

## Größere Möglichkeiten für die NMR-Spektroskopie durch Mikrospulenprobenköpfe\*\*

Frank C. Schroeder\* und Matthew Gronquist

### Stichwörter:

Analytische Methoden · Kapillar-NMR-Spektroskopie · Mengenempfindlichkeit · NMR-Spektroskopie · Strukturaufklärung

Dr. Volker Sinnwell  
zum 63. Geburtstag gewidmet

Die Kapillar-NMR(CapNMR)-Spektroskopie erhöht die Mengenempfindlichkeit der NMR-spektroskopischen Analyse und ermöglicht ihre Kombination mit anderen Analysetechniken. CapNMR-Spektroskopie bietet nicht nur eine höhere Empfindlichkeit, sondern liefert für niedermolekulare Verbindungen in vielen Fällen auch Spektren besserer Qualität als herkömmliche Verfahren. Dieser Kurzaufsatz beschreibt den aktuellen Stand der CapNMR-Technologie sowie ihrer Anwendungen zur Charakterisierung von niedermolekularen Verbindungen und Proteinen bei begrenzten Probenmengen, das schnelle Screening von Bibliotheken aus niedermolekularen Verbindungen oder Proteinen sowie die Kombination von CapNMR-Spektroskopie mit anderen Analysemethoden.

### 1. Einführung

NMR-Spektren geben unsere Vorstellung von organischen Strukturen als Kugel-Stab-Modellen am besten wieder. Wenn wir NMR-Spektren nach der ersten Ordnung interpretieren, so können wir jedes NMR-Signal einem bestimmten Wasserstoff- oder Kohlenstoffatom (genauer gesagt: Gruppen nichtäquivalenter Atome) zuordnen, sodass wir die einzelnen Wasserstoff- oder Kohlenstoffatome eines Moleküls quasi „sehen“ können. Homo- und Heterokern-Korrelationsspektren wie COSY, HSQC (heteronuclear single-quantum correlation) oder HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation) liefern weitere Signale, die in unserem Modell den Bindungen zwischen den Atomen entsprechen.<sup>[1]</sup>

Es ist diese Analogie zu Molekülmodellen, die die Interpretation von NMR-Spektren so eingängig macht. Ein tiefes Verständnis der physikalischen Grundlagen der NMR-Spektroskopie in Lösung ist weitaus schwerer zu erlangen – aber für die meisten Chemiker, die mit niedermolekularen Verbindungen arbeiten, ist dies auch nicht erforderlich. Organiker und Biochemiker können die NMR-Spektroskopie sehr effizient einsetzen, ohne sich um Quantenmechanik oder Statistik zu sorgen, da Grundkenntnisse über Pulssequenzen und Datenverarbeitung für den Umgang mit den verfügbaren NMR-Spektrometern vollständig ausreichen.

Allerdings wird dabei fast jeder, der die NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von Molekülstrukturen oder dynamischen Prozessen genutzt hat, früher oder später ihre Achillesferse kennengelernt haben: die begrenzte Empfindlichkeit. So benötigt man für eine NMR-spektroskopische Analyse wesentlich mehr Material als für ein Massenspektrum.<sup>[2-4]</sup> Zwar ist die NMR-Spektroskopie im Unterschied zur Massenspektrometrie eine zerstörungsfreie Methode, doch dies ist ein schwacher Trost, wenn man schlicht nicht genügend Material für ausreichend gute NMR-Spektren isolieren kann. So stehen bei der Identifizierung neuer Naturstoffe, bei der Analyse von Metaboliten oder Abbauprodukten von Pharmaka und Agrochemikalien sowie bei der Charakterisierung großer Bibliotheken synthetischer Verbindungen in der kombinatorischen Chemie häufig nur begrenzte Probenmengen zur Verfügung.

Die Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie hängt grundsätzlich von drei instrumentellen Parametern ab: der Stärke des Magnetfelds (starke Magnete erhöhen die Empfindlichkeit), der Größe und dem Füllfaktor der Empfänger-

[\*] Dr. F. C. Schroeder  
Biological Chemistry and Molecular Pharmacology  
Harvard Medical School  
250 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (USA)  
Fax: (+1) 617-432-6424  
E-Mail: frank\_schroeder@hms.harvard.edu

Dr. M. Gronquist  
Department of Chemistry  
SUNY College at Fredonia  
Fredonia, NY 14063 (USA)

[\*\*] Wir danken Professor Jerrold Meinwald und Dr. Ivan Keresztes, Cornell University, sowie Tim Peck und Dean Olson, Protasis-MRM, für hilfreiche Vorschläge und Diskussionen.

spule (die Mengenempfindlichkeit steigt mit zunehmendem Füllfaktor und abnehmendem Spulendurchmesser) und dem Rauschen, das bei der Detektion entsteht.<sup>[5,6]</sup> Nachdem NMR-Spektrometer in den 1960er Jahren weithin zugänglich geworden waren, sahen die beiden folgenden Jahrzehnte einen drastischen Anstieg der Feldstärke – und damit der Empfindlichkeit – dank des Einsatzes supraleitender Magnete. Diese Entwicklung hat sich bei kommerziellen NMR-Spektrometern in den vergangenen 15 Jahren zusehends verlangsamt, denn die heute erhältlichen Magnete stoßen bereits an die Leistungsgrenze verfügbarer supraleitender Drähte, und auch die Kosten für die Installation solcher Spektrometer steigen mehr als exponentiell mit der Feldstärke. Beispielsweise können sich die Kosten für Anschaffung und Installation eines 900-MHz-Spektrometers leicht auf 10000000 US-Dollar (ca. 8000000 Euro) belaufen, während ein Standard-600-MHz-Instrument bereits für weniger als 10% dieses Betrags zu haben ist<sup>[7]</sup> – und dabei ist die Empfindlichkeit bei 900 MHz lediglich doppelt so hoch wie bei 600 MHz.<sup>[7]</sup> Neuerdings wird daher vorrangig versucht, die Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie durch den Entwurf neuer Probenköpfe zu steigern, etwa durch Reduzieren des thermischen Rauschens im Empfänger oder durch die Entwicklung von Probenköpfen für kleinere Empfänger-spulen mit höherem Füllfaktor. Die Einführung von Tief-temperaturprobenköpfen, in denen das thermische Rauschen deutlich verringert wird, indem man die Empfängerspule und die Vorverstärker auf 25 K oder darunter abkühlt, ergab drei- bis viermal höhere Empfindlichkeiten als bei üblichen Probenköpfen.<sup>[8,9]</sup> Tieftemperaturprobenköpfe stellen allerdings extrem hohe Anforderungen an die thermische Isolierung und den Kühlmechanismus, da die 25 K kalte Empfängerspule nur wenige Millimeter von der NMR-Probe entfernt ist, die bei Raumtemperatur vermessen wird. Durch das erforderliche Helium-Kühlsystem sind Tieftemperaturprobenköpfen recht teuer in Ankauf und Wartung, und die Installation eines Tieftemperaturprobenkopfes führt gewöhnlich dazu, dass ein Spektrometer ausschließlich mit diesem Probenkopf genutzt werden kann.

Ungeachtet aller erwähnten Nachteile hat ihre deutlich höhere Empfindlichkeit Tieftemperaturprobenköpfe unentbehrlich für die NMR-spektroskopische Charakterisierung von Biomakromolekülen gemacht. Zur Analyse begrenzter Probenmengen bieten sich jedoch Mikrospulenprobenköp-

fe<sup>[10]</sup> als Alternative an, da sie – schon zu einem Bruchteil der Kosten für Tieftemperaturprobenköpfe – die Mengenempfindlichkeit deutlich steigern. In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir einige physikalische Konzepte, aus denen sich die Vorteile und Einschränkungen von Mikrospulenprobenköpfen ergeben, und vergleichen die Mengenempfindlichkeit von Mikrospulenprobenköpfen mit derjenigen üblicher Probenköpfe. Wir gehen außerdem auf Anwendungen der NMR-Spektroskopie mit Mikrospulen ein – als eigenständige Technik und in Verbindung mit anderen Analysetechniken wie HPLC oder Elektrophorese – und verweisen auf jüngste Fortschritte beim Einsatz von Mikrospulenprobenköpfen in Hochdurchsatzverfahren.

