

NMR-Spektroskopie: Wo sind die Grenzen der Nachweisempfindlichkeit?

Hans Wolfgang Spiess*

Empfindlichkeitssteigerung · Mikroskopie ·
Mikrospulen · NMR-Spektroskopie

Die magnetische Kernresonanz(NMR)-Spektroskopie ist in der Physik, Chemie, Biologie und Medizin unverzichtbar. Ihr Einsatz geht weit über Routineanwendungen in der chemischen Analytik hinaus und liefert z.B. die Struktur von Biomakromolekülen in Lösung^[1] oder die Struktur und Dynamik von Polymeren und supramolekularen Systemen, die nicht kristallin im traditionellen Sinne sind.^[2] Hochfeld-NMR-Spektroskopie ist heute bis zu einer ¹H-NMR-Frequenz von 2.4 GHz möglich.^[3] Ungeachtet des enormen Erfolgs der NMR-Spektroskopie, der vor allem auf ihrer sonst unerreichten Selektivität in Bezug auf die chemische Struktur beruht, wird ihre Anwendung noch immer durch ihre niedrige Nachweisempfindlichkeit eingeschränkt. Dagegen ist die Detektion von Einzelmolekülen in der Rastermikroskopie^[4] und in der Optik bereits etabliert, wo Signale einzelner Elektronenspins und deren Kopplung mit einzelnen Kernspins beobachtet werden können.^[5] Will man den steigenden Anforderungen an die Miniaturisierung gerecht werden, muss man die Nachweisempfindlichkeit der NMR-Spektroskopie deutlich erhöhen. In jüngster Zeit wurde nun über eine Reihe von Ansätzen zur Steigerung der Empfindlichkeit berichtet, die hier vorgestellt werden sollen. Dabei handelt es sich sowohl um grundlegend neue Detektionsverfahren als auch um wichtige Weiterentwicklungen bereits etablierter Methoden. Angesichts der breiten Einsatzbereiche der NMR-Spektroskopie ist es klar, dass das Problem der Nachweisempfindlichkeit nicht mit einer einzigen Technik gelöst werden kann; daher beschreibt dieses Highlight mehrere der neuen Ansätze in ihrem jeweiligen Zusammenhang.

Eine bereits weit fortgeschrittene Methode erhöht die Kernspinpolarisation durch laserpolarisierte Edelgase, wobei diese Gase auch selbst als NMR-Sonden eingesetzt werden können, z.B. bei der magnetischen Resonanztomographie (MRT) der Lunge.^[6] Um die Selektivität der Polarisation in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie in Flüssigkeiten, aber auch bei der MRT zu steigern, wurden Konzepte der supramolekularen Chemie genutzt, um Dendrimerkapseln als

Biosensoren für hyperpolarisiertes ¹²⁹Xe zu konstruieren.^[7] Lange unbeantwortet blieb jedoch die Frage, wie sich ¹²⁹Xe in kontrollierter Weise in Wasser lösen ließe. Zu diesem Zweck wurde kürzlich ein Membransystem für kontinuierlichen Fluss entwickelt,^[8] das die Anwendung dieser Methode bei der NMR-Spektroskopie von Biomolekülen in Lösung wesentlich erleichtern sollte.

Die Nachweisempfindlichkeit der NMR-Spektroskopie lässt sich auch durch Übertragung der hohen Polarisation von Elektronenspins auf Kernspins steigern (dynamic nuclear polarization, DNP). Nach langer Entwicklungszeit werden heute Steigerungsfaktoren von etwa 150 erreicht und ermöglichen so den Vergleich der Packung von Prionproteinen in Amyloidfasern und Nanokristallen desselben Materials durch Festkörper-NMR-Spektroskopie.^[9]

Ein anderer Ansatz zur Miniaturisierung nutzt die Blattfeder eines Kraftmikroskops zur mechanischen Detektion der magnetischen Resonanz (magnetic resonance force microscopy, MRFM). So wurden kürzlich Signale in einem Volumen von nur 650 Zeptolitern detektiert,^[10] 60 000-mal kleiner als das bisher kleinste Volumen für die magnetische Kernresonanzmikroskopie. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau und die mit Mikrotechnik erzeugten MRFM-Komponenten. Die erreichte Nachweisempfindlichkeit entspricht einer Ortsauflösung von etwa 100 nm und zeigt, dass die bildgebende NMR-Spektroskopie die Nanometerskala erreichen kann.

