

NMR- Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR von engl. nuclear magnetic resonance = Kernmagnetische Resonanz) ist eine spektroskopische Methode, die auf der magnetischen Wechselwirkung von Atomkernen miteinander, mit der Elektronenhülle des Moleküls und mit äußeren Magnetfeldern beruht.

Dabei sorgt man durch ein sehr starkes äußeres Magnetfeld dafür, dass sich z.B. die Wasserstoffatome einer Probe (beispielsweise Blutserum oder Plasma) in diesem Feld ausrichten. Stört man die Ausrichtung durch die Einstrahlung von Radiowellen, so erhält man aus dem Abklingen dieser Störung vielfältige Informationen (Anzahl der Kerne, ihre Umgebung, in welchen chem. Verbindungen sie sitzen, uvam.).

Dies birgt viele nicht zu unterschätzende Vorteile. Zum einen ist das Hantieren mit Chemikalien nicht mehr erforderlich. Zum anderen ist die Methode dadurch einfach anzuwenden, schnell und genau.

All diese Vorteile haben sich in den letzten Jahren in der explosionsartigen Verbreitung von Kernspintomographen in der Medizin, die nahezu die gleiche Technologie verwenden, manifestiert.

Auch im Bereich der Labordiagnostik werden NMR-Techniken zunehmend erfolgreich eingesetzt, und es ist zu erwarten, dass diese die in diesem Bereich noch dominierenden chemischen Verfahren mittelfristig zurückdrängen werden, da zum einen viele tausend chemische Bestandteile einer Lösung identifiziert werden können, zum anderen sämtliche arbeitsintensiven und fehleranfälligen labortechnischen Schritte im Vorfeld der Analyse entfallen. Auch wird die zu untersuchende Probe durch keinerlei Zugabe von anderweitigen Substanzen verunreinigt, sondern steht nach einer Messzeit von nur ca. 3 Minuten völlig unverändert wieder zur Verfügung.

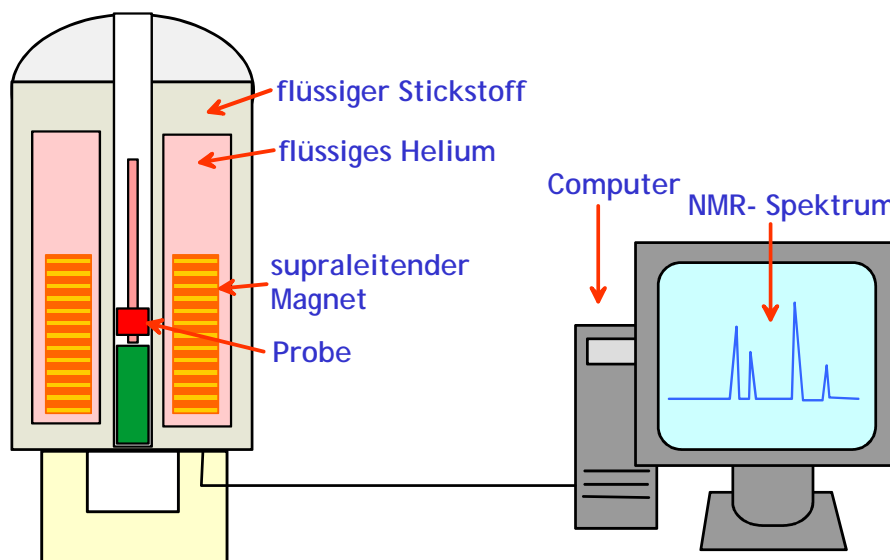


Abbildung 1: Aufbau eines heliumgekühlten NMR- Spektrometers: Nur mit Hilfe supraleitender Magneten ist es möglich, Magnetfeldstärken wie sie für die NMR benötigt werden zu erzeugen. Um diese weltweit stärksten Felder für technische Anwendungen zu generieren, wird supraleitendes Material mit Hilfe von flüssigem Helium bis nahe an den absoluten Nullpunkt (-273°C) abgekühlt.