## 2. NMR-Probenköpfe mit Mikrospulen

### 2.1. Grundlagen und Bauweise

Die Grundidee bei der Entwicklung von NMR-Probenköpfen mit Mikrospulen ergab sich daraus, dass sich das Signal-Rausch(S/N)-Verhältnis für eine bestimmte Analytmenge erhöht, wenn man den Durchmesser der Empfänger-spulen verringert.<sup>[5,10–12]</sup> Da Spulen mit kleinerem Durchmesser auch nur Platz für kleinere Probenvolumina bieten, sind NMR-Probenköpfe mit Mikrospulen nur dann vorteilhaft, wenn die in begrenzter Menge vorhandene Probe vollständig in dem geringeren Solvensvolumen löslich ist. Für Proben mit schlechterer Löslichkeit bieten Mikrospulen keinerlei Vorteile, da der kleinere Probenkopf eine geringere Menge einer solchen Probe aufnimmt als übliche Anordnungen. Deswegen ist die Konzentrationsempfindlichkeit von NMR-Probenköpfen mit Mikrospulen generell geringer als diejenige von 5-mm-Probenköpfen (Tabelle 1).<sup>[10]</sup>

Die Entwicklung von NMR-Probenköpfen mit kleineren Empfängerspulen war eine anspruchsvolle Aufgabe. Dadurch dass die Probe näher an kleinere Spulen herangebracht werden muss, kann es infolge unterschiedlicher magnetischer Suszeptibilitäten von Probe, Spulenmaterial und Umgebung zu einer deutlichen Linienverbreiterung kommen.<sup>[13–16]</sup> Bei der Verringerung des Spulendurchmessers ist auch zu bedenken, wie die Probe in den Probenkopf eingeführt wird, denn die herkömmlichen Probenröhrchen können nicht beliebig miniaturisiert werden, und ein hoher Füllfaktor der



**Frank C. Schroeder** studierte Chemie und Physik an der Universität Hamburg und promovierte 1997 unter Anleitung von Wittko Francke. Als Postdoktorand in der Gruppe von Jerrold Meinwald an der Cornell University vertiefte er sein Interesse an der spektroskopischen Charakterisierung niedermolekularer Verbindungen und an deren Rolle in der chemischen Biologie. Seit 2004 leitet er die Natural Products Initiative an der Harvard Medical School. Seine Forschungsinteressen umfassen NMR-spektroskopische Verfahren zur Charakterisierung niedermolekularer Verbindungen in Mischungen sowie die Identifizierung und Funktionsweise signalgebender Moleküle.



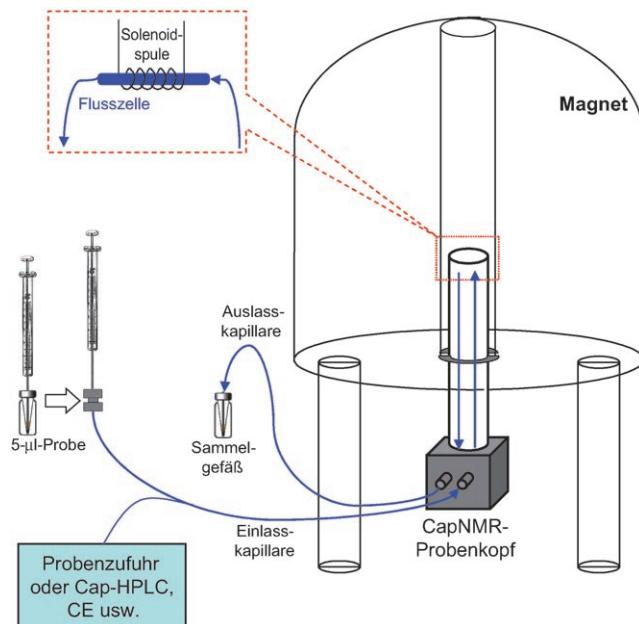
**Matthew Gronquist** promovierte 2002 an der Cornell University unter Anleitung von Jerrold Meinwald über die Charakterisierung und Synthese von Naturstoffen. Anschließend wechselte er als Assistant Professor an das State University of New York (SUNY) College at Cortland. Er ist seit 2006 Assistant Professor für Chemie am SUNY College at Fredonia. Zu seinen Forschungsinteressen zählen Signalstoffe bei Bakterien und die chemische Ökologie von Insekten.

**Tabelle 1:** Vergleich der Konzentrations- ( $S_c$ ) und Mengenempfindlichkeit ( $S_m$ ) für eine Sucrose-Probe in einem CapNMR-Mikrospulenprobenkopf und einem 5-mm-H{C,N}-Probenkopf bei 600 MHz mit Shigemi-Röhrchen.<sup>[a]</sup>

Probenkopf	Probenvolumen [ $\mu\text{L}$ ]	$S_c$ (S/N pro mm) (normalisiert)	$S_m$ (S/N pro $\mu\text{mol}$ ) (normalisiert)
5 mm	260 <sup>[b]</sup>	10.4	1
CapNMR	5	1	5.0

[a] Für Lösungen von Sucrose (17.2  $\mu\text{g}$ , 50 nmol) in  $\text{D}_2\text{O}$  wurde ein einziger Scan aufgenommen.<sup>[18]</sup> Die Signal-Rausch-Verhältnisse wurden für das Signal des anomeren Protons mit VNMR-Software (VARIAN) ermittelt. Lit. [12] enthält einen ähnlichen Vergleich. [b] Im Shigemi-Röhrchen hätte ein etwas kleineres Probenvolumen (200–220  $\mu\text{L}$ ) verwendet werden können. Dies hätte die Mengenempfindlichkeit des 5-mm-Probenkopfes um ungefähr 25 % verbessert, sodass die CapNMR-Spektroskopie nur noch etwa viermal empfindlicher wäre.

Spule ist entscheidend, um die Empfindlichkeitsverbesserung durch die Verkleinerung vollständig zu nutzen. Ein großer Fortschritt waren Probenköpfe, in denen die Empfängerspulen direkt um eine Kapillarflusszelle gewickelt waren; diese Kapillare befand sich in einer Flüssigkeit, deren magnetische Suszeptibilität derjenigen des Spulenmaterials entsprach.<sup>[17]</sup> Ein sorgfältiges Abstimmen der Suszeptibilität verringerte die Magnetfeldinhomogenitäten in der Umgebung der Spule drastisch und verbesserte die Linienform so weit, dass hochauflösende NMR-spektroskopische Untersuchungen möglich wurden. Die Linienbreiten für die jüngste Generation kommerzieller Kapillar-NMR(CapNMR)-Probenköpfe mit Mikrospulen sind bereits mit denjenigen von 5-mm-Tieftemperaturprobenköpfen vergleichbar. Da CapNMR-Flusszellen sehr klein sind, können sie horizontal (senkrecht zum Magnetfeld) ausgerichtet werden, sodass Solenoidspulen als Empfängerspulen verwendet werden können (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Aufbau und Funktionsweise des Probenkopfes in der CapNMR-Spektroskopie. CE = Kapillarelektrophorese.

Solenoidspulen sind wegen ihrer stärkeren Kopplung mit der Probe etwa doppelt so empfindlich wie die Sattelspulen, die für vertikal angeordnete Proben erforderlich sind;<sup>[10]</sup> die Empfindlichkeit des Probenkopfes wird durch den Einsatz von Solenoidspulen also über den Verstärkungseffekt der Miniaturisierung hinaus erhöht. Durch den Einsatz sehr kleiner Probenvolumina wird zudem die Feldkorrektion (Shimming) stark vereinfacht, und gewöhnlich sind nur einige wenige Parameter erster Ordnung anzugeleichen.<sup>[12]</sup> Bei Messreihen im gleichen Solvens genügt es zudem oft, wenn man die Feldkorrektion für die erste Probe vornimmt.

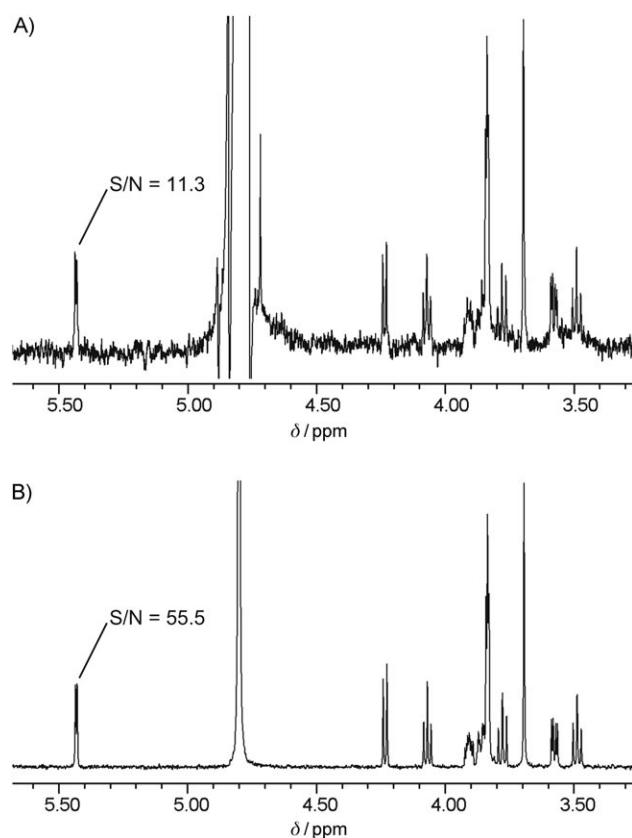
Typische NMR-Probenköpfe mit Mikrospulen enthalten nur eine Spule für das Deuterium-Lock-Signal und die Protonen- und  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Kanäle. Die CapNMR-Probenköpfe mit der größten Mengenempfindlichkeit bestehen aus einer sehr kleinen 5- $\mu\text{L}$ -Flusszelle mit einem aktiven Volumen von nur 2.5  $\mu\text{L}$ .<sup>[12]</sup> Darüber hinaus ist eine weniger empfindliche 10- $\mu\text{L}$ -Version mit einem aktiven Volumen von ca. 5  $\mu\text{L}$  erhältlich. Die Flusszelle ist darin jeweils mit aus der Gaschromatographie bekannten Kapillaren aus Kieselglas oder Kapillarschlüuchen aus fluoriertem Ethylenpropylen (FEP) mit 75–100  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser verbunden, die als Ein- und Auslass dienen. Beim Beladen der Flusszelle wird die Probe entweder manuell mit einer Spritze oder automatisch durch ein Flüssigkeitstransportsystem in den Einlass injiziert. Der Einsatz eines Kapillarfluss-Systems hat viele Vorteile: Mit Flusszellen lassen sich in Mikrospulen etwas höhere Füllfaktoren erzielen als mit Probenröhrchen. Bei sehr engen Kapillaren tritt praktisch keine Durchmischung in Ein- und Auslass auf, sodass Probleme bei der Probenhandhabung (z.B. Peakverbreiterung und Probenübertrag) minimiert werden, die in größeren Fluss-Systemen häufig auftreten.<sup>[12]</sup> Ferner können Ein- und Auslass leicht an weitere Analyseinstrumente, etwa ein Kapillar-Flüssigchromatographie(LC)-Gerät, angeschlossen werden, was zu „online“ gekoppelten Anwendungen führt. Wichtiger ist aber noch, dass CapNMR-Spektroskopie kompatibel mit Standard-Titerplatten und Mikrolitergefäß ist und sich somit für die Hochdurchsatzanalyse von Verbindungsbibliotheken anbietet. CapNMR-Spektroskopie kann außerdem leicht mit HPLC, Kapillarelektrophorese (CE) oder Massenspektrometrie (MS) kombiniert werden.