Besonders vielversprechend sind Ansätze, die etablierte Techniken nutzen und insbesondere den Einsatz der in kommerziellen NMR-Spektrometern verfügbaren, leistungsfähigen Pulssequenzen zulassen, die in allen Gebieten der NMR-Spektroskopie verwendet werden. Die Entwicklung neuer Probenköpfe kann hier die Nachweisempfindlichkeit drastisch steigern. In „konventionellen“ NMR-Spektrometern wird das NMR-Signal durch Hochfrequenzspulen detektiert. Deren Empfindlichkeit kann durch Miniaturisierung und Kühlung erheblich gesteigert werden (Mikro- und Kryoprobenköpfe). Der Hochfrequenzfluss, den die präzisionsierenden Kernspins erzeugen, kann aber auch mit anderen Mitteln detektiert werden. So wurde kürzlich ein Mikroschlitz-Wellenleiter (Abbildung 2) für NMR-spektroskopische Anwendungen entwickelt, dessen Induktionselement in weiten Größenbereichen, von Zentimetern bis Nanometern, produziert werden kann. Dies ermöglicht die Untersuchung von Biomolekülen im Nano- bis Pikomolbereich.^[11] Tatsäch-

[*] Prof. Dr. H. W. Spiess

Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)
Fax: (+ 49) 6131-379-320
E-Mail: spiess@mpip-mainz.mpg.de
Homepage:
<http://www.mpip-mainz.mpg.de/groups/spiess/Director>

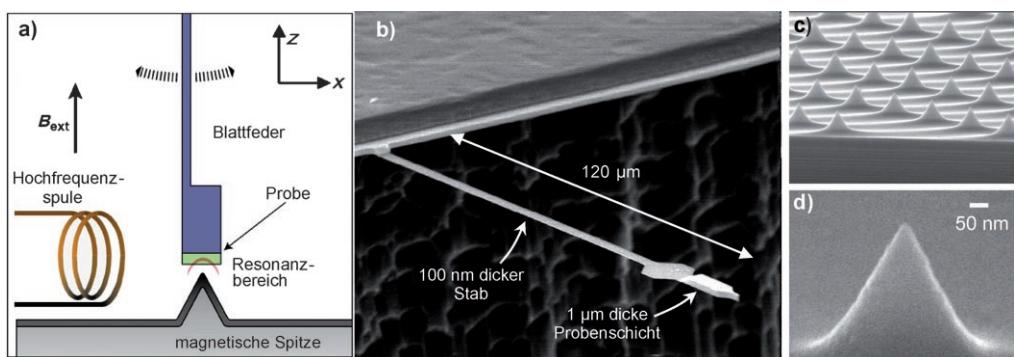


Abbildung 1. Schema und Komponenten eines MRFM-Experiments. a) Eine Blattfeder mit einem dünnen Probenfilm am Ende wird senkrecht zu einem Substrat ausgerichtet, das eine konische magnetische Spalte trägt. Kerne innerhalb des Resonanzbereichs in der Nähe der Spalte können magnetische Resonanz zeigen. b) Einkristalline Siliciumblattfeder, wie sie im Experiment verwendet wird. c) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Anordnung von geätzten Siliciumspitzen, die zur Herstellung magnetischer Spalten verwendet wurden. d) Einzelne magnetische Spalte. Wiedergabe von Lit. [10].