Im medizinischen Bereich ist es mit Hilfe der NMR möglich, die komplette Verteilung Cholesterin- und triglyceridhaltiger Partikel in menschlichem Blut aufgeschlüsselt nach ihrer Größe und Dichte zu ermitteln. Dies kann sehr günstig und mit hoher Genauigkeit geschehen. Für diese Messungen werden nur geringe Probenmengen (0,5 ml) benötigt, die zudem (auf Wunsch) nach der Messung weiter unverändert zur Verfügung stehen.

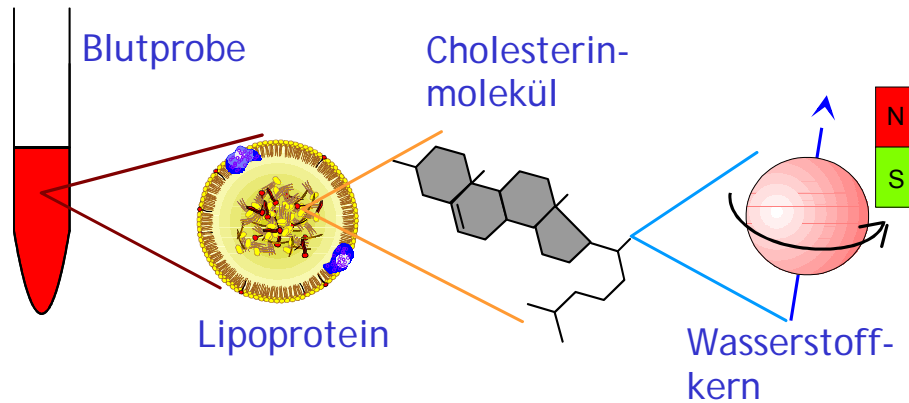


Abbildung 2: Informationsgewinnung mittels NMR: In jeder biologischen Probe, in jeder körpereigenen Substanz, befinden sich unzählige Wasserstoffatome. Diese Wasserstoffatome erfahren, je nach ihrer direkten Umgebung, einen leicht verschiedenen Einfluß des starken äußeren Magnetfelds, das bei NMR-Messungen anliegt. Damit ist es möglich viele tausend Substanzen zu unterscheiden, oder auch ob Cholesterinmoleküle in einem grossen LDL-Partikel gebunden sind, oder einem kleinen.

NMR in Biologie und Medizin

Durch ihren hohen Informationsgehalt pro Messung wird die NMR heute für vielfältige Aufgaben routinemäßig verwendet:

Analytische Chemie:

Zum zerstörungsfreien Nachweis von Inhaltsstoffen einer Probe.

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist eine der wichtigsten und am weit verbreitetsten Methoden der Spektroskopie. Ihre ausgezeichneten selektiven Eigenschaften in der Strukturanalytik haben sie in fast jedem chemisch forschenden Labor unabkömmlich gemacht. Darüber hinaus finden die hochauflösenden ^1H - und ^{13}C -NMR immer mehr Anwendung in der quantitativen Analytik. Typische Anwendungen der quantitativen NMR in der analytischen Chemie sind: Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen in mol mol⁻¹, Bestimmung von Stoffmengenanteilen in mol/mol %, Reinheitsanalyse in g/g % und Gehaltsanalyse in mg g⁻¹.

Strukturchemie:

Zur Bestimmung von Molekülstrukturen (organische Chemie oder Biochemie).

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ist es möglich, die hochaufgelöste dreidimensionale Struktur von Makromolekülen zu bestimmen. Hierzu werden Abstände zwischen Protonen auf 0,2- 0,5 nm genau bestimmt. Weiter fließen dihedrale Winkel und die relativen Orientierungen von chemischen Bindungen ein. Außerdem können Wechselwirkungen von Biomolekülen auf molekularer Ebene untersucht werden.

