cis*-bonds also exhibit marker bands at about 1405 cm^{-1} which are not observed experimentally. Thus it can be concluded that no *cis-trans* isomerization takes place for this series of diphenylpolyenes in the gas phase at $120\text{ }^\circ\text{C}$ and $200\text{ }^\circ\text{C}$, respectively.

For the *trans*-isomers, there is only one band (No. 11 in Table 4.1) standing out that exhibits a systematic trend of its frequency as a function of the chain length of the polyene. This band is assigned to the $\gamma(\text{C-H})$ out-of-plane deformation mode with all C-H displacements in phase. Force constants k and reduced masses μ for this vibrational mode are summarized in Table 4.3. The reduced mass is almost identical for DPB and DPH while the force constant is slightly higher for DPH. A possible explanation for this finding could be the increased π -electron delocalization between double and single bonds in DPH.

Tabelle 4.2: Computed C-C bond lengths (in pm) along the conjugated chain of the all-*trans* isomers of *trans*-stilbene (tSB), 1,4-diphenylbutadiene (DPB) and 1,6-diphenylhexatriene (DPH) from DFT (B3LYP/ TZVP) calculations).

[pm]	C ₁ -C ₂	C ₂ =C ₃	C ₃ -C ₄	C ₄ =C ₅	C ₅ -C ₆	C ₆ =C ₇	C ₇ -C ₈
tSB	146.4	134.3	146.4				
DPB	146.0	134.9	143.9	134.9	146.0		
DPH	145.9	135.0	143.6	135.5	143.6	135.0	145.9

This greater π -electron delocalization with increasing chain length has just recently been confirmed using microwave spectroscopy and high level calculations[93, 50, 94] for the unsubstituted analogues and is also reflected in the bond lengths as shown in Table 4.2. In the course of the $\gamma(\text{C-H})$ out-of-plane vibration the planar sp^2 character of the orbitals located at the carbon atoms is decreased which requires a larger force with increasing π -electron delocalization.

Tabelle 4.3: Computed force constants k and reduced masses μ for the $\gamma(\text{C-H})$ out-of-plane deformation mode of the all-*trans* isomers of *trans*-stilbene (tSB), 1,4-diphenylbutadiene (DPB) and 1,6-diphenylhexatriene (DPH) that exhibits a systematic trend of its frequency as a function of the chain length (unscaled harmonic frequencies derived from B3LYP/ TZVP geometries).

$\gamma(\text{C-H})$	$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}]$	$\mu [g/mol]$	$k [N/m]$
tSB	998.1	1.113	65.33
DPB	1021.2	1.090	66.98
DPH	1031.9	1.087	68.20

4.1.5 Conclusions

The homologue series of α , ω -diphenylpolyenes consisting of *trans*- and *cis*-stilbene, diphenylbutadiene (DPB) and diphenylhexatriene (DPH) could be transferred into the gas phase without decomposition. The measured infrared spectra are free from solvent effects and therefore are in very good agreement with the calculated vibrational frequencies at the B3LYP/TZVP level of theory. Furthermore, no indications for the thermal formation of DPB or DPH *cis*-isomers could be observed.

Acknowledgement:

This work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KL 531/27).

Appendix A. Supplementary material

Visualizations of selected vibrational modes assigned to the experimental infrared absorption bands are available as supplementary material for this article on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

4.1.6 Supplementary material

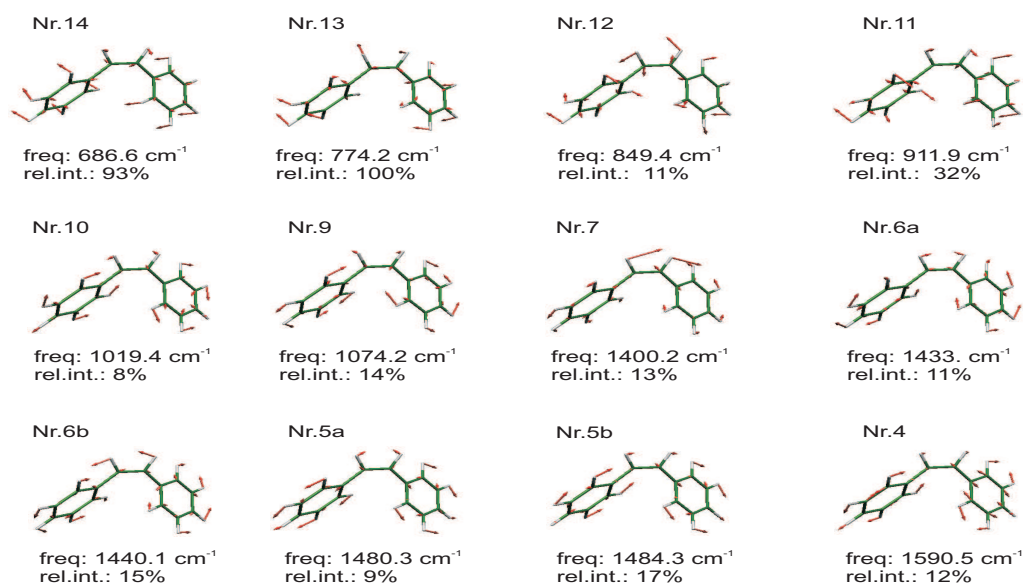


Abbildung 4.4: Visualization of vibrational modes assigned to experimental infrared absorption bands of *cis*-stilbene in the gas phase

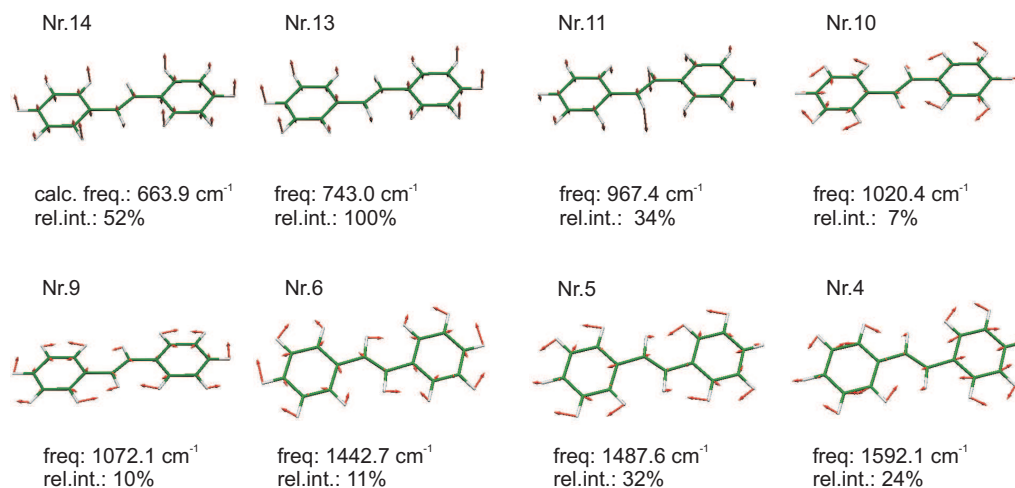


Abbildung 4.5: Visualization of vibrational modes assigned to experimental infrared absorption bands of *trans*-stilbene in the gas phase

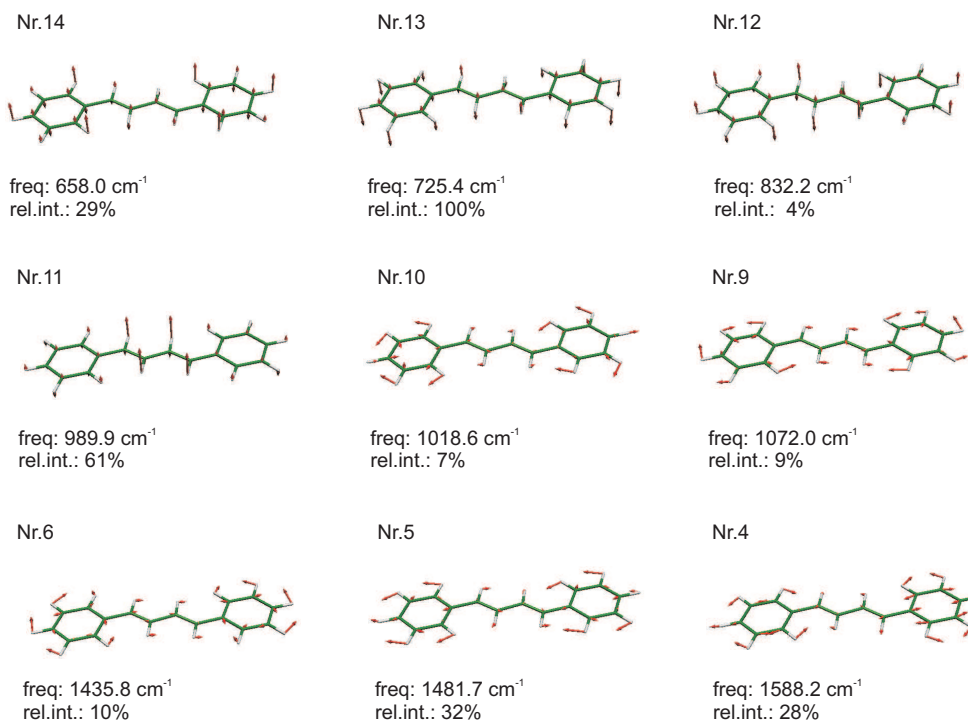


Abbildung 4.6: Visualization of vibrational modes assigned to experimental infrared absorption bands of all-*trans* diphenylbutadiene in the gas phase

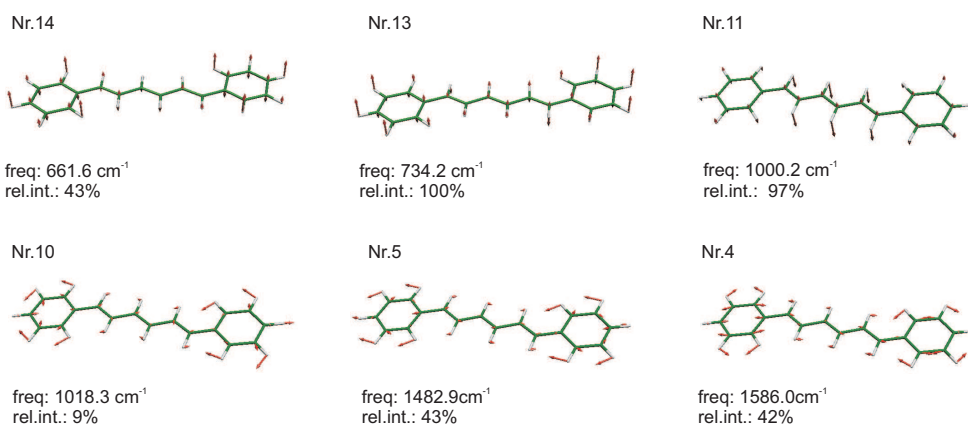


Abbildung 4.7: Visualization of vibrational modes assigned to experimental infrared absorption bands of all-*trans* diphenylhexatriene in the gas phase

4.2 Analysis of the FTIR spectrum of pyrazine

Analysis of the FTIR spectrum of pyrazine using evolutionary algorithms

Michael Schmitt^a, Lars Biemann^a, W. Leo Meerts^b
and Karl Kleinermanns^a

^aHeinrich-Heine-Universität, Institut für Physikalische Chemie I,
D-40225 Düsseldorf, Germany

^b Molecular and Biophysics group, Institute for Molecules and Materials,
Radboud University Nijmegen,
NL-6500 GL Nijmegen, The Netherlands.

Journal of Molecular Spectroscopy, 2009, **257**(1):74-81

Abstract

The FTIR spectrum of pyrazine in the gas phase has been measured and analyzed using automated evolutionary algorithms. For the stronger bands, the rotational constants for ground and vibrationally excited states, the correct band types and in some cases centrifugal distortion constants could be extracted. Several hot bands have been identified and assigned by comparison to a cubic force field calculation at the MP2/6-311G(d,p) level of theory. Vibrationally averaged rotational constants for the excited bands can give a further guidance in the assignment of the vibrational bands.

4.2.1 Introduction

Rovibrational or rovibronic spectra of medium size molecules contain a plethora of information which can be extracted using automated assignment techniques based on evolutionary algorithms (EA) even if no full rotational resolution can be achieved in the experiment.[95] This lack of rotational resolution might be caused by limitations of the experimental device, or by intrinsic properties of the investigated system, like e.g. for electronic excitation a short excited state life time.[96] Vibrationally averaged rotational constants of the excited vibrational state contain information about the harmonic and cubic force field and can be used as further guidance in the assignment of the experimental spectra. Quartic centrifugal distortion constants contain information about the harmonic force field and Coriolis couplings. The band type images the direction of the change of the dipole moment and can be used e.g. to distinguish between different conformers with local vibrations and differing band types. Overtones of the bands, which might show up in the contours contain the anharmonic constants of this vibration. The D_{2h} symmetry of pyrazine serves as a test case, which can easily be assigned to different band types due to its high symmetry. Vibrations of B_{1u} symmetry give rise to *a*-type bands, while B_{2u} vibrations are *b*-type bands and B_{3u} are *c*-type bands. For the definition of the axis system, the inertial axes and the atomic numbering used in this publication refer to Figure 4.2.1. This information, which can be extracted reliably from the rovibrational contours using evolutionary algorithm based fitting procedures, allows for the assignment of vibrational fundamentals and combination bands through symmetry and vibrationally average rotational constants. Pyrazine has been investigated experimentally thoroughly in the gas phase, the condensed phase and in the crystal using both infrared and Raman spectroscopy.[97, 98, 99, 100] Califano *et al.* gave a rather extensive assignment of pyrazine based on vibrational contours in the infra-red spectrum.[98] Raman spectra in the molten state have been taken by Zarembowitch *et al.*[101] and later by Billes *et al.* [99]

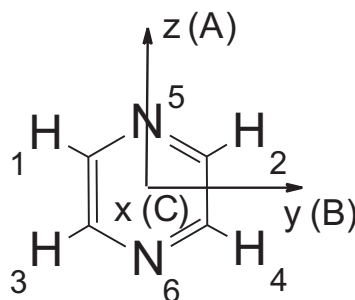


Abbildung 4.8: Structure, numbering and definition of the cartesian and inertial axis system of pyrazine.

The most reliable calculations of vibrational frequencies of pyrazine up to now comprise anharmonic force fields using density functional theory (DFT) with the B97-1

exchange-correlation functional and a triple- ζ plus double polarization (TZ2P) basis set [102], and the calculation of the quartic force field of pyrazine in the B3LYP/6-31G(d) hybrid density-functional approximation.[103]

4.2.2 Methods

Experimental procedures

The FTIR spectra of pyrazine have been recorded using a commercial Nicolet 5700 spectrometer. The sample was heated to 308, 315 and 550 K in a homebuilt vacuum absorption cell with a sample path of 10 cm, which is sealed with NaCl windows. Heating of the absorption cell was performed by means of heating resistors, and are connected directly to the window holders, in order to keep the windows at a slightly higher temperature than the cell to avoid condensation of the sample at the windows. The cell was evacuated and the spectra were taken at 2-3 mbar sample pressure. Pyrazine (99%) was obtained from Sigma Aldrich and used without further purification.

Computational methods

Ab initio calculations

The structure of pyrazine in the electronic ground state has been optimized at the MP2/6-311G(d,p) level with the Gaussian 03 program package.[35] The SCF convergence criterion used throughout the calculations was an energy change below 10^{-8} Hartree, while the convergence criterion for the gradient optimization of the molecular geometry was $\partial E/\partial r < 1.5 \cdot 10^{-5}$ Hartree/Bohr and $\partial E/\partial \varphi < 1.5 \cdot 10^{-5}$ Hartree/degree, respectively. Harmonic frequencies have been calculated by means of analytical second derivatives of the energy with respect to the Cartesian nuclear coordinates, Φ_{ij} . Anharmonic corrections to the vibrational frequencies and to the equilibrium structures were taken into account using numerical cubic (Φ_{ijk}) and some of the quartic force constants (Φ_{ijkl}) and computing the vibrational parameters using a second order perturbative approach as implemented in the Gaussian program suite.[104]

Spectral analysis using evolutionary algorithms

Evolutionary algorithms have been shown to yield reliable results for automated fits of fully rotationally resolved electronic and infrared spectra, as well as of electronic and IR band contours. Three different evolutionary algorithms were employed for the fits:

- A genetic algorithm (GA): A description of the GA used here can be found in [105, 106]. The genetic algorithm is basically a global optimizer, which uses concepts copied from natural reproduction and selection processes. For a detailed

description of the GA the reader is referred to the original literature. [107, 108, 109]

- The derandomized-ES DR2 algorithm: The DR2 evolution strategy[110] is aimed to accumulate information about the correlation or anti-correlation of past mutation vectors in order to adapt the step size.
- The CMA evolution strategy: The CMA-ES (Covariance Matrix Adaptation Evolution Strategy) is an evolutionary algorithm for difficult non-linear non-convex optimization problems in continuous domain. It turns out to be a particularly reliable and highly competitive evolutionary algorithm for local optimization [111] and, surprising at first sight, also for global optimization.[112]

All three methods use the same cost function (C_{fg}), which is defined as $C_{fg} = (1 - F_{fg})$ [106], where F_{fg} is the fitness function:

$$F_{fg} = \frac{\sum_{r=-l}^l w(r) \sum_{i=1}^N f(i)g(i+r)}{\sqrt{\sum_{r=-l}^l w(r) \sum_{i=1}^N f(i)f(i+r)} \sqrt{\sum_{r=-l}^l w(r) \sum_{i=1}^N g(i)g(i+r)}}. \quad (4.1)$$

In this equation f and g represent the experimental and calculated spectra, respectively. The overlap function $w(r)$ determines the steepness of the error landscape.

For an asymmetric rotor spectrum of a transition between the two vibrational states, the following Hamiltonian was employed.[113]

$$H_R = AJ_a^2 + BJ_b^2 + CJ_c^2. \quad (4.2)$$

Here J_g ($g = a, b, c$) are the components of the body fixed angular momentum operator, A, B and C are the three rotational constants.

Centrifugal distortion constants may be included if necessary through the model of a distortable rotor in Watson's A -reduced form.[114, 115]

4.2.3 Results and Discussion

Figure 4.2.3 shows an overview of the gas phase FTIR spectrum of pyrazine at a temperature of 308 K. The fit of the individual rovibrational bands requires the consideration of nuclear spin statistics. The 144 spin functions of the two pairs of identical hydrogen atoms and one pair of identical nitrogen atoms transform like $51A_g + 27 B_{2u} + 39B_{3u} + 27B_{1g}$ under the symmetry operations of the point group D_{2h} . The 78 *gerade* spin functions combine with the *eo* and *oe* rotational states, while the 66 *ungerade* states combine with the *oo* and *ee* rotational states, where *e* and *o* designate the even and oddness of the K_a and K_c levels.

In the following we will present the different strategies to fit the rovibrational contours of the individual vibrational bands. For each band type one example will be

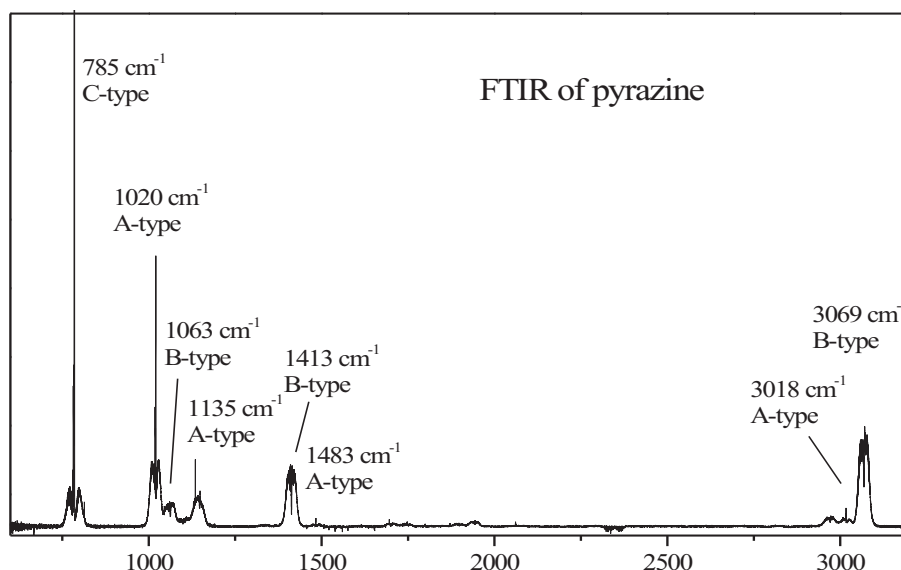


Abbildung 4.9: Overview FTIR spectrum of pyrazine. Frequencies and band types of the fundamentals are given in the Figure.

shown in detail. First we will start with the *b*-type bands in the spectrum. The band at 1413 cm^{-1} is shown in Figure 4.2.3. Trace a shows the experimental spectrum. The strongly overlapping rovibrational transitions generate a dense 'background', which does not contain usable information about the spectrum, but on the other hand contributes strongly to the cost function of the evolutionary optimizer. Therefore, a direct fit of this band converges only very slowly if at all. Trace b of Figure 4.2.3 shows the 'background' of the spectrum, which has been obtained by averaging over 150 data points (1.5 cm^{-1}). In trace c this background is subtracted from the original spectrum. The remaining spectrum contains all the extractable information from the spectrum and can be simulated using the best parameters from an EA-fit given in Table 4.4. The band type of the spectrum was fitted by allowing the angles θ and ϕ to adapt values between 0 and 90° . For a pure *b*-type band both angles are exactly 90° . The fit ran to values above 89° . The calculated rovibrational transitions are convoluted with a Gaussian profile of 0.14 cm^{-1} to take account of the experimental resolution of the spectrometer. This simulation is shown in trace d. The last trace (e) gives then the simulated spectrum after addition of the previously subtracted background. Due to the high temperature and the good signal to noise ratio for this band even the five quartic centrifugal distortion constants in the ground and vibrationally excited state could be determined. All molecular parameters are compared to the results of the anharmonic MP2/6-311G(d,p) calculation in Table 4.4. Very good agreement is obtained for the vibrationally averaged rotational constants for the vibrational ground state (averaged over the zero-point vibrations). Also the changes of the rotational constants upon vi-

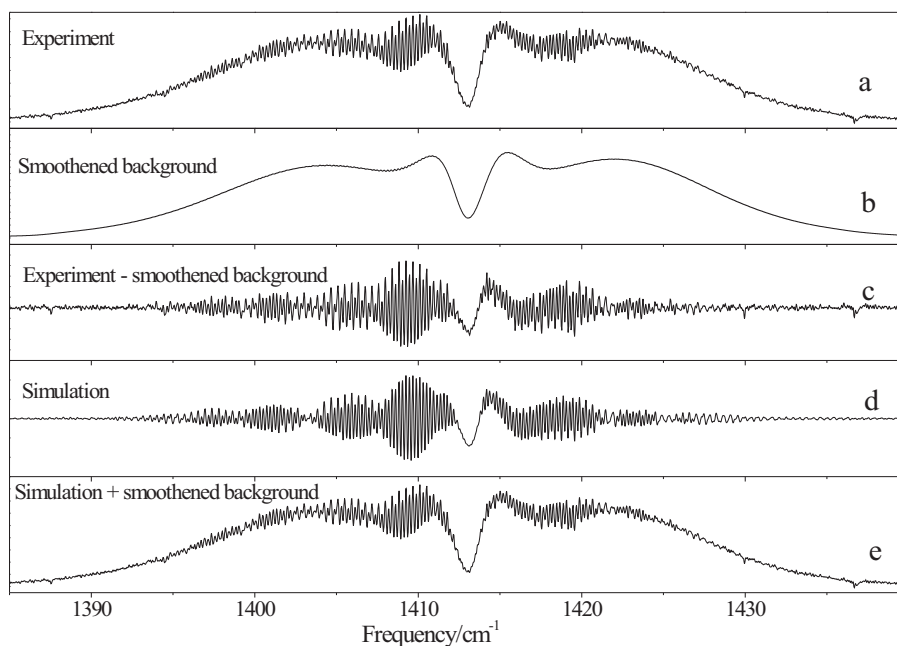


Abbildung 4.10: FTIR spectrum of the 1413 cm^{-1} band of pyrazine along with the best fit. For details see text.

brational excitation of this special mode are reproduced with a fair accuracy. The order of magnitude of the five centrifugal distortion constants from Watson's A -reduced Hamiltonian [114, 115] Δ_J , Δ_{JK} , Δ_K , δ_J , and δ_K are correctly reproduced by the theory despite δ_K which is off by about an order of magnitude.

The same strategy was employed for the b -type band at 3070 cm^{-1} . The fit of this contour resulted in a considerably worse agreement between experiment and simulation than for the 1413 cm^{-1} band. Subtracting simulation and experiment resulted in a remaining weaker component, shifted by -1.413 cm^{-1} , which was then included in a subsequent fit. Table 4.4 gives the molecular parameters of both components of this band. The existence of a second, overlapping band is in agreement with high resolution infrared, optothermal spectroscopy using a color-center laser for IR generation.[116] Due to the strongly overlapping second component it was not possible in this case to fit the centrifugal distortion constants. After the successful fit, we performed a global fit of the bands in the region between 2900 and 3100 cm^{-1} , which are slightly overlapping, keeping the previously determined parameters of the 3070 cm^{-1} band fixed. Four bands have been identified, with center frequencies of 2971 , 3007 , 3018 , and 3069 cm^{-1} . The third is an a -type band, the other three are b -type transitions.

A slightly different procedure is applied for fitting the vibrational band at 785 cm^{-1} . From the appearance it is clear that this band is a c -type band. The central Q -branch shows a noticeable shading to the red which cannot be explained by structure due to a

Tabelle 4.4: Optimized parameters from EA fits of the b -type rovibrational bands of pyrazine. For assignments and symmetry cf. Table 4.6.

	1413		3070		
	Exp.	MP2	Exp	MP2	
			Band I	Band II	
assignment	17		23	-	23
A / cm^{-1}	0.213828(12)	0.2139610	0.213823(80)	0.213823(80)	0.2139610
B / cm^{-1}	0.197308(13)	0.1951885	0.197304(87)	0.197304(87)	0.1951885
C / cm^{-1}	0.102611(11)	0.1020720	0.102608(72)	0.102608(72)	0.1020720
$\Delta_J / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	0.051(7)	0.026	-	-	-
$\Delta_{JK} / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	-0.044(21)	-0.025	-	-	-
$\Delta_K / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	0.023(17)	0.049	-	-	-
$\delta_J / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	-0.010(40)	0.011	-	-	-
$\delta_K / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	0.0018(66)	0.017	-	-	-
$\Delta I / \text{amu } \text{\AA}^2$	0.01	0.04	0.0128	0.01	0.04
ν_0 / cm^{-1}	1413.10	1413.0	3069.08	3067.67	3092.7
$\Delta A / 10^{-3} \text{cm}^{-1}$	-0.0156(15)	0.014	-0.22(6)	-0.21(12)	-0.152
$\Delta B / 10^{-3} \text{cm}^{-1}$	-0.1084(108)	-0.19	-0.21(6)	-0.44(12)	-0.05
$\Delta C / 10^{-3} \text{cm}^{-1}$	-0.1330(133)	-0.16	-0.17(4)	-0.38(8)	-0.046
$\Delta\Delta_J / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	-0.052(5)	-	-	-	-
$\Delta\Delta_{JK} / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	-0.001(22)	-	-	-	-
$\Delta\Delta_K / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	-0.002(20)	-	-	-	-
$\Delta\Delta_J / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	-0.004(4)	-	-	-	-
$\Delta\Delta_K / 10^{-6} \text{cm}^{-1}$	0.0053(89)	-	-	-	-
$\Delta\Delta I / \text{amu } \text{\AA}^2$	0.17	0.23	0.11	0.3624	0.03

single Q -branch, cf. Figure 4.11. Instead the observed structure is due the occurrence of hot sequence bands of this vibration. Figure 4.11 shows the central part of the spectrum taken at temperatures of 315 and 550 K, respectively. We added three more bands to the fit described above and fitted also the frequency separation, which reflects the difference in the $1 \leftarrow 0$, $2 \leftarrow 1$, $3 \leftarrow 2$, and $4 \leftarrow 3$ transitions. They are separated by -0.61 , -1.22 , and -1.89 cm^{-1} , respectively. The anharmonic MP2/6-311G(d,p) calculations (cf. Table 4.6) locate vibration 16 at 788.15 cm^{-1} and the first overtone of this vibration at 1575.72 cm^{-1} yielding a difference between $1 \leftarrow 0$ and $2 \leftarrow 1$ of -0.59 cm^{-1} in excellent agreement with the experimental value of -0.61 cm^{-1} . A fourth Q -branch band can be observed at 781.99 cm^{-1} . This band is too far away to be explained by another member of the same sequence. Instead, this band can be assigned to a hot band transitions originating from mode 2 which will be discussed in more detail below.