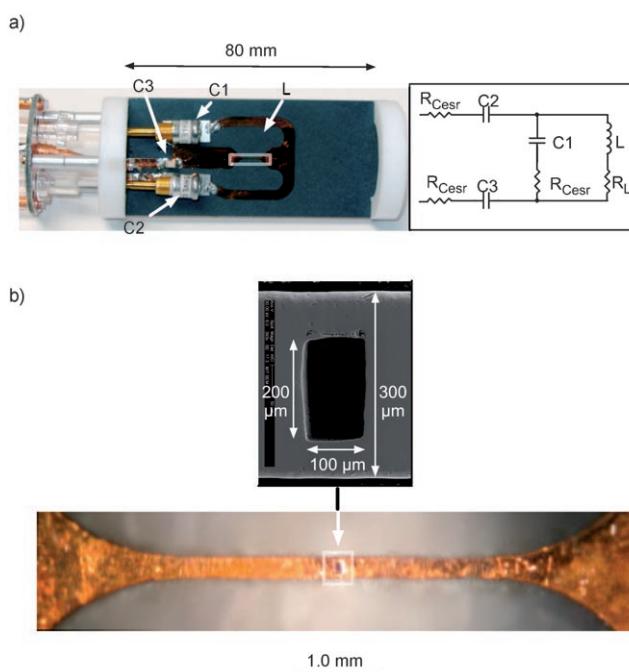


Abbildung 2. Mikroschlitz-Wellenleiter zum Nachweis von NMR-Signalen. a) Probenkopf ohne Mantel. Der Probenkreis befindet sich auf einem planaren Substrat. Der Detektionsbereich ist durch ein Rechteck gekennzeichnet, das Schaltbild ist rechts davon dargestellt. C: Kondensator, L: Induktivität, R: Widerstand. b) Mikroschlitz, hergestellt mit einem 248-nm-Excimerlaser, unmittelbar nach der Herstellung. Wiedergabe von Lit. [11].

lich wurden mit einem solchen Probenkopf zweidimensionale NMR-Spektren von 1.57 nmol Ribonuclease A mit einer 3300-mal geringeren Substanzmenge aufgenommen als in einem konventionellen 5-mm-NMR-Probenkopf. Über solche Anwendungen hinaus kann diese integrierte Bauweise in Zukunft in parallelen Anordnungen mit Mikrofluidik kombiniert werden und in kombinatorischen Verfahren und in „lab-on-a-chip“-Einheiten eingesetzt werden, z.B. in der Metabolomik. Ein verwandter, vielversprechender Ansatz beruht auf miniaturisierten Streifenleitungen,^[12] die mit li-

thographischen Methoden leicht herzustellen sind und zu kostengünstigen „Wegwerfkomponenten“ weiterentwickelt werden können.

In der Festkörper-NMR-Spektroskopie ist die spektrale Auflösung wegen winkelabhängiger Kopplungen wie Dipol-Dipol-Kopplung, anisotroper chemischer Verschiebung oder Quadrupol-Kopplung gering.^[13] Dies macht zusätzliche Konzepte für die Aufnahme hochauflöster NMR-Spektren erforderlich. Die meisten davon nutzen Rotation am magischen Winkel von 54.7° (MAS-NMR-Spektroskopie)^[14] in Kombination mit Hochleistungsentkopplung. Dabei werden heute Rotationsfrequenzen von 70 kHz erreicht.^[15] Wie bei der NMR-Spektroskopie an Flüssigkeiten werden Kryoprobenköpfe entwickelt, um die Nachweisempfindlichkeit zu steigern. In Kombination mit Doppelquantenspektroskopie liefert die MAS-Festkörper-NMR-Spektroskopie einzigartige Informationen über Struktur und Dynamik in supramolekularen Systemen, indem sie Wasserstoffbrücken, π - π -Wechselwirkungen, Formtreue und die Anbindung an Oberflächen in Proben ohne Isotopenmarkierung abfragt.^[2] In der Biophysik wurde MAS-NMR-Spektroskopie kürzlich zum Studium der Sekundärstruktur, der Dynamik und der Membranopologenie eines Rezeptors mit sieben Helices in seiner natürlichen Membranumgebung eingesetzt.^[16] Dazu wurde die Probe gleichförmig mit ^{13}C - und ^{15}N -Atomen markiert. In beiden Bereichen ist der Einsatz der NMR-Spektroskopie oft durch das verfügbare Material limitiert. Diese Limitierung bezieht sich nicht nur auf die insgesamt verfügbare Probenmenge, sondern häufig auch auf den vorhandenen Anteil an Material mit einer definierten Packung, z.B. fibrilläre Proteine wie Seide und Amyloid-Proteine oder auch selbstorganisierte biomimetische Materialien.

Hier bietet der Einsatz von Mikrospulen einen einfachen, aber vielversprechenden Ansatz.^[17] Diese machen Festkörper-NMR-Spektroskopie an Nanoliterproben möglich. Darauf hinaus sind die Hochfrequenzfelder in solchen Mikrospulen wesentlich stärker als in herkömmlichen Spulen und ermöglichen so eine erheblich effizientere Anregung und Entkopplung, die für viele Festkörper-NMR-spektroskopische Anwendungen entscheidend sind. Einen Submillime-

terotor zur Rotation im kHz-Bereich zu bringen, ist allerdings ausgesprochen schwierig. Abbildung 3 zeigt einen wesentlich einfacheren Weg: Der Mikrorotor wird von einem