Die Strukturaufklärung mittels NMR analysiert die Moleküle direkt in Lösung. Es muss daher nicht befürchtet werden, dass die erhaltenen Strukturen durch die Einbettung in ein Kristallgitter und die dadurch zusätzlich auf das Molekül einwirkenden Kräfte verfälscht sind.

Physik und Technik:

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Atomen (Kern-Kern-Wechselwirkungen).
Zur Untersuchung der magnetischen Feldverteilung in Festkörpern.
Zur Qualitätskontrolle bei Werkstoffen.

NMR ist als diagnostisches Verfahren in der Medizin und als Verfahren der molekularen Strukturanalytik in der Chemie etabliert. Dort wird das Objekt im Zentrum eines großen Magneten mit Hochfrequenz untersucht.

In den vergangenen Jahren wurden neue NMR-Geräte entwickelt, die klein und transportabel sind, und zur Untersuchung auf das Objekt aufgelegt werden. Hierdurch wird nicht nur die Untersuchung vor Ort ermöglicht, sondern es ergeben sich gleichzeitig viele neue Möglichkeiten zur zerstörungsfreien Prüfung organischer Werkstoffe und Produkte.

Insbesondere können Materialheterogenitäten und Veränderungen bei Belastungstests und im Betrieb erfasst werden, wobei die Messparameter die molekularen und morphologischen Eigenschaften von Kunststoffen charakterisieren. Ebenso sind diese Geräte geeignet z. B. zur Bestimmung von stofflicher Dichte und Netzwerkichte in Gummiprodukten, zur Zustandsbewertung von Polyethylenrohren, zur Untersuchung von Gemälden alter Meister, Mumien und alten Büchern, und zur Verfolgung des Heilungsprozesses bei Hautverbrennungen.

Medizin:

„Bildgebung“ oder „Imaging“:

Zur Untersuchung der Dichteverteilung einer Atomsorte in einem Körper (z.B. Kernspintomographie, Magnetresonanztomographie).

Magnetresonanztomographie (MR, MRT; Tomographie von griech. τόμος „Schnitt, abgeschnittenes Stück“ und γράφειν „ritzen, malen, schreiben“) ist ein bildgebendes Verfahren zur Darstellung der Gewebestrukturen im Körperinneren. Mit einer MRT kann man Schnittbilder des menschlichen (oder tierischen) Körpers erzeugen, die einen Vergleich und eine Orientierung an anatomischen Schnitten derselben Region zulassen und oft eine sehr gute Beurteilung der Organe und vieler Organveränderungen erlauben.

Bei Magnetresonanztomographie werden sehr starke magnetische Felder erzeugt, die sich auf ganz gewisse Weise ändern müssen. Empfangen werden extrem schwache elektromagnetische Wellen im Frequenzbereich der Ultrakurzwelle, die von den Atomkernen (meist Wasserstoff) im untersuchten Körper ausgesendet werden. Hauptsächliche Grundlage für den Bildkontrast sind unterschiedliche Relaxationszeiten in verschiedenen Gewebearten. Daneben tragen auch unterschiedliche Gehalte an Wasserstoff-Atomen in unterschiedlichen Geweben (z. B. Muskel, Knochen) zum Bildkontrast bei.

Funktionsprinzip der NMR- einfache Darstellung

Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments eines Atomkerns mit einem äußeren magnetischen Feld. Die Ursache für dieses magnetische Moment ist der quantenmechanische Eigendrehimpuls (Spin), den einige Atomkerne haben. Dies wird leicht verständlich, wenn man sich den Kern als ein geladenes Teilchen vorstellt, das um seine Achse rotiert und daher einen kleinen elektrischen Strom darstellt. Wegen dieses Stroms verhält sich der Atomkern wie ein kleiner Elektromagnet.

Dieses Bild entspricht natürlich einer klassischen Vorstellung, die in der Realität falsch ist. Die quantenmechanische Eigenschaft "Spin" bedeutet nicht, dass der Atomkern um seine Achse rotiert. Trotzdem hat das gewählte Bild wegen seiner Einfachheit einen großen anschaulichen Wert, und wird deshalb hier herangezogen. Die exakte theoretische Beschreibung der NMR- Spektroskopie setzt eine quantenmechanische Behandlung voraus, die jedoch den Rahmen dieser kurzen Einführung bei weitem sprengen würde.

