

Bildgebung in der NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie profitiert von Bildgebungsverfahren, z. B. beim Ausmitteln von Nullquanten-Artefakten

Thomas Schulte-Herbrüggen*

*Richard R. Ernst zum 70. Geburtstag
gewidmet*

Stichwörter:

Bildgebungsverfahren · NMR-Spektroskopie

„Fourier imaging ... can be considered as a typical 2D spectroscopy technique.“

R. R. Ernst et al.^[1]

Das Problem der Nullquanten-Kohärenzen

Die Magnetresonanz-Tomographie^[15] gründet größtenteils auf Fourier-Methoden, die in der NMR-Spektroskopie entwickelt wurden. Nun revanchieren sich die Bildgebungsverfahren, indem sie spektroskopische Domänen erobern und Erfolgsmarken setzen. Nachdem es mit Tomographietechniken bereits möglich ist, mehrdimensionale NMR-Experimente auf einen einzigen Scan zu reduzieren,^[2] demonstrierten Keeler und Thrippleton kürzlich in dieser Zeitschrift,^[3] wie man NMR-Spektren mit Bildgebungsmethoden von Nullquanten-Artefakten befreit und somit ein seit langem bestehendes Problem löst.

Um gleich mit einer Ironie zu beginnen: In der Geschichte der Mathematik gilt die Erfindung der *Null* als ein Geniestreich der Antike, wohingegen sich *Nullquanten-Kohärenzen* nur allzu oft als des Teufels Handschrift in einer breiten Palette alltäglicher NMR-Spektren zeigen. Zweifellos ist auf der sicheren Seite, wer wettet, dass fast jeder

NMR-Spektroskopiker schon stirnrunzelnd über Spektren mit hässlichen dispersiven „Traktorspuren“ und irreführenden *J*-Korrelationen gesessen hat. Was für eine Erleichterung, wenn Proteinstrukturen nun nicht mehr von Kreuzsignalen abhängen, die umgeben von (wenn nicht gar identisch mit) „Geister-Peaks“ sind!

Warum sind unerwünschte Nullquanten-Kohärenzen eigentlich so schwer zu eliminieren? Nun, sie entkommen gleich zwei der ansonsten so wirkungsvollen spektroskopischen Filtermethoden, den Phasenzyklen und den Feldgradienten; beide sind gleichermaßen machtlos, wenn es um die Trennung der Nullquanten von *z*-Polarisation geht. Es lohnt sich daher zurückzuschauen:

Nur ein Jahr nach dem entscheidenden Durchbruch zur experimentellen Realisierung von 2D-NMR-Spektren^[4] zeigten Ernst und Wokaun in einer einflussreichen Arbeit^[5], wie sich im Dichteoperator (der den Zustand eines Spinensembles beschreibt) jede Komponente gemäß ihrer Quantenordnung *p* mit einem komplexen Phasenfaktor $e^{-ip\varphi}$ markieren lässt. Dazu muss der Zustand um einen Winkel φ um die Quantisierungsachse *z* gedreht werden, was einfach einer Phasenverschiebung um φ entspricht. Mehr noch, diese Technik lässt sich nutzen, um Terme gewünschter Quantenordnung zu selektieren und alle anderen durch Phasenzyklen, d. h. mittels Fourier-Analyse bezüglich der Phaseninkremente φ , zu unterdrücken.^[5] Diese Methode führte unmittelbar zu Quantenfiltern^[6] und wurde rasch Routine,^[1,7] nachdem sie auf eindrückliche Weise das viersechrö-

tige Erscheinungsbild der frühen COSY-Spektren in die zivilisiert reinen Phasen der heutigen „Doppelquanten-gefilterten“ (DQF) COSY-Spektren überführt hatte.^[8] Ohne disperse, von der Diagonale ausgehende Verwerfungen bergen DQF-COSY-Spektren wertvolle Informationen über Konnektivität und Diederwinkel, die – zusammen mit den NOESY-Distanzen – die Basis für die NMR-spektroskopische Strukturaufklärung sind.^[9]

Wieso hilft der gleiche Trick des Quantenfilters nicht, um NOESY-artige Experimente von Nullquanten-Artefakten zu säubern? Die Ursache dafür ist in der Tatsache zu suchen, dass der Overhauser-Effekt Polarisierung von einem Spin auf den nächsten überträgt ($I_{kz} \leftrightarrow I_{lz}$) und *z*-Polarisation (I_{kz}) wie longitudinale Mehrspinordnung (z. B. $2I_{kz}I_{lz}$) invariant unter *z*-Rotationen sind; somit haben sie unabänderlich die Phasenmarkierung $p=0$ – genau wie die Nullquanten-Kohärenzen. Unterscheidung unmöglich!