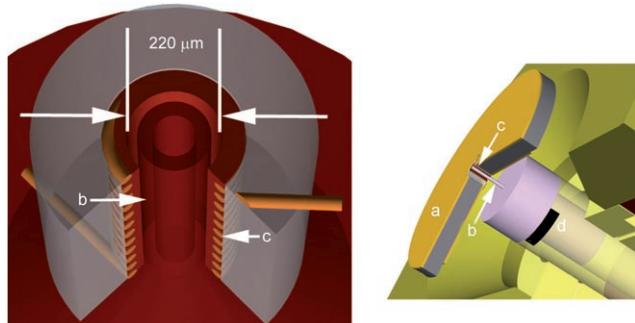


Abbildung 3. Rechts: Mikro-MAS-NMR-Probenkreis mit Kondensator (a) und Mikrospule (c) sowie Rotor (b), Huckepack auf einem 4-mm-MAS-Stator. Links: Ausschnitt mit Rotor (b) und Mikrospule (c). Wiedergabe von Lit. [17].

konventionellen Rotor quasi „Huckepack“ mitgedreht. Auf diese Weise können konventionelle Statoren eingesetzt werden, und der größere 4-mm-Rotor garantiert stabile Rotation auch für die Mikroprobe. Der Mikrorotor kann einen Außen- und Innendurchmesser von bis hinunter zu 170 bzw. 125 μm haben, was einem Probenvolumen von 10 Nanolitern entspricht. Der Mikrorotor und die ihn umgebende Mikrospule müssen exakt ausgerichtet werden. Mit einem konventionellen 4-mm-Rotor wurden jedoch bereits Rotationsfrequenzen bis 15 kHz erreicht. Das große Potenzial dieses Ansatzes wurde an gleichförmig isotopenmarkierten Polypeptiden in antiparallelen β -Faltblattstrukturen sowie an ausgerichteten Seidenfäden demonstriert.^[17]

Es ist zu erwarten, dass Mikrospulen in der Festkörper-NMR-Spektroskopie in Biophysik und Materialforschung, wo häufig nur kleine Probenmengen vorhanden sind, vielzählige Anwendungen finden werden. Diese Methode eignet sich allerdings nicht für hochgiftige oder radioaktive Proben, die in dickwandigen Behältern eingeschlossen sein müssen. Für solche Fälle wurde kürzlich ein neues Detektionsverfahren entwickelt, das auch an konventionellen NMR-Spektrometern einsetzbar ist.^[18] Es nutzt die induktive Kopplung zwischen einer konventionellen statischen großen Spule und einer mit der Probe rotierenden Mikrospule (Abbildung 4). Auf diese Weise wird eine drahtlose Übertragung der Hochfrequenzpulse und des NMR-Signals erreicht. Wie bei den Mikrospulen werden auch hier nicht nur Empfindlichkeiten im Nanoliterbereich erzielt, sondern auch starke Hochfrequenzfelder, die eine Hochleistungsentkopplung erleichtern.

Diese beiden MAS-NMR-Techniken stehen zwar noch am Anfang, lassen aber sehr informative Spektren von Nanoliter- oder sogar Pikoliterfeststoffproben erwarten. Beide profitieren von der Tatsache, dass Mikrotechnik die stabile Rotation und Verstärkung der Hochfrequenzfelder und damit eine höhere Nachweisempfindlichkeit und bessere Entkopplung ermöglicht. Darüber hinaus wird MAS-Spektroskopie

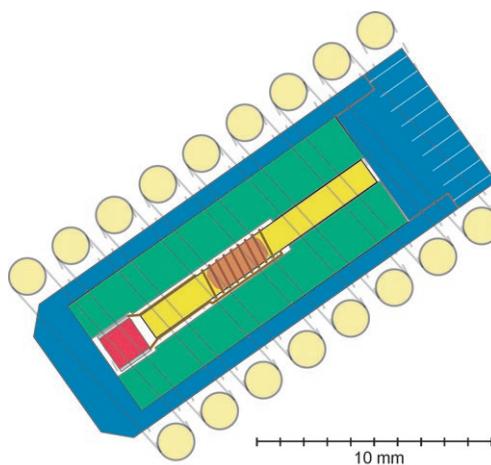


Abbildung 4. Magischer-Winkel-Spule für hochempfindliche Signaldetektion durch induktive Kopplung einer Spule, die mit der Probe rotiert. Die Probe befindet sich innerhalb einer abgestimmten Mikrospule in einer Glaskapillare (dunkelgelb). Ein zylindrischer keramischer Einsatz (grün) dient zur Fixierung der Kapillare und des Abstimmkondensators (rot) während der Rotation. Wiedergabe von Lit. [18].