Wir bleiben deshalb bei dem gewählten klassischen Bild, und stellen uns den Atomkern als einen kleinen, rotierenden Kreisel vor (vgl. **Abbildung 3**).

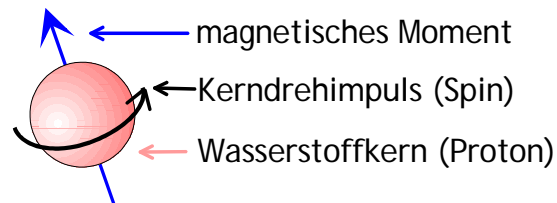


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Kernspins: Neben dem Wasserstoffkern besitzen noch viele andere Atomkerne eine physikalische Eigenschaft, die als Kerndrehimpuls (Spin) bezeichnet wird. Dieser Spin sorgt dafür, dass sich diese Atome wie winzige Kreisel verhalten, die zusätzlich in ihrer Kreiselachse ein kleines magnetisches Moment besitzen.

Der wichtigste Atomkern für die NMR- Spektroskopie ist das Proton, der Kern des Wasserstoffs, der in praktisch allen organischen Verbindungen in großer Zahl vorkommt. Daneben gibt es aber noch andere magnetisch aktive Kerne, von denen ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P für die NMR an Biomolekülen wichtig sind.

Wird organische Materie (Biomoleküle) nun einem starken Magnetfeld ausgesetzt, versuchen die Wasserstoffkerne (Protonen) sich in diesem Feld auszurichten. Da sie einen Spin besitzen ist Ihnen dies aufgrund quantenmechanischer Phänomene nur in zwei Richtungen (der Physiker spricht hier von Zuständen) erlaubt (**Abbildung 4**).

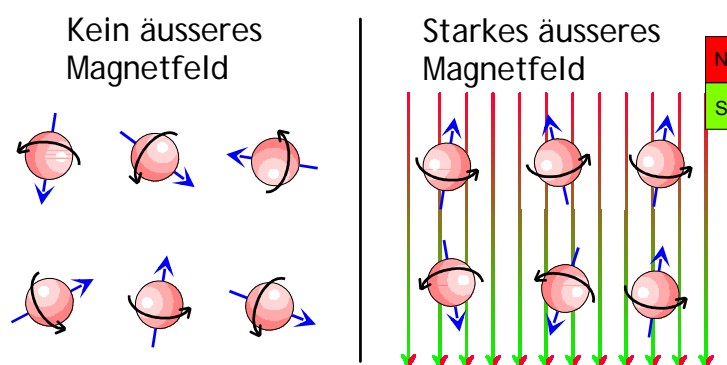


Abbildung 4: Verhalten der Protonenspins im Magnetfeld: Aufgrund ihres magnetischen Moments richten sich z.B. Wasserstoffatome (Protonen) in einem starken externen Magnetfeld aus. Quantenmechanische Gesetzmäßigkeiten erlauben ihnen dabei nur eine Ausrichtung parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld.

Dieser „Wille“ zur Ausrichtung, zusammen mit dem Eigendrehimpuls (Spin) der Kerne und den geltenden quantenmechanischen Gesetzen, zwingen die Kerne nun dazu mit ihrem magnetischen Moment um die Achse des äußeren Feldes zu taumeln (präzedieren), wie ein Kreisel im Magnetfeld der Erde. Die Geschwindigkeit mit der sie das tun (Lamorfrequenz) hängt direkt von der Stärke des äußeren Feldes ab.