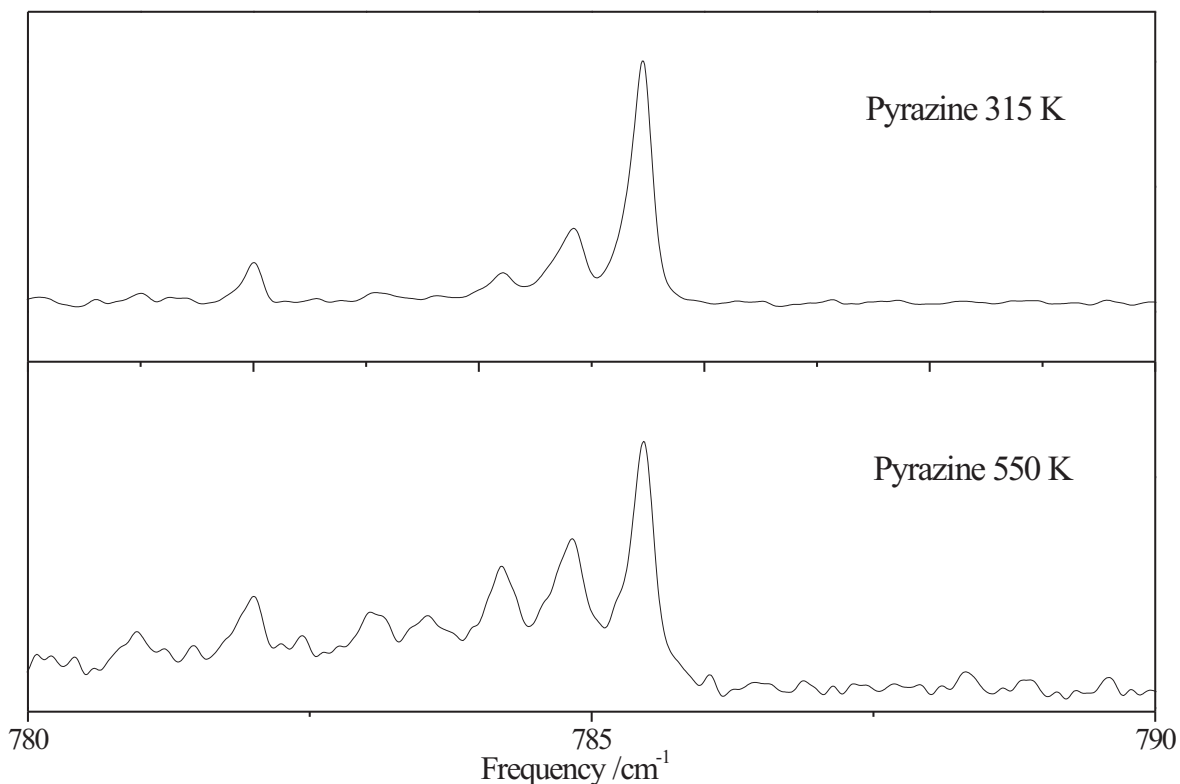


Abbildung 4.11: Spectrum of the central region of the 785 cm^{-1} band taken at 315 and 550 K, respectively.

In c -type spectra, the overwhelmingly strong Q -branch poses a problem with the cost function of the EA. Since it contains nearly no structure due to the limited resolution, its appearance is completely insensitive to changes of the molecular parameters. Nevertheless, it contributes more than 90 % of the intensity of this band and dominates

therefore the cost function, which is used to evaluate the quality of the fit. Therefore we employ a weight function, which reduces the weight of the central part of the spectrum in the evaluation of the cost function:

$$W = 1 - \sum_{i=1}^n A^{(i)} W_{type}^{(i)}(\Delta_w^{(i)}, (\nu - \nu_0^{(i)})) \quad (4.3)$$

where A is the amplitude of the weight function and $\Delta_w^{(i)}$ is its width. The weight function employed here is a square function defined as:

$$W_B(\Delta_w, \Delta\nu) = \begin{cases} 1 & \text{for } |\Delta\nu| \leq \frac{1}{2}\Delta_w \\ 0 & \text{otherwise.} \end{cases} \quad (4.4)$$

We chose the amplitude in this special case to suppress 95 % of the Q -branch intensity and subtracted additionally the smoothened background of the spectrum as described for the 1413 cm^{-1} band. Figure 4.12 shows the result of the fit. The smoothening tends to broaden somewhat the narrow Q -branch, cf. the second trace of Figure 4.12 an effect which is cancelled when computing the final simulation by re-adding the smoothened background. The best fit parameters for the strongest component of this c -type band are collected in Table 4.5.

As last example we present the fit of the band(s) at 1020 cm^{-1} . From the rovibrational contour it is clear that this band represents an a -type band. As in the case of the 785 cm^{-1} band, several Q -branches are visible, pointing to the existence of hot bands. The band has been fit using a strategy similar to that for the 785 cm^{-1} band. The intensities in the central part of the spectrum are suppressed using a 70 % block filter and additionally the smoothened background is removed from the spectrum. Figure 4.13 shows the results of the fit. The values of the best fit parameters for the strongest component of this band are compiled in Table 4.5.

For the a - and c -type bands discussed here, we compared the experimental ground state rotational constants and their changes upon vibrational excitation to the respective values of the anharmonic MP2/6-311G(d,p) calculation. For both bands good agreement for the ground state and for the vibrationally averaged bands is obtained. Sign as well as order of magnitude of the changes of the rotational constants are correctly predicted at this level of theory.

For the weaker vibrational bands the fit of the rotational constants yields no reliable results due to the bad signal/noise. Nevertheless, using the ground state rotational constants from the fits of the stronger bands, the band type can unequivocally be determined. Using this symmetry information and comparison to the results of the anharmonic MP2/6-311G(d,p) frequencies and their respective symmetries, all IR active fundamentals could be assigned (cf. Table 4.6 for harmonic and anharmonic frequencies) with the exception of the mode 15 (B_{2u}). The dipole moment change of this band is very close to zero and the calculated IR intensity smaller than 0.003 km/mole . This

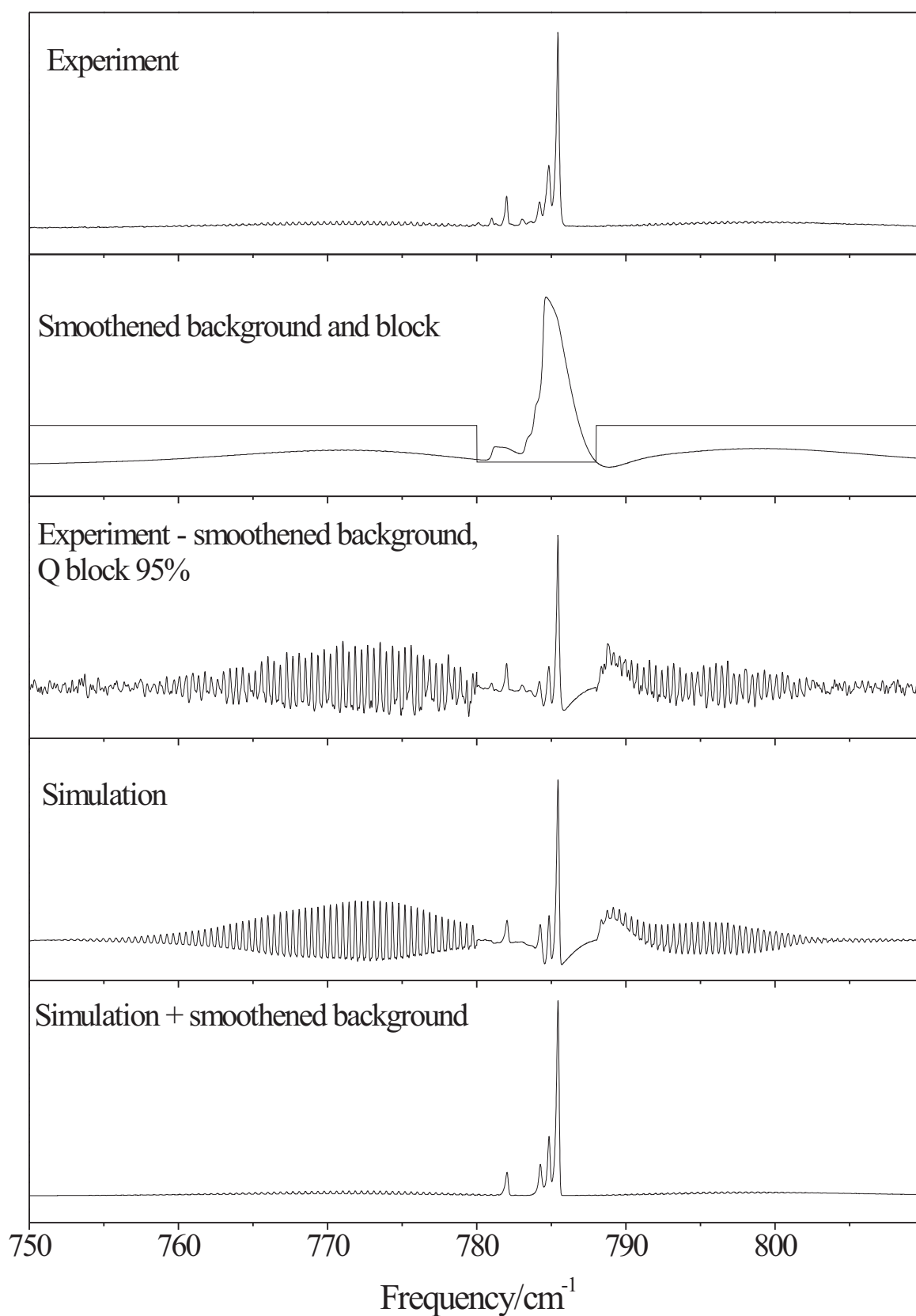


Abbildung 4.12: FTIR spectrum of the 785 cm⁻¹ band of pyrazine along with the best fit. For details see text.

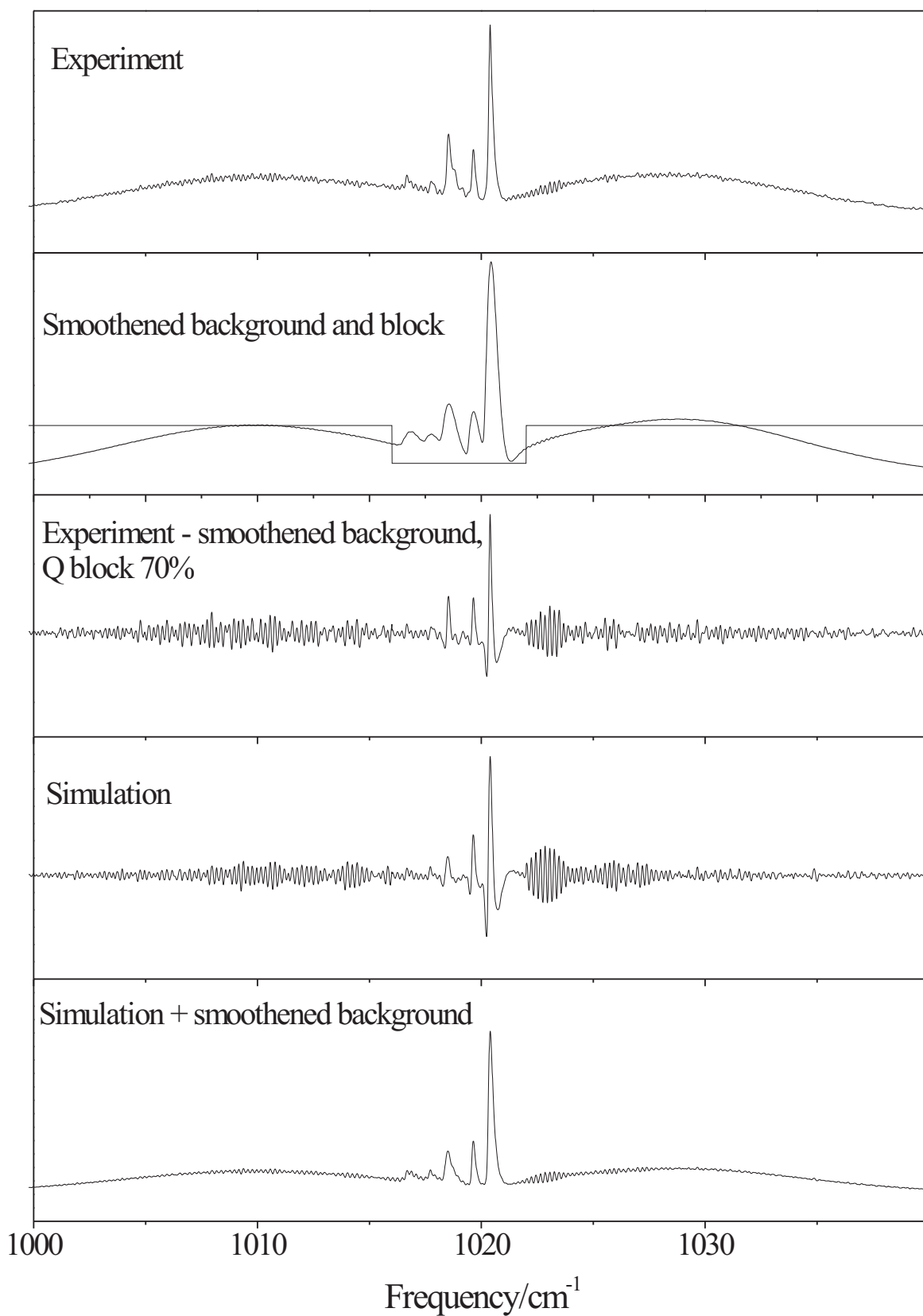


Abbildung 4.13: FTIR spectrum of the 1020 cm^{-1} band of pyrazine along with the best fit. For details see text.

Tabelle 4.5: Optimized parameters from EA fits of the *a*- and *c*-type rovibrational bands of pyrazine. For assignments and symmetry cf. Table 4.6.

	785		1020	
	Exp.	MP2	Exp.	MP2
band type	C		A	
assignment	6		11	
A / cm^{-1}	0.21382(20)	0.2139610	0.21382(41)	0.2139610
B / cm^{-1}	0.19730(21)	0.1951885	0.19730(26)	0.1951885
C / cm^{-1}	0.10260(38)	0.1020720	0.10260(25)	0.1020720
$\Delta I / \text{amu } \text{\AA}^2$	0.01	0.04	0.01	0.04
ν_0 / cm^{-1}	785.49	788.1	1020.31	1019.0
$\Delta A / \text{cm}^{-1}$	-0.00022(77)	-0.000195	0.00008(160)	-0.000036
$\Delta B / \text{cm}^{-1}$	-0.000166(80)	-0.000163	0.00022(16)	0.000250
$\Delta C / \text{cm}^{-1}$	0.00001(5)	0.00003	-0.00034(11)	-0.000186
$\Delta\Delta I / \text{amu } \text{\AA}^2$	-0.16	-0.15	0.69	0.45

mode was previously assigned to an IR band at 1130 cm^{-1} [101] or at 1335 cm^{-1} . [99] Nevertheless, the anharmonically corrected frequency of 1292 cm^{-1} (cf. Table 4.6) seems to be too far away for these assignments.

The band type, along with the vibrational frequency hence allows for the assignment of the combination bands and hot vibrational bands too, cf. Table 4.7. In this table, the symmetry of the combination band which is deduced from the band type of the fundamentals, as well as the assignments for the bands composing the combination and their respective symmetries are given. The hot band, which appears in the spectrum of the 785 cm^{-1} band at 782 cm^{-1} as a *c*-type band can be explained e.g. by the hot transition $2+6 \leftarrow 2$ (which is $\nu_{16b}(\text{B}_{3u}) + \nu_{11}(\text{B}_{3u}) \leftarrow (\nu_{16b}(\text{B}_{3u}))$ in Wilson's numbering scheme). Another *c* type band at 814 cm^{-1} , which appears in the *R*-branch of the 785 cm^{-1} band is assigned to the transition $3+10 \leftarrow 6$ in very good agreement to the calculated anharmonic frequencies in Table 4.7. Thus, the band type assures the assignments, which otherwise would only be based on the frequency information. The last column gives the anharmonically corrected frequency of the combination bands or of the hot vibrational bands. For the gas phase IR spectra, comprising the B_{1u} , B_{2u} , and B_{3u} bands the agreement with the anharmonic frequencies is spectacular. The agreement with the Raman active A_g , B_{1g} , B_{2g} , and B_{3g} bands, which have been measured in the liquid phase is still very good. Larger disagreement is only found for the region of the CH stretch vibrations (up to 2%).

The anharmonic force field calculations indicate two Fermi resonances in the region of the CH stretching vibrations: mode 23 at 3069.1 cm^{-1} (B_{2u}) is resonant to the combination of modes 17 at 1413.1 cm^{-1} (B_{2u}) and 20 at 1580 cm^{-1} (A_g) and mode 22 at 3018.0 cm^{-1} (B_{1u}) with the combination band of mode 18 at 1483.5 cm^{-1} (B_{1u}) and

mode 20 at 1580 cm^{-1} (A_g) readily explaining the observed deviations of the vibrational frequencies in the region of the CH stretch vibrations.

4.2.4 Conclusions and Outlook

A fit of rovibrational contours in the FTIR spectrum of pyrazine could be performed, aided by automated fits using evolutionary algorithms. Albeit the experimental resolution is limited, it is possible to extract a multitude of molecular parameters, upon them the rotational constants in both states, the absolute value of the angle of the dipole moment changes with the inertial axes, and in favorable cases even centrifugal distortion constants. Using classical (manual) line assignment based fits this task would be impossible due to the highly congested nature of these spectra.

In the present case we have only pure band *a*-, *b*-, and *c*-type bands due to the high symmetry of the pyrazine molecule. Nevertheless, we fit the angles θ and ϕ , which describe the dipole moment changes for each vibration in order to test the sensitivity of the fit for the determination of the band type. In all cases, not only the correct band type was found, but also the hybrid character due to the other two orientations was always less than 1%. Thus, we are confident, that this method can be applied to molecules with less symmetry, in order to determine the relative band types in hybrid bands.

This procedure will be especially beneficial in cases, where local vibrations can be assigned, and the direction of the change of their dipole moment gives direct structural information about the geometric orientation of the vibrating group in the inertial frame of the molecule. Possible applications range from local N-H or C=O stretching vibrations of amino acids which appear quite isolated in their respective spectral range to artificially localized C-D stretch vibrations in singly deuterated compounds.

Acknowledgment

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft through project K1531/27. The authors like to thank the National Computer Facilities of the Netherlands Organization of Scientific Research (NWO) for a grant on the Dutch supercomputing facility SARA. Granted computing time from the RRZ Köln is gratefully acknowledged. This work is part of the doctoral thesis of Lars Biemann.

Tabelle 4.6: Harmonic (ν^h) and anharmonic (ν^a) normal mode frequencies (in cm^{-1}) and IR intensities (in km/mole) of pyrazine from the MP2/6-311G(d,p) optimized structure. The first column gives the mode index, numbered by ascending frequencies, the next column the mode assignment following the nomenclature of Wilson,[117] the third column the assignment according to Mulliken.[118]

Vibration	Wilson	Mulliken	Symmetry	Band type	IR int.	ν^h	ν^a	Obs.
1	16a	7	A_u	-	0.0	338.2	336.7	336 ^b
2	16b	24	B_{3u}	C	22.1	416.2	410.1	418 ^a
3	6a	5	A_g	-	0.0	598.7	589.5	602 ^a
4	6b	22	B_{3g}	-	0.0	710.7	703.3	704 ^a
5	4	14	B_{2g}	-	0.0	751.0	747.7	756 ^a
6	11	23	B_{3u}	C	31.0	798.4	788.1	785.1
7	10a	8	B_{1g}	-	0.0	939.2	925.6	927 ^a
8	17a	6	A_u	-	0.0	960.6	977.7	971 ^b
9	5	13	B_{2g}	-	0.0	962.4	960.6	960 ^a
10	1	4	A_g	-	0.0	1028.6	1011.7	1016 ^a
11	12	12	B_{1u}	A	35.5	1035.7	1019.0	1020.3
12	15	18	B_{2u}	B	10.0	1087.6	1060.3	1062.9
13	18a	11	B_{1u}	A	4.6	1162.4	1133.8	1135.2
14	9a	3	A_g	-	0.0	1257.1	1235.8	1233 ^a
15	14	17	B_{2u}	B	0.0	1346.1	1292.4	-
16	3	21	B_{3g}	-	0.0	1368.1	1339.8	1346 ^a
17	19b	16	B_{2u}	B	32.1	1442.2	1413.0	1413.1
18	19a	10	B_{1u}	A	2.2	1504.3	1472.7	1483.5
19	8b	20	B_{3g}	-	0.0	1563.8	1521.8	1525 ^a
20	8a	2	A_g	-	0.0	1617.0	1566.9	1580 ^a
21	7b	19	B_{3g}	-	0.0	3201.0	3093.4	3040 ^a
22	13	9	B_{1u}	A	3.8	3201.5	3085.8	3018.0
23	20b	15	B_{2u}	B	51.4	3216.6	3092.7	3069.1
24	2	1	A_g	-	0.0	3221.3	3050.0	3055 ^a

^aRaman frequencies for the A_g , B_{1g} , B_{2g} , and B_{3g} modes are taken from Ref.[101].

^b A_u modes are neither IR nor Raman active. The values given here are deduced from combination bands in Table 4.7.

Tabelle 4.7: Experimental vibrational frequencies, band types and assignments of all observed bands of pyrazine along with the anharmonically corrected vibrational frequencies (ν^a) from the MP2/6-311G(d,p) calculations. The column MMod refers to the numbering according to ascending frequencies, the following columns give the assignments according to Ref.[117] and Ref.[118].

Obs.	Type	Sym.	Mode	Wilson	Mulliken	ν^a
781	C	B _{3u}	[6+6]-6	[6(B _{3u})+6(B _{3u})]-6(B _{3u})	[23+23]-23	787.7
782	C	B _{3u}	[2+6]-2	[16b(B _{3u})+11(B _{3u})]-16b(B _{3u})	[24+23]-24	788.3
785	C	B _{3u}	6	11(B _{3u})	23	788.1
814	C	B _{3u}	[3+10]-6	[6a(A _g)+1(A _g)]-11(B _{3u})	[5+4]-23	818.8
1020	A	B _{1u}	11	12(B _{1u})	12	1019.0
1063	B	B _{2u}	12	15(B _{2u})	18	1060.3
1099	B	B _{2u}	[1+5]	16a(A _u)+4(B _{2g})	7+14	1092.0
1135	A	B _{1u}	13	18a(B _{1u})	11	1133.8
1334	B	B _{2u}	[2+7]	16b(B _{3u})+10a(B _{1g})	24+8	1338.7
1413	B	B _{2u}	17	19b(B _{2u})	16	1413.1
1483	A	B _{1u}	18	19a(B _{1u})	10	1472.7
1702	B	B _{2u}	[6+7]	11(B _{3u})+10a(B _{1g})	[23+8]	1712.2
1748	A	B _{1u}	[12+4]	6b(B _{3g})+15(B _{2u})	[18+22]	1769.8
1871	C	B _{3u}	[1+19]	8b(B _{3g})+16a(A _u)	[7+20]	1857.9
1898	A	B _{1u}	[7+8]	10a(B _{1g})+17a(A _u)	[8+6]	1905.7
1943	B	B _{2u}	[8+9]	17a(A _u)+5(B _{2g})	[6+13]	1952.4
2061	A	B _{1u}	[18+3]	6a(A _g)+19a(B _{1u})	[10+5]	2060.4
2971	B	B _{2u}	[17+20]	19b(B _{2u})+8a(A _g)	[16+2]	2962.1
3007	B	B _{2u}	[18+19]	19a(B _{1u})+8b(B _{3g})	[10+20]	2986.4
3018	A	B _{1u}	22	13(B _{1u})	9	3085.8
3069	B	B _{2u}	23	20b(B _{2u})	15	3092.7

4.3 1-Cyclohexyluracil Aggregates in CDCl₃

FT-IR Spectroscopy of 1-Cyclohexyluracil Aggregates in CDCl₃ Solutions

Lars Biemann, Thomas Häber and Karl Kleineremanns

*Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
40225 Düsseldorf, Germany.*

Journal of Chemical Physics, 2009, **130**(12):125102/1-125102/5

Abstract

We reinvestigated the self-aggregation of 1-cyclohexyluracil (1CHU) in CDCl₃ solutions. Wavelength dependent absolute extinction coefficients of the monomer and of dimers are presented on the basis of a simple deconvolution method. Two isomeric dimer structures coexist in solution with similar abundance. Our results are supported by RI-B3LYP/TZVP calculations within the COSMO framework, to account for solvent effects in the *ab initio* calculations.

4.3.1 Introduction

Specific interactions between nucleobases such as hydrogen bonding or π -stacking play a crucial role in determining the structures of deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA) and are the molecular basis of information transfer in biological systems. The association of base-pairs as well as the self-association of nucleobases in solution has been well studied by IR spectroscopy and techniques. [119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127] While many investigations focused on the determination of aggregation constants and their temperature dependence, it remained unclear whether the solution spectra are a superposition of the absorption of different isomeric aggregate structures and, most import, which isomers contribute to the experimentally observed spectra.

Recently we developed a simple deconvolution method that allows us to separate the FT-IR solution spectra of nucleobases into contributions of monomers, dimers, trimers and so on, even if the spectral features overlap. [128] We only need a single monomer band that is not perturbed by any aggregate absorption. The deconvolution method provides us with absolute, wavelength dependent extinction coefficients of the aggregates and, when combined with *ab initio* calculations, facilitates the characterization of the aggregate structures. The applicability of the method has been successfully demonstrated on the self-aggregation of 9-ethyladenine. [128]

We decided to extent the deconvolution method to the self-aggregation of 1-cyclohexyluracil (1CHU). From IR spectra taken at various sample concentrations, association constants of $K_d = 6.1 \text{ dm}^3/\text{mol}$ [121] and $6.8 \text{ dm}^3/\text{mol}$ [123] have been deduced, but no indications for the formation of larger aggregates have been found.

The most simple aggregates that can be formed by 1CHU via hydrogen bonds are dimers. The carbonyl groups at positions 2 and 4 can serve as hydrogen bond acceptors and the N-H group in position 3 as hydrogen bond donor. Neglecting geometries in which only a single hydrogen bond is formed and focussing on cyclic dimers containing two hydrogen bonds, only three geometries remain, which are shown in Figure 4.29. To distinguish between these dimers, we will refer to them as the (2-2)-, (2-4)- and (4-4)-dimer according to the numbered positions of the carbonyl groups which act as hydrogen bond acceptors.

4.3.2 Methods

1-Cyclohexyluracil (1CHU, 99.0 %) and deuterio-chloroform (98 at. %), stabilized with silver foil, were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. All spectra were recorded with a spectral resolution of 2 cm^{-1} using a Nicolet 5700 FTIR spectrometer equipped with a liquid-nitrogen cooled MCT detector. Both solvent and solution were handled in the same IR cell with CaF₂ windows having an absorption pathway of 0.2 or 1.0 mm. The weak CDCl₃ absorption at 3154.6 cm^{-1} of a

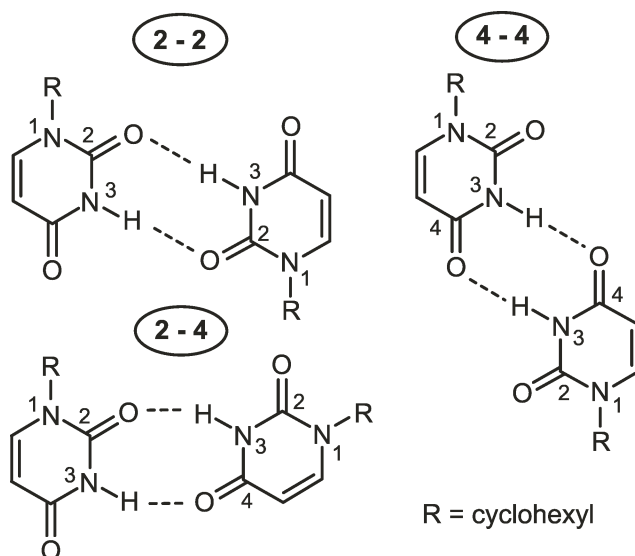


Abbildung 4.14: Valence structures of the three possible cyclic 1CHU dimers containing two hydrogen bonds. The symbol R stands for the bulky cyclohexyl side chain. The structures are labeled according to the positions of the hydrogen bond accepting carbonyl groups $C_2=O$ and $C_4=O$.

pure solvent spectrum was used to calibrate the absorption path length by comparison with a $CDCl_3$ spectrum of known path length measured in a sealed liquid spectrophotometer cell (Model SL-2, 1.079 mm path length, International Crystal Laboratories). The spectra were corrected for solvent contributions by subtracting a pure solvent spectrum that was taken immediately before measuring each solution. Using $CDCl_3$ instead of $CHCl_3$ ensured that no part of the spectral region of interest was superimposed by strong solvent absorptions.

