

## Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie mittels Kernresonanzkraftmikroskopie\*\*

Kai W. Eberhardt, Christian L. Degen, Andreas Hunkeler und Beat H. Meier\*

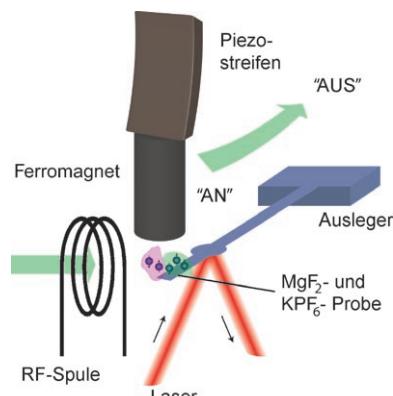
Die Magnetresonanztomographie (magnetic resonance imaging (MRI)) ist eine nichtinvasive Methode zur Erstellung dreidimensionaler Bilder mit hohem Informationsgehalt, die in den verschiedensten Bereichen, von der Humanmedizin bis zu den Materialwissenschaften, angewendet wird. Bei Mikrobildgebungsverfahren ist in günstigen Fällen eine Auflösung von etwa einem Mikrometer möglich.<sup>[1]</sup> Die Kernresonanzkraftmikroskopie (magnetic resonance force microscopy (MRFM))<sup>[2-4]</sup> eröffnete neue Möglichkeiten für MRI-Verfahren, die Nanometerskala zu erreichen. So wurde vor kurzem eine Auflösung von 90 nm in einer zweidimensionalen Abbildung der Spindichte erreicht,<sup>[5]</sup> und die Einzelspinauflösung, die bei Elektronen bereits gelungen ist,<sup>[6]</sup> rückt in greifbare Nähe.

Wie die MRI- ist die MRFM-Methode nicht auf die drei Raumdimensionen begrenzt. Spektrale Dimensionen können hinzugefügt werden und detaillierte chemische und Strukturinformationen auf atomarem Niveau liefern. Solche Experimente werden routinemäßig in der klinischen MRI durchgeführt. Diese spektroskopischen Bildgebungsverfahren sind unter dem Namen „MR Spectroscopic Imaging“ (MRSI) oder „Chemical-Shift Imaging“ (CSI)<sup>[7]</sup> bekannt. In MRFM-Experimenten wurden spektrale Informationen, z. B. die dipolare und die quadrupolare Kopplung, bereits verwendet. Unter anderem konnte man damit den Bildern neue Kontraste hinzufügen.<sup>[8-10]</sup> Die wichtigste Wechselwirkung – die chemische Verschiebung – wurde bisher dagegen, wegen der Schwierigkeit bei der Kombination von hoher räumlicher mit hoher spektraler Auflösung, nicht verwendet. In einem Versuchsaufbau, bei dem der Feldgradient an der Probenposition verschwindet, konnte die mechanische Detektion der chemischen Verschiebung ohne räumliche Auflösung an millimetergroßen Proben gezeigt werden.<sup>[11,12]</sup>

Analog zur MRI nutzt die MRFM die räumliche Variation der Resonanzfrequenz in einem Magnetfeldgradienten, um ein Bild der Spindichte des untersuchten Objekts zu erstellen. Doch anders als bei der MRI wird bei der MRFM die Ma-

gnetsierung mittels eines mikromechanischen Auslegers detektiert, der die Kraft des magnetischen Moments eines Spins im Magnetfeldgradienten misst. Sowohl die räumliche Auflösung als auch die Empfindlichkeit können gegenüber der induktiven Größen detektierten MRI klar verbessert werden.<sup>[13]</sup> Die ständige Präsenz eines Feldgradienten erschwert aber die spektroskopischen Anwendungen. Dies gilt insbesondere für die Spektroskopie der chemischen Verschiebung, da diese Wechselwirkung die gleichen Symmetrieeigenschaften wie die Wechselwirkung mit einem Magnetfeld(gradienten) hat. Prinzipiell könnte man durch das Aufnehmen von Nullquantenspektren in einem Feldgradienten Informationen über die chemische Verschiebung gewinnen.<sup>[14]</sup> Auch andere verwandte Methoden wurden diskutiert.<sup>[15,16]</sup> All diese Methoden haben aber ihre Einschränkungen und können nicht die gesamte Information eines normalen NMR-Spektrums wiedergeben. Wir stellen nun einen alternativen Ansatz vor, bei dem während des Experiments die Gradientenquelle temporär von der Probe weg bewegt wird (Abbildung 1). Die spektrale Information kann dann in einem annähernd homogenen Feld aufgenommen werden. Wir werden auch zeigen, dass auf diese Art CSI möglich ist.