In ihrem Mikrokosmos werden die Kerne nun aber ebenfalls magnetisch von Ihren atomaren Nachbarn beeinflusst. Das heißt, das Magnetfeld, das jeder einzelne Kern "sieht" ist je nach seiner Lage und Umgebung unterschiedlich. Diese Beeinflussung ist gering, aber mit modernen Geräten sehr gut messbar. Diese geringen Unterschiede sind es, die es der NMR erlauben, quasi den direkten Blick in das Innerste der Materie zu werfen und herauszufinden, wie die unmittelbare Umgebung eines Atomkerns beschaffen ist. Dadurch lassen sich zum Beispiel die räumlichen Strukturen von Proteinen in atomarer Auflösung aufklären.

Um NMR Messungen durchzuführen sendet man auf die Probe einen kurzen Puls elektromagnetischer Wellen (Radiowellen) mit der Lamorfrequenz. Diese eingestrahlte Energie stört nun die um das externe magnetische Feld präzedierenden Wasserstoffkerne.

Viele von ihnen werden praktisch in den zweiten erlaubten Zustand „geschüttelt“. Nach Abschalten der Radiowelleneinstrahlung kehren die Protonen dann wieder innerhalb weniger Sekunden in ihre Gleichgewichtsverteilung zurück (vgl. **Abbildung 5**). Die magnetischen Momente von Abermilliarden in ihre Gleichgewichtslage zurücktaumelnden Protonen addieren sich zu einem gut messbaren Signal, das Auskunft über die Anzahl der Kerne, ihre chemische Umgebung und viele weitere Informationen liefert.

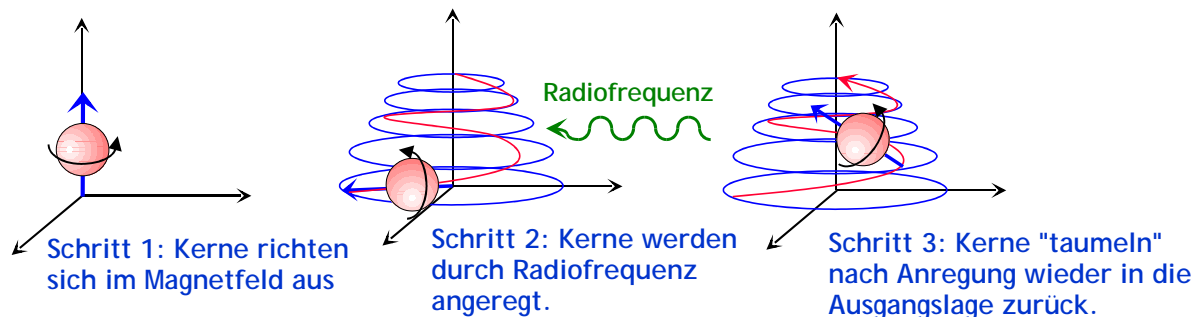


Abbildung 5: Prinzip einer NMR- Messung: Werden die, durch das äußere Magnetfeld ausgerichteten, Atomkerne nun einer geeigneten Radiofrequenz ausgesetzt, wird Ihre Ausrichtung gestört. Nach dem Abschalten der Radiofrequenz brauchen die Atomkerne nun eine gewisse Zeit (ca. 1 sec) um in ihre Gleichgewichtslage zurückzukehren. Während dieser Zeit senden sie nun ihrerseits ein charakteristisches Radiosignal aus, das aufgezeichnet werden kann, und mit dessen Hilfe die Atome und ihre Umgebung identifiziert werden können.

Historische Entwicklung der NMR

Die NMR wurde 1946 unabhängig von **Felix Bloch** und **Edward Mills Purcell** beschrieben, wofür sie 1952 den Nobelpreis für Physik bekamen:

In einem homogenen Magnetfeld spalten die Energieniveaus des Kernspins in mehrere Zustände auf. Zwischen ihnen kann ein Übergang induziert werden, wenn man Radiowellen mit einer Frequenz einstrahlt, die dem Energieunterschied der Zustände entspricht.