Concentrations were varied between 22 and 100 mM (10^{-3} mol/dm³). All solutions were prepared on the day of their use and kept in the dark to prevent the formation of impurities due to photolysis of the solvent $CDCl_3$. Solutions of lower concentrations were prepared by diluting a solution of 100 mM.

Geometry optimizations and harmonic frequency calculations at the B3LYP/ TZVP level of theory were carried out for the monomer and the three doubly-bridged dimers. All calculations were performed using the Turbomole program package [31, 38, 36, 37] and within the resolution-of-the-identity (RI) approximation [129, 130]. In the optimized structures the “plane” of the cyclohexyl sidegroup is oriented perpendicular to the plane of the pyrimidine ring. The effect of placing 1CHU inside a solvent cavity has been estimated by using the conductor-like screening model (COSMO) [131] implemented in the Turbomole program package. COSMO is a continuum solvation model, where

the solute molecule forms a cavity within the dielectric continuum of permittivity ϵ that represents the solvents. For chloroform a permittivity of $\epsilon = 4.807$ and a refractive index of $n = 1.444$ has been used. [132] The latter is only used in the numerical frequency calculations to account for the problem of non-equilibrium solvation within the continuum model, because the molecular vibrations are on a time scale that do not allow a reorientation of the solvent molecules. [133]

Calculated harmonic vibrational frequencies were scaled by 0.9482 (N–H stretch) and 0.9801 (C=O stretch) in order to match the calculated and experimental N₃–H and C₄=O stretching vibrations of the 1CHU monomer in solution. Our calculations predict a red-shift of the N–H stretching vibration of about 20 cm^{-1} when going from the gas phase to the chloroform solution. This is in good agreement with the experimentally observed frequency shift of about 40 cm^{-1} . [128] The larger red-shift observed in the experiment is in part due to weak hydrogen-bond like interactions between 1CHU and the solvent molecules. [120]

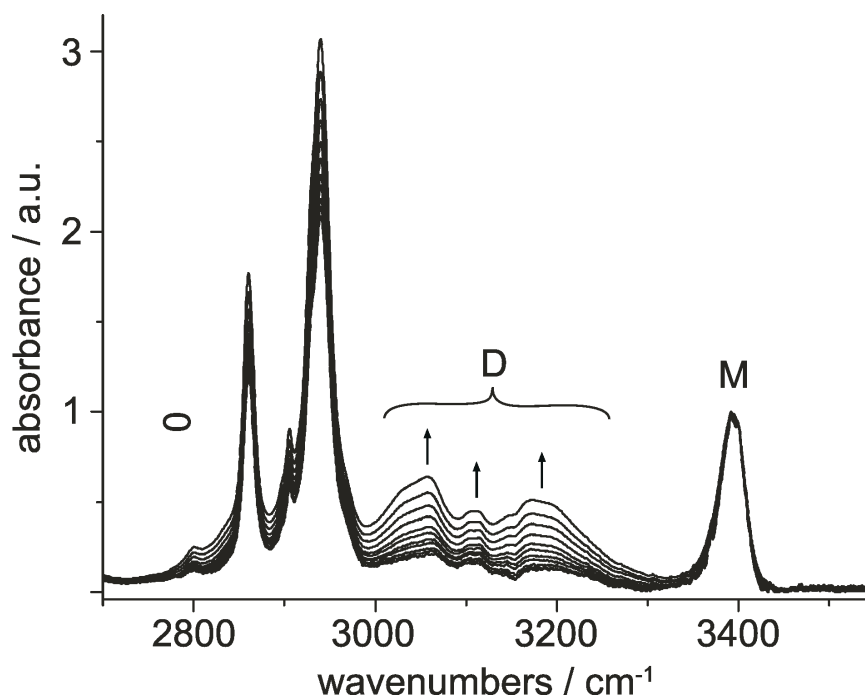


Abbildung 4.15: FTIR spectra of 1CHU in CDCl_3 measured at various concentrations (22 to 100mM, from bottom to top). The spectra were scaled to match the intensity of the N–H stretching vibration of the monomer at 3392 cm^{-1} (M). With increasing concentration several maxima arise between 3000 and 3300 cm^{-1} which belong to 1CHU dimers (D).

4.3.3 Results

Figure 4.30 shows a series of FTIR absorption spectra of 1CHU in CDCl_3 at concentrations ranging from 20 to 100 mM. The spectra are scaled to match the intensity of the monomer N_3H stretching vibration at 3392 cm^{-1} (marked M in Figure 4.30). With increasing concentration several absorption maxima arise between 3000 and 3300 cm^{-1} which can be assigned to aggregates of 1CHU (marked D). [120, 121, 123, 124] The bands below 3000 cm^{-1} belong to the C–H stretching modes of the cyclohexyl side chain. The concentration dependence of the FTIR spectra and previous work demonstrate that the spectra are a superposition of several components and the solutions consist of at least monomers and dimers.

We can derive the integrated absorption coefficient of the monomer N_3H stretching vibration by fitting the corresponding band to Voigt profiles and by extrapolating the apparent integrated absorption coefficients $\alpha_{app} = A/c_0l$ to the limit of infinite dilution: $\alpha = \lim_{c_0 \rightarrow 0} A/c_0l$. [123, 128] Here A is the integrated absorption obtained from the fits, c_0 is the initial 1CHU concentration and l the optical path length. From that we obtain an extrapolated integrated absorption coefficient of $\alpha = 50.1 \pm 5.4\text{ km/mol}$.

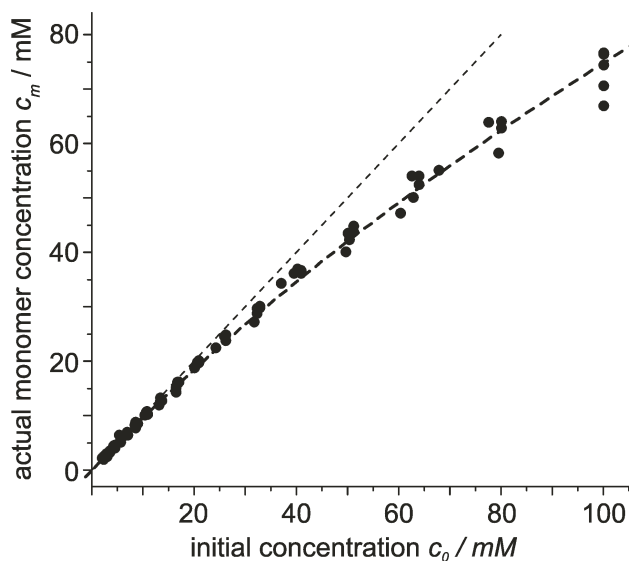


Abbildung 4.16: Actual monomer concentration c_m as a function of the initial concentration c_0 . The dashed line is a fit to a quadratic polynomial in c_m (see text for details). The dimerization constant obtained from the fit is $K_d = 2.26 \pm 0.18\text{ dm}^3/\text{mol}$. There is no indication for the formation of trimers. The dotted line is the diagonal $c_m = c_0$ and illustrates the deviation from a linear behavior due to aggregate formation.

Following our previous analysis of 9-ethyladenine aggregates we can now determine the aggregation constant(s) by plotting the actual monomer concentration c_m in solution as a function of the initial concentration c_0 (Figure 4.16) and by fitting it to a polynomial of the form:

$$c_0 = c_m + 2c_d + 3c_t = c_m + 2K_d c_m^2 + 3K_d K_t c_m^3 \quad (4.5)$$

where c_d and c_t are the actual dimer and trimer concentrations and K_d and K_t are the dimerization and trimerization constants, respectively. The actual monomer concentration c_m is obtained by dividing the integrated absorption of the N₃-H monomer band by the previously derived integrated absorption coefficient and the optical path length: $c_m = A/\alpha l$. The dashed line in Figure 4.16 is a fit to a quadratic polynomial by setting K_t to zero. The dimerization constant obtained from the fit is $K_d = 2.26 \pm 0.18 \text{ dm}^3/\text{mol}$. Inclusion of the trimerization constant does not improve the quality of the fit. To the contrary, statistical errors render the value of K_t insignificant, so that there is no indication for the formation of 1CHU trimers or larger aggregates, in agreement with previous work. [121, 123] In contrast, trimers do exist in 9-ethyladenine/CDCl₃ solutions [123] and the trimerization constant K_t could be readily obtained by fitting the experimental data to equation 4.13. [128]

To separate the experimental FTIR spectra into contributions from monomers and dimers we use a simple deconvolution method that has been described in detail earlier. [128] Assuming that Beer's law is applicable and that the 1CHU/CDCl₃ solutions consist only of monomers and dimers, then the absorption at a given wavenumber $\tilde{\nu}$ is the sum of the absorptions of monomers (A_m) and dimers (A_d) and we can write:

$$A(\tilde{\nu}) = A_m + A_d = \epsilon_m l c_m + \epsilon_d l K_d c_m^2 \quad (4.6)$$

where ϵ_m and ϵ_d are the wavelength dependent extinction coefficients of the monomer and dimers, respectively. By fitting the experimental absorption at a given wavenumber but for different concentrations to equation 4.19 we can determine the monomer and dimer contributions to the spectrum. In addition, since we know the dimerization constant from equation 4.13 we can provide absolute values of the extinction coefficients over the full spectral region covered by our experiment.

Figure 4.34 shows the absolute extinction coefficients of the 1CHU monomer (dashed line) and of the dimers (solid line) between 1550 and 1850 cm⁻¹ as well as between 2600 and 3600 cm⁻¹. The spectra in Figure 4.34 have been averaged over five independent concentration series, each of it covering a concentration range from 2 to 100 mM. Fit errors and statistical errors make up less than 15 % of the prominent spectral features. The N-H stretching absorption of the monomer has a maximum at 3392 cm⁻¹ with an extinction coefficient of about 116 dm³/(mol cm), in agreement with the literature value of 135 dm³/(mol cm). [121] In the region of the C=O stretching vibrations there are two major absorptions. The C₄=O carbonyl group has a maximum at 1687 cm⁻¹

and the $\text{C}_2=\text{O}$ group at 1711 cm^{-1} with peak extinction coefficients of about 2210 and $965\text{ dm}^3/(\text{mol cm})$, respectively. Integration of the three monomer absorptions yields integrated absorption coefficients for the $\text{C}_4=\text{O}$, $\text{C}_2=\text{O}$ and N_3-H stretching vibrations of 439, 228 and 42 km/mol , respectively. If we take into account the experimental errors, then the so derived integrated absorption coefficient of the monomer N_3-H stretching vibration matches the value obtained from extrapolating the apparent absorption coefficients to infinite dilution ($\alpha = 50.1\text{ km/mol}$). Furthermore, the relative ratios of the experimental absorption coefficients are in acceptable agreement with the calculated absorption coefficients of 1457, 470 and 114 km/mol at the RI-B3LYP/TZVP level of theory within the COSMO framework and using the harmonic approximation.

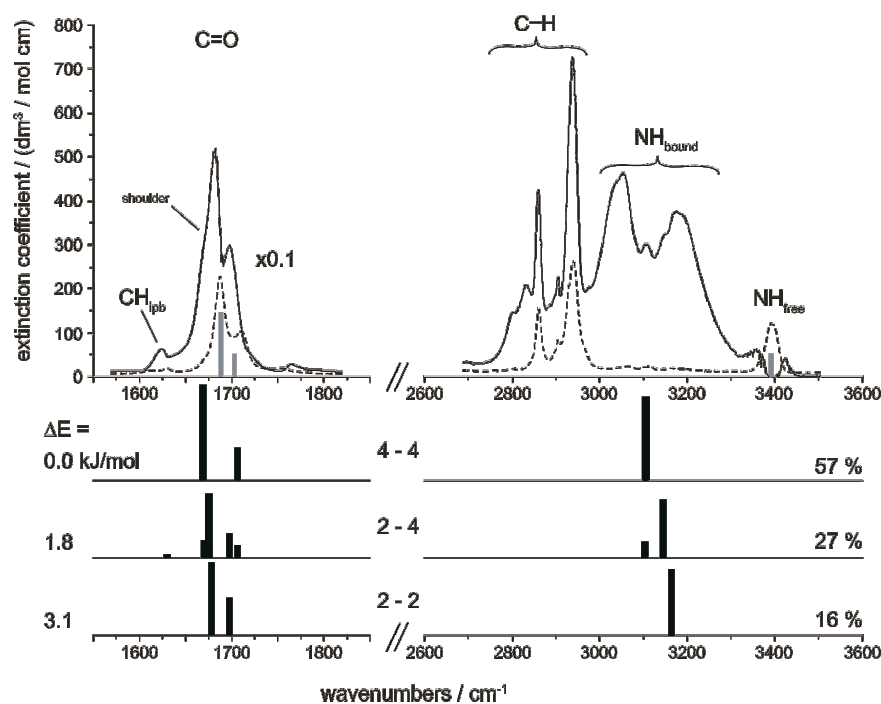


Abbildung 4.17: Wavelength dependent extinction coefficients [in $\text{dm}^3/(\text{mol cm})$] of the monomer (dashed line) and of dimers (solid line) in the region of the $\text{C}=\text{O}$ stretching vibrations (left, scaled by 0.1) as well as the $\text{C}-\text{H}$ and $\text{N}-\text{H}$ stretching vibrations (right). Also shown are the calculated and scaled stick spectra at the RI-B3LYP/TZVP level of theory within the COSMO framework. The stick spectrum of the monomer is shown in gray underneath the deconvoluted monomer spectrum. The numbers to the right of the dimer stick spectra are relative populations based on a Boltzmann distribution.

The cyclic dimers in Figure 4.29 no longer feature a free, non-hydrogen bonded NH group, so that the absorptions between 3000 and 3300 cm⁻¹ belong to hydrogen bonded NH···O=C groups. [120, 121, 123, 124] Figure 4.34 shows three major features around 3049, 3107 and 3177 cm⁻¹, but several shoulders of overlapping absorptions are also discernible. At 3049 cm⁻¹ the extinction coefficient is about 456 dm³/(mol cm). In the C=O stretching region we observe two major absorptions at 1681 and 1697 cm⁻¹ with maximum extinction coefficients of 5115 and 2930 dm³/(mol cm), respectively. In addition there is a shoulder at approximately 1672 cm⁻¹ and a weaker absorption at 1624 cm⁻¹.

Also shown in Figure 4.34 are the calculated and scaled stick spectra of the monomer (gray) and of the three dimer structures (black) at the RI-B3LYP/TZVP level of theory within the COSMO framework. The stick spectra of the dimers are sorted with increasing relative energy from top to bottom. Table 4.8 summarizes the calculated relative energies and dipole moments of the monomer and of the dimers, both in the gas phase and in solution. The most stable dimer structure is the symmetric 4-4 dimer, followed by the 2-4 and 2-2 dimers (see Figure 4.29 for the structures). The energetic order of the three dimers does not change when going from the gas phase to CDCl₃ solutions.

Tabelle 4.8: Calculated relative energies ΔE_0 (in kJ mol⁻¹) and dipole moments μ of the 1CHU monomer and of the three dimers in the gas phase and in CDCl₃ solutions (RI-B3LYP/TZVP).

	gas phase		CDCl ₃ solution ^a	
	ΔE_0	μ / Debye	ΔE_0	μ / Debye
monomer	-	5.64	-40.44 ^b	7.00
4-4 dimer	0.00 ^c	0.04	0.00 ^c	0.03
2-4 dimer	3.41 ^c	5.27	1.83 ^c	6.34
2-2 dimer	4.79 ^c	0.02	3.13 ^c	0.04

^aCalculated using the COSMO model ($\epsilon = 4.807$). ^bEnergy difference (including ZPE) of the calculated monomer in solution and in the gas phase. ^cRelative energy (including ZPE) with respect to the most stable dimer at the same level of theory.

4.3.4 Discussion

In the preceding section we demonstrated how to deconvolute the FTIR spectra of 1CHU/ CDCl_3 solutions into contributions from the monomer and dimers, but the deconvolution method is not suitable to differentiate between different dimer isomers, because we are only analyzing how the absorption depends on a certain power of the actual monomer concentration. Here we take advantage of the calculated stick spectra shown in Figure 4.34. As mentioned above, the C=O stretching region of the dimers is dominated by two strong absorption maxima at 1681 and 1697 cm^{-1} , but a shoulder at $\approx 1672 \text{ cm}^{-1}$ is clearly discernible in addition to a weaker absorption at 1624 cm^{-1} . Based on the RI-B3LYP/TZVP calculations we expect the most stable 4-4 dimer to show only two absorptions in that region and no band close to 1624 cm^{-1} with sufficient intensity for detection. By contrast, the asymmetric 2-4 dimer not only has its most intense band close to the largest absorption of the 4-4 dimer, but also has a weak absorption at 1630 cm^{-1} due to an intense C–H in-plane-bend vibration (CH_{ipb} in Figure 4.34) of the pyrimidine ring. This indicates that both dimers (4-4 and 2-4) contribute to the deconvoluted dimer spectrum in Figure 4.34. Consequently we tentatively assign the major dimer absorption in the hydrogen-bound N–H stretching region at 3049 cm^{-1} to the 4-4 dimer and the absorption around 3177 cm^{-1} to the 2-4 dimer. However, the spectral features of the bound N–H stretching vibrations might be disturbed by strong anharmonic couplings in the “cyclic” dimers [134], which could explain the sub-structure observable in that spectral region.

In a zero-order picture we would assume that the asymmetric 2-4 dimer, which has a rather large dipole moment of about 5 to 6 Debye, receives an extra stabilization in solution. This is partially confirmed by Table 4.8 where the asymmetric 2-4 dimer is but slightly favored over the symmetric 2-2 dimer, which has no dipole moment. However, the effect is small and both dimers are stabilized relative to the most stable 4-4 dimer in solution compared to the gas phase.

Based on the relative energies in solution we can estimate the relative abundance of the different dimers by using a Boltzmann distribution. Within this approximation the solution consists of approximately 57 % 4-4 dimers, 27 % 2-4 dimers and 16 % 2-2 dimers. However, the continuum model does not take into account the effect of a permanent dipole moment of the solvent molecules. Therefore we expect the stabilization of the 2-4 dimer in polar solvents to be somewhat stronger than estimated by the COSMO model. As a consequence, both, the 4-4 dimer and the 2-4 dimer probably contribute to the experimental dimer spectrum, with only minor contributions of the 2-2 dimer, confirming the conclusions derived above by comparing the deconvoluted dimer spectrum and the calculated stick spectra.

Finally we would like to mention that the dimerization constant obtained in this work is about one-third of the value reported earlier ($K_d = 6.1 \text{ dm}^3/\text{mol}$ [121] and $6.8 \text{ dm}^3/\text{mol}$ [123]), although our experimentally determined extinction coefficient of the monomer N–H stretching vibration is in good agreement with the literature. [121] The exact reason for the deviation is unclear, but any impurity (e.g. water) in the solution that can form clusters with the solute molecules will increase the apparent self-association constant, because it is derived from the loss of monomers as observed by the decrease of the monomer N–H stretching vibration. Water impurities have been made responsible for the 10-fold variations in the published association constants of 8-bromo-9-ethyladenine, as discussed by Chen and Lord. [135] The presence of water in the literature spectra might explain the higher association constants reported earlier for 1CHU [121, 123]. We did not observe any absorptions due to water impurities in our FTIR spectra.

4.3.5 Summary

We reinvestigated the self-aggregation of 1-cyclohexyluracil and determined the absolute, wavelength dependent extinction coefficients of the monomer and of dimers by a simple deconvolution method. The method is in principle applicable to any spectral region and is a useful tool to discriminate between monomer and dimer absorptions. It allows to extract the pure monomer spectrum even in spectral regions, that are congested by monomer and aggregate absorptions, for example the C=O stretching vibrations in Figure 4.34. Based on RI-B3LYP/TZVP calculations within the COSMO framework we were able to identify isomeric dimer structures which coexist in 1CHU/CDCl₃ solutions, namely, the 4-4 and 2-4 dimers.

Acknowledgement:

This work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KL 531/27).

4.4 Structural Assignment of Adenine Aggregates in CDCl_3

Structural Assignment of Adenine Aggregates in CDCl₃

Lars Biemann¹, Thomas Häber¹, Daniela Maydt², Klaus Schaper²,
Karl Kleiner^{1*}

¹*Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
40225 Düsseldorf, Germany.*

²*Institut für Organische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
40225 Düsseldorf, Germany.*

Journal of Chemical Physics, 2008, **128**(19):195103/1-195103/8

Abstract

We reinvestigated the self-association of 9-substituted adenine derivatives in CDCl₃ solutions and present the infrared spectra of 9-ethyladenine and *N*-methyl-9-ethyladenine and its aggregates in the spectral regions between 1500 and 1800 cm⁻¹ and between 2700 and 3600 cm⁻¹. Wavelength dependent absolute extinction coefficients of the monomer and dimers are presented on the basis of a simple deconvolution method. Comparison of the deconvoluted dimer spectra with quantum chemical calculations allows for a structural assignment of the two dimer structures that coexist in 9-ethyladenine/CDCl₃ solutions. In contrast, the dimer spectrum of *N*-methyl-9-ethyladenine is dominated by a single isomer.

4.4.1 Introduction

Specific interactions between nucleobases like hydrogen bonding or π -stacking play a crucial role in determining the structures of desoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA) and are the molecular basis of information transfer in biological systems. The association of the nucleobase adenine in solution has intensively been studied by IR spectroscopy. Lord and Rich report on the importance of specific hydrogen bonding for the association of 9-ethyladenine in chloroform solutions and present IR-spectra in the region of 2500-3800 cm^{-1} that exhibit several red shifted IR bands at higher sample concentrations.[119, 120] In a similar work by Sobell, the observed bands at 3527 cm^{-1} and 3416 cm^{-1} were assigned to the symmetric and antisymmetric stretching vibration of the adenine amino group in the monomer while the additional peaks at 3482, 3312, 3255 and 3180 cm^{-1} were assigned to hydrogen-bound aggregates.[122] This assignment is supported by gas phase and solid phase data.[136, 127, 126] Furthermore all these bands vanished upon deuteration, which supports this assignment.[121] From IR spectra taken at various sample concentrations, association constants can be deduced. Kyogoku et al. suggested three plausible cyclic structures for 9-ethyladenine dimers and discussed the possibility that more than one form of dimer may be present in solution. A combined association constant $K_{12} = K_{AA1} + K_{AA2} + K_{AA3} = 3.1 \text{ l/mole}$ was estimated under the assumption that no higher order associates were formed.[121] In a later work, Nagel et al. combined near-infrared spectroscopy with vapor pressure osmometry and derived from this data an association constant of $K_{12} = 1.4 \text{ l/mole}$ for the cyclic dimers and of $K_{23} = 4.8 \text{ l/mole}$ for the stepwise formation of the different trimers.[123, 124] Concerning the aggregate structures, NMR spectroscopy at low temperatures reveals that in CDCl_3 solution both protons of the amino group are almost equivalently used for hydrogen bonds in the self-associated dimers.[125]

For the gas phase computational and IR-UV double-resonance studies are published that give more detailed information.[137] For adenine-adenine, 9-methyladenine(9MA)-adenine and 7-methyladenine(7MA)-adenine clusters well resolved vibronic spectra were obtained in a supersonic jet experiment which could be structurally assigned based on their infrared spectra. For 9MA-9MA however only very broad and unstructured bands were observed and the data obtained from IR-holeburning were insufficient for a safe structural assignment. A symmetrical cluster structure like 1-1 in Figure 4.29 seemed to be the most probable structure.[137] R2PI detection of short-lived electronic states with broad electronic spectra is notoriously difficult so that even majority species in the jet escape detection.[138, 139] We therefore decided to use direct IR absorption spectroscopy for detection and reinvestigated alkylated adenine under equilibrium conditions in CDCl_3 as a non-aqueous solvent to reveal the structures of the dimers and to enlighten the question whether higher aggregates are formed. Comparison of DFT calculations with the experimental IR spectra enable an unambiguous assignment of the absorption bands observed in the solution spectra to certain aggregate structures.

4.4.2 Experiment

9-Ethyladenine (9EA) was synthesized from adenine as described by Nair et al. [140] and was obtained in 30% yield after recrystallization from butanone. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.39 (t, ³J_{HH}=7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂), 4.16 (q, ³J_{HH}=7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂), 7.18 (s, 2H, NH₂), 8.13 (s, 1H, 2-H), 8.15 (s, 1H, 8-H) ppm, ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 16.71 (CH₃CH₂), 40.92 (CH₃CH₂), 120.25 (5-C), 141.83 (8-C), 150.75 (4-C), 153.73 (2-C), 157.36 (6-C) ppm, IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3267 (-N-H-valence), 1672 (-C=N-valence), 1600, 1415 (-CH₃ and -CH₂-deformation), 1309 (-C-N-valence) cm⁻¹, EI mass spectroscopy: m/z = 164 [M+1]⁺, 163 [M]⁺, 148, 136, 135, 121, 109, 108, 94, 57, 54, 43, anal. Calc. for C₇H₉N₅: C, 51.5; H, 5.6, N, 42.9; found: C, 51.3; H, 5.7; N, 43.2.

Procedures for the synthesis of *N*-Methyl-9-ethyladenine (NMe9EA) have been described earlier [141]. Here a synthesis analog to the one described above was used. 1-Methyladenine (1.00 g, 6.70 mmol) is suspended in dry DMF under inert conditions and under exclusion of light with 60% sodiumhydrid (0.27 g, 6.70 mmol) in oil. The mixture is stirred at room temperature (RT) for 30 min and an additional 30 min at 60 °C. The mixture is allowed to cool to 25 °C before adding 1.34 g (6.70 mmol) ethyl p-toluenesulfonate. The mixture is stirred for another 10 min at RT and 11 h at 60 °C. The solvent is removed under reduced pressure and the resulting precipitate is suspended in 18 ml methanol/dichloromethane 1/9. Sodium p-toluenesulfonate is filtered off and the solvent is removed. The raw product is recrystallized from butanone to yield 0.15 g (0.85 mmol, 13 %) of a white powder. ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃), δ = 1.39 (t, ³J_{HH}=7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂) 3.33 (s, 3H, *N*-CH₃), 4.17 (q, ³J_{HH}=7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂), 7.62 (s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, 2-H), 8.21 (s, 1H, 8-H) ppm. ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 15.24 (CH₃CH₂), 25.75 (*N*-CH₃), 37.93 (CH₃CH₂), 119.80 (5-C), 140.00 (8-C), 152.26 (2-C, 4-C, 6-C) ppm. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3242 (-N-H-valence), 1623, 1414 (-CH₃ and -CH₂-deformation), 1295 (C-N-valence) cm⁻¹. EI mass spectroscopy: m/z = 179 [M+2]⁺, 178 [M+1]⁺, 177 [M]⁺, 162, 150, 148, 120, 119, 106, 93, 42, anal. Calc. for C₇H₉N₅: C, 54.2; H, 6.3, N, 39.5; found: C, 53.5; H, 6.1; N, 38.3.

Adenine (99.0%), *N*-methyladenine (99.0%) and deuterio-chloroform (98 at.%), stabilized with silver foil, were purchased from *Sigma-Aldrich* and used without further purification.

All spectra were recorded with a spectral resolution of 2 cm⁻¹ using a Nicolet 5700 FTIR spectrometer equipped with a liquid-nitrogen cooled MCT detector. Both solvent and solution were handled in the same IR cell with CaF₂ windows having an absorption pathway of 0.2 or 1.0 mm. The weak CDCl₃ absorption at 3154.6 cm⁻¹ of a pure solvent spectrum was used to calibrate the absorption path length by comparison with a CDCl₃ spectrum of known path length measured in a sealed liquid spectrophotometer

cell (Model SL-2, 1.079 mm path length, International Crystal Laboratories). The spectra of the adenine derivatives were corrected for solvent contributions by subtracting a pure solvent spectrum that was taken immediately before measuring each solution. Using CDCl_3 instead of CHCl_3 ensured that no part of the spectral region of interest was superimposed by strong solvent absorptions.

Concentrations were varied between 22 and 100 mM (10^{-3} mol/dm³). All solutions were prepared on the day of their use and kept in the dark to prevent the formation of impurities due to photolysis of the solvent CDCl_3 . Solutions of lower concentrations were prepared by diluting a solution of 100 mM.