mit vergleichsweise niedrigen Rotationsfrequenzen in hochmobilen Proben wie Gelen oder biologischem Gewebe zur Eliminierung anisotroper Restkopplungen und Suszeptibilitätsverbreiterung der NMR-Peaks eingesetzt. In Mikrospulen sind die Zentrifugalkräfte anders als in konventionellen Rotoren wegen der niedrigen Kapillardurchmesser minimal. Die hohe Nachweisempfindlichkeit der neuen Techniken eröffnet die Möglichkeit, das Volumen von Biopsieproben drastisch zu reduzieren. Sogar MAS-NMR-Spektroskopie an einzelnen Zellen sollte möglich werden. Auch metabolomische Studien an eingefrorenen Systemen sind denkbar, denn Einfrieren minimiert den Probenabbau und macht Extraktion und Homogenisierung überflüssig. Diese Verfahren können mit Kryotechnik kombiniert werden, was die Nachweisempfindlichkeit noch einmal steigert. Nicht zuletzt können die starken Hochfrequenzfelder im MHz-Bereich den Anwendungsbereich der Festkörper-NMR-Spektroskopie drastisch verändern. Man denke etwa an verbesserte Entkopplung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung, an die Anregung von Kernen in paramagnetischen Systemen oder an die NMR-Spektroskopie quadrupolarer Kerne wie ^{14}N .

In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit der NMR-Spektroskopie in Gasen, Flüssigkeiten und Festkörpern entwickelt. Einige basieren auf völlig neuen Detektionstechniken (Abbildung 1), andere steigern die Anregung der Kerne und die Nachweisempfindlichkeit in konventionellen NMR-Spektrometern (Abbildungen 2–4). Solche Entwicklungen, die bei Weitem noch nicht abgeschlossen sind, bilden die Grundlage dafür, dass die NMR-Spektroskopie auch in Zukunft eine unverzichtbare Methode in vielen Gebieten der Wissenschaft bleiben wird, nicht zuletzt in der Chemie.

Online veröffentlicht am 28. November 2007

-
- [1] K. Wüthrich, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3462–3486; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3340–3363.
 - [2] H. W. Spiess, *J. Polym. Sci. Part A* **2004**, *42*, 5031–5044.
 - [3] M. B. Kozlov, J. Haase, C. Baumann, A. G. Webb, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2005**, *28*, 64–76.
 - [4] H.-J. Butt, R. Berger, E. Bonaccorso, Y. Chen, J. Wang, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *133*, 91–104.
 - [5] L. Childress, M. V. G. Dutt, J. M. Taylor, A. S. Zibrov, F. Jelezko, J. Wrachtrup, P. R. Hemmer, M. D. Lukin, *Science* **2006**, *314*, 281–285.
 - [6] R. H. Acosta, P. Blümller, L. Agulles-Pedros, A. E. Morbach, J. Schmiedeskamp, A. Herweling, U. Wolf, A. Scholz, W. G. Schreiber, W. Heil, M. Thelen, H. W. Spiess, *Magn. Reson. Imaging* **2006**, *24*, 1291–1297.
 - [7] J. L. Mynar, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6334–6335.
 - [8] D. Baumer, E. Brunner, P. Blümller, P. P. Zänker, H. W. Spiess, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7440–7442; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7282–7284.
 - [9] P. C. A. van der Wel, K.-N. Hu, J. Lewandowski, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10840–1846.
 - [10] H. J. Mamin, M. Poggio, C. L. Degen, D. Rugar, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 301–306.
 - [11] Y. Maguire, I. L. Chuang, S. Zhang, N. Gershenfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9198–9203.
 - [12] P. J. M. van Bentum, J. W. G. Janssen, A. P. M. Kentgens, J. Bart, J. G. E. Gardeniers, *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 104–113.
 - [13] K. Schmidt-Rohr, H. W. Spiess, *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Academic Press, London, **1994**.
 - [14] E. R. Andrew, A. Bradbury, G. R. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659–1659; I. J. Lowe, *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285–287.
 - [15] A. Samoson, T. Tuherm, J. Past, A. Reinhold, T. Anupold, I. Heinmaa, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *246*, 15–31.
 - [16] M. Etzkorn, S. Martell, O. C. Andonesi, K. Seidel, M. Engelhard, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 463–466; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 459–462.
 - [17] H. Janssen, A. Brinkmann, E. R. H. van Eck, P. J. M. van Bentum, A. P. M. Kentgens, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8722–8723.
 - [18] D. Sakellariou, G. Le Goff, J. F. Jacquinot, *Nature* **2007**, *447*, 694–697.
-