Die von uns eingesetzte experimentelle Methode folgt dem allgemeinen Schema der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie.<sup>[17]</sup> Die Dimensionen können entweder



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung unseres Kernresonanzkraftmikroskops. Die Probe ist auf einem mechanischen Ausleger befestigt und spürt abhängig von der Ausrichtung des magnetischen Moments des Spins die anziehende oder abstoßende Kraft der ferromagnetischen Gradientenquelle. Die Radiofrequenz(RF)-Einstrahlung invertiert periodisch die Spins mit der mechanischen Resonanzfrequenz des Auslegers, was zu dessen Oszillation führt, die anhand der Reflexion eines Laserstrahls mit einem optischen Sensor detektiert wird. Zu unserem Versuchsaufbau gehört ein Piezostreifen, der die Gradientenquelle von der Probe weg bewegen kann.

[\*] K. W. Eberhardt, C. L. Degen,<sup>[†]</sup> A. Hunkeler, Prof. B. H. Meier  
Laboratorium für Physikalische Chemie, ETH Zürich, 8093 Zürich  
(Schweiz)  
E-Mail: beme@ethz.ch

[†] derzeitige Anschrift: IBM Research Division, Almaden Research Center, San Jose (USA)

[\*\*] Die Autoren danken Jacco van Beek, René Verel und Urban Meier für die wissenschaftliche Unterstützung. Die Arbeit wurde finanziell vom Schweizerischen Nationalfonds, der ETH Zürich und der Kommission für Technologie und Innovation unterstützt.

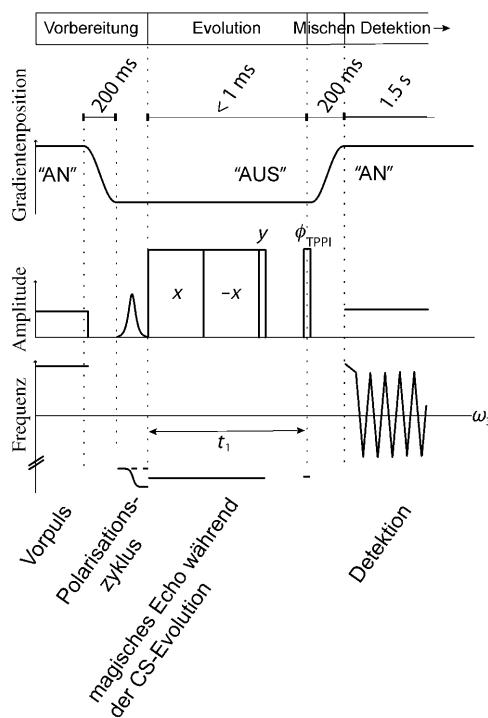
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200802978> zu finden.

Raumdimensionen, entsprechend der Bildgebungsdimension, oder spektrale Dimensionen sein. In den hier vorgestellten Beispielen ist jeweils eine räumliche Dimension mit einer oder zwei spektralen Dimensionen kombiniert. Das Pulsprogramm für das zweidimensionale Experiment mit einer räumlichen und einer spektralen Dimension ist in Abbildung 2 zu sehen.