4.4.3 Calculations

The most simple aggregates that can be formed by 9-substituted adenine derivatives via hydrogen bonds are dimers. The nitrogen atoms in the purine system at positions 1, 3 and 7 can serve as hydrogen bond acceptors. Neglecting geometries in which only a single hydrogen bond is formed and focussing on cyclic dimers containing two hydrogen bonds, only three geometries remain, which are shown in Figure 4.29. To distinguish between these dimers, we will refer to them as the (1-1)-, (1-7)- and (7-7)-dimer according to the nitrogen atoms that act as hydrogen bond acceptors. In Figure 4.29 R stands for H (9EA) or CH_3 (NMe9EA). In order to further investigate these structures with respect to their relative energies and vibrational frequencies, geometry optimizations and harmonic frequency calculations at the B3LYP/TZVP level of theory were carried out for the monomer and the three dimers. All calculations were performed using the Turbomole program package.[38, 36, 37] In case of 9EA the symmetrical (1-1)-dimer is the most stable arrangement followed by the (1-7)- and the (7-7)-dimer (Figure 4.19, column a). The conformation of the ethyl group in 9-position has little influence on the overall stability of the three dimer geometries, but the up/down conformation turned out to be the most stable one. Here, up/down refers to the position of the ethyl groups relative to the molecular plane of the purine system with the ethyl group on one 9EA molecule tilted above and the ethyl group of the other 9EA molecule tilted below the plane of the purine systems. Neglecting the ethyl side chain, NMe9EA exists in two different conformations that differ only in the orientation of the N-methyl-aminogroup (Figure 4.20), with the *trans* conformer being more stable than the *cis* conformer. Although the methyl group is only a small substituent, the energy difference between the two conformers amounts to 6.2 kJ/mol (ZPE corrected) at the B3LYP/TZVP level of theory and is caused by sterical hindrance between the methyl group and the five-membered ring. As a consequence, the relative order of dimer stabilities is reversed in NMe9EA compared to 9EA. Now the (7-7)-dimer is by far the most stable dimer (Figure 4.19, column d), because it consists of two NMe9EA subunits with the favorable *trans* conformation of the N-methyl-aminogroup (see Figure 4.29). We estimated the effect of placing the adenine derivatives inside a solvent cavity by using the polarizable

continuum model (PCM) that is implemented in the Gaussian 03 program package. This model places the molecules in a cavity created by overlapping spheres inside of a continuum polarisability and uses a dielectric constant of $\epsilon = 4.9$ to simulate the solvent chloroform.[35] In all calculations we used the same functional and basis set as for the gas phase calculations. The relative energies of the 9EA and NMe9EA dimers inside the solvent cavity are shown in Figure 4.19, columns b and c. While the energetic order of the dimers is unaffected by the solvent, it has a large impact on the magnitude of the relative energies and, hence, on the relative population of the different dimers. Compared to the gas-phase calculations, the relative energy of the 9EA dimers is reduced by the solvent, but in NMe9EA it is increased, even though the energy difference between the *cis* and *trans* conformers of NMe9EA is reduced from 6.2 to 4.8 kJ/mol if placed in a solvent cavity. Summarizing the results, we expect the NMe9EA/CDCl₃ solution spectra to be dominated by the (7-7)-dimer with small contributions of the other dimers. The 9EA/CDCl₃ spectra, on the other hand, should have similar contributions from the (1-1)- and (1-7)-dimers and only small contributions from the (7-7)-dimer.

Vibrational frequencies were calculated at the B3LYP/TZVP and B3LYP/TZVP/PCM levels of theory and scaled by 0.945 (N–H stretch) and 0.985 (N–H bend) for the gas-phase calculations and by 0.973 and 0.995 for the PCM calculations. Scaling factors were chosen to match the calculated N–H stretching and bending frequencies of the NH₂ or NHMe group to the experimental absorption maxima of the 9EA and NMe9EA monomers. Stick spectra of the scaled harmonic frequencies of 9EA and NMe9EA at the B3LYP/TZVP/PCM level of theory are shown in Figures 4.26, 4.27 and 4.28. Vibrational frequencies and relative energies at the B3LYP/TZVP/PCM level of theory are summarized in Table 4.10.

In the experiment the antisymmetric and symmetric N–H stretch frequencies of 9EA in CDCl₃ are red-shifted by about 40 cm⁻¹ compared to their gas-phase values.[137] The red-shift is caused by weak hydrogen-bond like interactions between the adenine derivatives and the solvent.[120] Our gas-phase and PCM calculations (unscaled) predict a red-shift of about 100 cm⁻¹. Similar shifts are predicted for the free N–H stretch vibration of the 9EA dimers, whereas the H-bonded N–H stretch vibrations are unaltered, because they are more or less shielded from the solvent by the two monomer subunits that form the dimer. This effect has to be kept in mind when comparing experimental and scaled calculated frequencies, since the scaling factor that is derived from the monomer N–H stretch vibrations is not necessarily valid for the hydrogen bonded N–H stretch vibrations as well. On the other hand, calculations predict a rather systematic shift of about 20 cm⁻¹ for the N–H bending vibrations, whether the N–H bond is involved in a hydrogen bond or not.

4.4.4 Results

9-ethyladenine

The infrared spectra of 9-ethyladenine (9EA) in CDCl_3 consist of absorptions due to the monomer as well as of bands that belong to aggregates. Figure 4.21 shows a series of FTIR absorption spectra of 9EA at concentrations ranging from 20 to 100 mM. The spectra are scaled to match the intensities of the monomer (M) absorptions at 3528 cm^{-1} and 3410 cm^{-1} , which are the antisymmetric and symmetric N–H stretch vibrations of the NH_2 group, respectively.[119, 120, 121, 123, 122] Since the formation of aggregates depends on the actual monomer concentration, the spectrum at the lowest concentration is dominated by bands that belong to the monomer (lowest trace in Figure 4.21). With increasing concentration several absorption maxima between 3100 and 3400 cm^{-1} and at 3478 cm^{-1} arise. They were assigned to aggregates of 9EA previously.[122, 121, 123] The bands at 2879 , 2940 and 2987 cm^{-1} belong to C–H stretching modes of the aliphatic ethyl side chain, whereas the bands at 3037 and 3061 cm^{-1} were assigned to the aromatic $\text{C}_2\text{--H}$ and $\text{C}_8\text{--H}$ stretching vibrations.[121].

The concentration dependence of the FTIR spectra and previous work[119, 120, 121, 123, 122] clearly demonstrate that the spectra are a superposition of several components and the solutions consist of at least 9EA monomers and dimers. Before presenting a quantitative analysis we will determine the number of independent components by means of factor analysis.[142, 143] The concentration series of our IR absorbance measurements can be represented by a $n_\lambda \times n_c$ absorbance data matrix $\mathbf{A}$, where n_λ denotes the number of data points in the observed spectral region and n_c the number of spectra recorded at different concentrations. Under the assumption that Lambert-Beer's law is valid for all concentrations and path lengths we can describe the experimental data by the matrix equation:

$$\mathbf{A} = \mathbf{E}\mathbf{C}d + \epsilon, \quad (4.7)$$

where $\mathbf{E}$ is the $n_\lambda \times n_k$ matrix of extinction coefficients, $\mathbf{C}$ is the $n_k \times n_c$ concentration matrix, d the optical path length, n_k the number of components and ϵ a matrix of random measurement errors. The number of independent components n_k is determined by calculating the nonzero eigenvalues of the symmetric covariance matrix $\mathbf{B} = (\mathbf{E}\mathbf{C})^T(\mathbf{E}\mathbf{C})$ of size $n_c \times n_c$. Malinowski showed that the $n_c - n_k$ eigenvalues of $\mathbf{B}$ which do not represent an independent component are composed solely of experimental errors and are zero within statistical errors.[142] There exist different statistical criteria to decide which of the eigenvalues belong to the group of nonzero eigenvalues. Here we used Malinowski's F -test function.[143] Following this analysis, we obtain a number of $n_k = 3$ independent components at a confidence level of 97.5 % and $n_k = 4$ at the 95 % level. In other words, we need at least three components for an adequate description of the spectra at different concentrations. One of them is the 9EA monomer. Different 9EA dimers should behave like a single component, because they have the same concentration dependence. So the three components are most likely the monomer, dimer and

probably the trimer. This is confirmed by the quantitative analysis described below.

Quantitatively we can determine the integrated absorption coefficients and the dimerization constant by fitting the shape of the FTIR spectra in the region of the monomer bands to Voigt profiles. To minimize errors due to variations of the baseline, we fitted the first derivative of the experimental spectra to the first derivatives of Voigt profiles. Voigt profiles were chosen because they provide enough flexibility to reproduce the shape of the solution spectra.

Integrated absorption coefficients can be derived by extrapolating apparent absorption coefficients $\alpha_{app} = A/c_0d$ to the limit of infinite dilution. Here A is the integrated absorption obtained from the fits, c_0 is the initial 9EA concentration and d the optical path length. For the symmetric and antisymmetric N–H stretch vibrations of 9EA we get values of $\alpha^{(s)} = 62.3 \pm 3.8$ and $\alpha^{(a)} = 38.5 \pm 3.1$ km/mol, respectively. The ratio of the absorption coefficients $\alpha^{(s)}/\alpha^{(a)}$ is in good agreement with the ratio of the calculated absorption coefficients (see Table 4.10). Since we know the absolute absorption coefficients of the monomer we can now calculate the actual monomer concentrations c_M for each spectrum. Figure 4.22 shows the actual monomer concentration in 9EA/CDCl₃ as a function of the initial concentration c_0 . The less than linear increase of the actual monomer concentration clearly indicates the presence of 9EA clusters. Previously, it has already been discussed that 9EA/CDCl₃ solutions are composed of monomers, dimers and larger aggregates.[121, 123] If we assume that the only larger aggregates are trimers, we can fit the initial monomer concentration c_0 to a cubic polynomial in c_m (solid line in Figure 4.22),

$$c_0 = c_m + 2c_d + 3c_t = c_m + 2K_d c_m^2 + 3K_d K_t c_m^3 \quad (4.8)$$

where c_d and c_t are the actual dimer and trimer concentrations and $K_d = c_d/c_m^2$ and $K_t = c_t/c_m c_d$ the dimerization and trimerization equilibrium constants, respectively. The so obtained $K_d = 1.6 \pm 0.4$ dm³/mol and $K_t = 6.4 \pm 2.0$ dm³/mol are in agreement with previous measurements.[121, 123] The larger error of the trimerization constant reflects the uncertainties in the actual and initial monomer concentrations, as K_t depends on the third power of the monomer concentration. Furthermore, both, K_d and K_t are rather small and the cluster contribution to the spectra is small compared to that of the monomer. For example, a 100 mM 9EA/CDCl₃ solution consists of 72.6 mM monomers, 8.4 mM dimers and 4.0 mM trimers. As was pointed out earlier, we expect at least two dimers to contribute to the experimental spectra, so that the above dimerization constant is only an average dimerization constant. The same is true for the trimerization constant.

To deconvolute the experimental FTIR spectra into contributions from monomers, dimers and trimers, we used a simple and direct novel approach. If the solutions consist only of monomers, dimers and trimers, then the absorption at a given wavenumber is

the sum of the absorptions of monomers, dimers and trimers at that wavenumber:

$$A(\tilde{\nu}) = A_m + A_d + A_t \quad (4.9)$$

Using Beer's Law and replacing dimer and trimer concentrations by their equilibrium constants and the monomer concentration results in:

$$A(\tilde{\nu}) = \epsilon_m l c_m + \epsilon_d l K_d c_m^2 + \epsilon_t l K_d K_t c_m^3 \quad (4.10)$$

where l is the optical path length, ϵ the wavelength dependent extinction coefficient and c_m the actual monomer concentration. By fitting the experimental absorption to equation 4.10 we can determine the monomer, dimer and trimer contributions to the FTIR spectrum. From a technical point of view, the factors $\epsilon_m l$, $\epsilon_d l K_d$ and $\epsilon_t l K_d K_t$ were treated as single, wavelength dependent fit parameters and constrained to non-negative values. The fit parameters were set to zero if the fit error of that parameter was larger than its value. Fit errors make up less than 10 % of the prominent spectral features of the dimer and monomer. If we perform the fit for each wavenumber and use the previously derived dimerization and trimerization constants, then we can directly determine the wavelength dependent extinction coefficients not only of the monomer but of the dimer and trimer as well. Figure 4.23 shows the so obtained extinction coefficients of the monomer (M), dimer (D) and trimer (T) for the spectral regions of the N-H stretch and bend vibrations.

The monomer extinction coefficients of the symmetric and antisymmetric NH_2 stretch vibrations are determined to be 213 and 117 $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, respectively, measured at the maximum of the absorption bands. These values are in good agreement with previous measurements by Rich and co-workers.[121] For the dimer, the extinction coefficient shows four prominent maxima at 3174, 3257, 3308 and 3478 cm^{-1} , where the latter is the free N-H stretch vibration with a maximum extinction coefficient of 350 $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. The other three correspond to hydrogen bonded N-H stretch vibrations. Finally, the trimer spectrum shows three maxima at 3146, 3310 and 3479 cm^{-1} , where the latter is the free N-H stretch vibration again, this time that of the trimer. We should note, however, that while the spectral positions of the trimer bands are reproducible, the uncertainty of the extinction coefficients is three to four times larger than for the dimer.

N-Methyl-9-ethyladenine

Clusters larger than the dimer are most likely formed by attaching a third monomer unit to a dimer structure and forming two new hydrogen bonds. In these doubly bridged trimers both N-H bonds of the central monomer unit are part of a hydrogen bond (see Figure 4.29). To prevent the formation of trimers and even larger aggregates (except stacked pairs of dimers), 9-ethyladenine was chemically modified by replacing one of

the hydrogen atoms of the amino group by a methyl group, which leads to *N*-Methyl-9-ethyladenine (NMe9EA, see fig. 4.20). Since NMe9EA dimers lack suitable hydrogen bond donors, we expect it to form only dimers and no larger aggregates. Indeed, factor analysis, which has been described in the previous section, reveals a number of $n_k = 2$ independent components at a confidence level of 97.5 %. In the case of 9EA we got three components at the same confidence level. Thus, two components (monomer and dimers) are sufficient to describe the NMe9EA spectra at different concentrations. Figure 4.24 shows a series of FTIR absorption spectra of NMe9EA at concentrations ranging from 20 to 100 mM. The spectra are scaled to match the intensity of the monomer N–H stretch vibration at 3448 cm^{-1} . As in the case of 9EA, with increasing concentration several absorption maxima arise between 3100 and 3400 cm^{-1} which can be assigned to aggregates of NMe9EA. Since NMe9EA has only one N–H bond, the monomer shows only one N–H band and there is no free N–H band of the dimers. The substitution at the amino group has only little influence on the CH stretching modes of the aliphatic side chain, which are observed at 2986 , 2944 and 2877 cm^{-1} .

We analyzed the NMe9EA spectra very much in the same way as the 9EA spectra. Fitting the monomer N–H band to Voigt profiles and extrapolating to infinite dilution yields an integrated absorption coefficient of $52\text{ pm}^3\text{ km/mol}$. Contrary to the results with 9EA, we could not find any indication for the formation of larger clusters than dimers when analyzing the actual monomer concentration as a function of the initial concentration (equation 4.11). Instead, a quadratic polynomial was sufficient to describe the relation between the two concentrations, with the cubic coefficient being insignificant. From that, we derived a dimerization constant of $0.48 \pm 0.09\text{ dm}^3/\text{mol}$, which is about three times smaller than the one determined for 9EA. A similar change of the dimerization constant has been reported by Rich and co-workers.[125] Using the absorption coefficient and equilibrium constant we can estimate that a 100 mM NMe9EA/ CDCl_3 solution consists of 93.1 mM free monomer and about 4.0 mM dimers.

Fitting the NMe9EA spectra to equation 4.10 also shows no significant contribution of trimers. Because the value of the cubic fit coefficient was not significant across the whole spectral region, it was set to zero and the cubic term was neglected. Figure 4.25 shows the extinction coefficients of the monomer (M) and dimer (D) spectra of NMe9EA in CDCl_3 . As expected, the extinction coefficients of 9EA and NMe9EA and their aggregates are of comparable magnitude.

The NMe9EA monomer spectrum has a maximum at 3448 cm^{-1} with an extinction coefficient of about $161\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. The dimer shows a broad spectral feature centered around 3260 cm^{-1} and with a maximum extinction coefficient close to $500\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. The small weak feature around 3412 cm^{-1} is most likely an artifact of the fit. In the region of the NH_2 bending vibration the monomer shows a strong peak at 1624 cm^{-1} and three weaker features at 1636 , 1605 and 1581 cm^{-1} . The dimer has a strong band at

1630 cm^{-1} , about two times stronger than that of the monomer, and three weaker features at 1646 , 1614 and 1587 cm^{-1} .

4.4.5 Discussion

In the preceding sections we demonstrated how to deconvolute the FTIR spectra into contributions from the monomer, dimer and larger clusters, e.g., trimers. However, this analysis is not suitable to differentiate between different structures of the same cluster size, because we are only analyzing how the absorption depends on a certain power of the actual monomer concentration. From our DFT calculations it is clear that at least in 9EA, two dimers coexist in solution (see Figure 4.19). At this point, comparison of the deconvoluted spectra with calculated harmonic frequencies allows for a tentative assignment of the observed absorption bands to certain dimer structures. Figure 4.26 shows the 9EA dimer spectrum together with the scaled stick spectra of the three dimer structures that were obtained from B3LYP/PCM/TZVP calculations. The stick spectra are sorted from top to bottom with increasing dimer energy. In the NH stretch region the calculated spectrum of the asymmetric (1-7)-dimer contains four NH stretching vibrations, whereas the symmetric (1-1)- and (7-7)-dimer each feature only one strong absorption for the free NH stretching vibration and one for the hydrogen bound NH stretching vibration. The band at 3478 cm^{-1} in the deconvoluted spectrum is assigned to the NH stretching vibration of the free (not involved in hydrogen bonding) N-H bond of the amino group. Its frequency is in good agreement with the scaled stick spectra for each dimer. Assuming that the energetically disfavored (7-7)-dimer of 9EA is absent in solution leaves us with the three bound NH vibrations of the (1-1)- and (1-7)-dimer that should be observable in the deconvoluted spectrum below 3400 cm^{-1} . We therefore tentatively assign the observed bands at 3308 and 3257 cm^{-1} to the hydrogen bound NH stretching vibrations of the (1-7)-dimer and the slightly more intense absorption at 3174 cm^{-1} to the (1-1)-dimer (dashed lines in Figure 4.26). The broad shoulder to the left of the 3174 cm^{-1} band might be due to combination modes or in part to an incomplete deconvolution, because it coincides with the maximum of the trimer spectrum (see below).

In the NH bend region the strongest absorption is observed at 1648 cm^{-1} followed by two weaker bands at 1596 and 1577 cm^{-1} . The calculated stick spectra of the (1-1)- and (1-7)-dimer each show only two strong bands with one or two weak features next to them. However, if we assume that both dimers exist in almost equal quantity and if we sum up the intensities using the same widths for the spectral lines, then we end up with a similar intensity pattern as in the deconvoluted spectrum. Therefore the band at 1648 cm^{-1} is formed by absorptions from both dimers, while the bands at 1596 and 1577 cm^{-1} are dominated by contributions from the (1-1)- and (1-7)-dimer, respectively.

The analysis of the trimer spectrum is more difficult, because we cannot rule out the presence of larger clusters than trimers, although the latter are the most likely species

in a sequential cluster process after the dimer. In spite of the greater uncertainties in the deconvolution process, the calculated stick spectra of the two most stable trimer structures are qualitatively in good agreement with our deconvoluted spectrum. As for the dimer, the free NH stretch vibration of the trimer at 3479 cm^{-1} is well reproduced by the calculations. The band at 3310 cm^{-1} could be assigned to the vibration calculated at around 3250 cm^{-1} , while the broad feature around 3146 cm^{-1} might be caused by the three closely spaced vibrations below 3200 cm^{-1} .

The sharp feature at 1630 cm^{-1} in the NH bending region is an artefact of the deconvolution and due to the very strong absorption of the monomer at this wavenumber. All other spectral features are rather broad and unstructured, with a broad band around 1640 cm^{-1} and several overlapping features around 1580 cm^{-1} . The calculated stick spectra in that region are grouped in two clusters of frequencies that qualitatively reproduce the deconvoluted trimer spectrum, when convoluted with an appropriate bandwidth. However, our data do not provide any reliable structural assignment of the dominant trimers in solution. In the case of the methylated species (NMe9EA) the DFT calculations predict the (7-7)-dimer to be dominating, whereas it was the least stable structure in 9EA. Figure 4.28 shows the deconvoluted NMe9EA dimer spectrum together with the calculated stick spectra, again sorted from top to bottom with increasing energy. Apparently the free NH stretching vibration of the 9EA dimers around 3485 cm^{-1} is no longer present in the NMe9EA dimer spectrum as the free hydrogen atom has been substituted by a methyl group. Instead, the NH stretch region is dominated by a broad band centered around 3260 cm^{-1} , with some smaller features superimposed on it. Harmonic calculations predict a single strong absorption close to 3300 cm^{-1} . The nature of the broad band in the experimental spectrum remains unclear. It could have been broadened due to coupling with the solvent or with other vibrational modes. Also, the small features that are visible on top of the band might be caused by contributions from the less favorable (1-7)- and (1-1)-dimers. Finally, the NH bend region of the NMe9EA dimer spectrum is dominated by a strong band at 1630 cm^{-1} with three weaker bands at 1646 , 1614 and 1587 cm^{-1} . While calculations predicted two strong bands of similar intensity for 9EA dimers, they predict a single strong band and some weaker features next to it for NMe9EA, which is in qualitative agreement with experiment. Therefore, and because of its stability, we tend to assign the NMe9EA dimer spectrum to the (7-7)-dimer, although we cannot rule out that the other dimers contribute to the spectra in non-negligible amounts.

In the deconvoluted dimer spectra of NMe9EA as well as of 9EA no bands that indicate the presence of π -stacked aggregates could be observed.

4.4.6 Conclusions

In future work we want to apply our deconvolution procedures to other basepairs in the condensed phase. Based on the known monomer concentrations of 9EA we can also

extend our method to the deconvolution of the UV spectra of 9EA-aggregates.

Acknowledgement: This work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 663/A4).

4.4. STRUCTURAL ASSIGNMENT OF ADENINE AGGREGATES IN CDCl_3 101

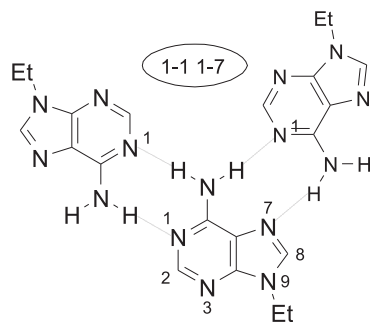
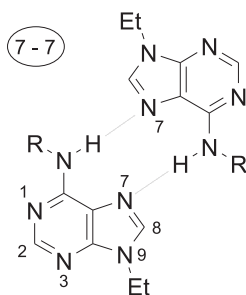
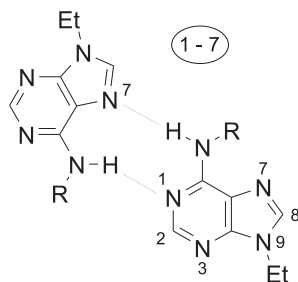
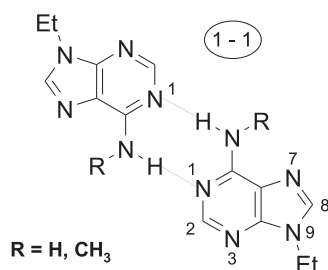


Abbildung 4.18: The three possible cyclic dimer structures of 9-substituted adenine derivatives and the most stable trimer. Structures are labeled according to the number of the hydrogen bond accepting nitrogen atom as (1-1)-, (1-7)- and (7-7)-dimer and (1-1)/(7-1)-trimer. $\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3$ corresponds to 9-ethyladenine and *N*-Methyl-9-ethyladenine respectively

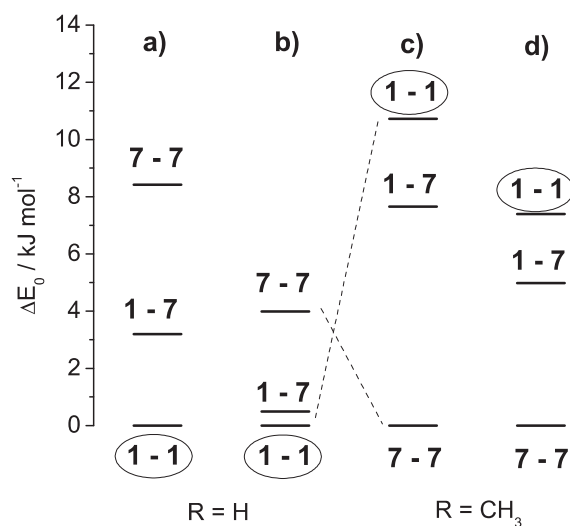


Abbildung 4.19: Relative energies (including zero-point energy) of 9EA (R=H) and NMe9EA (R=CH₃) dimers at different levels of theory. Columns a) and d): B3LYP/TZVP. Columns b) and c): B3LYP/PCM/TZVP. Substitution at the amino group leads to a reversal of the energetic order.

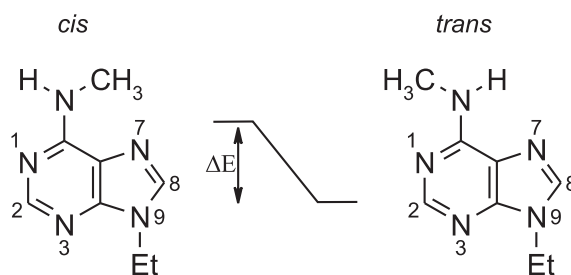


Abbildung 4.20: *Cis* and *trans* conformers of *N*-Methyl-9-ethyladenine (NMe9EA). The *trans* conformer is more stable by $\Delta E = 6.2$ kJ/mol.

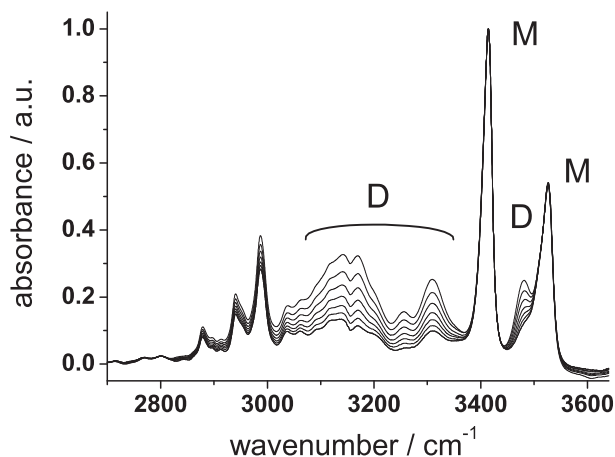


Abbildung 4.21: FTIR spectra of 9EA in CDCl_3 measured at various concentrations (20 to 100 mM). The spectra were scaled to match the intensity of the symmetric NH_2 stretching vibration at 3410 cm^{-1} . The contribution of the aggregate bands increases with increasing concentration.

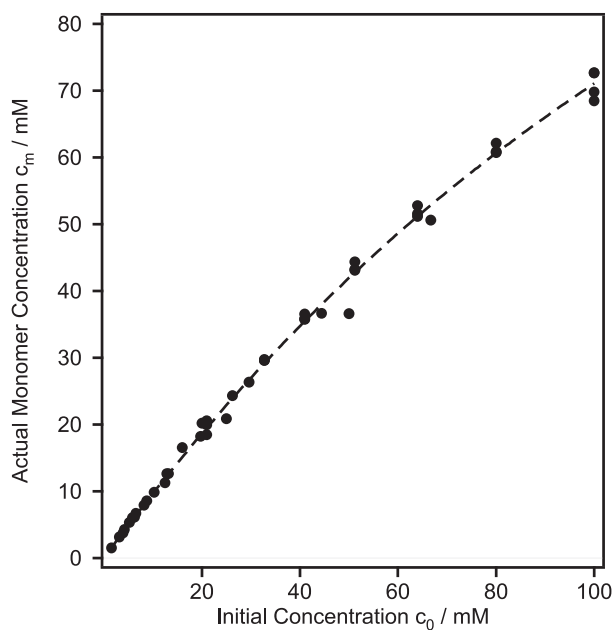


Abbildung 4.22: Actual monomer concentration c_m as a function of the initial concentration c_0 in 9EA/ CDCl_3 solutions. Fitting c_0 to a cubic polynomial in c_m (dashed line) results in a dimerization constant of $K_d = 1.6 \pm 0.4\text{ dm}^3/\text{mol}$.