## 2.2. Vergleich der Mengenempfindlichkeit

Im vorigen Abschnitt ist deutlich geworden, dass der Einsatz von CapNMR-Spektroskopie eine neuartige Probenvorbereitung und –zufuhr erfordert. An die Stelle eines NMR-Röhrchens aus Glas, in dem eine Lösung der Substanz in 200–600  $\mu\text{L}$  Solvens (je nach Probenkopf und Glasröhrchen) vorbereitet wird, tritt in der CapNMR-Spektroskopie eine Lösung der Substanz in nur 5–10  $\mu\text{L}$  Solvens, die möglichst verlustfrei – manuell mit einer Spritze oder automatisch mit einem Flüssigkeitstransportsystem – in den Probenkopf überführt werden muss. Will man die Nützlichkeit des Flusszellaufbaus von CapNMR-Spektroskopie mit der herkömmlicher Probenköpfe für NMR-Röhrchen vergleichen, sind diese Unterschiede zu berücksichtigen, insbesondere

wenn man die CapNMR-Spektroskopie mit manueller Injektion von Proben betrachtet, die auch in gewöhnlichen Probenköpfen analysiert werden könnten. Der Hauptgrund für den Einsatz von CapNMR-Spektroskopie wäre in diesem Fall die deutlich höhere Mengenempfindlichkeit.<sup>[12]</sup> Aber wie groß ist dieser Unterschied zu normalen 5-mm-Probenköpfen in der Praxis? Bei Verwendung solvensspezifischer NMR-Röhrchen mit abgestimmter Suszeptibilität (z.B. Shigemi-Röhrchen) in 5-mm-Probenköpfen resultiert bereits eine zwei- bis dreimal höhere Mengenempfindlichkeit. Um zu ermitteln, wie weit CapNMR-Spektroskopie die Empfindlichkeit über das mit Shigemi-Röhrchen mögliche Maß hinaus steigern kann, verglichen Gronquist et al. die Spektren, die sie mit beiden Probenkopfarten für Sucrose-Lösungen (10 mm) sowie einige Naturstoffextrakte erhielten.<sup>[18]</sup> Für eine Messreihe wurden eindimensionale <sup>1</sup>H-NMR-Spektren sowie zweidimensionale <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMQC- und <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMBC-Spektren<sup>[19]</sup> von 5 µL einer 10 mm Sucrose-Probelösung aufgenommen, die mit einer Spritze in den CapNMR-Probenkopf injiziert wurde. Für eine zweite Messreihe wurde dieselbe Sucrosemenge in dem Volumen an D<sub>2</sub>O gelöst, das für ein 5-mm-Shigemi-Röhrchen erforderlich ist; anschließend wurden entsprechende Spektren mit einem gewöhnlichen 5-mm-H{C,N}-Probenkopf am selben Spektrometer aufgenommen. Beim Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren zeigte das CapNMR-Spektrum ein ungefähr fünfmal besseres Signal-Rausch-Verhältnis (Abbildung 2). Zudem ist das HDO-Solvenssignal in der CapNMR-Messung um Größenordnungen kleiner als bei der Verwendung des 5-mm-Probenkopfes, dessen aktives Volumen 100-mal größer ist. Durch das kleinere Solvensignal konnte das CapNMR-Spektrum mit einer höheren Empfängerstärkung aufgenommen werden, was zu der beobachteten größeren Empfindlichkeit beitrug.

Besonders wichtig für die NMR-spektroskopische Charakterisierung niedermolekularer Verbindungen sind die indirekt detektierten C,H-Korrelationen HMQC, HSQC und HMBC. Wegen der geringen natürlichen Häufigkeit von <sup>13</sup>C ist die Empfindlichkeit dieser Experimente deutlich geringer als diejenige von H,H-Korrelationen, und unzureichende Signal-Rausch-Verhältnisse in HMQC/HSQC- und besonders in HMBC-Spektren verhindern oft letztlich die Strukturaufklärung niedermolekularer Verbindungen bei begrenzter Probenmenge. CapNMR-Probenköpfe sind oft mit Gradientenspulen ausgestattet, sodass die Aufnahme von HMQC- und HMBC-Spektren mit oder ohne Gradienten möglich ist. (Die Version ohne Gradienten ist gewöhnlich etwas empfindlicher.) Wie für die HMBC-Spektren ohne Gradienten in Abbildung 3 gezeigt ist, bringen CapNMR-Probenköpfe auch hier deutliche Empfindlichkeitsvorteile.<sup>[18]</sup> Die indirekt detektierten C,H-Korrelationen ohne Gradienten, in denen die Signale für Protonen an <sup>12</sup>C-Atomen durch Phasenzyklen unterdrückt werden, können die Empfindlichkeit gegenüber entsprechenden Spektren mit Gradienten steigern<sup>[20]</sup> (siehe auch Lit. [21]). Diese Spektren profitieren in besonderem Maße von den kleineren Solvenssignalen bei der Aufnahme mit CapNMR-Probenköpfen.

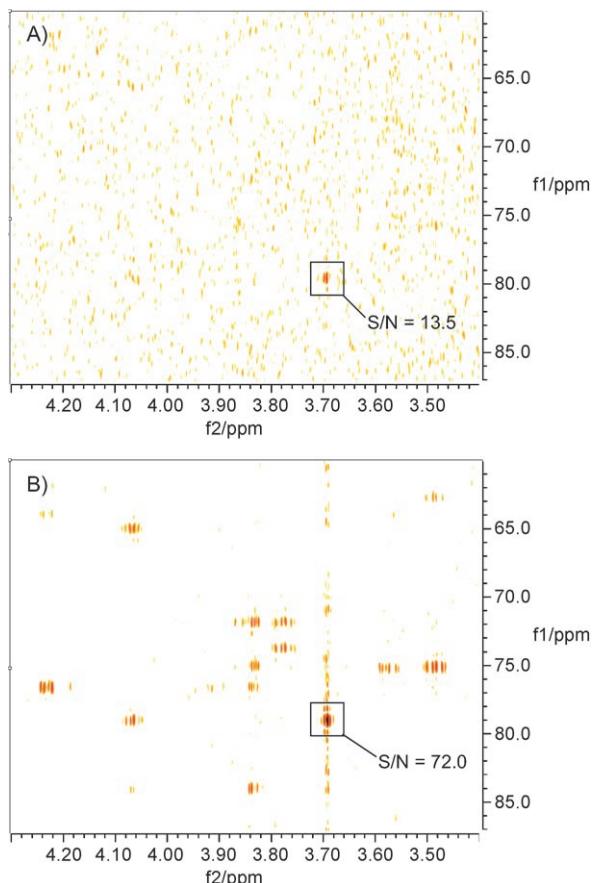


**Abbildung 2.** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren (je 1 Scan) für eine Lösung von Sucrose (17.2 µg) in A) D<sub>2</sub>O (260 µL) in einem Shigemi-Röhrchen in einem 5-mm-H{C,N}-Probenkopf; B) 5 µL D<sub>2</sub>O in einem 5-µL-CapNMR-Probenkopf. Die Signal-Rausch(S/N)-Verhältnisse wurden mit der VNMR-Software (Varian Inc.) ermittelt.