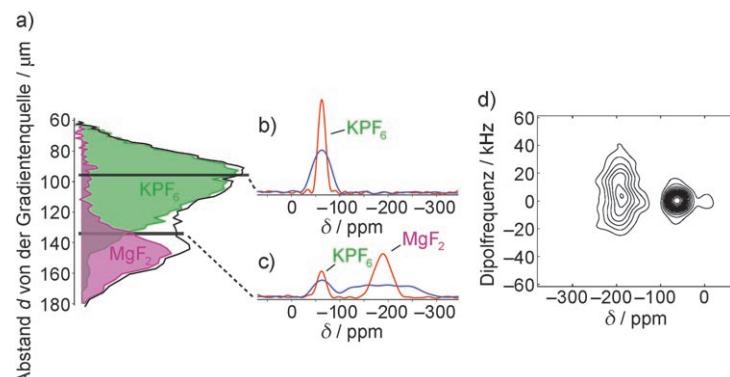
Während der Akquisition der spektralen Information wird die Gradientenquelle, hier ein kleiner Ferromagnet, der an einem Piezoantrieb befestigt ist (siehe Abbildung 1), mechanisch zu einer entfernten „Aus“-Position weg bewegt, was zu einem relativ homogenen Feld an der Probenposition führt (siehe Hintergrundinformationen). Die Spinkohärenz wird mit einem  $\frac{\pi}{2}$ -Puls erzeugt und evolviert während  $t_1$  unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung und – falls vorhanden – anderer Wechselwirkungen wie der  $J$ -Kopplung, der dipolaren oder der quadrupolaren Kopplung (Abbildung 2). Nach  $t_1$  wird die Magnetisierung in die  $z$ -Richtung und die Gradientenquelle zurück in die „An“-Position über der Probe gebracht. Das Signal kann nun im starken Gradienten mit einer hohen räumlichen Auflösung aufgenommen werden. Wie üblich wird die indirekte Dimension aufgenommen, indem die Evolutionszeit  $t_1$  in einer Reihe von Experimenten inkrementiert wird.<sup>[9]</sup> Durch eine Fourier-Transformation in  $t_1$  erhält man dann ein nach der chemischen Verschiebung aufgelöstes Spektrum. Mit dem Pulsprogramm von Abbildung 2 wird die Raumdimension Schicht für Schicht aufgenommen. Dazu wird im Frequenzraum die Zentraffrequenz  $\omega_3$  der ausgelesenen Frequenzschicht systematisch variiert. Eine gleichzeitige Aufnahme aller Schichten wäre jedoch möglich, wenn man eine Hadamard-Enkodierung während (oder unmittelbar vor) der Signaldetektion verwendete.<sup>[18]</sup>

Ein eindimensionales MRFM-Bild unserer Testprobe, die aus zwei Einkristallen ( $\text{KPF}_6$  und  $\text{MgF}_2$ ) besteht, ist in Abbildung 3a gezeigt. Die räumliche Auflösung, die sich aus der Dicke der Resonanzschicht im Einzelexperiment ergibt,<sup>[19]</sup> ist  $2.0 \mu\text{m}$ . Die durch die schwarze durchgezogene Linie dargestellte Signalintensität entspricht der gesamten  $^{19}\text{F}$ -Spindichte der Probe. Die farbigen Flächen kennzeichnen die Anteile von  $\text{KPF}_6$  und  $\text{MgF}_2$ , die mittels eines Kreuzdepolarisationsexperiments (cross-dipolarization (CDP)) unterschieden wurden, das die Tatsache nutzt, dass die Fluormagnetisierung des  $\text{KPF}_6$ -Kristalls durch Pulse auf die  $^{31}\text{P}$ -Spins zerstört werden kann.<sup>[10]</sup>

In Abbildung 3b und c sind Spektren der lokalisierteren chemischen Verschiebung gezeigt. Die blauen Spektren stammen aus dem oben beschriebenen Einpulsexperiment, die roten wurden mit einem Pulsschema mit magischem Echo zur Linienverschärfung<sup>[20,21]</sup> aufgenommen. Dabei wird die dipolare Kopplung zwischen den Spins selektiv gemittelt, was wesentlich deutlichere und besser aufgelöste Signale zur Folge hat. Abbildung 3b zeigt das Spektrum bei  $d = 95 \mu\text{m}$ . Bei dieser Position kann nur  $\text{KPF}_6$  untersucht werden, und das Spektrum besteht aus einer einzelnen Linie bei  $\delta = -60 \text{ ppm}$ . Bei  $d = 135 \mu\text{m}$  dagegen ist die Probe heterogen, und ein zweites Signal, von  $\text{MgF}_2$ , wird bei  $\delta = -190 \text{ ppm}$  beobachtet. Zugleich ist die Intensität des  $\text{KPF}_6$ -Si-