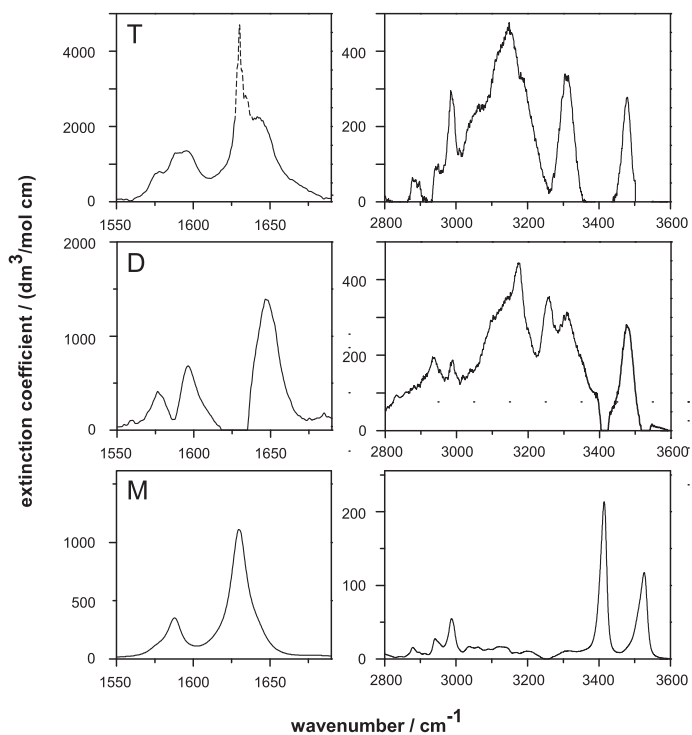


Abbildung 4.23: Wavelength dependent extinction coefficients for the 9EA monomer (M), dimer (D) and trimer (T) spectra. The dashed feature results from an artefact of the deconvolution procedure.

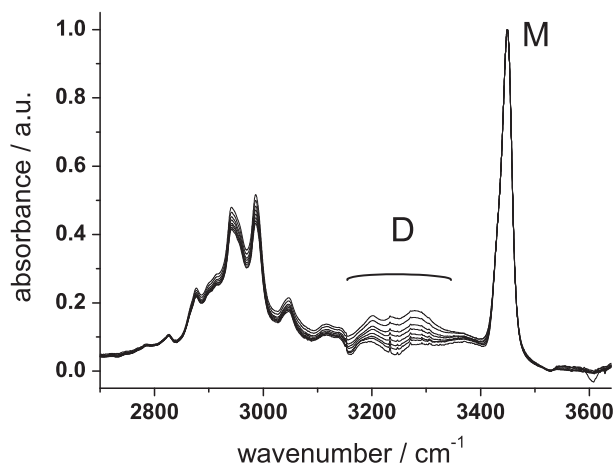


Abbildung 4.24: FTIR spectra of NMe9EA in CDCl_3 measured at various concentrations (20 to 100 mM). The spectra were scaled to match the intensity of the monomer N-H stretch vibration at 3448 cm^{-1} . The contribution of the aggregate bands increases with increasing concentration.

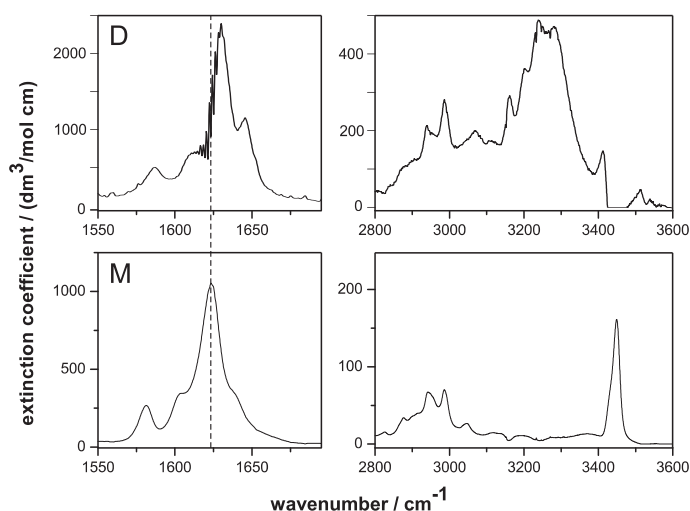


Abbildung 4.25: Wavelength dependent extinction coefficients for the NMe9EA monomer (M) and dimer (D) spectra.

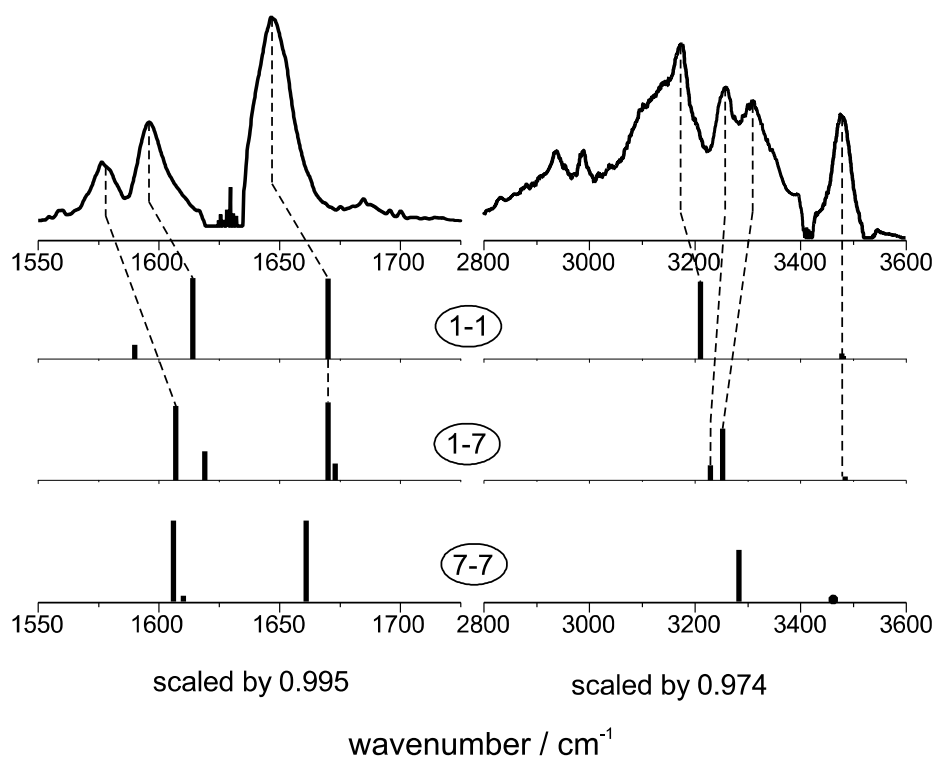


Abbildung 4.26: Comparison of the experimental 9EA dimer spectrum (extinction coefficient) with calculated vibrational frequencies at the B3LYP/PCM/TZVP level of theory.

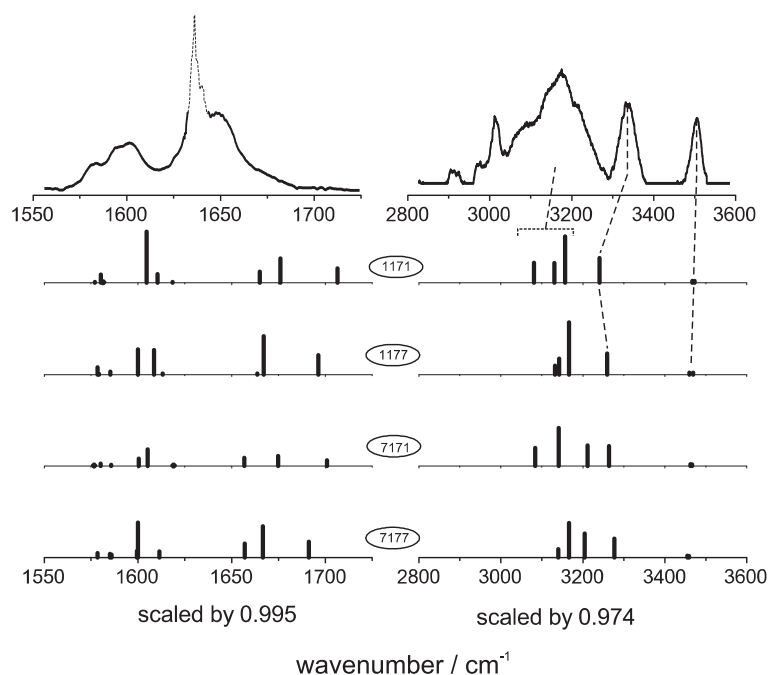


Abbildung 4.27: Comparison of the experimental 9EA trimer spectrum (extinction coefficient) with calculated vibrational frequencies at the B3LYP/PCM/TZVP level of theory.

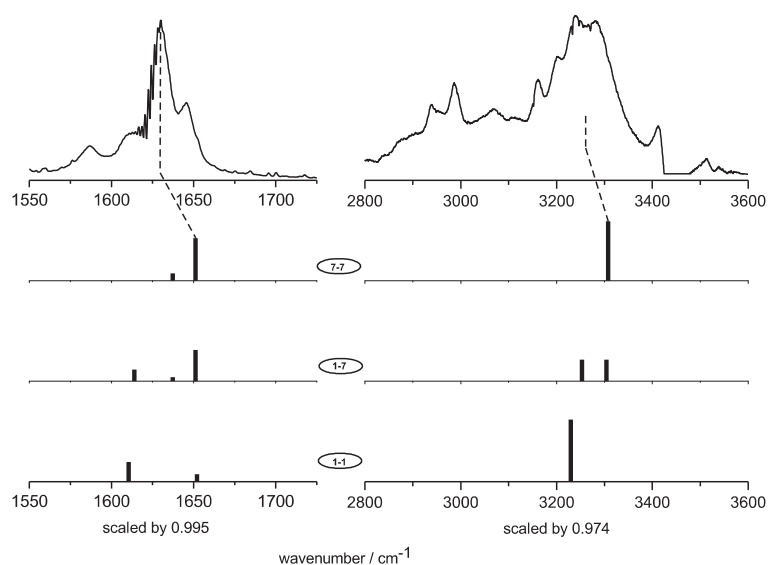


Abbildung 4.28: Comparison of the experimental NMe9EA dimer spectrum (extinction coefficient) with calculated vibrational frequencies at the B3LYP/PCM/TZVP level of theory.

Tabelle 4.9: Relative energies (in kJ/mol) and scaled harmonic frequencies (in cm^{-1}) of 9EA and NMe9EA and their dimers at the B3LYP/PCM/TZVP level of theory. Calculated infrared intensities (in km/mol) are given in parenthesis.

	Monomer		Dimers		
			(1-1)	(1-7)	(7-7)
9EA					
Energy			0.00	0.49	3.99
NH stretch (free)	3527 (137)		3481 (148)	3484 (188)	3462 (105)
	3407 (299)		3478 (265)	3462 (231)	3461 (342)
NH stretch (bound)			3210 (3828)	3252 (2558) 3229 (745)	3283 (2563)
NH bend	1630 (1061)		1670 (996)	1672 (205)	1661 (1233)
	1598 (104)		1614 (1389)	1670 (962)	1610 (73)
			1590 (175)	1619 (358)	1606 (1092)
			1503 (272)	1607 (919)	1592 (218)
NMe9EA	<i>trans</i>	<i>cis</i>			
Energy	0.00	4.85	10.72	7.65	0.00
NH stretch (free)	3448 (184)	3410 (235)			
NH stretch (bound)			3287 (3214)	3362 (1277) 3159 (1285)	3366 (2187)
NH bend	1626 (974)	1598 (1074)	1640 (1049)	1640 (1404)	1629 (101)
	1583 (176)	1584 (197)	1599 (1546)	1626 (178)	1629 (1898)
				1602 (523)	1585 (324)
				1586 (270)	

4.5 FT-IR Spectroscopy of 2'-Deoxycytidine in CDCl₃

FT-IR Spectroscopy of 2'-Deoxycytidine Aggregates in CDCl₃ Solutions

Lars Biemann¹, Thomas Häber¹, Daniela Maydt², Klaus Schaper²,
Karl Kleinermanns^{1*}

¹*Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
40225 Düsseldorf, Germany.*

²*Institut für Organische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
40225 Düsseldorf, Germany.*

Journal of Chemical Physics, 2011, **134**(11):115103/1-115103/8

Abstract

We investigated the self-aggregation of 2'-deoxy-3',5'-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-cytidine dC(TBDMS)₂ in CDCl₃ solutions by Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy and report the formation of larger aggregates than dimers in this solvent for the first time. The hydrogen bonding patterns in these complexes, which occur with increasing concentration may serve as a model for DNA super-structures like triplexes. From the IR spectra, wavelength dependent absolute extinction coefficients of the monomer, dimer as well as a contribution from larger clusters which are supposedly trimers are deduced on the basis of a simple deconvolution method. Our results are supported by RI-B3LYP/TZVP calculations within the COSMO framework, to account for solvent effects in the *ab initio* calculations.

4.5.1 Introduction

Specific interactions between nucleobases such as hydrogen bonding or π -stacking play a crucial role in determining the structures of deoxyribonucleic acid (DNA) and are the molecular basis of information transfer in biological systems. Besides the Watson-Crick pairing of complementary nucleobases [21] related interactions play a critical role in stabilizing higher-order structures of ribonucleic acid (RNA) such as hairpin loops. In DNA super-structures, for example, tri- and quadruplexes[25, 26, 23, 144], homopurine and homopyrimidine pairs are involved. In the field of material science efforts have been made to use molecular recognition between nucleobases in the design of synthetic polymeric materials[145]. An understanding of the interactions between isolated nucleosides and the knowledge of the preferred structures at this level are important prerequisites for the investigations of oligo-nucleosides and whole DNA-strands which is the motivation for this study.

The association of cytosine[146] and of base-pairs as well as the self-association of the nucleoside cytidine has been well studied by IR spectroscopy and laser techniques in the gas phase[147, 148], in D₂O solution[149, 150, 151] and in the solid state.[152, 153, 154, 155, 156, 157, 158] *Ab initio* calculations predict the formation of enol-tautomers to be unlikely and the most stable cytosine dimer consisting of two keto-tautomers.[159] This is consistent with IR-UV double resonance spectra from supersonic jet expansions.[146] The IR-UV hole burning spectra correspond to keto-dimers, but are dominated by dimer structures that involve hydrogen bonding via the nitrogen (N1) that is substituted by the sugar moiety in the nucleoside (see Figure 4.29), rendering these dimer structures impossible for the nucleosides.[146] For the nucleoside cytidine in the gas phase only pseudo association constants with no regard of the structures involved are reported.[147] In D₂O solution no aggregation of cytidine could be observed due to its low solubility. In the case of 2'-deoxycytidine the formation of clusters was attributed to hydrogen bonding between the 5'-OH of the sugar moiety and the carbonyl oxygen which cannot occur in natural DNA because of blocking of the free OH group by a phosphate residue.[151]

In the solid state 2'-deoxycytidine forms cyclic dimers via two hydrogen bonds between the amino group (N4) and aromatic nitrogen (N3). But still all available hydrogen atoms participate in hydrogen bonding which leads to an angle of 17° between the planes of the bases.[160]

To better mimic the conditions inside DNA structures, the association of substituted cytidine and 2'-deoxycytidine has also been studied in organic solvents. The dimer structure is supposed to be similar to the arrangement in the solid state despite the fact that it is planar (see Figure 4.29).[161, 162, 163, 164, 165] Carmona et al. examined

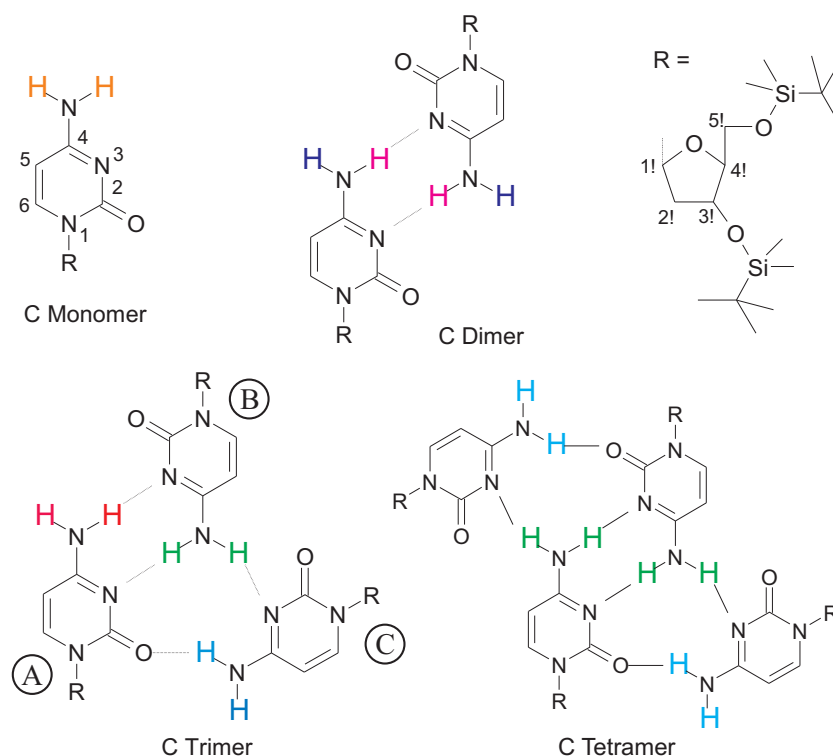


Abbildung 4.29: Valence structures of the dC(TBDMS)₂ monomer, the cyclic dimer, containing two hydrogen bonds, the trimer structure that is formed by adding one monomer unit to the dimer structure and a tetramer structure that is formed by adding two monomer units to the dimer structure. The colours of the N–H groups correspond to the calculated harmonic frequencies as shown in Figure 4.34. The symbol R stands for the bulky silyl protecting group.

the self-association of 2'-deoxy-3',5'-bis(triisopropyl)-cytidine but ruled out the formation of larger aggregates like trimers in CDCl₃ in a concentration range of 9 to 30 *mM*. [163] Recently it was reported by Temps et al. that 2',3',5'-tris(*tert*-butyldimethylsilyl)-cytidine forms larger aggregates than dimers in apolar solvents like *n*-hexane. [165]

The present work clarifies the transition from the cytidine dimer towards larger structures. A simple deconvolution method allows us to separate the FT-IR solution spectra into contributions of monomers, dimers, trimers and so on, even if the spectral features overlap. [128, 166] We only need a single monomer band that is not perturbed by any absorption of another species or aggregate. The deconvolution method provi-

des us with absolute, wavelength dependent extinction coefficients of the aggregates and, when combined with *ab initio* calculations, facilitates the characterization of the aggregate structures. By applying this scheme, the structure of the cyclic dimer is confirmed and by extending the range of concentration up to 150 mM the formation of a larger aggregate could be observed, whose vibrations are in agreement with a trimer structure.

The integrated absorption coefficient of a monomer band enables the determination of the actual cytidine concentration also for cases where the formation of guanosine cytidine Watson-Crick aggregates can occur, which is envisioned as future work. The homo-association constants for cytidine enable an estimation whether such clusters have to be taken into account when base pairing with guanosine is possible.

4.5.2 Experimental Methods

The synthesis of dC(TBDMS)₂ was carried out according to the procedure described by Ogilvie. [167]

3.16 g (12.0 mmol) 2'-deoxycytidine monochlorid, 7.92 g (52.5 mmol) *tert*-butyldimethylsilylchlorid and 7.20 g (105 mmol) imidazole are dissolved in 12 mL dry *N,N*-dimethylformamide. The reaction mixture is stirred for 24 h at room temperature. The solution is hydrolyzed with 60 mL of water and extracted with 3 x 30 mL methylene chloride, the combined organic phases are washed with 30 mL of water and dried over sodium sulfate. The solvent is removed under reduced pressure. Acetonitrile was added and the insoluble product was filtered off and dried in vacuum to yield 3.25 g (7.13 mmol, 60%) of 2'-deoxy-3',5'-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)cytidine.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.04 (2s, 3H each, Si(CH₃)₂), 0.09 (2s, 3H each, Si(CH₃)₂), 0.86 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.91 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 2.03 – 2.08 (m, 1H, 2' α – H), 2.36 – 2.41 (m, 1H, 2' β – H), 3.74 – 3.76 (m, 1H, 3'-H), 3.87 – 3.91 (m, 2H, 5'-H), 4.34 – 4.37 (m, 1H, 4'H), 5.70 (d, 1H, ³J_{HH}=7.4 Hz, 3-H), 6.24 (t, 1H, ³J_{HH}=6.1 Hz, 1'-H), 7.95 (d, 1H, ³J_{HH}=7.5 Hz, 4-H) ppm,

¹³C-{¹H}-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = –5.57, –5.50, –4.96 & – 4.60 (Si(CH₃)₂), 17.91 & 18.32 (SiC(CH₃)₃), 25.69 & 25.87 (SiC(CH₃)₃), 42.13 (2'-C), 61.93 (5'-C), 70.28 (3'-C), 85.85 (1'-C), 87.25 (4'-C), 93.96 (3-C), 141.21 (4-C), 155.68 (1-C), 165.51 (2-C) ppm,

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3364 (-N-H-valence), 2956 & 2859 (-C-H-valence), 1638 (-C=O-valence), 1406 (-CH₃ and -CH₂-deformation), 1363 (-C-N-valence) 1116 (-C-O-C-valence) cm⁻¹.

For the ¹H-NMR spectrum, the ¹³C-NMR spectrum and the IR-spectrum see supplementary information.

EI mass spectroscopy: m/z = 456 [M]⁺, 399, 322, 287, 266, 226, 168, 73, 57, anal. Calc. for C₂₁H₄₁N₃O₄Si₂: C, 55.34; H, 9.07, N, 9.22; found: C, 55.13; H, 8.93; N, 9.19; mp = 186 °C.

Deutero-chloroform (98 at. %), stabilized with silver foil, was purchased from Sigma-Aldrich and filtered over basic aluminum oxide directly before use.

All spectra were recorded with a spectral resolution of 2 cm⁻¹ using a Nicolet 5700 FTIR spectrometer equipped with a liquid-nitrogen cooled MCT detector. Both solvent and solution were handled in the same IR cell with CaF₂ windows having an absorption pathway of 0.2 mm. The weak CDCl₃ absorption at 3154.6 cm⁻¹ of a pure solvent spectrum was used to calibrate the absorption path length by comparison with a CDCl₃ spectrum of known path length measured in a sealed liquid spectrophotometer cell (Model SL-2, 1.079 mm path length, International Crystal Laboratories). The spectra were corrected for solvent contributions by subtracting a pure solvent spectrum that was taken immediately before measuring the concentration series. Using CDCl₃ instead of CHCl₃ ensured that no part of the spectral region of interest was superimposed by strong solvent absorptions. Concentrations were varied between 0.4 and 150 mM (10⁻³ mol/dm³) by adding a highly concentrated solution via a microliter syringe to neat solvent. The sample solution was circulated through the IR cell using a precision dispenser.

4.5.3 Computational Methods

Geometry optimizations and harmonic frequency calculations at the B3LYP/ TZVP level of theory were carried out for the monomer, dimer, trimer and tetramer. All calculations were performed using the Turbomole program package [31, 38, 36, 37] within the resolution-of-the-identity (RI) approximation [129, 168, 130]. The large silyl protecting groups were replaced by simple methyl groups in the calculations. The effect of placing the nucleosides inside a solvent cavity has been estimated by using the conductor-like screening model (COSMO) [131] implemented in the Turbomole pro-

gram package. COSMO is a continuum solvation model, where the solute molecule forms a cavity within the dielectric continuum of permittivity ϵ that represents the solvents. For chloroform a permittivity of $\epsilon = 4.807$ and a refractive index of $n = 1.444$ has been used. [132] The latter is only used in the numerical frequency calculations to account for the problem of non-equilibrium solvation within the continuum model, because the molecular vibrations are on a time scale that do not allow a reorientation of the solvent molecules. [133] See supplementary material for a table of calculated vibrational frequencies and intensities.

Calculated harmonic vibrational frequencies were scaled by 0.9800 (N–H bend) and 0.9525 (N–H stretch) in order to match the calculated and experimental N–H₂ bending and symmetric stretching vibrations of the dC(TBDMS)₂ monomer in solution (see Figure 4.34).

4.5.4 Results and Discussion

Figure 4.30 shows a series of FT-IR absorption spectra of dC(TBDMS)₂ in CDCl₃ at concentrations ranging from 5.6 to 120 mM. The spectra are scaled to match the intensity of the monomer N–H stretching vibrations at 3535 and 3418 cm⁻¹ (marked M in Figure 4.30) which are the antisymmetric and symmetric N–H stretch vibrations of the NH₂ group, respectively.

With increasing concentration several absorption maxima arise between 3000 and 3400 cm⁻¹ which can be assigned to aggregates of dC(TBDMS)₂. [161, 165] The intense bands below 3000 cm⁻¹ belong to the C–H stretching modes of the protecting groups where the absorptions of monomers and aggregates are overlapping completely. In the N–H bend region the absorption bands of monomer and aggregates are overlapping as well especially at about 1650 cm⁻¹ where a broad and intense band is observed. Only the peak at 1598 cm⁻¹ seems to be of pure monomer nature while the two features at 1534 cm⁻¹ and 1478 cm⁻¹ exhibit shoulders that gain intensity more than proportional with increasing concentration. The concentration dependence of the FT-IR spectra demonstrates that the spectra are a superposition of several components and the solutions consist of monomers and aggregates.

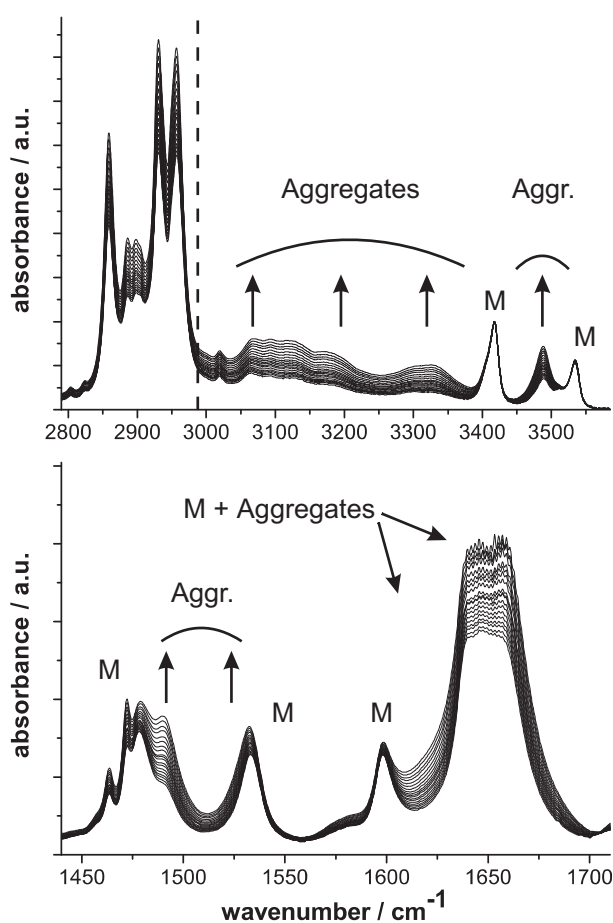


Abbildung 4.30: FT-IR spectra of $\text{dC}(\text{TBDMS})_2$ in CDCl_3 measured at various concentrations (5.6 to 120mM, from bottom to top) in the N-H stretch region (upper layer) and N-H bend region (lower layer). The spectra were scaled to match the intensity of the N-H stretching vibration of the monomer at 3418 cm^{-1} (M). With increasing concentration several maxima arise (especially between 3000 and 3400 cm^{-1}), which belong to aggregates.

The concentration c_0 that has initially been weighed in corresponds to a number of molecules that may be present as monomeric units as well as incorporated in dimers, trimers and so on.

$$c_0 = [C] + 2[C_2] + 3[C_3] + \dots = c_m + 2c_d + 3c_t + \dots \quad (4.11)$$

Assuming a stepwise reversible monomer-oligomer aggregation, the successive equilibria may be written as:

$$\begin{array}{lll} C + C \rightleftharpoons C_2 & K_d = \frac{[C_2]}{[C]^2} = \frac{[c_d]}{[c_m]^2} & (4.12) \\ C + C_2 \rightleftharpoons C_3 & K_t = \frac{[C_3]}{[C][C_2]} = \frac{[c_t]}{[c_m][c_d]} \\ \vdots & \vdots & \\ C + C_{n-1} \rightleftharpoons C_n & K_n = \frac{[C_n]}{[C][C_{n-1}]} \end{array}$$

The initial concentration c_0 may then be expressed as a polynomial in c_m :

$$c_0 = c_m + 2c_d + 3c_t + \dots = c_m + 2K_d c_m^2 + 3K_d K_t c_m^3 + \dots \quad (4.13)$$

where c_d and c_t are the actual dimer and trimer concentrations and K_d and K_t are the dimerization and trimerization constants, respectively.