### 3. Eigenständige Anwendungen

#### 3.1. Offline-Charakterisierung niedermolekularer Verbindungen

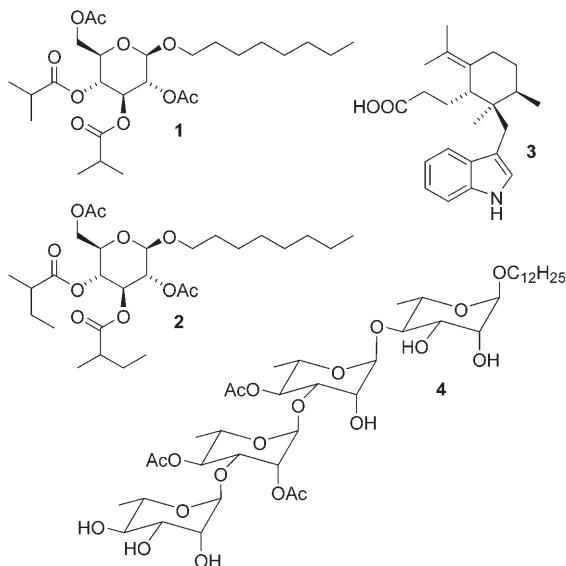
Nur wenige Beiträge beschreiben die Anwendung von NMR-Probenköpfen mit Mikrospulen für die Charakterisierung von niedermolekularen Verbindungen bei begrenzter Probenmenge, z. B. von wertvollen Naturstoffen oder anderen biologisch aktiven Materialien, die nicht in ausreichender Menge für eine Strukturbestimmung mit üblichen NMR-Probenköpfen erhalten werden können. Naturstoff-Forscher könnten jedoch stark von Mikrospulenprobenköpfen profitieren. Potenziell interessante Sekundärmetabolite vieler Organismen werden nur deswegen von der Naturstoffuntersuchung ausgeschlossen, weil sie in so geringen Mengen verfügbar sind, dass die Sammlung von ausreichendem Material für eine fundierte Identifizierung mit gewöhnlichen NMR-Spektroskopiemethoden als nicht möglich gilt. Die zögerliche Einführung von Mikrospulen-NMR-Techniken in der Naturstoff-Forschung könnte teilweise auf den Flusszellaufbau zurückzuführen sein, der eine sorgfältige Probenvorbereitung erforderlich macht und Chemiker abschreckt, die NMR-Röhrchen aus Glas gewohnt sind. Die manuelle Injektion<sup>[18,22]</sup> oder die automatische Zufuhr<sup>[23]</sup> einzelner Proben in CapNMR-Probenköpfe bereiten jedoch keinerlei Probleme. Zum



**Abbildung 3.** A)  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum (ohne Gradient) einer Lösung von Sucrose (17.2 µg) in  $\text{D}_2\text{O}$  (260 µL) in einem Shigemi-Röhrchen in einem 5-mm- $\text{H}[\text{C},\text{N}]$ -Probenkopf. B)  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum (ohne Gradient) einer Lösung von Sucrose (17.2 µg) in  $\text{D}_2\text{O}$  (5 µL) in einem 5-µL-CapNMR-Probenkopf. Die Gesamtaufnahmedauer für die Spektren betrug jeweils 14 h.<sup>[18]</sup> Die S/N-Verhältnisse wurden anhand von f2-Schnitten mit der VNMR-Software (Varian Inc.) ermittelt.

Beladen einer 5-µL-CapNMR-Flusszelle wird die Substanz in 5 µL deuteriertem Solvens gelöst und – mit einem Flüssigkeitstransportsystem oder einfach mit einer Spritze – in den Einlass überführt. Nach der Probe wird noch etwas deuteriertes Solvens injiziert, um die Probe durch den Einlass in die Flusszelle zu schieben. Das hierfür benötigte Solvensvolumen hängt von der Länge des Einlasses ab und wird bei der Installation des Probenkopfes anhand einer Testprobe ermittelt. Nach Abschluss der NMR-spektroskopischen Analyse wird die Probe einfach durch Injektion eines größeren Solvensvolumens (ca. 50 µL) aus dem Probenkopf gespült und aufgefangen. Diese Offline-Probeninjektion bietet eine gute Reproduzierbarkeit und kann routinemäßig zur Charakterisierung vieler in begrenzter Menge verfügbarer Proben angewendet werden. Allerdings müssen alle Proben vor der Injektion sorgfältig filtriert werden, um zu verhindern, dass unlösliche Verunreinigungen die Kapillaren verstopfen. Folgerichtig wird gewöhnlich ein Filtrationsschritt vorgeschaltet (übliche Filtergröße: 2 µm).

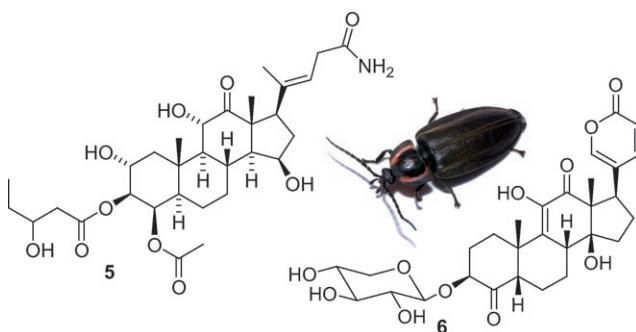
Bei der Identifizierung der beiden antibakteriellen Glycoside **1** und **2** gelang Hu und Mitarbeitern die erste Strukturaufklärung neuer Naturstoffe durch CapNMR-Spektro-



**Abbildung 4.** Pflanzliche Naturstoffe, die Hu und Mitarbeiter mithilfe von CapNMR-Spektroskopie identifizierten.

skopie (Abbildung 4).<sup>[24]</sup> Die Glycoside **1** und **2** wurden durch automatische Hochdurchsatzfraktionierung aus einer Bibliothek pflanzlicher Extrakte isoliert. Fraktionen mit antibakterieller Aktivität wurden nach der Fraktionierung durch CapNMR mit manueller Injektion offline charakterisiert. Auf ähnliche Weise wurden der antibakterielle pflanzliche Metabolit Suaveolindol<sup>[25]</sup> (**3**) und eine Gruppe teilweise acetylierter Oligorhamnoside<sup>[26]</sup> wie **4** mithilfe der CapNMR-Spektroskopie identifiziert. Die isolierte Menge an Glycosid **2** (70 µg) hätte sicherlich nicht für eine Charakterisierung durch gewöhnliche Techniken ausgereicht. Zwar wurden ausreichende Mengen an **1** und **3** für die Identifizierung in üblichen 5-mm-Probenköpfen isoliert, doch mit dem CapNMR-Probenkopf konnten die  $^{13}\text{C}$ -NMR-, gCOSY(gradient-selected COSY)-, HSQC- und HMBC-Spektren in viel kürzerer Zeit erhalten werden.

Gronquist et al. nutzten einen 5-µL-CapNMR-Probenkopf, um neuartige Steroide mit Pyroneilstrukturen aus einigen wenigen Exemplaren einer seltenen Glühwürmchen-Spezies zu charakterisieren.<sup>[18]</sup> Dabei wurden dreizehn neue Cardenolide und ähnliche Steroide entdeckt (z.B. **5** und **6**, Abbildung 5). Die Verbindungen wurden anhand von dqf-COSY(double quantum filtered COSY)-, NOESY-, HMQC- und HMBC-Routinespektren identifiziert. Dabei wurden HMBC-Spektren ohne Gradienten erhalten, die hinreichend gut zur Strukturaufklärung für Proben waren, die nicht mehr als 40 nmol Substanz enthielten. Ein direkter Vergleich von CapNMR-Spektren und Spektren, die mit Shigemi-Röhrchen in einem 5-mm- $\text{H}[\text{C},\text{N}]$ -Probenkopf gemessen wurden, ergab für CapNMR eine etwa dreimal höhere Empfindlichkeit. Die sehr hohe Qualität der Spektren (gute Linienform, wenige Artefakte) war für die spektroskopische Charakterisierung der Steroide entscheidend, da diese teilweise als Gemische von zwei oder drei Verbindungen vorlagen. Die beobachtete Steigerung um das Dreifache fällt allerdings deutlich geringer aus als die Empfindlichkeitszunahme bei den Experimenten



**Abbildung 5.** Steroide aus *Lucidota-atra*-Glühwürmchen, die mithilfe von CapNMR-Spektroskopie identifiziert wurden.

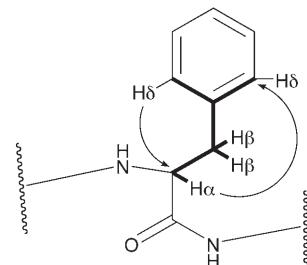
mit Sucrose in Abschnitt 2.2. Der Grund hierfür liegt in den Einzelheiten der Probenvorbereitung: Eine Probe kann nahezu verlustfrei in ein Shigemi-Röhrchen überführt werden, da man mehrfach aus dem Gefäß mit der Originalprobe in das relativ große Volumen des NMR-Röhrchens nachspülen kann. Bei der CapNMR-Spektroskopie bleibt hingegen unvermeidlich eine kleiner Probenanteil im Originalgefäß zurück, da die Probe in einer einzigen 5- $\mu\text{L}$ -Injektion überführt werden muss. Dennoch konnten mithilfe des CapNMR-Probenkopfes mindestens doppelt so viele Glühwürmchen-Cardenolide identifiziert werden wie bei der möglichen Verwendung eines Shigemi-Röhrchens in einem 5-mm-Probenkopf.

Außer zur Identifizierung neuer Naturstoffe eignet sich die Kapillar-NMR-Spektroskopie auch für die Dereplikation von Naturstoffbibliotheken, wie Hu et al. zeigten.<sup>[27]</sup> Da gewöhnlich bereits 10 nmol Substanz (5  $\mu\text{g}$  für eine Verbindung mit einer Molmasse von 500 g mol<sup>-1</sup>) für die Aufnahme von <sup>1</sup>H- sowie von <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY-Spektren genügen, können bekannte Naturstoffe auch dann leicht identifiziert werden, wenn sie nur in Spuren vorliegen. CapNMR-Probenköpfe sind darüber hinaus erfolgversprechend für die Identifizierung von bekannten Metaboliten in der Pharmakologie oder von synthetischen Verbindungen in der kombinatorischen Chemie (siehe Abschnitt 5).