Schlimer noch, diese drei Arten von Komponenten werden von magnetischen Feldinhomogenitäten nahezu nicht beeinflusst,^[5] und zwar aus ganz ähnlichen Gründen: Während eines Feldgradienten dephasieren Terme des Dichteoperators wiederum proportional zu ihrer Quantenordnung^[10] und ermöglichen daher Quantenselektion mittels Gradienten – eine Methode, zu der die Gruppe von Keeler im Laufe der Jahre maßgeblich beigetragen hat.^[11] Das Verfahren gehört mittlerweile zum kanonischen Repertoire und ermöglicht Quantenfilter in einem Scan (genau genommen in je einem für Echo und Antiecho eines Spektrums in reiner Phase), wäh-

[*] Dr. T. Schulte-Herbrüggen
Institut für Organische Chemie und Biochemie II
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4
85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-mail: tosh@ch.tum.de

rend Phasenzyklen üblicherweise mehrere Transienten addieren. Dennoch ist die Phasenmarkierung bei beiden Methoden, den Phasenzyklen und den Gradienten, weitgehend ähnlich und damit ergeben sich gemeinsame blinde Flecke, die zum Glück jedoch nicht ganz übereinstimmen.

Die Lösung von Keeler und Thrippleton

Nun zeigten Keeler und Thrippleton^[3] eine elegante Lösung des notorischen Rätsels, wie man Nullquanten-Kohärenzen unterdrückt, zugleich aber Polarisierungen und Mehrspinordnungen behält. Ihre experimentellen Ergebnisse sehen deutlich besser aus als all jene früherer einschlägiger Lösungsversuche. Allerdings sind dazu modernste Spektrometer erforderlich, mit denen gepulste Feldgradienten mit selektiven Pulsen, die adiabatisch über einen Frequenzbereich geschoben werden, kombiniert werden können – Optionen, von denen sich die Pioniere kaum hätten träumen lassen, dass sie eines Tages mit den Stabilitätsanforderungen der Hochauflösungsspektroskopie verträglich sein würden.

Der eigentliche Trick der neuen Technik ist der Bildgebung abgeschaut und beruht auf unterschiedlichen Evolutionen der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit von der geometrischen Lage innerhalb der Probe. Über die ganze Probe gemittelt hebt sich der Beitrag dieser unterschiedlichen Evolutionen auf und wird im Spektrum unsichtbar. Das zugrunde liegende Modul zur Refokussierung lässt sich bildlich sehr leicht genauer verstehen, man rufe sich nur in Erinnerung, dass ein z -Gradient die Resonanzfrequenz von der Höhe in der Probe (d.h. der z -Koordinate) abhängig macht (Abbildung 1a). Mit anderen Worten, jede Lage hat ihre eigene Larmor-Frequenz ω . Wenn man nun während eines solchen z -Gradienten einen selektiven 180° -Puls anlegt, dessen Frequenz zeitlich so variiert, dass sie die Resonanz der obersten Schicht bei $t=0$, die der untersten Schicht jedoch erst bei $t=\tau_f$ erreicht, so invertiert auch die Entwicklung der chemischen Verschiebung (im Sinne eines Hahnschen Spinechos) zu-

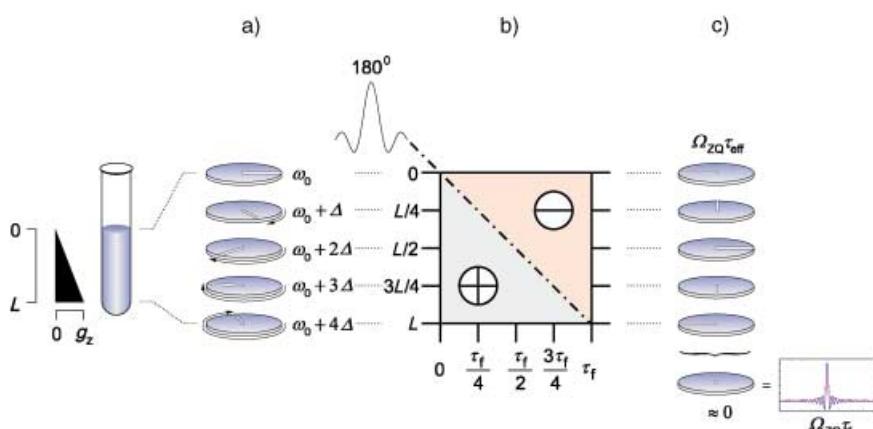


Abbildung 1. Allgemeines Modul, um Nullquanten-Kohärenzen auszumitteln, Polarisationen und Mehrspinordnungen aber zu behalten.^[3] Für Einzelheiten siehe Text.