Because of the strong red shift of the NH stretch vibrations upon H-bonding and the concentration dependence shown in Figure 4.30 it is assumed that aggregates do not contribute significantly to the infrared absorption at 3418 cm^{-1} which has been assigned to the asymmetric stretch vibration of the amino group. For a given pathlength d , the integrated absorption A of this band is, applying Beer's law, a direct measure for the actual concentration c_m of monomer units present in solution.

$$A_{int}^{3418} = \alpha_m \cdot c_m \cdot d \Leftrightarrow c_m = \frac{A_{int}^{3418}}{\alpha_m d} \quad (4.14)$$

Where α_m is the integrated absorption coefficient of the monomer. Expressing c_m by its integrated absorption ($A = A_{int}^{3418}$), equation 4.13 can be written as:

$$c_0 = \left(\frac{A}{\alpha d} \right) + 2K_d \left(\frac{A}{\alpha d} \right)^2 + 3K_d K_t \left(\frac{A}{\alpha d} \right)^3 + \dots \quad (4.15)$$

or:

$$\frac{c_0}{A/d} = \frac{1}{\alpha} + \frac{2K_d}{\alpha^2} \left(\frac{A}{d} \right) + \frac{3K_d K_t}{\alpha^3} \left(\frac{A}{d} \right)^2 + \dots \quad (4.16)$$

To account for contributions from overlapping bands at high sample concentrations the integrated absorption A of the monomer has been determined by fitting the corresponding band of the symmetric NH₂ stretch vibration at 3418 cm^{-1} as well as the neighboring bands to Voigt profiles in a global analysis. According to equation 4.16 the term $c_0/(A/d)$ can be expressed as a polynomial in A/d . The order of the polynomial reflects the maximum clustersize. If no larger aggregates than dimers are formed, a straight line results and K_d can be calculated from the slope.

A plot of $c_0/(A/d)$ as a function of A/d , like depicted in Figure 4.31, shows that relying on the linearity alone might be misleading if only a small concentration range is covered. It is important to notice that in the range of 0.9 - 30 mM (Fig 4.31b)) the plot seems linear although the behavior over the complete concentration range (0.4 - 150mM in Fig 4.31 a)) is far from linear. Previously it has been argued [163] that the linearity in the reduced range proofs the absence of larger clusters. The non-linear graph points out the influence of bigger aggregates beyond the dimer.

The red line in Figure 4.31 is a weighted linear fit over the full concentration range, assuming that only dimers are formed in this range of concentrations by setting K_t to zero. This fit does not represent the experimental data convincingly. Inclusion of the trimerization constant (blue curve) does substantially improve the quality of the fit and yields a dimerization equilibrium constant of $K_d = 5.6 \pm 0.2\text{ L/mol}$, a trimerization equilibrium constant of $K_t = 24.7 \pm 0.6\text{ L/mol}$ and an absorption coefficient of $\alpha = 68.2\text{ km/mol}$.

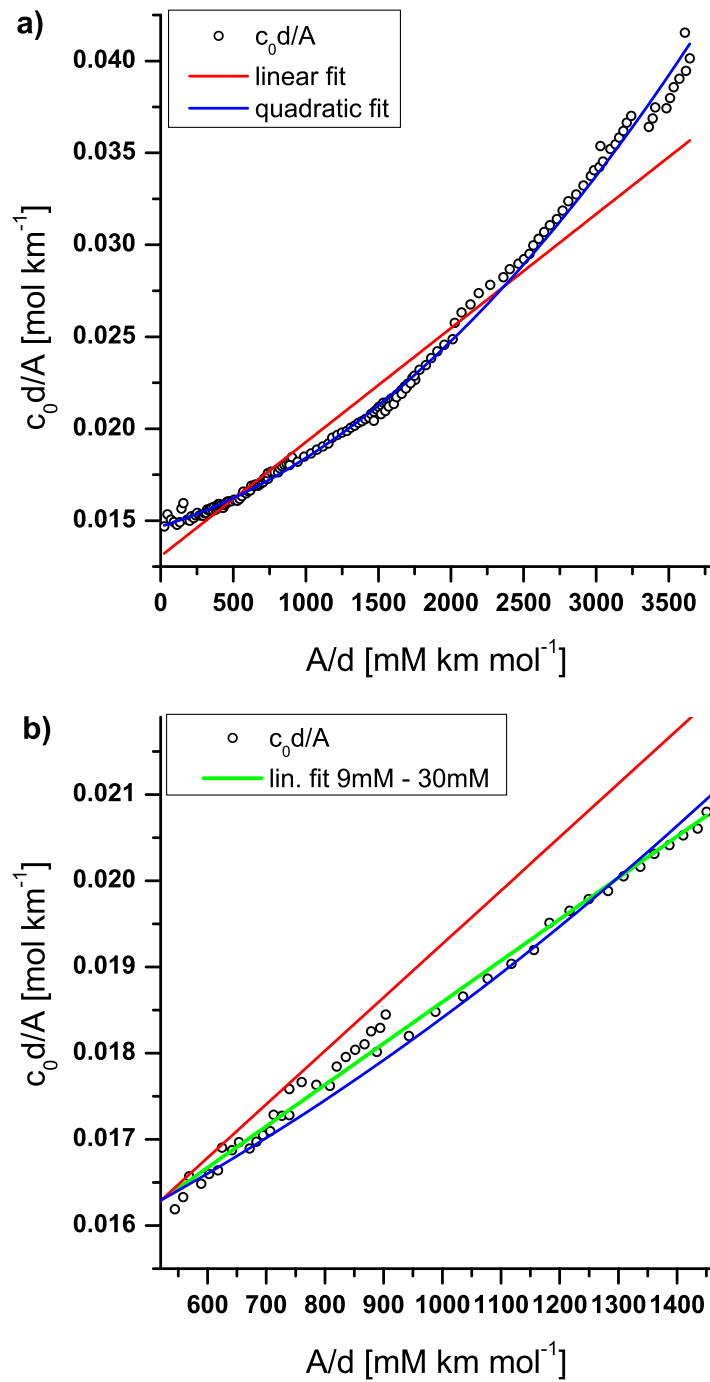


Abbildung 4.31: Determination of integrated absorption coefficient α and of equilibrium constants from a polynomial fit a) 0.4 - 150mM b) 0.9 - 30mM (see text).

The value of α is of special importance because it directly influences all other fitting parameters and thereby all equilibrium constants. The value of $\alpha = 68.2 \text{ km/mol}$ is in good agreement with an extrapolation of the apparent integrated absorption coefficients $\alpha_{app} = A/c_0d$ to the limit of infinite dilution: $\alpha = \lim_{c_0 \rightarrow 0} (A/c_0d)$ (s. Fig. 4.32) which is an alternative method to determine the absorption coefficient.[123, 128]

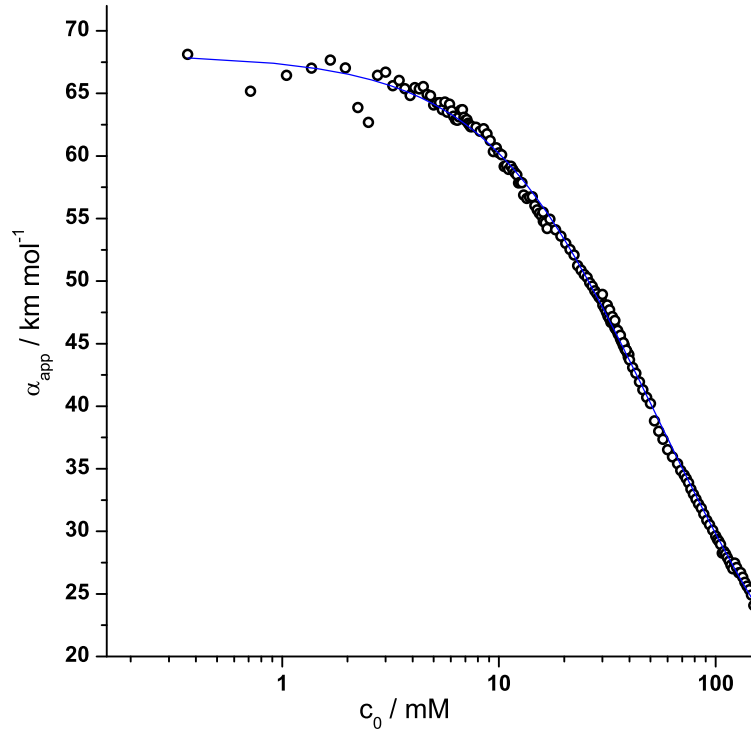


Abbildung 4.32: Determination of integrated absorption coefficient α via an extrapolation of the apparent integrated absorption coefficients $\alpha_{app} = A/c_0d$ to the limit of infinite dilution: $\alpha = \lim_{c_0 \rightarrow 0} (A/c_0d)$.

The significant change of the slope in this plot emphasizes the importance of measurements at small concentrations for a correct determination of the absorption coefficient.

According to equation 4.16 it should in theory be possible to determine the integrated absorption coefficient α along with all equilibrium constants K_i by a polynomial fit. But inclusion of a cubic term to account for the formation of tetramers results in a negative value for the tetramer association constant.

However, the fit also yields a good representation of the experimental data if the trimer is left out by setting K_t to zero and tetramers are included. The only difference that demonstrates the influence of the model on the fitted physical parameter is a different value of $K_d = 10.3 \text{ L/mol}$.

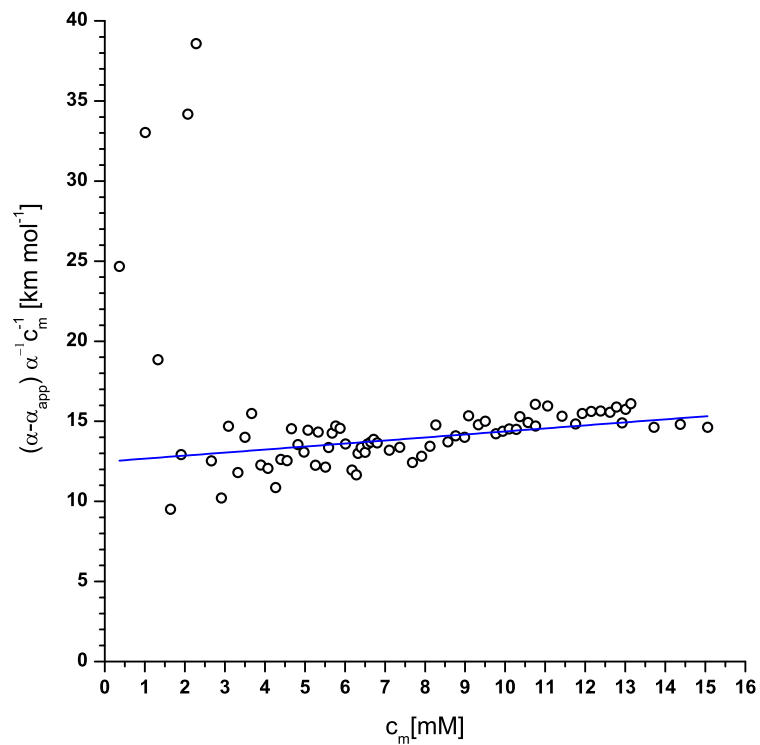


Abbildung 4.33: Determination of dimer equilibrium constant K_d via an extrapolation of equation 4.18 to the limit of zero monomer concentration.

For this reason a different approach was taken to confirm the value for K_d . It goes back to the work of Klotz et al.[169] and has been applied by Nagel et al. to study the aggregation of adenine and uracil derivatives:[123]

$$\lim_{c_m \rightarrow 0} \left(\frac{q}{1-q} \frac{1}{c_m} \right) = 2 K_d \quad (4.17)$$

where q is the fraction of hydrogen-bonded molecules under the assumption that cyclic dimers are formed. The extrapolation to zero monomer concentration is independent of the model for the formation of larger clusters. This equation can be recast in terms of our variables, which gives the expression:

$$\lim_{\frac{A}{\alpha d} \rightarrow 0} \left(\frac{\alpha - \alpha_{app}}{\alpha} \frac{1}{\frac{A}{\alpha d}} \right) = 2 K_d \quad (4.18)$$

The corresponding graphical extrapolation which is shown in Figure 4.33 results in a value for the dimerization constant of $K_d = 6.24 \text{ L/mol}$.

This value, determined by a method that does not depend on the formation of trimers or tetramers, should be reproduced by the fitting procedure described above. The agreement is fair under the assumption that the larger aggregates are tetramers ($K_d = 10.3 \text{ L/mol}$) but quite good ($K_d = 5.6 \text{ L/mol}$) assuming that trimers are formed. Because the following deconvolution procedure requires unique clustersizes, the larger clusters were assigned to be trimers.

To separate the experimental FT-IR spectra into contributions from monomers, dimers and trimers, we used a simple deconvolution method that has been described in detail earlier. [128] Assuming that Beer's law is applicable and that the dC(TBDMS)₂/CDCl₃ solutions consist of monomers, dimers and trimers, then the absorption at a given wavenumber $\tilde{\nu}$ is the sum of the absorptions of monomers (A_m), dimers (A_d) and trimers (A_t) at that wavenumber. Thus we can write:

$$A(\tilde{\nu}) = A_m + A_d + A_t = \epsilon_m d c_m + \epsilon_d d K_d c_m^2 + \epsilon_t d K_d K_t c_m^3 \quad (4.19)$$

where d is the optical path length, ϵ the wavelength dependent extinction coefficient and c_m the actual monomer concentration. By fitting the experimental absorption at a given wavenumber but for different concentrations to equation 4.19 we can determine the monomer, dimer and trimer contributions to the spectrum. In addition, since we know the association constants for the dimerization and trimerization from equation 4.16 we can provide absolute values of the extinction coefficients over the full spectral region covered by our experiment.

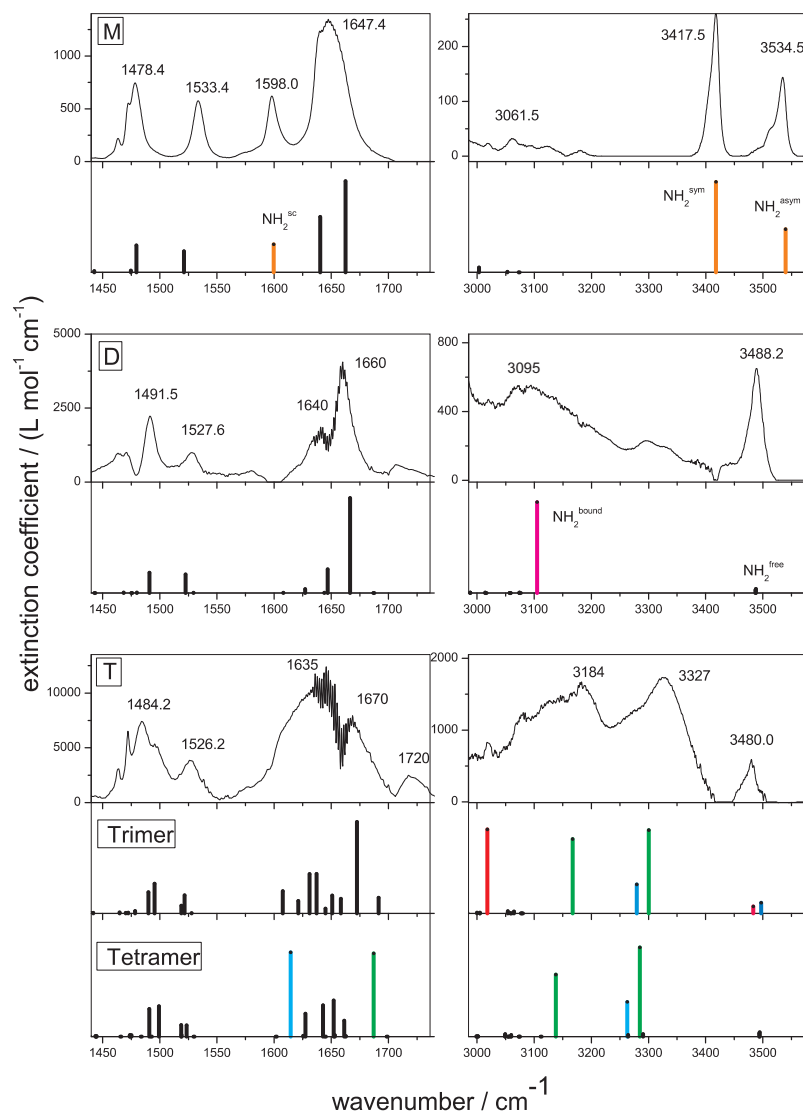


Abbildung 4.34: Wavelength dependent extinction coefficients [in $\text{dm}^3/(\text{mol cm})$] of the monomer (M), the dimer (D) and the trimer (T) in the region of the N-H bending vibrations (left) as well as the C-H and N-H stretching vibrations (right). Also shown are the calculated and scaled stick spectra at the B3LYP/TZVP level of theory within the COSMO framework. The colours correspond to the assigned N-H groups of the structures shown in Figure 4.29.

The absolute extinction coefficients of the dC(TBDMS)₂ monomer (M), dimer (D) and larger clusters (T) for the spectral regions of the N-H stretch and bend vibrations are depicted in Figure 4.34. In addition calculated harmonic frequencies based on the B3LYP/TZVP geometries (also of a tetramer structure) are shown as stick spectra.

This level of theory is suited to predict the vibrational frequencies and the red shift due to H-bonding. The experimentally observed broadening that occurs upon H-bonding, which can reach up to 500 cm⁻¹ (FWHM) e.g. for carboxylic acid dimers [170, 171] can only be modeled using more costly methods. [172, 173, 174] Due to the broad experimental spectra the assignment to certain geometries, especially for the trimers and tetramers, remains ambiguous.

The peaks in the calculated spectra are coloured referring to the assigned N-H groups as shown in Figure 4.29.

The deconvoluted monomer spectrum is in good agreement with calculated frequencies and relative intensities as shown in Figure 4.34. The most intense band in the N-H bending region at about 1650 cm⁻¹ can be assigned to the overlapping C=O and C₅=C₆ stretching vibrations. The maximum at 1598 cm⁻¹ corresponds to a scissor mode of the free amino group and the bands at 1533 cm⁻¹ and 1478 cm⁻¹ can be ascribed to stretching modes C₄=N₃ and C₄=C₅ in the aromatic ring. The N-H stretching absorption of the monomer is dominated by the symmetric stretch of the amino group at 3418 cm⁻¹ and the asymmetric stretch at 3535 cm⁻¹. At 3061 cm⁻¹ additional weak absorptions of aromatic C-H stretch vibrations can be observed.

The cyclic dimer (see Figure 4.29) no longer features a non-hydrogen bonded NH₂ group and due to symmetry the vibrations in the dimer are coupled. Hydrogen-bonding leads to a red shift and a broadening of the involved N-H stretch absorption and the wave-number of the infrared active stretching vibration of both H-bonded hydrogen atoms with opposite phase (NH₂^{bound}) has been calculated to be 3105 cm⁻¹ giving a red shift of 313 cm⁻¹ compared to the asymmetric NH₂ stretching vibration of the monomer. The deconvoluted dimer spectrum shows a broad absorption band at about 3095 cm⁻¹ which we assign to the NH₂^{bound} mode. The prominent feature at 3488 cm⁻¹ corresponds to the stretching vibration (NH₂^{free}) of the free, non H-bonded hydrogen of the amino groups.

The strong broadening of the H-bonded band that is not featured at this level of theory complicates the comparison with the calculated intensities.

Not included in the calculated stick spectra are the strong C-H absorptions of the protecting groups below 3000 cm⁻¹ (see Figure 4.30) which render the deconvolution

in this spectral region impossible. These absorptions are strong and overlap for the different cluster sizes. In Figure 4.30 can be seen that they gain intensity more than proportional with increasing concentration. This behavior is most probably not due to the C–H vibrations of the protecting groups but to H-bonded N–H vibrations that are red-shifted this far. The deconvolution that might be incomplete in this region, attributes this increase to the dimer alone, resulting in an increase of the dimer spectrum that coincides with a decrease in intensities in the trimer spectrum.

For the N–H bend region the most prominent change besides minor spectral shifts is that the NH_2^{sc} mode has vanished completely. The absorption band at about 1650 cm^{-1} due to the C=O and $\text{C}_5=\text{C}_6$ stretching vibrations also changed its shape and is discernible as an intense sharp peak at 1660 cm^{-1} accompanied by a shoulder at 1640 cm^{-1} .

The deconvoluted spectrum for the larger aggregates does not allow for an unambiguous assignment.

Those vibrations involving stretching motions within the aromatic rings are located below 1525 cm^{-1} and correspond well to the calculated ones for both the trimer and the tetramer. The combined N–H bending and C=O stretching vibrations add up to a very broad band around 1635 cm^{-1} exhibiting a shoulder at 1670 cm^{-1} and probably due to partial saturation the spectrum is unsteady between 1625 and 1675 cm^{-1} .

The agreement with the stick spectra is acceptable for the trimer, where the symmetry is broken while the vibrations are still coupled to cooperative motions leading to a number of absorptions in the N–H bend region that cannot be assigned to local modes. But for the tetramer the agreement is at most slightly worse and only the localized NH_2 scissor motions at 1614 and 1687 cm^{-1} for which the highest intensities have been calculated stand out.

According to the calculations, all N–H stretch vibrations can be assigned to local modes of the individual amino groups. The deconvoluted spectrum features two broad absorption maxima at 3184 cm^{-1} and at 3327 cm^{-1} which are in good agreement with the calculated frequencies of the symmetric and antisymmetric stretching vibration of the amino groups (green, see Figure 4.29). The feature at 3480 cm^{-1} corresponds to the non H-bonded $\text{NH}_2^{\text{free}}$ vibration. In the trimer, the H-bonded $\text{NH}_2^{\text{bound}}$ groups of monomer units A and C (see Figure 4.29) have red shifts that differ a lot, also in comparison with the cyclic dimer. The calculated red shift for the $\text{NH}_2^{\text{bound}}$ (blue) of monomer unit C is 175 cm^{-1} less than in the dimer, indicating a weaker H-bond with the carbonyl oxygen, while the H-bond between the amino group of molecule A (red) and molecule B gained strength leading to an increase of 87 cm^{-1} in the red shift of the corresponding $\text{NH}_2^{\text{bound}}$ stretching vibration. Unfortunately the shift is so strong that the absorption

maximum is expected in the spectral region where the deconvolution is incomplete due to the overlap with the strong C–H absorptions of the protecting groups.

In the symmetrical tetramer, the $\text{NH}_2^{\text{bound}}$ vibration of monomer unit A (given in red for the trimer) vanishes. Therefore the relatively weak absorption around 3020 cm^{-1} in the experimental spectrum points towards a contribution of the tetramer.

All together, the accordance between deconvoluted and theoretical spectra is reasonable but still the observed deviations prevent an unambiguous assignment.

Finally we would like to mention that the dimerization constant obtained in this work is almost one order of magnitude smaller than the value reported earlier ($K_d = 41.2\text{ dm}^3/\text{mol}$ [163] and $42.8\text{ dm}^3/\text{mol}$ [164]). Carmona et al. plotted the monomer absorption A_N at 3418 cm^{-1} (not the integrated absorption) against c_0/A_N to determine K_d and monomer extinction coefficient ϵ simultaneously. This method is equivalent to the model used in this work (s. equation 4.16) if only monomers and dimers are accounted for. The linear behavior in the concentration range between 9 and 30mM was taken as evidence that no larger aggregates are formed. Our experimental data as depicted in Figure 4.31 show that such a plot can appear to be linear in this reduced concentration range while the behavior over the whole range differs clearly from linearity.

An analysis of our data in the range between 9 and 30mM under the assumption that only dimers are formed yields a value of $K_d = 12.6\text{ L/mol}$. The reason for the deviance between this value and the one reported earlier remains unclear and especially cannot be explained by traces of water in our samples because an additionally aggregation with water would lead to higher values for K_d .

Nevertheless the agreement between the values determined via the polynomial fit and the extrapolations to zero concentration show the consistency of our data. The non-linear behavior that indicates the formation of larger aggregates is very articulate over the complete range of concentrations. The proposed trimerization does not contribute at low concentrations. At 1 mM (as used by Temps et al.[164]) the association constants determined in this work predict 99 % of the dC(TBDMS)₂-molecules to be present as monomeric units and 1 % to be incorporated in dimer structures while larger aggregates can be neglected. But at higher concentrations the influence of larger aggregates increases and already at 25 mM about 10 % of the dC(TBDMS)₂-molecules are predicted to be incorporated in trimers.

4.5.5 Conclusions

We investigated the self-aggregation of 2'-deoxy-3',5'-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-cytidine. Infrared spectra taken at different concentrations revealed the formation of dimers and larger aggregates. We determined the absolute, wavelength dependent extinction coefficients of the monomer, dimer and larger aggregates (trimers or tetramers) by a simple deconvolution method. This method is a useful tool to discriminate between absorptions of different cluster sizes. The extracted pure monomer spectrum is in very good agreement with calculated harmonic frequencies based on B3LYP/TZVP calculations within the COSMO framework. With the exception of the spectral region around 3000 cm^{-1} where the deconvolution is hindered by the strong C–H absorptions of the protecting groups, the deconvoluted dimer spectrum is in reasonably good agreement with the calculations. The analysis applied in this work strongly indicates the formation of larger clusters and hints towards a strong contributions from trimers. Nevertheless the observed spectral features do not allow for an unambiguous assignment, whether the larger aggregates are trimers or tetramers.

Acknowledgement:

This work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KL 531/27).

4.5.6 Supplementary material

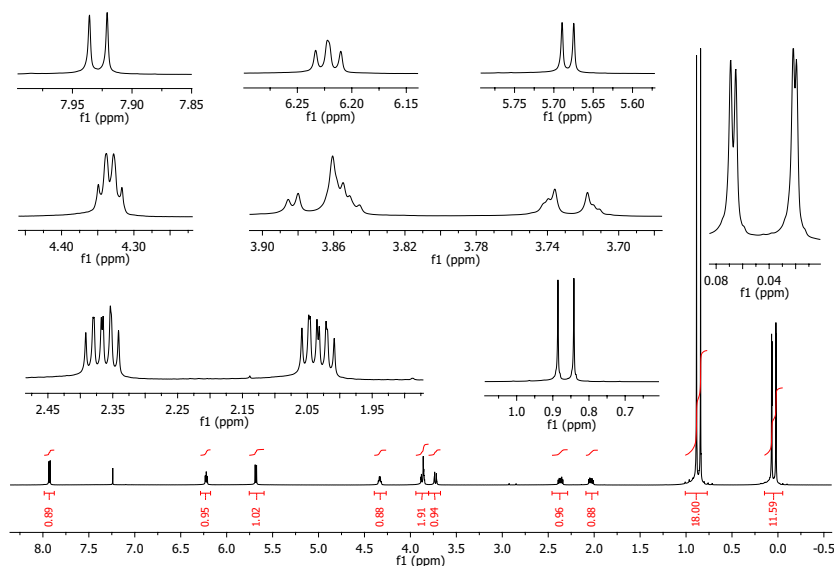


Abbildung 4.35: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3)

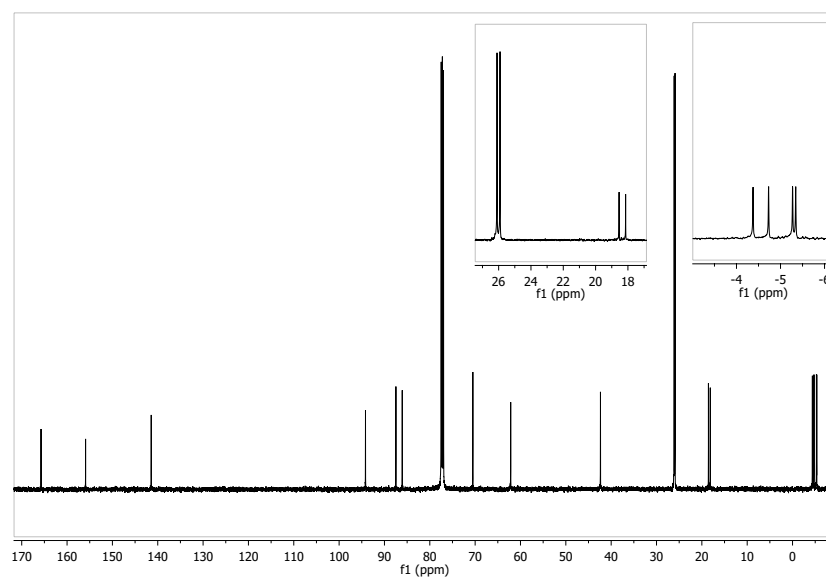
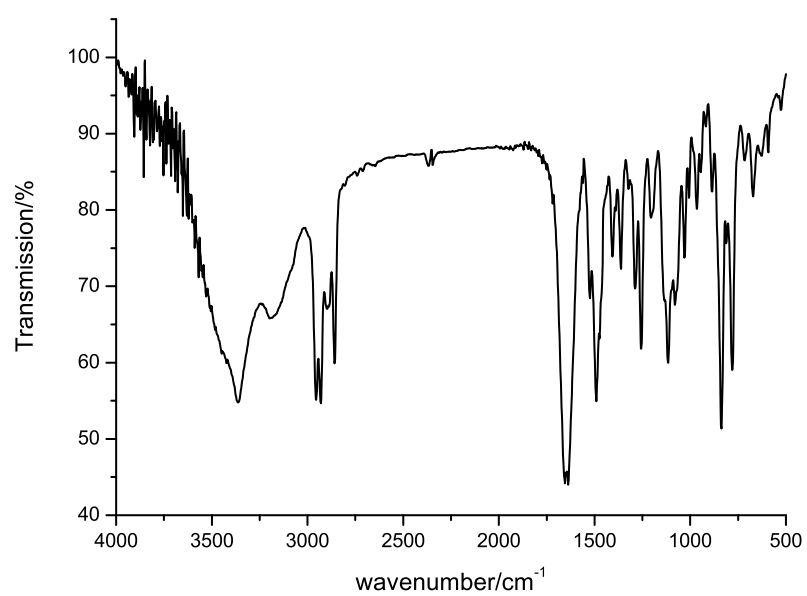
Abbildung 4.36: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR (125 MHz, CDCl_3)

Abbildung 4.37: Solid state (KBr pellet) infrared spectrum

Tabelle 4.10: Absolute energies (in E_h) and relative energies (in kJ/mol) of 1-methylcytosin monomer, dimer, trimer and tetramer in $CDCl_3$ solution at the B3LYP/PCM/TZVP level of theory together with unscaled harmonic frequencies (in cm^{-1}) and calculated infrared intensities (in km/mol). Only vibrational frequencies with non-zero intensity are listed.