### 3.2. Bestimmung von Proteinstrukturen

CapNMR-Probenköpfe sind schon seit einigen Jahren kommerziell erhältlich, doch ihr Nutzen für die Charakterisierung von Biomakromolekülen wurde erst kürzlich erkannt. Die vergleichsweise geringe Konzentrationsempfindlichkeit von Mikrospulenprobenköpfen spricht zunächst gegen ihre Anwendung zur Charakterisierung von Proteinen und Nucleinsäuren, da diese Biomakromoleküle generell in geringeren Konzentrationen gelöst sind als niedermolekulare organische Verbindungen. Im Jahr 2004 zeigten Peti et al. jedoch, dass Mikrospulenprobenköpfe auch Vorteile für die Bestimmung von Proteinstrukturen bieten.<sup>[22]</sup> Die NMR-spektroskopische Charakterisierung eines Proteins beginnt normalerweise mit der Zuordnung des Proteinrückgrats durch bewährte Tripelresonanzexperimente wie HNCOCA und HNCA.<sup>[28]</sup> Dem folgt die Aufnahme zusätzlicher Spektren,

um die aliphatischen und aromatischen Seitenketten zuzuordnen. Diese Zuordnung ist, besonders im Fall aromatischer Aminosäureseitenketten, weniger direkt als die Charakterisierung des Proteinrückgrats; sie ist zudem oft sehr zeitaufwändig, weil <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-NOESY-, <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY- und <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-TOCSY-Spektren interpretiert werden müssen, die stark verbreiterte Signale enthalten, sodass die Kreuzpeaks überlagert sind und nicht eindeutig zugeordnet werden können. Da die hydrophoben aromatischen Seitenketten entscheidend für die Proteinstabilität sind, besteht ein großes Interesse an besseren Methoden zu ihrer Charakterisierung. Peti et al. nutzten die außergewöhnlichen physikalischen Eigenchaften von Mikrospulenprobenköpfen, um die Zuordnung der Seitenketten enorm zu vereinfachen. Zusätzlich zu ihrer hohen Mengenempfindlichkeit zeichnen sich Mikrospulenprobenköpfe dank ihrer Solenoidspulen durch hervorragende Radiofrequenz(RF)-Eigenschaften aus, und schon eine sehr geringe Transmitterleistung ist ausreichend, um kurze 90-Grad-Pulse für Proton und Kohlenstoffatom zu erhalten. Diese Vorzüge der Mikrospulen ermöglichen zum ersten Mal die Zuordnung der aromatischen und aliphatischen Seitenketten eines vollständig <sup>13</sup>C-markierten Proteins anhand eines einzigen HCCH-TOCSY-Experiments (Abbildung 6). Mit



**Abbildung 6.** In einem wichtigen Schritt der NMR-spektroskopischen Charakterisierung von Proteinen werden die Atome  $\text{C}\alpha/\text{Ha}$  und  $\text{C}\beta/\text{H}\beta$  in aromatischen Aminosäuren mit den  $\text{H}\delta$ -Protonen des entsprechenden aromatischen Rings in Verbindung gebracht. Die HCCH-TOCSY-Korrelationen zwischen  $\text{H}\alpha$  und  $\text{C}\delta$  sowie  $\text{H}\delta$  und  $\text{C}\alpha$  in einem Phenylalaninrest sind gezeigt.<sup>[22]</sup>

herkömmlichen 5-mm-Probenköpfen können solche Spektren nicht aufgenommen werden, da eine Induktion des TOCSY-Transfers über den gesamten Bereich chemischer Verschiebungen für aromatische und aliphatische Kohlenstoffatome eine unerreichbar hohe RF-Leistung erfordern würde. Mit ihrer HCCH-TOCSY-Messung über den ganzen Bereich ordneten Peti et al. alle Seitenketten eines 9.7-kDa-Proteins zu; ihre Probe enthielt dabei lediglich 500  $\mu\text{g}$  Substanz. Auch die dreidimensionalen HNCO- und HNCOCA-Spektren für die Zuordnung des Rückgrats wurden mit einem CapNMR-Probenkopf erhalten.

Ein neueres Beispiel von Peti et al. beschreibt den Einsatz von Kapillar-NMR-Systemen in der Strukturgenomik.<sup>[29]</sup> Bei der Suche nach geeigneten Studienobjekten für eine röntgenkristallographische Strukturanalyse greifen Strukturbiologen zunehmend auf das NMR-spektroskopische Screening von Proteinbibliotheken zurück, um Proteine aufzuspüren, die auch in Lösung gefaltet sind. Zusammen mit Hoch-

durchsatzmethoden für die Expression und Reinigung von Proteinen können CapNMR-Techniken dazu beitragen, den Substanzbedarf bei strukturgenomischen Untersuchungen spürbar zu verringern. Anhand von  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -COSY-Spektren demonstrierten Peti et al. die Effizienz ihres miniaturisierten Ansatzes. Sie verglichen ihre Resultate für neun Maushomolog-Proteine mit solchen, die nach üblichen Methoden in größerem Maßstab erhalten wurden, wobei das CapNMR-Verfahren Strukturinformationen ähnlicher Qualität lieferte. Mithilfe der Kapillar-NMR-Spektroskopie gelingt also die Miniaturisierung von Strukturgenomik-Ansätzen ohne Verschlechterung der Datenqualität. Dies senkt die Kosten der Proteinsynthese deutlich, da beispielsweise 20-mal geringere Mengen an  $^{15}\text{N}$ -markierten Medien benötigt werden.

#### 4. Gekoppelte Techniken

Gegenüber früheren Durchfluss-NMR-Probenköpfen bieten Kapillarprobenköpfe klare Vorteile in Aufbau und Leistung, die eine direkte Kopplung mit verschiedenen Chromatographiemethoden ermöglichen („hyphenated“ techniques).<sup>[30]</sup> CapNMR-Probenköpfe eignen sich besonders gut für die Kombination mit Kapillartrennmethoden, die mit kompatiblen Flussgeschwindigkeiten arbeiten und deren Peakvolumina dem Volumen der Flusszelle nahekommen; diese Anforderung muss erfüllt sein, um die Mengenempfindlichkeit des Mikrospulenprobenkopfes zur Gänze zu nutzen. Die für Kapillartrennungen typischen höheren Konzentrationen für die Peaks ergeben eine zusätzliche Empfindlichkeitserhöhung gegenüber Trennungen in weiteren Röhrchen.<sup>[31]</sup> Durch die sehr niedrigen Flussgeschwindigkeiten in Kapillarsystemen verringert sich der Bedarf an deuterierten Solventien, was einerseits die Kosten senkt und andererseits eine Unterdrückung des Solvenssignals überflüssig macht. Die Kapillar-NMR-Spektroskopie wurde online mit Kapillar-HPLC (CapLC-NMR) gekoppelt, ebenso mit Kapillarelektrophoresetechniken wie der Kapillarisotachophorese (cITP-NMR)<sup>[32]</sup> und der Kapillarelektronchromatographie (CEC-NMR).<sup>[33]</sup>

##### 4.1. Kapillar-LC-NMR (CapLC-NMR)

Kapillar-HPLC ist das Trennverfahren, das am häufigsten mit CapNMR-Probenköpfen gekoppelt wurde, nicht zuletzt weil die HPLC sich als Methode der Wahl für vielfältige Trennungen erwiesen hat. Wie bei früheren LC-NMR-Verfahren<sup>[34,35]</sup> sind je nach Probenart und vorgegebenem Zeitrahmen verschiedene Vorgehensweisen denkbar. Im Continuous-flow-Modus (auch On-flow-Modus genannt) werden im Verlauf der Trennung kontinuierlich Transienten gesammelt. Die stete Zufuhr frisch polarisierter Kerne in die Flusszelle erhöht einerseits die Empfindlichkeit, da die Relaxationsintervalle in den Pulssequenzen verkürzt werden können, andererseits verbreitern sich die Linien mit zunehmender Flussgeschwindigkeit.<sup>[36]</sup> Da sich die Elutionsbanden der einzelnen Peaks nur kurz im aktiven Volumen der

Flusszelle aufhalten, werden nur relativ wenige Scans pro Komponente gesammelt, und folglich ist dieser Modus wenig empfindlich.<sup>[33]</sup> Die Empfindlichkeit kann durch geringe Flussgeschwindigkeiten<sup>[37]</sup> und größere Probenmengen verbessert werden, aber man stößt dabei schnell an eine Grenze, da sich dabei die Qualität der chromatographischen Trennung verschlechtert. Durch die hohe Mengenempfindlichkeit der CapNMR-Probenköpfe ist Continuous-flow-LC-NMR dennoch erwägenswert, wenn eine schnelle Analyse detaillierte Strukturinformationen liefern soll. Krucker et al. nutzten die Vorzüge von CapLC-NMR bei der Continuous-flow-Analyse von Naturstoffgemischen.<sup>[38]</sup> Sie trennten ein 200-nL-Aliquot, das jeweils ca. 1.3 µg von vier Tocopherol-Homologen enthielt, und identifizierten jede eluierte Fraktion einzeln anhand ihres  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums. (Hier ist anzumerken, dass zwei der Komponenten,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocopherol, nicht massenspektrometrisch unterschieden werden können.) Ein Vergleich mit klassischen HPLC-NMR-Experimenten derselben Autoren zeigte, dass das CapLC-NMR-System vergleichbar leistungsfähig ist, aber nur 1/200 der Probenmenge benötigt.<sup>[39]</sup>