erst oben ($t=0$) und erst bei $t=\tau_f$ unten (Abbildung 1b). Dies gilt für alle chemischen Verschiebungen, insbesondere auch für nichtverschwindende Nullquantenresonanzen $\Omega_{ZQ} = \Omega_k - \Omega_l$ von $I_k^- I_l^+$. Ist der Unterschied zwischen den Evolutionen in den einzelnen Schichten groß genug, so ergibt der Durchschnitt über die ganze Probe endlich null Nullquanten – selbst wenn noch ein weiteres Zeitintervall (beispielsweise eine Mischzeit) folgt (Abbildung 1c).

Das Ausmitteln resultiert natürlich schon nach einem Scan und ist robust gegen Zufallsprozesse wie die Diffusion zwischen den Schichten sowie gegen etwaige Konvektion, getrieben durch Temperaturgradienten über die Probe. In NOESY-Experimenten gilt es jedoch aufzupassen, dass die Resonanzfrequenzbandbreite über die ganze Probe groß gegenüber der spektralen Bandbreite ist, weil sonst die NOE-Aufbauraten zwischen zwei Spins in Abhängigkeit von der Differenz ihrer Resonanzfrequenzen abgeschwächt würden, was eine quantitative Interpretation behinderte. Wegen ihrer Robustheit und generellen Einsetzbarkeit, z.B. bei isotropem TOCSY^[12] und anderen Experimenten mit Mischprozessen ausgehend von z -Magnetisierung, ist Keelers Methode der Nullquantenunterdrückung in Zukunft ein weites Einsatzfeld gewiss.

Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie in einem Schuss

Experimentelle Robustheit ist nicht gerade das Verkaufsargument für einen ausgefuchsten Vorschlag,^[2] wie man mehrdimensionale NMR-Experimente in einem einzigen Scan ausführen kann; das Argument ist vielmehr die frappant kurze Messzeit. Die Arbeit von Frydman et al.^[2] mag sehr wohl die Inspirationsquelle für Keeler und Thrippleton gewesen sein. Das Prinzip eines 2D-NMR-Experiments in einem Scan beruht nämlich auf paralleler t_1 -Evolution wiederum in räumlich getrennten Schichten, wobei eine jede einem unterschiedlichen t_1 -Inkrement entspricht und daher auch separat detektiert werden muss. Um diese etwas heiklen Be-

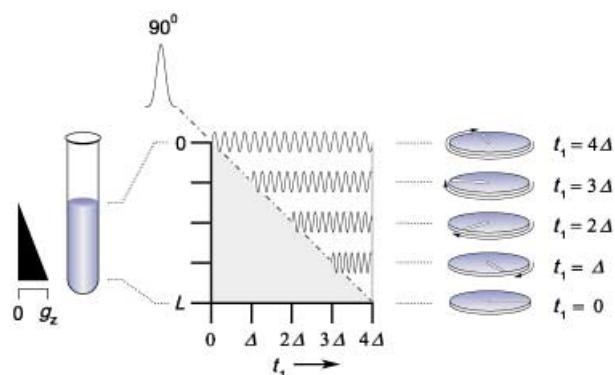


Abbildung 2. Anregungsschema, um in einem einzigen Scan zu 2D-Spektren zu kommen.^[2] Der z -Gradient sorgt für schichtspezifische Resonanzfrequenzen. Ein selektiver 90° -Puls erregt jede Schicht zu einer unterschiedlichen Zeit, sodass die Spins schichtweise in t_1 evolvieren. Nur der Mischprozess ist uniform möglich. Echoplanare Bildgebungsprinzipien^[14] erlauben schließlich die für die Detektion notwendige Schichttrennung.