1-Methylcytosin RI-B3LYP/TZVP $CHCl_3$ solution	Monomer		Dimer		Trimer		Tetramer	
n	1		2		3		4	
	$[E_h]$		$[E_h]$		$[E_h]$		$[E_h]$	
Energy	-434.1733385		-868.3603358		-1302.5455034		-1736.7311486	
ZPE	0.1260742		0.2574433		0.3849907		0.5126622	
E_{total}	-434.0472643		-868.1028925		-1302.1605127		-1736.2184864	
	[kJ/mol]		[kJ/mol]		[kJ/mol]		[kJ/mol]	
$D_e = E_n - nE_1$	0.00		21.96		49.15		77.27	
D_e/n	0.00		10.98		16.38		19.32	
harm. freq.	$[cm^{-1}]$	$[km/mol]$	$[cm^{-1}]$	$[km/mol]$	$[cm^{-1}]$	$[km/mol]$	$[cm^{-1}]$	$[km/mol]$
NH ₂ stretch	3716.05	83.4	3661.82	133.7	3671.52	181.9	3669.08	141.2
	3588.39	174.7	3661.28	96.3	3657.07	119.5	3668.31	108.9
			3260.12	2995.5	3465.37	1436.1	3454.92	81.9
					3443.21	499.7	3448.79	2941.6
					3325.45	1283.0	3427.45	56.5
					3168.88	1449.3	3425.80	1145.0
							3294.70	2048.0
C=O stretch	1696.30	880.2	1700.43	2313.5	1726.00	310.4	1721.55	2026.6
+ NH ₂ bend	1673.68	535.1	1680.36	578.0	1706.52	1809.3	1695.24	389.1
+ ring vib.	1632.34	270.4	1660.47	93.4	1692.29	288.3	1686.98	33.8
	1552.19	203.3	1553.65	451.9	1684.46	354.5	1685.71	880.8
	1509.70	259.6	1521.41	492.9	1678.52	92.4	1676.27	762.1
					1670.46	783.6	1660.65	558.3
					1664.23	779.9	1658.56	20.2
					1654.17	244.0	1647.38	2052.6
					1640.40	439.2	1554.56	274.2
					1552.82	355.5	1549.97	40.0
					1549.79	152.1	1549.74	283.3
					1525.92	587.8	1529.90	739.9
					1520.40	419.8	1521.31	676.2

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten der FT-IR Spektroskopie erweitert und eingesetzt, um Einsichten in die Strukturen von Molekülen und Molekülaggregaten zu gewinnen und zu vertiefen. Die dabei verwendeten Methoden lassen sich in drei Teilbereiche untergliedern.

Sprunghafte Verdampfung organischer Moleküle

Eine homologe Reihe α,ω -Diphenylpolyene vom Stilben bis zum Diphenylhexatrien, die als Modellverbindungen für Carotinoide dienen und die mit zunehmender Kettenlänge schwerer flüchtig werden, konnte mittels einer speziellen Messzelle zur sprunghaften Verdampfung zersetzungsfrei in die Gasphase überführt werden. Die Methode der sprunghaften Verdampfung macht auch solche Moleküle, die nur kurze Zeit thermisch stabil sind, für die Infrarotspektroskopie in der Gasphase zugänglich. Auf diese Weise konnte erstmals ein Infrarotspektrum von Diphenylhexatrien in der Gasphase aufgenommen werden. Derartige Infrarotspektren sind frei von Umgebungseffekten wie z.B. Lösungsmiteleinflüssen, so dass durch einen Vergleich mit harmonischen Schwingungsfrequenzen aus quantenchemischen Rechnungen direkt die vorliegenden Strukturen nachgewiesen werden konnten. Mit Hilfe von Dichtefunktionalrechnungen wurde eine Markerbande identifiziert, die charakteristisch für die *cis*-Konformere ist, so dass gezeigt werden konnte, dass bei den im Experiment vorliegenden Temperaturen von bis zu 200 °C keine thermische Isomerisierung auftritt und die *all-trans* Anordnung erhalten bleibt.

Analyse der rovibratorischen Bandenstruktur in FT-IR Spektren

Es konnte am Beispiel von Pyrazin in der Gasphase gezeigt werden, dass die spektrale Auflösung eines kommerziellen FT-IR Spektrometers ausreichend sein kann, um die Rotationskonstanten relativ großer organischer Moleküle im Grund- und angeregten Zustand zu bestimmen. Des Weiteren konnten der Absolutwert des Winkels der Änderung des Dipolmoments im Trägheitsachsensystem sowie einzelne Zentrifugalverzerrungskonstanten ermittelt werden. Trotz der nicht vollständigen Rotationsauflösung konnten die Bandenkonturen erfolgreich simuliert werden, indem Verfahren aus dem Bereich der hochauflösenden (Laser-)Spektroskopie, wie die automatisierte Anpassung der Spektren mit Hilfe evolutionärer Algorithmen, eingesetzt wurden. Da Pyrazin der Punktgruppe D_{2h} angehört, können aus Gründen der Symmetrie nur reine A-, B- oder C-Typ Banden für die fundamentalen Vibrationen auftreten, so dass die durchgeführte Untersuchung Modellcharakter besitzt. Mit Hilfe der Grundzustandsrotationskonstanten, die aus den starken Absorptionsbanden bestimmt wurden, konnte der Bandentyp auch für die schwächeren Absorptionen bestimmt werden. Dabei betrug der ermittelte Hybridcharakter der Banden, d.h. der Anteil anderer Bandentypen jeweils weniger als 1 %. Im Vergleich mit anharmonischen Frequenzen aus MP2/6-311G(d,p)-Rechnungen konnten auf Basis dieser Symmetrieminformation mit Ausnahme einer Mode alle infrarotaktiven fundamentalen Schwingungen zugeordnet werden.

Aggregation von Nukleobasen und Nukleosiden in CDCl_3 Lösungen

Es wurde die Homo-Aggregation von DNS-Bausteinen in flüssiger Phase mittels FT-IR Spektroskopie untersucht, da diese Methode struktursensitiv ist und sich besonders zur Untersuchung von Wasserstoffbrückenbindungen eignet, die zu einem erheblichen Teil die Struktur der DNS bestimmen. Dabei wurde deuteriertes Chloroform als Lösungsmittel verwendet, um die Gegebenheiten innerhalb der DNS-Stränge zu simulieren. Die Identifikation der gebildeten Strukturen wird dabei durch den Einsatz einer Methode zur Analyse der Spektren erleichtert. Eine detaillierte Diskussion der Vor- und Nachteile der Methode erfolgt im nachfolgenden Abschnitt 5.2. Dieses neu entwickelte Verfahren erlaubt es, die Anteile die jeweils auf eine bestimmte Aggregatgröße zurückzuführen sind, zu separieren. Die einzige Voraussetzung hierfür ist, dass eine Absorptionsbande existiert, die allein dem jeweiligen Monomer zuzuordnen ist und nicht von weiteren Banden überlagert wird. Eine solche Bande kann für alle Nukleobasen mit Ausnahme von Guanin im Bereich der N-H-Streckschwingungen identifiziert werden. Anstelle von Thymin wird hier Uracil verwendet, weil mit 1-Cyclohexyluracil bereits ein Derivat, das eine hohe Löslichkeit in Chloroform aufweist, kommerziell erhältlich ist. Für die

anderen Nukleobasen ist eine synthetische Derivatisierung durch Einbringen aliphatischer Seitenketten notwendig um ebenfalls eine ausreichende Löslichkeit zu erreichen. Anhand von Konzentrationsreihen wird über einen polynomischen Fit der Konzentrationsabhängigkeit der reinen Monomerbande bestimmt, bis zu welcher Clustergröße (Dimere, Trimere, etc.) Aggregate gebildet werden. Dieser Fit liefert die Gleichgewichtskonstanten für die jeweilige Clustergröße ohne jedoch zwischen den möglichen verschiedenen Strukturen zu unterscheiden. Diese Gleichgewichtskonstanten ermöglichen es, die aufgenommenen Infrarotspektren in die Anteile zu separieren, die jeweils auf eine bestimmte Clustergröße zurückzuführen sind. So ist es möglich, den absoluten Extinktionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge über den gesamten untersuchten Spektralbereich anzugeben. Durch einen Vergleich mit berechneten harmonischen Schwingungsfrequenzen auf der Grundlage von Dichtefunktionalrechnungen kann in einem zweiten Schritt teilweise eine Zuordnung zu konkreten Aggregatstrukturen erfolgen. Zusätzlich kann anhand der relativen Assoziationsenergien unter Annahme einer BOLTZMANN-Verteilung eine Abschätzung des Verhältnisses zwischen den verschiedenen vorliegenden Clustergeometrien vorgenommen werden.

Beim 1-Cyclohexyluracil wird durch den sterisch anspruchsvollen Cyclohexylrest eine Aggregation über das Dimer hinaus verhindert. Das separierte Monomerspektrum stimmt sehr gut mit den berechneten Frequenzen überein, was genauso für die Monomerspektren der Adenin- und Cytidinderivate zutrifft.

Es können drei verschiedene zyklische Dimerstrukturen von 1-Cyclohexyluracil gebildet werden. Das extrahierte Dimerspektrum für 1-Cyclohexyluracil wird dominiert von den Absorptionen einer symmetrischen Dimergeometrie, bei der jeweils die Carbonylgruppe in 4-Position als H-Brücken-Akzeptor fungiert (4-4-Dimer) und die beiden Cyclohexylreste maximal voneinander entfernt sind. Laut Rechnungen ist diese Anordnung energetisch am günstigsten und sollte knapp 60 % der Dimere ausmachen. Daneben konnte noch die energetisch zweitgünstigste Anordnung in Form eines zyklischen aber asymmetrischen Dimers nachgewiesen werden.

In ähnlicher Weise kann auch 9-Ethyladenin drei verschiedene zyklische Dimerstrukturen bilden, da die Aminogruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum Stickstoff entweder in 1-Position oder in 7-Position ausbilden kann. Die DFT-Rechnungen sagen voraus, dass das energetisch günstigste (1-1)-Dimer und das zweitgünstigste (1-7)-Dimer etwa zu gleichen Anteilen vorliegen, während die (7-7)-Anordnung nur etwa bei 10 % der Dimere vorliegen sollte. Tatsächlich ist das extrahierte experimentelle Dimerspektrum im Einklang mit dieser Zusammensetzung.

Da die Aminogruppen in den Dimerstrukturen nur jeweils mit einem Proton eine H-Brücke eingehen, verbleiben die freien Amino-Wasserstoffatome als mögliche Positionen für die Anlagerung weiterer Monomereinheiten. Die Konzentrationsabhängigkeit der Intensität der Monomerbande spiegelt dies wider, so dass die Bildung größerer Aggregate nachgewiesen werden konnte. Unter der Annahme, dass es sich bei den größeren Clustern um Trimere handelt, konnte aus den Messreihen ein entsprechendes Spektrum extrahiert werden. Dieses stimmt grob überein mit den berechneten Schwingungsfrequenzen für die energetisch günstigste Trimerstruktur, die aus der oben beschriebenen Anlagerung eines weiteren Monomers an die stabilste Dimergeometrie resultiert. Aufgrund der Breite der experimentellen Banden und den weniger prominenten Unterschieden zwischen den berechneten Schwingungsfrequenzen der möglichen unterschiedlichen Trimerstrukturen, lässt sich das Vorhandensein weiterer Trimergeometrien nicht mit Sicherheit ausschließen.

Zusätzlich wurde mit N-Methyl-9-ethyladenin ein Derivat untersucht, bei dem eines der Amino-Wasserstoffatome durch eine Methylgruppe substituiert ist. Hierdurch wird wie erwartet die Anlagerung weiterer Monomere an das Dimer verhindert. Desweiteren kann die Methylgruppe im Monomer zwei unterschiedliche Anordnungen einnehmen, wobei die *trans*-Ausrichtung um 6.2 kJ/mol bevorzugt ist. Dies hat eine Umkehrung der Reihenfolge der relativen Stabilitäten der Dimere zur Folge, so dass nun das (7-7)-Dimer deutlich energetisch bevorzugt ist. Dies wird durch das experimentelle Dimerspektrum bestätigt, dass im wesentlichen nur noch von jeweils einer breiten Bande im Bereich der N-H-Streck- und N-H-Knick-Schwingungen dominiert wird.

Für die Untersuchung von Cytosin wurde von der isolierten Nukleobase übergegangen zum derivatisierten Nucleosid 2'-desoxy-3',5'-bis(*tert*-butyl-dimethylsilyl)-cytidin. Dieses enthält den natürlichen Riboserest, der zusätzlich mit sperrigen Silylgruppen versehen wurde. Anders als erwartet bewirken diese sterisch anspruchsvollen Gruppen jedoch nicht eine Stagnation der Aggregation auf der Stufe des Dimers. Obwohl die Bildung von Trimeren im Rahmen einer schrittweisen Aggregation naheliegt, lässt sich eine Beteiligung von Tetrameren auch im Vergleich mit Frequenzrechnungen nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen. Im Gegensatz hierzu ist die Situation auf der Stufe der Dimere deutlich einfacher, da nur eine zyklische Dimerstruktur gefunden wurde, deren berechnete Schwingungsfrequenzen mit den experimentellen Daten im Einklang sind.

5.2 Diskussion der Methode zur Spektrenzerlegung

Ein großer Vorteil des gewählten Verfahrens besteht darin, dass die Aggregation nicht a priori bereits im zugrundeliegenden Modell auf eine Clustergröße beschränkt werden muss. Vielmehr sind die empirischen Messdaten der begrenzende Faktor für die Analyse. Es werden Aggregate bis zu der maximalen Clustergröße berücksichtigt, die noch eine signifikante Verbesserung für die Übereinstimmung zwischen Experiment und Funktionsfit bewirken. Grundsätzlich könnte das Verfahren auch geeignet sein, um die Bildung noch größerer Aggregate zu belegen und evtl. auch zwischen ihnen zu unterscheiden. Allerdings schreitet die Aggregation der untersuchten DNS-Basen-Derivate in Chloroform nicht so weit fort, weil insbesondere der Konzentrationsbereich durch die geringe Löslichkeit limitiert ist.

Die Spektrenanpassung mittels eines globalen Fits bietet Vorteile speziell im Zusammenhang mit der Verwendung des integrierten Absorptionskoeffizienten. Da an die Spektren, die bei verschiedenen Konzentrationen aufgenommen werden, VOIGT-Profile angepasst werden, deren Halbwertsbreiten für alle Konzentrationen identisch sind, können Effekte durch Überlagerungen mit benachbarten Banden besser berücksichtigt werden. Die Breite der Monomerbanden wird quasi durch die Spektren bei geringer Konzentration ohne Überlagerung mit Aggregatbanden definiert und dann für die hohen Konzentrationen beibehalten.

Die Übereinstimmung der Werte für die Gleichgewichtskonstanten K_d für die Dimerbildung, die mit Hilfe der hier vorgestellten Methode ermittelt wurden, mit aus der Literatur bekannten Werten, schwankt jedoch stark. Für 1-Cyclohexyluracil, das nur Dimere bildet und bei dem auch bei den höchsten Konzentrationen nur eine geringe Überlagerung der Monomerbande mit angrenzenden Aggregatbanden auftritt, ist der Wert mit $K_d = 2.26 \pm 0.18 \text{ dm}^3/\text{mol}$ etwa um einen Faktor drei kleiner als die Literaturwerte ($K_d = 6.1 \text{ dm}^3/\text{mol}$ [121] bzw. $6.8 \text{ dm}^3/\text{mol}$ [123]) während es eine gute Übereinstimmung gibt für 9-Ethyladenin, für das eine Bildung von Trimeren gezeigt werden konnte. Im Falle des Cytidinderivats ist eine differenzierte Betrachtung notwendig, da in Chloroform bislang die Bildung von Aggregaten über das Dimer hinaus vernachlässigt wurde. Carmona et al. haben für einen eingeschränkten Konzentrationsbereich bis 30 mM unter der Annahme, dass nur Dimere gebildet werden einen Wert von $K_d = 41.2 \text{ dm}^3/\text{mol}$ bestimmt. Mit dem hier vorgestellten Verfahren ergibt sich im gleichen Konzentrationsbereich ebenfalls unter Vernachlässigung der Trimerbildung, die hier noch weniger deutlich hervor tritt, ein Wert von $K_d = 12.6 \text{ dm}^3/\text{mol}$ also erneut eine ca. um einen Faktor drei kleinere Gleichgewichtskonstante. Über den gesamten Konzentrationsbereich bis 150 mM kann die Bildung größerer Cluster nicht

mehr vernachlässigt werden, aber nach Einbeziehung einer Trimerbildung ergibt sich nur noch eine Dimerisierungskonstante von $K_d = 5.6 \text{ dm}^3/\text{mol}$. Der Ursprung dieser Abweichungen konnte nicht abschließend geklärt werden. An dieser Stelle muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass in dieser Arbeit nicht die thermodynamischen Größen bei der Aggregation im Mittelpunkt stehen, sondern die gebildeten Strukturen.

Hier liegt der eigentliche Nutzen der Methode. Für alle untersuchten Moleküle konnten eindeutig die Spektrenanteile separiert werden, die auf Dimere zurückgehen. Ausgehend von dieser gesicherten Erkenntnis ist ein Vergleich mit berechneten Spektren möglich. So wird verhindert, dass intensive Absorptionen von Trimeren etc. fälschlicherweise Dimergeometrien zugeordnet werden. Liegen im Dimerspektrum mehrere starke Banden vor, ist dies ein Hinweis für das Vorliegen verschiedener Dimerstrukturen. Unter Berücksichtigung der berechneten relativen Energien ergibt sich für alle untersuchten Systeme ein stimmiges Bild beim Vergleich der Dimerspektren mit gerechneten Frequenzen, sodass die beobachteten Absorptionen konkreten Dimergeometrien zugeordnet werden können.

Dadurch, dass im Modell eine Aggregation über das Dimer hinaus zugelassen wird, kann für 9-Ethyladenin ein IR-Spektrum der Trimere extrahiert werden und für das Cytidinderivat kann sogar erstmals die Bildung derartiger Cluster in Chloroform nachgewiesen werden. Die Abweichungen des Kurvenverlaufs der Messdaten vom Verlauf, der auf einer ausschließlichen Bildung von Dimeren beruht, ist so stark, dass sie einen eindeutigen Beleg für die Bildung größerer Cluster liefert. Der separierte Beitrag dieser größeren Aggregate zu den Spektren ist ebenfalls im Einklang mit berechneten Frequenzen solcher Strukturen.

Eine Zuordnung zu bestimmten Geometrien ist in diesen Fällen allerdings nicht mehr möglich, was jedoch kein unmittelbarer Fehler der Analysenmethode ist. Denn mit zunehmender Anzahl an Molekülen in einem Aggregat nimmt grundsätzlich auch die Zahl möglicher verschiedener Isomere zu. Diese wiederum zeichnen sich dadurch aus, dass sie in einem ähnlich breiten relevanten Spektralbereich eine höhere Zahl an Schwingungsbändern aufweisen. In Kombination führt das dazu, dass sich die IR-Spektren der einzelnen Isomere für höhere Aggregate weniger stark unterscheiden. Zusammen mit dem Umstand der stark verbreiterten Banden in flüssiger Phase macht dies eine Identifizierung und Zuordnung zu einzelnen Strukturen unmöglich.

Insgesamt hat sich das Verfahren zur Spektrenzerlegung für die Analyse der Aggregation von DNS-Basen als ein sehr nützliches Werkzeug erwiesen. Die Aggregation über das Stadium von Dimeren hinaus konnte für alle Fälle eindeutig bewiesen oder widerlegt werden. Die gesicherte Extraktion der Dimerspektren ermöglicht letztendlich die Zuordnung der Schwingungsbänder zu konkreten gerechneten Strukturen.

5.3 Ausblick

Die Methode der sprunghaften Verdampfung erweitert die Gruppe der organischen Moleküle, die in der Gasphase mittels Infrarotspektroskopie untersucht werden können. Für zukünftige Studien kommen daher alle derartigen Moleküle in Frage, die sich bei klassischem Erhitzen an der Schwelle der thermischen Stabilität befinden.

Die für die α, ω -Diphenylpolyene identifizierte Markerbande für *cis*-Strukturen ist für die Untersuchung der Isomerisierung zum Beispiel mittels zeitaufgelöster Methoden wie *Step-Scan*-FTIR-Spektroskopie von Interesse.

Der erfolgreiche Fit der Rotationskonturen der Schwingungsbanden des Pyrazin mittels evolutionärer Algorithmen sollte sich analog auch für andere Moleküle ähnlicher Größe durchführen lassen. Die Vorgehensweise könnte insbesondere bei Molekülen nützlich sein, für die sich lokalisierte Schwingungsmoden, wie z.B. lokale N–H- oder C=O-Streckschwinungen in Aminosäuren, zuordnen lassen. In solchen Fällen enthält der jeweilige Bandentyp Informationen über die geometrische Ausrichtung der Schwingung im Trägheitsachsensystem und somit über die Struktur des Moleküls.

Die Kenntnis der Aggregatstrukturen, die für die Homo-Assoziation identifiziert wurden, ist neben ihrer Bedeutung bei der Ausbildung von Haarnadelschleifen, fehlerhafter Basenpaarung oder DNS-Superstrukturen wie z.B. Triplexen auch eine wichtige Voraussetzung für Studien zur Hetero-Aggregation zwischen unterschiedlichen Basenpaaren. Die ermittelten Gleichgewichtskonstanten dienen der Abschätzung ob eine Homo-Aggregation neben der natürlichen Basenpaarung auftreten kann. Die für die Homo-Aggregate gefundenen charakteristischen Absorption sind dabei ein weiteres Hilfsmittel. Des Weiteren ist die Methode der Spektrenanalyse zur Untersuchung von Aggregationsprozessen natürlich weitestgehend unabhängig von der Art der zu untersuchenden Moleküle, solange spektrale Veränderungen bei der Clusterbildung auftreten und gleichzeitig Absorptionsbanden zu identifizieren sind, die eindeutig nur auf Monomere zurückzuführen sind.

Literaturverzeichnis

- [1] J. A. Evans and E. J. Johnson. The role of phytonutrients in skin health. *Nutrients*, 2:903–928, 2010.
- [2] J. von Lintig. Colors with functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 30:35–56, 2010.
- [3] S. Tyagi, G. Singh, A. Sharma, and G. Aggarwal. Phytochemicals as candidate therapeutics: An overview. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 3:53–55, 2010.
- [4] D. Qiu, Z.-R. Chen, and H.-R. Li. Density functional theory study on thermal isomerization of β -carotene. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 865:44–48, 2008.
- [5] H. Schulz and M. Baranska. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectros.*, 43:13–25, 2007.
- [6] R. W. Schoenlein, L. A. Peteanu, R. A. Mathies, and C. V. Shank. The first step in vision: femtosecond isomerization of rhodopsin. *Science*, 254:412–415, 1991.
- [7] Y. Shichida and H. Imai. Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals. *Cell. Mol. Life Sci*, 54:1299–1315, 1998.
- [8] H.-W. Choe, J. H. Park, Y. J. Kim, and O. P. Ernst. Transmembrane signaling by gpcrs: Insight from rhodopsin and opsin structures. *Neuropharmacology*, 60:52–57, 2011.
- [9] J. M. Berg, L. Stryer, and J. L. Tymoczko. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
- [10] L. Biemann, M. Braun, and K. Kleinermanns. Gas phase infrared spectra and corresponding DFT calculations of α , ω -diphenylpolyenes. *J. Mol. Spectrosc.*, 259:11–15, 2009.

- [11] R. Linder, M. Nispel, T. Häber, and K. Kleineremanns. Gas-phase FT-IR-spectra of natural amino acids. 409:260–264, 2005.
- [12] D. W. Pratt. High resolution spectroscopy in the gas phase: Even large molecules have well-defined shapes. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 49:481–530, 1998.
- [13] A. R. W. McKellar. High-resolution infrared spectroscopy with synchrotron sources. *J. Mol. Spectrosc.*, 262:1–10, 2010.
- [14] P. R. Griffiths and J. A. de Haseth. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Wiley, 2007.
- [15] M. Schmitt, L. Biemann, W. L. Meerts, and K. Kleineremanns. Analysis of the FTIR spectrum of pyrazine using evolutionary algorithms. *J. Mol. Spectrosc.*, 257:74–81, 2009.
- [16] W. L. Meerts, M. Schmitt, and G. C. Groenenboom. New applications of the genetic algorithm for the interpretation of high-resolution spectra. *Can. J. Chem.*, 82:804–819, 2004.
- [17] W. L. Meerts and M. Schmitt. A new automated assign and analysing method for high-resolution rotationally resolved spectra using genetic algorithms. *Phys. Scr.*, 73:C47–C52, 2006.
- [18] W. L. Meerts and M. Schmitt. Application of genetic algorithms in automated assignments of high-resolution spectra. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 25:353–406, 2006.
- [19] C. N. Pace. Energetics of protein hydrogen bonds. *Nat. Struct. Biol.*, 16:681–682, 2009.
- [20] R. L. Baldwin. Energetics of protein folding. *J. Mol. Biol.*, 371:283–301, 2007.
- [21] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171:964–967, 1953.
- [22] D. D. Boehr. During transitions proteins make fleeting bonds. *Cell*, 139:1049–1051, 2009.
- [23] M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby, and P. B. Arimondo. The triple helix: 50 years later, the outcome. *Nucleic Acids Res.*, 36:5123–5138, 2008.
- [24] A. Jain, G. Wang, and K. M. Vasquez. DNA triple helices: Biological consequences and therapeutic potential. *Biochimie*, 90:1117–1130, 2008.