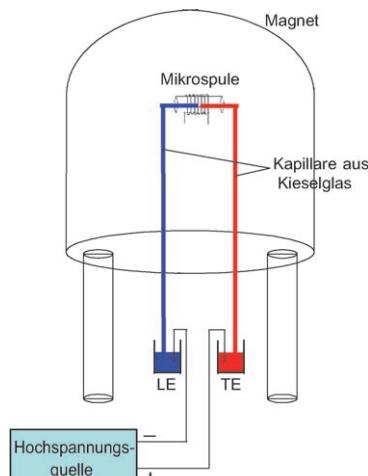
Die meisten Anwendungen mit begrenzter Probenmenge erfordern Aufnahmezeiten, die im Continuous-flow-Modus nicht erreichbar sind. Im Stopped-flow-Modus können Elutionsbanden ausgewählter Peaks dagegen in der Flusszelle festgehalten werden, sodass ein- oder zweidimensionale Spektren über längere Zeit aufgenommen werden können. Dies verbessert das Signal-Rausch-Verhältnis erheblich, andererseits dauert die gesamte Analyse naturgemäß länger. Ein direkt vor dem NMR-Probenkopf eingebauter UV/Vis-Detektor identifiziert die Fraktionen vor dem Eintritt in die Kapillarflusszelle, und die zeitliche Verzögerung bis zur korrekten Positionierung der Elutionsbanden des Analyten im aktiven Volumen der Flusszelle wird durch Kalibrieren ermittelt. Ein Continuous-flow-Aufbau mit nur 50–100 µm Innendurchmesser für den Ein- und Auslass der Flusszelle minimiert die Verdünnung der Probe durch Diffusion, während das kleine Probenvolumen und der vergleichsweise große Durchmesser der Flusszelle eine schnelle Äquilibrierung der Proben in der Flusszelle begünstigen.<sup>[12]</sup> Daher ist die Probendiffusion auch bei mehrstündigen Aufnahmen vernachlässigbar. Das Potenzial von Stopped-flow-CapLC-NMR-Spektroskopie wurde unlängst für die Analyse von Naturstoffen<sup>[40,41]</sup> und bei der Identifizierung von Metaboliten<sup>[42,43]</sup> mit begrenzten Probenmengen nachgewiesen. Außerdem kommt die Technik für die Verfolgung der Proteinphosphorylierung bei der zellulären Signalgebung in Betracht.<sup>[44]</sup>

Diese Beispiele zeigen die CapLC-NMR-Spektroskopie als vielversprechende Technik, mit der sich schnell detaillierte Strukturinformationen bei begrenzter Probenmenge erhalten lassen. Doch wie für die eigenständigen Anwendungen bereits angemerkt, zeigen sich die Vorzüge der CapLC-NMR-Spektroskopie gegenüber anderen NMR-Techniken erst dann in vollem Umfang, wenn wirklich wenig Substanz verfügbar ist. Vor kurzem erwies sich die CapLC-NMR-Spektroskopie beim Vergleich mit alternativen Methoden als effiziente Technik für die Unterscheidung diastereomerer Adamantan-Metabolite in einer Urinprobe.<sup>[41]</sup> Die Autoren machten aber auch auf Einschränkungen des CapLC-NMR-Systems aufmerksam, wie etwa die Beladungskapazität der Säule und

Schwierigkeiten beim Erfassen der Elutionsbanden einzelner Peaks für Stopped-flow-Messungen. Daher sind alternative Techniken vorzuziehen, solange die Probenmenge nicht ernstlich begrenzt ist. In diesen Fällen ist es vorteilhaft, die gewünschten Fraktionen in größerem Maßstab offline zu sammeln und anschließend manuell oder automatisch in den CapNMR-Probenkopf zu injizieren. Zwar handelte es sich bei den meisten bisherigen CapLC-NMR-Anwendungen um Machbarkeitsstudien, doch die Technik scheint gute Aussichten zu haben, sich als Routinemethode zu etablieren. Darauf deutet auch die Vermarktung eines CapLC-NMR-Komplettsystems mit automatischer Probenführung und integrierter Diodenanordnung für die UV/Vis-Detektion hin.<sup>[45]</sup>

#### 4.2. Kopplung von Kapillarelektrophorese und Kapillar-NMR-Spektroskopie (CE-NMR)

Die Kapillarelektrophorese und ihre vielfältigen Varianten haben sich zu wichtigen Trennmethoden entwickelt, die oft auch dann effizient sind, wenn die HPLC versagt.<sup>[46]</sup> Es sind bereits viele verschiedene Detektionsmethoden (z. B. UV/Vis-Spektroskopie, MS) mit kapillarelektrophoretischen Trennungen gekoppelt worden, doch die NMR-Spektroskopie blieb bislang wegen ihrer geringen Empfindlichkeit außen vor. Die NMR-Spektroskopie mit Mikrospulen bietet nun erstmals eine Möglichkeit, die Leistungsfähigkeit kapillarelektrophoretischer Trennverfahren mit der detaillierten Information zur Struktur und Dynamik von Molekülen aus NMR-Spektren zu verbinden.<sup>[14]</sup> Unter den bisher beschriebenen CE-NMR-Varianten mit Mikrospulen verspricht Kapillarisotachophorese-NMR-Spektroskopie (cITP-NMR) am meisten.<sup>[32]</sup> Die Kapillarisotachophorese (cITP) trennt und konzentriert geladene Spezies anhand ihrer elektrophoretischen Mobilitäten, indem eine hohe Spannung über eine Kapillare angelegt wird, die ein Zwei-Puffer-System aus einem Leitelektrolyten (leading electrolyte, LE) und einem Folgeeletrolyten (trailing electrolyte, TE; Abbildung 7) enthält. Unter optimalen Bedingungen steigert eine cITP-Trennung die Konzentration geladener Analyten um zwei bis drei Größenordnungen. Bei der Kopplung an Kapillar-NMR-Spektroskopie werden mithilfe der cITP einzelne Probenkomponenten genau im aktiven Volumen des Kapillarprobenkopfes platziert, um so den Mikrospulenaufbau bestmöglich zu nutzen. Durch diese Fokussierung der Probe können in der cITP-NMR-Spektroskopie Probenköpfe mit aktiven Volumina von zehn bis hundert Nanolitern eingesetzt werden. Diese zusätzliche Verstärkung macht cITP-NMR zu der NMR-Technik mit der bislang höchsten Mengenempfindlichkeit. Korir et al. demonstrierten das Potenzial der cITP-NMR für die Online-Trennung und -Analyse von nanomolaren Mengen bioaktiver niedermolekularer Verbindungen.<sup>[47]</sup> Dazu wurde eine Mischung mit jeweils 2.5 nmol von drei sulfatierten Heparin-Disacchariden getrennt, und jede Komponente wurde anhand eines <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums identifiziert, das aufgenommen wurde, während die Banden das aktive Volumen (25 nL) eines eigens entwickelten Mikrospulenprobenkopfes passierten.



**Abbildung 7.** Funktionsweise von cITP-NMR. Zum Fokussieren der geladenen Analyte wird eine hohe Spannung an eine Kapillare angelegt, die ein Zwei-Puffer-System enthält. Die Analytbanden werden beim Passieren des Mikrospulenprobenkopfes detektiert.<sup>[47,49]</sup>

Im Unterschied zur CapLC-NMR-Spektroskopie, die sich als Routineanalysemethode zu etablieren scheint, befindet sich die Kapillarelektrophorese-NMR-Spektroskopie (CE-NMR) noch in einem frühen Entwicklungsstadium. Die meisten Ergebnisse wurden mit speziell gebauten Probenköpfen erzielt, die oft modifizierte Kapillaren und sehr kleine aktive Volumina verwenden.<sup>[48,49]</sup> Erste vielversprechende Resultate deuten aber an, dass CE-NMR sich einmal als Methode der Wahl für bestimmte chemische, biochemische und Umweltanalysen durchsetzen könnte.