**Abbildung 2.** Pulssequenz der eindimensionalen Spektroskopie in einem zweidimensionalen Experiment (eine Raum- und eine Spektraldimension). Während der Evolutionszeit  $t_1$  befindet sich der Gradient in der „Aus“-Position, und die spektrale Information wird kodiert. Mit Hilfe von Magisch-Echo-Nutationspulsen wird die dipolare Kopplung kompensiert. Um das Signal auszulesen, werden die Spins periodisch invertiert, wodurch der Ausleger angeregt wird und dessen Schwingungsamplitude detektiert werden kann. Die räumliche Auflösung ist durch die Frequenzschicht gegeben, über die während der Akquisition gefahren wird. Die Pulse in der Vorbereitungszeit sind nicht wesentlich für die Hauptfunktion, aber nützlich für die Unterdrückung von Artefakten (siehe Hintergrundinformationen). Für zwei spektrale Dimensionen (für ein ortsaufgelöstes 2D-NMR-Spektrum) kann eine zweite Evolutionszeit hinzugefügt werden. Weitere Einzelheiten sind im Text und in den Hintergrundinformationen zu finden.



**Abbildung 3.** Ortsaufgelöste Spektren der chemischen Verschiebung für  $\text{KPF}_6$ - und  $\text{MgF}_2$ -Einkristalle: a)  $^{19}\text{F}$ -Spindichte als Funktion des Position  $z$ . b) und c) Spektren an zwei Stellen der Probe. In (b) ist nur  $\text{KPF}_6$  vorhanden, in (c)  $\text{KPF}_6$  und  $\text{MgF}_2$ . Die roten und blauen durchgezogenen Linien stammen aus Experimenten mit bzw. ohne Linienverschärfung. d) 2D-Spektrum, das die dipolare und die CS-Dimension in einem lokalen Feldexperiment korreliert. Weitere Einzelheiten sind im Text und in den Hintergrundinformationen zu finden.

gnals kleiner, da sich an der neuen Position weniger KPF<sub>6</sub> befindet.

Um das oben beschriebene Experiment auf (neben der einen räumlichen Dimension) zwei spektrale Dimensionen zu erweitern, wird eine zweite Evolutionszeit,  $t_2$ , zum Pulsprogramm von Abbildung 2 hinzugefügt (siehe auch Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Als ein Beispiel zeigen wir das Spektrum eines „Separated-local-Field“-Experiments,<sup>[22]</sup> das die chemische Verschiebung und die dipolare Kopplung miteinander korreliert (Abbildung 3d) und das an derselben Probenposition aufgenommen wurde wie das Spektrum in Abbildung 3c. Entlang der ersten Dimension wird die chemische Verschiebung verwendet, um die Resonanzen von KPF<sub>6</sub> und MgF<sub>2</sub> aufzulösen, während die dipolare Kopplung durch das magische Echo unterdrückt wird. In der zweiten Dimension ist die dipolare Kopplung aktiv, während die chemische Verschiebung zumindest teilweise durch einen Hahn-Echo-Puls aufgehoben wird.<sup>[23–25]</sup> Da die schnellen Rotationsbewegungen der KPF<sub>6</sub>-Einheit im Kristall die dipolare Kopplung teilweise löschen, ist das KPF<sub>6</sub>-Signal in der dipolaren Dimension  $\omega_2$  – wie erwartet – schmäler. Das MgF<sub>2</sub>-Signal ist hingegen wesentlich breiter, da in diesem Kristall keine signifikanten Bewegungen vorhanden sind.

Wir schätzen den verbleibenden Gradienten in der „Aus“-Position der Gradientenquelle auf etwa  $(23 \pm 3) \text{ T m}^{-1}$ , also annähernd zwei Größenordnungen kleiner als die  $2.5 \text{ kT m}^{-1}$ , die für die Signaldetektion und die räumliche Enkodierung verwendet werden. Um hochauflösende Spektren der chemischen Verschiebung zu erhalten, ließe sich der verbleibende Gradient noch verkleinern, indem die Gradientenquelle weiter weg bewegt oder verkleinert wird oder angepasste Shim-Spulen verwendet werden. Des Weiteren ist es vorstellbar, den Gradienten durch Erwärmen der ferromagnetischen Gradientenquelle über die Curie-Temperatur auszuschalten.