- [25] K. Gehring, J.-L. Leroy, and M. Gueron. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine cytosine base pairs. *Nature*, 363:561–565, 1993.
- [26] P. Carmona, M. Molina, A. Lasagabaster, and R. Escobar. Determination of the hydrogen-bonded structure of CGG trimers in chloroform solution by vibrational spectroscopy. *Biospectroscopy*, 1:235–245, 1995.
- [27] H. Günzler and H.-U. Gremlich. *IR-Spektroskopie*. Wiley-VCH, 2003.
- [28] W. Demtröder. *Molekülphysik Theoretische Grundlagen und experimentelle Methoden*. Oldenbourg, 2003.
- [29] H. Haken and H. C. Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer, 2003.
- [30] A. Schäfer, C. Huber, and R. Ahlrichs. Fully optimized contracted gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. *J. Chem. Phys.*, 100:5829–2835, 1994.
- [31] R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, and C. Kölmel. Electronic structure calculations on workstation computers: The program system turbomole. *Chem. Phys. Lett.*, 162:165–169, 1989.
- [32] P. Hohenberg and W. Kohn. Inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev.*, 136:B864–B871, 1964.
- [33] C. Lee, W. Yang, and R. G. Parr. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 37(2):785–789, 1988.
- [34] M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz, J. H. Jensen, S. Koseki, M. S. Gordon, K. A. Nguyen, T. L. Windus, and S. T. Elbert. Berny optimization. *QCPE Bulletin*, 10:52–62, 1990.
- [35] 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. Petersson, 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. Knox, 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. Gonzalez, and J. A. Pople. Gaussian 03, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- [36] O. Treutler and R. Ahlrichs. Efficient molecular numerical integration schemes. *J. Chem. Phys.*, 102(1):346–354, 1995.
- [37] M. von Arnim and R. Ahlrichs. Performance of parallel turbomole for density functional calculations. *J. Comput. Chem.*, 19(15):1746–1757, 1998.
- [38] C. Huber, R. Ahlrichs, and A. Schäfer. Fully optimized contracted gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. *J. Chem. Phys.*, 100:5829–5835, 1994.
- [39] P. Deglmann, K. May, F. Furche, and R. Ahlrichs. *Chem. Phys. Lett.*, 384(1–3):103–107, 2004.
- [40] P. Deglmann, F. Furche, and R. Ahlrichs. *Chem. Phys. Lett.*, 362(5–6):511–518, 2002.
- [41] P. Deglmann and F. Furche. Efficient characterization of stationary points on potential energy surfaces. *J. Chem. Phys.*, 117(21):9535–9538, December 2002.
- [42] A. A. Michelson. On the application of interference-methods in spectroscopic measurements. *Phil. Mag. (Ser. 5)*, 31:338–346, 1891.
- [43] Thermo Electron Corporation. *OMNIC Series User's Guide Version 7.1*, 2004.
- [44] A. Vavra. *Gasphasen-Infrarotspektroskopie von schwer verdampfenden organischen Substanzen*. Master's thesis, Universität Düsseldorf, 2007.
- [45] D. Maydt. *Photochemie und Photophysik ausgewählter Modellverbindungen: Synthese und Charakterisierung*. PhD thesis, Universität Düsseldorf, 2009.
- [46] N. C. Craig and R. L. Sams. An investigation of the rotamers of butadiene by high-resolution infrared spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, 112:12637–12646, 2008.
- [47] G. F. Woods and L. H. Schwartzman. 1,3,5-Hexatriene. *J. Am. Chem. Soc.*, 70:3394–3396, 1948.

- [48] Jesse C. H. Hwa, Peter L. De Benneville, and Homer J. Sims. A new preparation of 1,3,5-hexatriene and the separation of its geometrical isomers. *J. Am. Chem. Soc.*, 82:2537–2540, 1960.
- [49] F. W. Langkilde, R. Wilbrandt, O. F. Nielsen, D. H. Christensen, and F. M. Nicolaisen. Vibrational spectra of 1,3,5-hexatriene and methylated derivatives. *Spectrochim. Acta*, 43A:1209–1230, 1987.
- [50] Y. N. Panchenko and G. R. De Maré. Vibrational analysis of buta-1,3-diene and its deuterio and ^{13}C derivatives and some of their rotational isomers. *J. Struct. Chem.*, 49:235–244, 2008.
- [51] V. Schettino, F. L. Gervasio, G. Cardini, and P. R. Salvi. Density functional calculation of structure and vibrational spectra of polyenes. *J. Chem. Phys.*, 110:3241, 1999.
- [52] Y. N. Panchenko, G. R. De Maré, R. Aroca, and C. W. Bock. *All-trans*- and *t,T,t,C,t,T,t*-deca-1,3,5,7,9-pentaenes: *Ab initio* structures, vibrational analyses, and some regularities in the series of related molecules. *Struct. Chem.*, 11:121–140, 2000.
- [53] F. W. Langkilde, B. Amstrup, R. Wilbrandt, and A. M. Brouwer. Vibrational spectra of 1,3,5-hexatriene and methylated derivatives-II. The coupling pattern for lateral methylation. *Spectrochim. Acta*, 45A:883–903, 1989.
- [54] P. D. Chowdary, T. J. Martinez, and M. Gruebele. The vibrational adiabatic torsional potential energy surface of *trans*-stilbene. *Chem. Phys. Lett.*, 440:7–11, 2007.
- [55] J. Catalán. On the non-planarity of *trans*-stilbene. *Chem. Phys. Lett.*, 421:134–137, 2006.
- [56] M. L. Freile, S. Risso, A. Curaqueo, M. A. Zamora, and R. D. Enritz. *Ab initio* conformational study of vinylogues. 2-Butene, stilbene and their conjugated polyenes. 731:107–114, 2005.
- [57] J. F. Arenas, I. L. Tocón, J. C. Otero, and J. I. Marcos. Vibrational spectra of *cis*-stilbene. *J. Mol. Struct.*, 349:29–32, 1995.
- [58] M. Trætteberg and E. B. Frantsen. A gas electron diffraction study of the molecular structure of *trans*-stilbene. *J. Mol. Struct.*, 26:57–68, 1975.

- [59] M. Trætteberg and E. B. Frantsen. A gas electron diffraction study of the molecular structure of *cis*-stilbene. *J. Mol. Struct.*, 26:69–76, 1975.
- [60] M. Jocelyn Cox and Fleming Crim. Vibrational energy flow rates for *cis*- and *trans*-stilbene isomers in solution. *J. Phys. Chem. A*, 109:11673–11678, 2005.
- [61] H. Okamoto. Picosecond infrared spectroscopy of electronically excited *trans*-stilbene in solution in the fingerprint region. *J. Phys. Chem. A*, 103:5852–5857, 1999.
- [62] Z. Meić, T. Šuste, G. Baranović, V. Semrečki, S. Holly, and G. Keresztury. Infrared and raman spectra of *cis*-stilbene and its deuterated isotopomers. *J. Mol. Spectrosc.*, 348:229–232, 1995.
- [63] G. Baranović, Z. Meić, H. Günten, J. Mink, and G. Keresztury. Intramolecular vibrational coupling in the ground electronic state (S_0) of *trans*-stilbene. *J. Phys. Chem.*, 94:2833–2843, 1990.
- [64] A. Bree and R. Zwarich. Vibrational spectra of *cis*-stilbene and 1,1-diphenylethene. *J. Mol. Struct.*, 75:213–224, 1981.
- [65] Z. Meić and H. Güsten. Vibrational studies of *trans*-stilbenes - 1. Infrared and raman spectra of *trans*-stilbene and deuterated *trans*-stilbenes. *Spectrochim. Acta*, 34A:101, 1978.
- [66] C. Pecile and B. Lunelli. Infrared spectra of *trans*-1,2-diphenylethylene and *trans*-1,2-diphenylethylene- d_{12} . *Can. J. Chem.*, 47:243, 1969.
- [67] M. Dehestani and R. Islampour. Effects of distortion-rotation of potential energy surfaces on absorption and resonance raman cross section of *trans*-stilbene molecule. *Int. J. Quant. Chem.*, 103:119–126, 2005.
- [68] K. Furuya, K. Kawato, and H. Yokoyama. Molecular distortion of *trans*-stilbene and the raman intensity of the in-plane and out-of-plane wag of the central CH=CH group. *J. Phys. Chem. A*, 107:8251–8258, 2003.
- [69] G. Baranović. Resonance raman spectra of deuterated *cis*-stilbene. *J. Raman Spectr.*, 32:293–299, 2001.
- [70] K. Tsumura, K. Furuya, A. Sakamoto, and M. Tasumi. Vibrational analysis of *trans*-stilbene in the excited singlet state by time-dependent density functional

- theory: calculations of the raman, infrared, and fluorescence excitation spectra. *J. Raman Spectr.*, 39:1584–1591, 2008.
- [71] Z. Meić, T. Hrenar, and R. Mitrić. Dependence of calculated vibrational dynamics in *trans*-stilbene on the choice of DFT functionals. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, 21:161–164, 2002.
- [72] H. Watanabe, Y. Okamoto, K. Furuya, A. Sakamoto, and M. Tasumi. Vibrational analysis of *trans*-stilbene in the ground and excited singlet electronic states revisited. *J. Phys. Chem. A*, 106:3318–3324, 2002.
- [73] G. Baranović, Z. Meić, and A. H. Maulitz. Vibrational analysis of stilbene and its isotopomers on the ground state potential energy surface. *Spectrochim. Acta Part A*, 54:1017–1039, 1998.
- [74] F. Negri and G. Orlandi. Infrared and Raman spectra of binuclear aromatic molecules: a density functional theory study. *J. Raman Spectr.*, 29:501–509, 1998.
- [75] C. H. Choi and M. Kertesz. Conformational information from vibrational spectra of styrene, *trans*-stilbene, and *cis*-stilbene. *J. Phys. Chem. A*, 101:3823–3831, 1997.
- [76] K. Palmö. Normal coordinate analysis of *trans*-stilbene and tolane. *Spectrochim. Acta Part A*, 44:341–353, 1988.
- [77] W. Fuß, C. Kosmidis, W. E. Schmid, and S. A. Trushin. The lifetime of the perpendicular minimum of *cis*-stilbene observed by dissociative intense-laser field ionization. *Chem. Phys. Lett.*, 385:423–430, 2004.
- [78] H. Hamaguchi and K. Iwata. Exchange model of vibrational dephasing in S_1 *trans*-stilbene in solution and its possible correlation with the isomerization reaction. *Chem. Phys. Lett.*, 208:465, 1993.
- [79] R. B. Gerber, G. M. Chaban, S. K. Gregurick, and B. Brauer. Vibrational spectroscopy and the development of new force fields for biological molecules. *Biopolymers*, 68(3):370–382, 2003.
- [80] R. B. Gerber, B. Brauer, S. K. Gregurick, and G. M. Chaban. Calculation of anharmonic vibrational spectroscopy of small biological molecules. *Phys. Chem. Comm.*, 5:142–150, 2002.

- [81] C. Plützer, I. Hünig, K. Kleinermanns, E. Nir, and M. S. de Vries. Pairing of isolated nucleobases: Double resonance laser spectroscopy of adenine-thymine. *Chem. Phys. Chem.*, 4:838–842, 2003.
- [82] R. Linder, K. Seefeld, A. Vavra, and K. Kleinermanns. Gas phase infrared spectra of nonaromatic amino acids. 453:1, 2008.
- [83] A. Vavra, R. Linder, and K. Kleinermanns. Gas phase infrared spectra of flavone and its derivatives. *Chem. Phys. Lett.*, 463:349–352, 2008.
- [84] R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, and C. Kölmel. Electronic structure calculations on workstation computers: The program system turbomole. *Chem. Phys. Lett.*, 162:165–169, 1989.
- [85] C. Huber A. Schäfer and R. Ahlrichs. Fully optimized contracted gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. *J. Chem. Phys.*, 100:5829–5835, 1994.
- [86] C. F. Chabalowski P. J. Stephens, F. J. Devlin and M. J. Frisch. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J. Phys. Chem.*, 98:11623–11627, 1994.
- [87] W. Yang C. Lee and 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.
- [88] M. Häser M. Ehrig H. Horn, H. Weiss and R. Ahlrichs. Prescreening of two electron integral derivatives in scf gradient and hessian calculations. *J. Comput. Chem.*, 12:1058–1064, 1991.
- [89] F. Furche P. Deglmann and R. Ahlrichs. An efficient implementation of second analytical derivatives for density functional methods. 362:511–518, 2002.
- [90] J. F. Arenas, I. L. Tocón, J. C. Otero, and J. I. Marcos. *A Priori* scaled quantum mechanical vibrational spectra of *trans*- and *cis*-stilbene. *J. Phys. Chem.*, 99:11392–11398, 1995.
- [91] B. K. V. Hansen, S. Møller, and J. Spanget-Larsen. The vibrational structure of (*E,E'*)-1,4-diphenyl-1,3-butadiene linear dichroism FT-IR spectroscopy and quantum chemical calculations. *Spectrochim. Acta Part A*, 65:770–778, 2006.

- [92] K. Lunde and L. Zechmeister. A study of the infrared spectra of some stereoisomeric diphenylpolyenes. *Acta Chem. Scand.*, 8:1421–1432, 1954.
- [93] N. C. Craig, P. Groner, and D. C. McKean. Equilibrium structures for butadiene and ethylene: Compelling evidence for π -electron delocalization in butadiene. *J. Phys. Chem. A*, 110:7461–7469, 2006.
- [94] R. D. Suenram, B. H. Pate, A. Lesarri, J. L. Neill, S. Shipman, R. A. Holmes, M. C. Leyden, and N. C. Craig. Semiempirical equilibrium structure for the C₆ backbone of *cis*-1,3,5-hexatriene; structural evidence for greater π -electron delocalization with increasing chain length in polyenes. *J. Phys. Chem. A*, 113:1864–1868, 2009.
- [95] W. L. Meerts and M. Schmitt. Application of genetic algorithms in automated assignments of high-resolution spectra. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 25:353–406, 2006.
- [96] Y. Lee, B. Kim, M. Schmitt, and K. Kleinermanns. Observation of ultraviolet rotational band contours of the dna base adenine: Determination of the transition moment. *J. Phys. Chem. A*, 110:11819–11823, 2006.
- [97] R. C. Lord, A. L. Marston, and Foil A. Miller. Infra-red and raman spectra of the diazines. *Spectrochim. Acta*, 9:113–125, 1957.
- [98] S. Califano, G. Adembri, and G. Sbrana. Vapour and crystal spectra in polarized light of pyrazine-d₀, *cis* pyrazine-d₂, and pyrazine-d₄. *Spectrochim. Acta*, 20:385–396, 1964.
- [99] F. Billes, H. Mikosch, and Sandor Holly. A comparative study on the vibrational spectroscopy of pyradizine, pyrimidine and pyrazine. 423:225–234, 1998.
- [100] S. Breda, I. D. Reva, L. Lapinski, M. J. Nowak, and R. Fausto. Infrared spectra of pyrazine, pyrimidine and pyridazine in solid argon. *J. Mol. Struct.*, 786:193–206, 2006.
- [101] J. Zarembowitch and L. Bokobza-Sebagh. Apport de la coordination des heterocycles a la connaissance de leurs spectres i.r. et raman i. spectres de la pyrazine. *Spectrochim. Acta*, A 32:605–615, 1976.
- [102] A. Daniel Boese and Jan M. L. Martin. Vibrational spectra of the azabenzenes revisited: Anharmonic force fields. *J. Phys. Chem. A*, 108:3085–3096, 2004.

- [103] K. V. Berezin, V. V. Nechaev, and P. M. El'kin. Anharmonic resonances in the vibrational spectra of pyrazine. *J. Appl. Spectros.*, 72:9–19, 2005.
- [104] V. Barone. Anharmonic vibrational properties by a fully automated second-order perturbative approach. *J. Chem. Phys.*, 122:014108–1–014108–10, 2005.
- [105] J. A. Hageman, R. Wehrens, R. de Gelder, W. Leo Meerts, and L. M. C. Buydens. Direct determination of molecular constants from rovibronic spectra with genetic algorithms. *J. Chem. Phys.*, 113:7955–7962, 2000.
- [106] W. Leo Meerts, M. Schmitt, and G. Groenenboom. New applications of the genetic algorithm for the interpretation of high resolution spectra. *Can. J. Chem.*, 82:804–819, 2004.
- [107] J. H. Holland. *Adaption in Natural and Artificial Systems*. MI: The University of Michigan Press, Ann-Arbor, 1975.
- [108] D. E. Goldberg. *Genetic Algorithms in search, optimisation and machine learning*. Addison-Wesley, Reading Massachusetts, 1989.
- [109] I. Rechenberg. *Evolutionstrategie - Optimierung technischer Systeme nach Prinzipien der biologischen Evolution*. Frommann-Holzboog, Stuttgart, 1973.
- [110] A. Ostermeier, A. Gawelczyk, and N. Hansen. Step-size adaptation based on non-local use of selection information. In Y. Davidor, H.-P. Schwefel, and R. Männer, editors, *Parallel Problem Solving from Nature, PPSN III*. Springer, Berlin/Heidelberg, 1994.
- [111] N. Hansen and A. Ostermeier. Completely derandomized self-adaptation in evolution strategies. *Evol. Comput.*, 9(2):159–195, 2001.
- [112] N. Hansen and S. Kern. Evaluating the CMA evolution strategy on multimodal test functions. In X. Yao et al., editors, *Parallel Problem Solving from Nature PPSN VIII*, volume 3242 of *LNCS*, pages 282–291. Springer, Berlin/Heidelberg, 2004.
- [113] H. C. Allen and P. C. Cross. *Molecular Vib-Rotors*. Wiley, New York, 1963.
- [114] J. K. G. Watson. Determination of centrifugal distortion coefficients of asymmetric top molecules. *J. Chem. Phys.*, 46:1935–1945, 1967.

- [115] J. K. G. Watson. Determination of centrifugal distortion coefficients of asymmetric-top molecules. III. Sextic coefficients. *J. Chem. Phys.*, 48:4517–4525, 1968.
- [116] K. B. Hewett, M. Shen, C. L. Brummel, and L. A. Philips. High resolution infrared spectroscopy of pyrazine and naphthalene in a molecular beam. *J. Chem. Phys.*, 100:4077–4086, 1994.
- [117] E. B. Wilson. The normal modes and frequencies of vibration of the regular plane hexagon model of the benzene molecule. *Phys. Rev.*, 45:706–714, 1934.
- [118] R. S. Mulliken. Report on notation for the spectra of polyatomic molecules. *J. Chem. Phys.*, 23:1997–2011, 1955.
- [119] R. M. Hamlin Jr., R.C. Lord, and A. Rich. Hydrogen-bonded dimers of adenine and uracil derivatives. *Science*, 148:1734–1737, 1965.
- [120] Y. Kyogoku, R. C. Lord, and A. Rich. Hydrogen bonding specificity of nucleic acid purines and pyrimidines in solution. *Science*, 154:3748:518–520, 1966.
- [121] Y. Kyogoku, R. C. Lord, and A. Rich. An infrared study of hydrogen bonding between adenine and uracil derivatives in chloroform solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 89:496–503, 1967.
- [122] H. M. Sobell and J. H. Miller. Infrared demonstration of hydrogen bonding between purine and pyrimidine base analogues in solution. *J. Mol.Biol.*, 24:345–350, 1967.
- [123] G. M. Nagel and Sue Hanlon. Higher order associations of adenine and uracil by hydrogen bonding. I. Self-association of 9-ethyladenine and 1-cyclohexyluracil. *Biochemistry*, 11(5):816–823, 1972.
- [124] G. M. Nagel and Sue Hanlon. Higher order associations of adenine and uracil by hydrogen bonding. II. Formation of complexes in mixed solutions of 9-ethyladenine and 1-cyclohexyluracil. *Biochemistry*, 11(5):823–830, 1972.
- [125] H. Iwahashi, H. Sugeta, and Y. Kyogoku. Detection of separated amino proton resonance signals of adenine derivatives at low temperature and its application to estimation of population of the adenine-uracil dimers in solution. *Biochemistry*, 21:631–638, 1982.

- [126] M. Mathlouthi, A.-M. Seuvre, and J.L. Koenig. F.t.-i.r. and laser-raman spectra of adenine and adenosine. *Carbohydrate Research*, 131:1–15, 1984.
- [127] M. J. Nowak, L. Lapinski, J. S. Kwiatkowski, and J. Leszczynski. Molecular structure and infrared spectra of adenine. Experimental matrix isolation and density functional theory study of adenine ^{15}N isotopomers. *J. Phys. Chem.*, 100:3527–3534, 1996.
- [128] D. Maydt K. Schaper L. Biemann, T. Häber and K. Kleinermanns. Structural assignment of adenine aggregates in CDCl_3 . *J. Chem. Phys.*, 128:195103/1–195103/8, 2008.
- [129] H. Oehm M. Häser K. Eichkorn, O. Treutler and R. Ahlrichs. Auxiliary basis sets to approximate coulomb potentials. *Chem. Phys. Lett.*, 240:283–298, 1995.
- [130] O. Treutler K. Eichkorn, F. Weigend and R. Ahlrichs. Auxiliary basis sets for main row atoms and transition metals and their use to approximate coulomb potentials. *Theor. Chem. Accounts Theor. Comput. Model. Theor. Chim. Acta*, 97:119–124, 1997.
- [131] A. Klamt and G. Schüürmann. Cosmo: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2:799–805, 1993.
- [132] David R. Lide, editor. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press LLC, 78th edition, 1997–1998.
- [133] A. Klamt. Calculation of UV/Vis spectra in solution. *J. Phys. Chem.*, 100:3349–3353, 1996.
- [134] M. A. Suhm T. N. Wassermann, C. A. Rice and D. Luckhaus. Hydrogen bonding lights up overtones in pyrazoles. *J. Chem. Phys.*, 127:234309/1–234309/9, 2007.
- [135] M. C. Chen and R. C. Lord. Re-investigation of specific hydrogen bonding of certain adenine and uracil derivatives by infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 340:90–94, 1974.
- [136] C.. Plützer, I. Hünig, K. Kleinermanns, E. Nir, and M. S. de Vries. Pairing of isolated nucleobases: Double resonance laser spectroscopy of adenine–thymine. *Chem. Phys. Chem.*, 4(8):838–842, 2003.

- [137] C. Plützer, I. Hünig, and K. Kleineremanns. Pairing of the nucleobase adenine studied by IR-UV double-resonance spectroscopy and *ab initio* calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5:1158–1163, 2003.
- [138] A. Abo-Riziq, L. Grace, E. Nir, M. Kabelac, P. Hobza, and M. S. de Vries. Photochemical selectivity in guanine-cytosine base-pair structures. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 102(1):20–23, 2005.
- [139] K. Seefeld, R. Brause, T. Häber, and K. Kleineremanns. Imino tautomers of gas-phase guanine from mid-infrared laser spectroscopy. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 111:6217–6221, 2007.
- [140] V. Nair and S. G. Richardson. Utility of purinyl radicals in the synthesis of base-modified nucleosides and alkylpurines: 6-amino group replacement by H, Cl, Br, and I. *J. Am. Chem. Soc.*, 102:3969–3972, 1980.
- [141] Y. Maki, K. Kameyama, M. Suzuki, M. Sako, and K. Hirota. The effect of protecting groups of the nucleobase and the sugar moieties on the acidic hydrolysis of the glycosidic bond of 2'-deoxyadenosine: A kinetic and ^{15}N NMR spectroscopic study. *J. Chem. Res. Miniprint*, 12:3601–3654, 1984.
- [142] E. R. Malinowski. Determination of the number of factors and the experimental error in a data matrix. *Anal. Chem.*, 49(4):612–617, 1977.
- [143] E. R. Malinowski. Statistical *f*-tests for abstract factor analysis and target testing. *J. Chemometr.*, 3:49–60, 1988.
- [144] J. T. Davis. G-quartets 40 years later: From 5 ϵ -gmp to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 43:668–698, 2004.
- [145] J. L. Sessler, C. M. Lawrence, and J. Jayawickramarajah. Molecular recognition via base-pairing. *Chem. Soc. Rev.*, 36:314–325, 2007.
- [146] E. Nir, I. Hünig, K. Kleineremanns, and M. S. de Vries. The nucleobase cytosine and the cytosine dimer investigated by double resonance laser spectroscopy and *ab initio* calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5:4780–4785, 2003.
- [147] M. Dey, F. Moritz, J. Grotemeyer, and E. W. Schlag. Base pair formation of free nucleobases and mononucleosides in the gas phase. *J. Am. Chem. Soc.*, 116:9211–9215, 1994.

- [148] E. Nir, Ch. Plützer, K. Kleinermanns, and M. de Vries. Properties of isolated dna bases, base pairs and nucleosides examined by laser spectroscopy. *Eur. Phys. J. D*, 20:317–329, 2002.
- [149] M. Tsuboi, Y. Kyogoku, and T. Shimanouchi. Infrared absorption spectra of protonated and deprotonated nucleosides. *Biochim Biophys Acta*, 55:1–12, 1962.
- [150] A. A. Maevsky and B. I. Sukhorukov. Ir study of base stacking interactions. *Nucleic Acids Res.*, 8:3029–3042, 1980.
- [151] K. Kulinska, J. Sarzynska, and M. Wiewiorowski. Differences in the association abilities in aqueous solutions of cytidine, 2 β -deoxycytidine and their phosphate salts studied by fourier transform infrared spectroscopy. *Vib. Spectros.*, 1:277–286, 1991.
- [152] W. Krzyzosiak, M. Jaskolski, H. Sierzputowska-Gracz, and M. Wiewiorowski. Comparative structural analysis of cytidine, ethenocytidine and their protonated salts. ii. ir spectral studies. *Nucleic Acids Res.*, 10:2741–2753, 1982.
- [153] M. Mathouthi, A. M. Seuvre, and J. L. Koenig. F.T.-I.R. and laser-raman spectra of cytosine and cytidine. *Carbohydr. Res.*, 146:1–13, 1986.
- [154] N. Leulliot, M. Ghomi, H. Jobic, Ot. Bouloussa, V. Baumruk, and C. Coulombeau. Ground state properties of the nucleic acid constituents studied by density functional calculations. 2. Comparison between calculated and experimental vibrational spectra of uridine and cytidine. *J. Phys. Chem. B*, 103:10934–10944, 1999.
- [155] S. A. Lee, J. Li, A. Anderson, W. Smith, R. H. Griffey, and V. Mohan. Temperature-dependent raman and infrared spectra of nucleosides. II-Cytidine. *J. Raman Spectr.*, 32:795–802, 2001.
- [156] J. Li, S.A. Lee, A. Anderson, L. Lettress, R. H. Griffey, and V. Mohan. Temperature-dependent raman and infrared spectra of nucleosides. III-Deoxycytidine. *J. Raman Spectr.*, 34:183–191, 2003.
- [157] M. Rozenberg, C. Jung, and G. Shoham. Ordered and disordered hydrogen bonds in adenosine, cytidine and uridine studied by low temperature ft infrared spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5:1533–1535, 2003.

- [158] M. Rozenberg, C. Jung, and G. Shoham. Low temperature FTIR spectra and hydrogen bonds in polycrystalline cytidine. *Spectrochim. Acta Part A*, 60:2369–2375, 2004.
- [159] P. K. Sahu, R. K. Mishra, and S.-L. Lee. A density functional theory study for the hydrogen-bonded nucleic acid base pair: Cytosine dimer. *J. Phys. Chem. A*, 109:2887–2893, 2005.
- [160] D. W. Young and H. R. Wilson. The crystal and molecular structure of 2'-deoxycytidine. *Acta Cryst.*, B31:961–965, 1975.
- [161] Y. Kyogoku, R. C. Lord, and A. Rich. Hydrogen bonding specificity of nucleic acid purines and pyrimidines in solution. *Science*, 154:518–520, 1966.
- [162] M. Eigen. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*, 58:465–523, 1971.
- [163] P. Carmona, M. Molina, and A. Lasagabaster. Vibrational analysis of the hydrogen bonding of cytidine and guanosine derivatives. *J. Phys. Chem.*, 97:9519–9524, 1993.
- [164] N. K. Schwalb, T. Michalak, and F. Temps. Ultrashort fluorescence lifetimes of hydrogen-bonded base pairs of guanosine and cytidine in solution. *J. Phys. Chem. B*, 113:16365–16376, 2009.
- [165] N. K. Schwalb and F. Temps. On the structure and excited electronic state lifetimes of cytidine self-assemblies with extended hydrogen-bonding networks. *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 208:164–170, 2009.
- [166] L. Biemann, T. Häber, and K. Kleinermanns. Fourier transform infrared spectroscopy of 1-cyclohexyluracil aggregates in cdcl_3 solutions. *J. Chem. Phys.*, 130:125102, 2009.
- [167] K. K. Ogilvie. The *tert*-butyldimethylsilyl group as a protecting group in deoxynucleosides. *Can. J. Chem.*, 51:3799–3801, 1973.
- [168] H. Oehm M. Häser K. Eichkorn, O. Treutler and R. Ahlrichs. Auxiliary basis sets to approximate coulomb potentials. *Chem. Phys. Lett.*, 242:652–660, 1995.
- [169] I. M. Klotz and J. S. Franzen. Hydrogen bonds between model peptide groups in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 84:3461–3466, 1962.

- [170] Steven T. Shipman, Pamela C. Douglas, Hyun S. Yoo, Charlotte E. Hinkle, Ellen L. Mierzejewski, and Brooks H. Pate. Vibrational dynamics of carboxylic acid dimers in gas and dilute solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9:4572–4586, 2007.
- [171] C. Emmeluth, M. A. Suhm, and D. Luckhaus. A monomers-in-dimers model for carboxylic acid dimers. *J. Chem. Phys.*, 118:2242–2255, 2003.
- [172] J. Dreyer. Hydrogen-bonded acetic acid dimers: Anharmonic coupling and linear infrared spectra studied with density-functional theory. *J. Chem. Phys.*, 122:184306/1–184306/10, 2005.
- [173] P. Blaise, M. J. Wojcik, and O. Henri-Rousseau. Theoretical interpretation of the line shape of the gaseous acetic acid cyclic dimer. *J. Chem. Phys.*, 122:064306/1–064306/12, 2005.
- [174] G. M. Florio, T. S. Zwier, E. M. Myshakin, K. D. Jordan, and E. L. Sibert III. Theoretical modeling of the OH stretch infrared spectrum of carboxylic acid dimers based on first-principles anharmonic couplings. *J. Chem. Phys.*, 118:1735–1746, 2003.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Lars Biemann