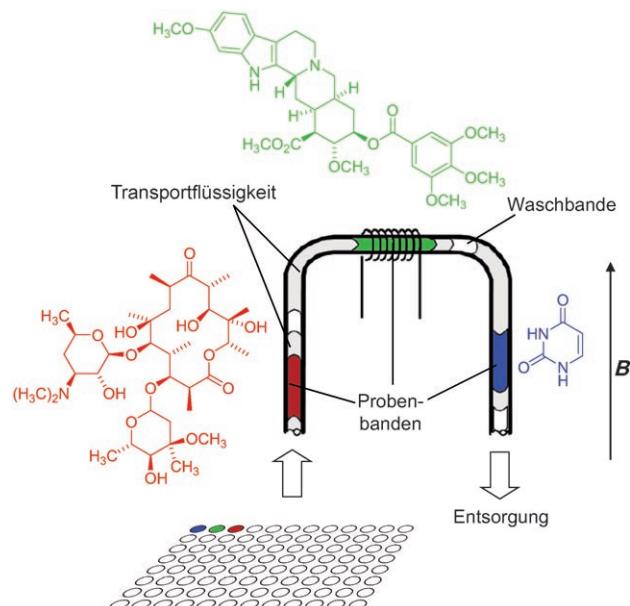
#### 5. Hochdurchsatz-Kapillar-NMR-Spektroskopie

Die Kapillar-NMR-Spektroskopie ist besonders aussichtsreich für Hochdurchsatzanwendungen wie die Analyse von Bibliotheken aus Naturstoffen oder synthetischen Verbindungen. Ein lange bekanntes Problem bei der Charakterisierung großer Bibliotheken ist das Fehlen eines universellen Detektors. Verschiedene Kombinationen von MS-, UV- und Verdampfungs-Lichtstreudetektoren (ELSD) wurden ausgiebig in Hochdurchsatzverfahren eingesetzt, doch diese Methoden sind entweder nur für bestimmte Substanzgruppen geeignet oder liefern nur wenig Strukturinformation. Für eine umfassende Charakterisierung von Naturstoffen und synthetischen Verbindungen aus Bibliotheken ist daher oft die detaillierte strukturelle und stereochemische Information aus zusätzlichen NMR-Spektren unverzichtbar.<sup>[50]</sup> NMR-Spektroskopietechniken wurden auch genutzt, um Bibliotheken aus niedermolekularen Verbindungen auf schwache Ligand-Protein-Wechselwirkungen zu durchsuchen, die über den Erfolg oder Misserfolg bei der Wirkstoffentwicklung entscheiden können, mit üblichen Fluoreszenztechniken aber schwer zu erkennen sind.<sup>[51–53]</sup> Zwar sind automatische Hochdurchsatz-NMR-Systeme nichts Neues,<sup>[54]</sup> doch die verbesserte Mengenempfindlichkeit von Kapillarprobenköpfen mit Mikrospulen eröffnet auf diesem Gebiet neue Perspek-

tiven, da Spektren schneller und mit kleineren Probenmengen aufgenommen werden können, wobei zudem deutlich weniger deuteriertes Solvens verbraucht wird. Als Durchfluss-Systeme sind Kapillarprobenköpfe gut für eine Automatisierung geeignet – sowohl online gekoppelt mit analytischen Trennverfahren als auch offline als eigenständige Analysegeräte. Der allgemeine Trend scheint zu Offline-Analysen zu gehen, die durch den Einsatz standardisierter Probenformate in komplementären Analyseverfahren erleichtert werden. Die einfache und stabile Feldkorrektion der Mikrosputulenanordnungen macht die gesamte Probenbearbeitung noch effizienter. Da die NMR-Spektroskopie schließlich eine zerstörungsfreie Methode ist, kann sie in Online-Analysen mit einem Fraktionensammler oder einer zusätzlichen Detektionstechnik, etwa MS, UV oder ELSD, gekoppelt werden, sodass komplementäre Strukturinformationen erhältlich sind.

Kürzlich wurden erste Versuche an Testbibliotheken mit Mikrosprulenprobenköpfen unterschiedlicher Systemkonfigurationen vorgenommen. Bailey und Marshall nutzten eine Continuous-flow-Methode für die schnelle Analyse einer Testbibliothek aus *p*-Hydroxybenzoësäureestern.<sup>[55]</sup> Die einzelnen Proben wurden nacheinander automatisch von einer 96er-Titerplatte geladen und als gleichmäßiger Probenstrom durch die Kapillarflusszelle gepumpt. Dabei wurden kontinuierlich Transienten aufgenommen und als Pseudo-2D-Daten gespeichert; aus diesen Dateien wurden Inkreme mente für die einzelnen Proben extrahiert und zu individuellen eindimensionalen Spektren vereinigt. Mit einer Substanzmenge pro Injektion von umgerechnet 3.4 µg lieferten diese <sup>1</sup>H-NMR-Spektren hinreichende Informationen, um die Strukturen zu bestätigen. Eine 96er-Titerplatte wurde in weniger als einer Stunde mit weniger als 4.0 mL deuteriertem Solvens durchgemustert.

Eine Alternative bietet eine Stopped-flow-Methode von Kautz et al., die auf einer Analyse mit segmentiertem Flüssigkeitsstrom (segmented flow analysis, SFA) beruht.<sup>[56]</sup> Die Verbindungen der Bibliothek werden hierfür einzeln injiziert, wobei die Probenbanden durch einen nicht mischbaren Fluorkohlenwasserstoff mit vergleichbarer Suszeptibilität als Transportflüssigkeit getrennt sind. Die einzelnen Proben werden beim Eintritt in die Flusszelle NMR-spektroskopisch erkannt und anschließend zur Aufnahme von Spektren gestoppt. Die Transportflüssigkeit dient zur Benetzung der Kapillarenwände, um die Adhäsion zu verringern und den daraus folgenden Übertrag und Probenverlust zu verhindern. Dadurch dass sich die Transportflüssigkeit nicht vermischt, begrenzt sie auch die Probenausbreitung, sodass Datensätze für zweidimensionale Spektren über mehrere Tage aufgenommen werden können. Das Potenzial der Technik zeigte sich bei der eindeutigen Identifizierung aller Mitglieder einer Testbibliothek mit strukturell so verschiedenen Verbindungen wie Reserpin, Erythromycin und Uracil (grüne, rote bzw. blaue Struktur in Abbildung 8). Die Substanzmengen lagen bei 10 µg pro Injektion, und die Analyse einer 96er-Titerplatte benötigte 3 h und 0.5 mL deuteriertes Solvens. Erst kürzlich wurde ein flexibles automatisches System vorgestellt, das sowohl einzelne Proben als auch ganze Bibliotheken auf 384er-Titerplatten verarbeitet.<sup>[23]</sup> Bei diesem computerge-



**Abbildung 8.** Funktionsweise der SFA-NMR-Spektroskopie.<sup>[56]</sup> Die Proben aus einer Bibliothek werden als getrennte 1- $\mu$ L-Banden eingebracht, die durch eine nicht mischbare Transportflüssigkeit voneinander getrennt sind. [D<sub>6</sub>]DMSO-Waschbanden mit 1% Trimethylsilylpropionat begrenzen den Probenübertrag und erleichtern die Detektion und Positionierung der Probenbanden.

steuerten System ist es jederzeit möglich, Einzelmessungen dringender Proben in die laufende Analyse einer Bibliothek einzuschlieben.

## **6. Zusammenfassung und Ausblick**

Die Einführung von Mikrospulenprobenköpfen wird die Anwendungsbreite der NMR-Spektroskopie, die bereits jetzt zu den wichtigsten Analysetechniken für Organiker und Biochemiker zählt, noch erweitern, da sie die Mengenempfindlichkeit erhöht und die Kombination mit nahezu jeder Chromatographietechnik ermöglicht. Wenn man bedenkt, wie grundlegend sich die Mikrospulentechnologie von der Technik üblicher NMR-Probenköpfe unterscheidet, so muss ihr Erfolg allerdings überraschen: Schon wenige Jahre nach ihrer Erfindung bietet sie eine ernstzunehmende Alternative zu Tieftemperaturprobenköpfen, und in vielen Fällen sind Mikrospulenanordnungen bei deutlich niedrigeren Kosten vergleichbar empfindlich. CapNMR-Probenköpfe können darüber hinaus schnell installiert und gegen herkömmliche 5- oder 3-mm-NMR-Probenköpfe ausgetauscht werden – anders als bei Tieftemperaturprobenköpfen muss also nicht ein Spektrometer eigens zu ihrer Anwendung abgestellt werden. Da die Technologie noch jung ist, sind weitere Verbesserungen der Empfindlichkeit und des apparativen Aufbaus zu erwarten. Interessierte Chemiker müssen sich zur Anwendung der Mikrospulen-NMR-Spektroskopie mit den Besonderheiten der Probenvorbereitung und –handhabung vertraut machen. Vor der Injektion der Probe ist eine sorgfältige Filtration erforderlich, und eine vollständige Überführung der

begrenzten Probenmenge in die Flusszelle gelingt nicht immer. Die Routineverfahren für manuelle und automatische Probeninjektion werden jedoch ständig verbessert. Hochdurchsatzverfahren in der kombinatorischen Chemie und der Naturstoffchemie sowie pharmakologische Anwendungen könnten von Probenköpfen mit zwei oder mehr Flusszellen profitieren.<sup>[57]</sup>

Mikrospulenprobenköpfe erscheinen derzeit besonders geeignet für die NMR-spektroskopische Untersuchung niedermolekularer Verbindungen. Ihr Nutzen für die Charakterisierung von Biomakromolekülen ist dadurch eingeschränkt, dass viele Proteine und Nucleinsäuren nicht in hinreichender Konzentration gelöst werden können; für solche Proben sind Tieftemperaturprobenköpfe weiterhin vorzuziehen. In jüngsten Studien von Peti et al. haben sich Mikrospulenprobenköpfe jedoch auch bei der Bestimmung von Proteinstrukturen bewährt, und manchmal kann ihr Einsatz sogar von entscheidendem Vorteil sein (siehe Abschnitt 3.2).