dingungen experimentell zu realisieren, griffen die Autoren das Prinzip der Fourier-Bildgebung auf.^[13] nutzten die Phasenmarkierung der Schichten aber nicht zur Raumauflösung, sondern zur schichtweisen t_1 -Evolution (Abbildung 2). Zu diesem Zweck wird ein selektiver Anregungspuls mit einem Flipwinkel von 90° über diskrete Frequenzen zu diskreten Zeiten geschoben, während zugleich ein Feldgradient wirkt. Dadurch bekommt wieder jede Scheibe ihre eigene Resonanzfrequenz und nun auch ihr eigenes t_1 -Inkrement. Nur der anschließende Mischprozess kann gleichmäßig in der ganzen Probe erfolgen, wohingegen die Detektion nochmals scheibenspezifisch verläuft. Dies gelingt – wiederum! – dank eines der medizinischen Magnetresonanz-Tomographie entlehnten Tricks, nämlich des Gradientenechos der echoplanaren Bildgebung (echo-planar imaging).^[14] Die Einschränkung des t_1 -Inkrementes auf eine einzige räumliche Schicht und damit einen kleinen Probenteil erfordert hohe Konzentrationen, wie sie bei kleinen Molekülen leicht zu erreichen sind, bei denen auch verminderde Auflösung durch Diffusion und t_1 -Rauschen durch Konvektion unkritisch sind. Folglich mag sich diese Methode besonders in der Routine-Analytik zur drastischen Zeitsparnis anbieten, lässt sie sich erst einmal robust implementieren und automatisieren.

Mithilfe von Bildgebungsverfahren kann somit der Spektroskopiker die Probe in räumlich getrennte Schichten mit unterschiedlicher Anregung, Evolu-

tion und Detektion aufteilen. Die Transformationseigenschaften der relevanten Operatorterme nutzend, lässt sich somit räumliches Editieren mit spektralem Editieren kombinieren. Über die Bereinigung oder Beschleunigung bereits bekannter Experimente hinaus eröffnet sich somit eine ungeahnte Perspektive für neuartige Experimente.

- [1] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford, 1987; siehe auch den Nobel-Vortrag: R. R. Ernst, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 817–836; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 805–823.
- [2] L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15858–15862.
- [3] M. J. Thripleton, J. Keeler, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4068–4071; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3938–3941.
- [4] W. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246; „The Unpublished Baško Polje (1971) Lecture Notes“: J. Jeener in *NMR and More* (Hrsg.: M. Goldman, A. Porneuf), Les Éditions de Physique, Les Ulis, **1994**, S. 266–272.
- [5] A. Wokaun, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *52*, 407–412.
- [6] G. Bodenhausen, H. Kogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1984**, *58*, 370–388.
- [7] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536.
- [8] U. Piantini, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6800–6801.
- [9] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1988**; siehe auch den Nobel-Vortrag: K. Wüthrich, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3462–3484; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3340–3363.
- [10] C. J. R. Counsell, M. H. Levitt, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1985**, *64*, 470–478.
- [11] G. Kontaxis, J. Stonehouse, R. D. Laue, J. Keeler, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, *111*, 70–76; A. L. Davis, J. Keeler, R. D. Laue, D. Moskau, *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 207–216; siehe auch: *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* (Hrsg.: D. M. Grant, R. K. Harris), Wiley, Chichester, **1996**.
- [12] S. J. Glaser, J. Quandt, *Adv. Magn. Reson.* **1996**, *19*, 59–252.
- [13] A. Kumar, D. Welti, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1975**, *18*, 69–83; W. A. Edelstein, J. M. S. Hutchinson, G. Johnson, T. Redpath, *Phys. Med. Biol.* **1980**, *25*, 751–756; P. T. Callaghan, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*, Clarendon Press, Oxford, **1991**.
- [14] P. Mansfield, *J. Phys. C* **1977**, *10*, L55–L58; P. Mansfield, *Magn. Reson. Med.* **1984**, *1*, 370–386; siehe Lit. [15b] sowie P. G. Morris, *NMR Imaging in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, **1986**.
- [15] Zum Zeitpunkt der Korrektur dieses Beitrags wurde bekannt, dass Lauterbur und Mansfield für die Magnetresonanz-Tomographie mit dem Medizinnobelpreis 2003 ausgezeichnet werden. Zur Technik sei auf folgende Arbeiten verwiesen: a) P. C. Lauterbur, *Nature* **1973**, *242*, 190–191; b) P. Mansfield, P. G. Morris, *NMR Imaging in Biomedicine*, Academic Press, New York, **1982**; c) siehe auch Lit. [14].