Wir haben hier das CSI und seine Erweiterung zur zweidimensionalen Spektroskopie mit einem Kernresonanzkraftmikroskop demonstriert. Die räumliche Auflösung, hier etwa  $2.0 \mu\text{m}$  in einer Dimension, kann durch ein Verringern der RF-Modulation während des Auslesens<sup>[26]</sup> oder durch das Verwenden stärkerer Feldgradienten<sup>[5]</sup> noch wesentlich erhöht werden. Das Experiment kann auch mit dem Hadamard-Multiplexschema kombiniert werden, bei dem mehrere Raumschichten auf einmal aufgenommen werden, was das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Ein zweidimensionales Bildgebungsverfahren, das die Hadamard- und die Fourier-Enkodierung basierend auf einem Feldgradienten in einem statischen bzw. RF-Feld im selben Gerät verwendet, wurde vor kurzem beschrieben.<sup>[27]</sup> Dieses kann mit ein- oder zweidimensionaler Spektroskopie kombiniert werden und liefert somit detaillierte chemische Information mit hoher räumlicher Auflösung. Wir erwarten, dass die weitere Entwicklung

dieser Methode zum CSI von Werkstoffen und lebenden biologischen Objekten wie Zellen führen wird.

Eingegangen am 21. Juni 2008  
Online veröffentlicht am 16. Oktober 2008

**Stichwörter:** Bildgebungsverfahren ·

Mikrobildgebungsverfahren · Mikroskopie · NMR-Spektroskopie

- [1] S.-C. Lee, K. Kim, J. Kim, S. Lee, J. H. Yi, S. W. Kim, K.-S. Ha, C. Cheong, *J. Magn. Reson.* **2001**, *150*, 207–213.
- [2] J. A. Sidles, *Appl. Phys. Lett.* **1991**, *58*, 2854–2856.
- [3] D. Rugar, C. S. Yannoni, J. A. Sidles, *Nature* **1992**, *360*, 563.
- [4] J. A. Sidles, J. L. Garbini, K. J. Bruland, D. Rugar, O. Zuger, S. Hoen, C. S. Yannoni, *Rev. Mod. Phys.* **1995**, *67*, 249–265.
- [5] H. J. Mamin, M. Poggio, C. L. Degen, D. Rugar, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 301–306; siehe auch das Highlight dazu: H. W. Spiess, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 649–652; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 639–642.
- [6] D. Rugar, R. Budakian, H. J. Mamin, B. W. Chui, *Nature* **2004**, *430*, 329–332.
- [7] T. R. Brown, B. M. Kincaid, K. Ugurbil, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3523–3526.
- [8] R. Verhagen, A. Wittlin, C. W. Hilbers, H. van Kempen, A. P. M. Kentgens, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1588–1589.
- [9] C. L. Degen, Q. Lin, A. Hunkeler, U. Meier, M. Tomaselli, B. H. Meier, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 207601.
- [10] K. W. Eberhardt, Q. Lin, U. Meier, H. Andreas, B. H. Meier, *Phys. Rev. B* **2007**, *75*, 184430.
- [11] L. A. Madsen, G. M. Leskowitz, D. P. Weitekamp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12804–12808.
- [12] G. M. Leskowitz, L. A. Madsen, D. P. Weitekamp, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **1998**, *11*, 73–86.
- [13] J. A. Sidles, D. Rugar, *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *70*, 3506–3509.
- [14] A. Wokaun, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *52*, 407.
- [15] D. P. Weitekamp, J. R. Garbow, J. B. Murdoch, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3578–3579.
- [16] J. R. Garbow, D. P. Weitekamp, A. Pines, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 5301–5310.
- [17] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford, 1987.
- [18] K. W. Eberhardt, C. L. Degen, B. H. Meier, *Phys. Rev. B* **2007**, *76*, 180405.
- [19] N. Nestle, A. Schaff, W. S. Veeman, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2001**, *38*, 1–35.
- [20] W. K. Rhim, A. Pines, J. S. Waugh, *Phys. Rev. B* **1971**, *3*, 684.
- [21] C. L. Degen, Q. Lin, B. H. Meier, *Phys. Rev. B* **2006**, *74*, 104414.
- [22] R. K. Hester, J. L. Ackerman, B. L. Neff, J. S. Waugh, *Phys. Rev. Lett.* **1976**, *36*, 1081.
- [23] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580.
- [24] D. P. Weliky, G. Dabbagh, R. Tycko, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *104*, 10–16.
- [25] M. Tomaselli, P. Robyr, B. H. Meier, C. Grob-Pisano, R. R. Ernst, U. W. Suter, *Mol. Phys.* **1996**, *89*, 1663.
- [26] K. W. Eberhardt, S. Mouaziz, G. Boero, J. Brugger, B. H. Meier, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 227603.
- [27] B. H. Meier, Vortrag auf der Experimental NMR Conference (ENC), Asilomar, CA, **2008**.