Auch einige weitere Vorteile miniaturisierter NMR-Probenköpfe dürfen nicht übersehen werden: Wegen der geringen Probenvolumina benötigen NMR-Probenköpfe mit Mikrospulen deutlich kleinere Bereiche mit homogenem Magnetfeld als übliche 5-mm-Probenköpfe. Daraus folgt die relativ einfache Feldkorrektion (Shimming) für Mikrospulenprobenköpfe, bei denen es gewöhnlich ausreicht, einige Shims erster Ordnung anzupassen. Wichtiger ist jedoch, dass einerseits durch die Entwicklung kleinerer Magnete Kosten gespart werden könnten und andererseits auch Magnete mit höherer Feldstärke oder aus alternativen Materialien, einschließlich Raumtemperatur-Supraleitern, denkbar sind. Die Einführung kleiner Magnete mit hohen Feldstärken für die hochauflösende NMR-Spektroskopie könnte die Größe von NMR-Spektrometern stark verringern und so letztlich auch zur Entwicklung von Instrumenten für die Laborbank führen.

Eingegangen am 8. Mai 2006

Online veröffentlicht am 22. September 2006

Übersetzt von Dr. Volker Jacob, Mannheim

- [1] R. R. Ernst, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 817; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 805.
- [2] A. E. Derome, *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon, New York, **1987**.
- [3] C. L. Putzig, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 26R.
- [4] M. E. Lacey, R. Subramanian, D. L. Olson, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3133.
- [5] D. I. Hoult, R. E. Richards, *J. Magn. Reson.* **1976**, *24*, 71.
- [6] A. Abraham, *The Principles of Nuclear Magnetism*, Clarendon Press, Oxford, **1961**.
- [7] P. L. Rinaldi, *Analyst* **2004**, *129*, 687.
- [8] D. J. Russell, C. E. Hadden, G. E. Martin, A. A. Gibson, A. P. Zens, J. L. Carolan, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1047.
- [9] M. Spraul, A. S. Freund, R. E. Nast, R. S. Withers, W. E. Maas, O. Corcoran, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1546.
- [10] A. G. Webb, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *31*, 1.
- [11] J. N. Shoolery, *Top. Carbon-13 NMR Spectrosc.* **1979**, *2*, 28.
- [12] D. L. Olson, J. A. Norcross, M. O'Neil-Johnson, P. F. Molitor, D. J. Detlefsen, A. G. Wilson, T. L. Peck, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2966.
- [13] N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3849.
- [14] N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7929.
- [15] T. L. Peck, R. L. Magin, P. C. Lauterbur, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, *108*, 114.
- [16] A. G. Webb, S. C. Grant, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1996**, *113*, 83.
- [17] D. L. Olson, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Science* **1995**, *270*, 1967.
- [18] M. Gronquist, J. Meinwald, T. Eisner, F. C. Schroeder, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10810.
- [19] Eine ausführliche Einführung in die zweidimensionale NMR-Spektroskopie und häufig in der NMR-Spektroskopie verwendete Abkürzungen: H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490.
- [20] R. Hurd, B. K. John, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 648.
- [21] P. L. Rinaldi, P. A. Keifer, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, *108*, 259.
- [22] W. Peti, J. Norcross, G. Eldridge, M. O'Neil-Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5873.
- [23] A. Jansma, T. Chuan, R. W. Albrecht, D. L. Olson, T. L. Peck, B. H. Geierstanger, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6509.
- [24] J.-F. Hu, H.-D. Yoo, C. T. Williams, E. Garo, P. A. Cremin, L. Zeng, H. C. Vervoort, C. M. Lee, S. M. Hart, M. G. Goering, M. O'Neil-Johnson, G. R. Eldridge, *Planta Med.* **2005**, *71*, 176.
- [25] H.-D. Yoo, P. A. Cremin, L. Zeng, E. Garo, C. T. Williams, C. M. Lee, M. G. Goering, M. O'Neil-Johnson, G. R. Eldridge, J.-F. Hu, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 122.
- [26] J.-F. Hu, E. Garo, G. W. Hough, M. G. Goering, M. O'Neil-Johnson, G. R. Eldridge, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 585.
- [27] J.-F. Hu, E. Garo, H.-D. Yoo, P. A. Cremin, L. Zeng, M. G. Goering, M. O'Neil-Johnson, G. R. Eldridge, *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 127.
- [28] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy*, Academic Press, San Diego, CA, **1996**.
- [29] W. Peti, R. Page, K. Moy, M. O'Neil-Johnson, I. A. Wilson, R. C. Stevens, K. Wüthrich, *J. Struct. Funct. Genomics* **2005**, *6*(4), 259.
- [30] D. A. Jayawickrama, J. V. Sweedler, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 819.
- [31] J. P. C. Vissers, *J. Chromatogr. A* **1999**, *856*, 117.
- [32] R. A. Kautz, M. E. Lacey, A. M. Wolters, F. Foret, A. G. Webb, B. L. Karger, J. V. Sweedler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3159.
- [33] E. Rapp, A. Jakob, A. B. Schefer, E. Bayer, K. Albert, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 1053.
- [34] V. Exarchou, M. Krucker, T. A. van Beek, J. Vervoort, I. P. Gerorthanassis, K. Albert, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 681.
- [35] S. H. Hansen, A. G. Jensen, C. Cornett, I. Bjornsdottir, S. Taylor, B. Wright, I. D. Wilson, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5235.
- [36] A. G. Webb, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 688.
- [37] M. Sandvoss in *Online NMR and Related Techniques* (Hrsg.: K. Albert), Wiley, Chichester, **2002**, S. 111.
- [38] M. Krucker, A. Lienau, K. Putzbach, M. D. Grynbaum, P. Schuler, K. Albert, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2623.
- [39] A. Lienau, T. Glaser, M. Krucker, D. Zeeb, F. Ley, F. Curro, K. Albert, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5192.
- [40] H. B. Xiao, M. Krucker, K. Putzbach, K. Albert, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 135.
- [41] P. Hentschel, M. D. Grynbaum, P. Molnar, K. Putzbach, J. Rehbein, J. Deli, K. Albert, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 285.
- [42] R. J. Lewis, M. A. Bernstein, S. J. Duncan, C. J. Sleigh, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 783.
- [43] M. Sandvoss, A. D. Roberts, I. M. Ismail, S. E. North, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 259.
- [44] P. Hentschel, M. Krucker, M. D. Grynbaum, K. Putzbach, R. Bischoff, K. Albert, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 747.
- [45] <http://www.bruker-biospin.de/NMR/hyphenation/caplc.html>.
- [46] L. DeFrancesco, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 497A.

- [47] A. K. Korir, V. K. Almeida, D. S. Malkin, C. K. Larive, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5998.
- [48] A. M. Wolters, D. A. Jayawickrama, J. V. Sweedler, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 162.
- [49] V. K. Almeida, C. K. Larive, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 755.
- [50] D. Raftery, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1403.
- [51] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531.
- [52] A. D. Chen, M. J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 414.
- [53] A. H. Siriwardena, F. Tian, S. Noble, J. H. Prestegard, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3454.
- [54] P. A. Keifer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 388.
- [55] N. J. C. Bailey, I. R. Marshall, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3947.
- [56] R. A. Kautz, W. K. Goetzinger, B. L. Karger, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 14.
- [57] M. A. Macnaughtan, T. Hou, J. Xu, D. Raftery, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5116.



**Erlebnis Wissenschaft**  
... für alle die mehr wissen wollen



Peter Häußler  
**Donnerwetter – Physik**



John Emsley  
**Sonne, Sex und Schokolade**  
Mehr Chemie im Alltag

\*Der Euro-Preis gilt nur in Deutschland

Unsere Bestseller als Jubiläumsausgabe für nur  
**€ 12,50/sFr 20,-\***



Häußler, P.  
**Donnerwetter – Physik!**  
Physik – mal anders ...  
2006, VIII, 552 S., 196 Abb., 11 Tab. Broschur.  
€ 12,50/sFr 20,-. ISBN 3-527-31644-2

Als ich das Buch „Donnerwetter – Physik“ las, fragte ich mich, warum ich in der Schule so wenig im Physikunterricht verstanden habe. Der Autor schafft es mit leichter, anschaulicher Sprache, schwierige Sachverhalte so zu erläutern, dass auch Physikundige plötzlich verstehen, wie die Welt funktioniert.

Emsley, J.  
**Sonne, Sex und Schokolade**  
Mehr Chemie im Alltag  
2006, XIV, 288 S., 7 Tab. Broschur.  
€ 12,50/sFr 20,-. ISBN 3-527-30790-7

Entdecken Sie, warum Schokolade uns glücklich macht, was im Körper passiert, wenn Männer von der Liebe träumen, welche Geheimnisse Coca-Cola in sich birgt und ob Mozarts Tod nicht ein ärztlicher Kunstfehler war.



**WILEY-VCH**  
WILEY-VCH · Postfach 101161 · D-69451 Weinheim  
Fax: +49 (0) 6201-60 61 84 · service@wiley-vch.de

**10 JAHRE**  
Erlebnis Wissenschaft  
[www.wiley-vch.de/erlebnis-wissenschaft](http://www.wiley-vch.de/erlebnis-wissenschaft)