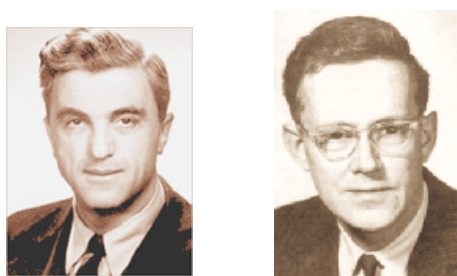


Abbildung 6: Felix Bloch (links) und Edward M.Purcell

Die Entwicklung der NMR als Untersuchungsmethode der analytischen Chemie und Biochemie verlief weitgehend parallel zur Entwicklung der elektromagnetischen Technik. Purcell war im Zweiten Weltkrieg an der Entwicklung des Radars am MIT beteiligt und forschte insbesondere an der Detektion von elektromagnetischer Energie und deren Absorption durch Materie. Diese Arbeiten halfen später, die Hintergründe der NMR besser zu verstehen.

In den nächsten Jahrzehnten wurde hauptsächlich die CW-Methode (continuous wave) benutzt, indem entweder in einem äußeren festen Magnetfeld ein Hochfrequenzfeld eingestrahlt wurde, deren Frequenz einen bestimmten Bereich durchlief, wodurch die einzelnen Resonanzen durchfahren wurden (frequency sweep) oder die Frequenz des

eingestrahlten Feldes konstant gehalten wurden und das Magnetfeld variiert wurde (field sweep). Diese Technik war durch ihr schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis gekennzeichnet.

Durch Mittelung kann allerdings das Signal-Rausch-Verhältnis wesentlich verbessert werden. Später ermöglichte der Einsatz der Fourier-Transformation-NMR, mit der gleichzeitig viele Resonanzfrequenzen analytisch zugänglich wurden, eine schnellere Aufnahme der Spektren.

Dieses Verfahren (FT-NMR) wurde zuerst von **Richard R. Ernst** verwendet. In das externe Magnetfeld wird ein möglichst kurzer elektromagnetischer Puls eingestrahlt. Je kürzer der Puls ist, desto mehr Frequenzanteile sind darin enthalten und können damit angeregt werden. Mittels Detektoren wird dann das Abklingen dieser angeregten Zustände aufgenommen. Nach Transformation dieses Zeit-Signals in die Frequenzdomäne sind die Frequenzen der angeregten Zustände zugänglich.

Die Verwendung von unterschiedlichen Pulsformen, Frequenzen und Dauern ermöglicht dieser Technik eine große Flexibilität.

Später wurde dieses Verfahren durch die Verwendung mehrerer Pulse hintereinander zu einer zweidimensionalen und höherdimensionalen NMR ausgebaut. Diese Zeitintervalle ermöglichen unter anderem einen Transfer von Magnetisierung zwischen Atomkernen. Damit können die Kern-Kern-Wechselwirkungen untersucht werden.

Kurt Wüthrich, Ad Bax, Vladimir Sklenar und viele andere bauten diese 2D- und Multi-Dimensions- NMR zu einer mächtigen Analysetechnik der Biochemie aus, insbesondere zur Analyse von Biopolymeren wie Proteinen. Wüthrich bekam für diese Arbeiten 2002 den Nobelpreis in Chemie. Diese Technik wird als Ergänzung der Röntgenstrukturanalyse eingesetzt, da NMR besonders bei Biomolekülen in flüssiger oder flüssig-kristalliner Form eingesetzt werden kann, während die Röntgenstrukturanalyse nur für kristalline Materialien geeignet ist.



Abbildung 7: Richard Ernst (links) und Kurt Wüthrich

Da die Stärke des NMR-Signals und die Detektionsmöglichkeiten (das Signal/ Rausch-Verhältnis verbessert sich) mit der Stärke des Magnetfeld steigt, begünstigte diese Technik die Entwicklung von sehr starken Magneten, momentan bis zu 900 MHz.

Unter dem Namen Magnetresonanztomografie wird die Kernspinresonanz als bildgebendes Verfahren in der Medizin angewandt.