

Hintergrundinformationen zur Kernspinresonanzspektroskopie

NMR: Kernspinresonanz

Die Kernspinresonanz (NMR = engl.: nuclear magnetic resonance), auch (magnetische) Kernresonanz oder kernmagnetische Resonanz genannt, ist ein physikalisches Phänomen, das auf der magnetischen Wechselwirkung von Atomkernen miteinander, mit der Elektronenhülle des Moleküls und mit äußeren Magnetfeldern beruht. Genutzt wird die NMR in der Medizin und zahlreichen naturwissenschaftlichen und technischen Anwendungsfeldern.

Kernspinresonanzspektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) ist inzwischen eine der wichtigsten und weit verbreitetsten Methoden der Spektroskopie. Sie erlaubt die zerstörungsfreie Analyse von sowohl organischen als auch anorganischen Substanzen mit Nachweisgrenzen i.d.R. im ppm-Bereich. Ein sehr starkes und homogenes äußeres Magnetfeld sorgt dafür, dass sich die NMR-aktiven Atomkerne der Probe in diesem Feld ausrichten. Stört man diese Ausrichtung durch die Einstrahlung von Radiowellen, erfasst daraufhin messtechnisch das Abklingen dieser Störung und bereitet diese Daten computergestützt auf, so erhält man ein NMR-Spektrum (siehe Abbildung 1). Dieses Spektrum enthält Informationen über Stoffmenge und chemische Struktur aller organischen Substanzen in der Probe. Jede Substanz kann einem oder mehreren Signalen, sogenannten „Peaks“ zugeordnet werden. Die Fläche unter diesen Peaks ist proportional zur Stoffmenge und deren Positionen im Spektrum sind charakteristisch für die chemische Struktur der Substanz. Die Kernspinresonanzspektroskopie kann auf diese Weise vielfältige Informationen zur Konzentration und Struktur aber auch zur Molekül-Dynamik und zu Molekül-Molekül-Wechselwirkungen liefern.

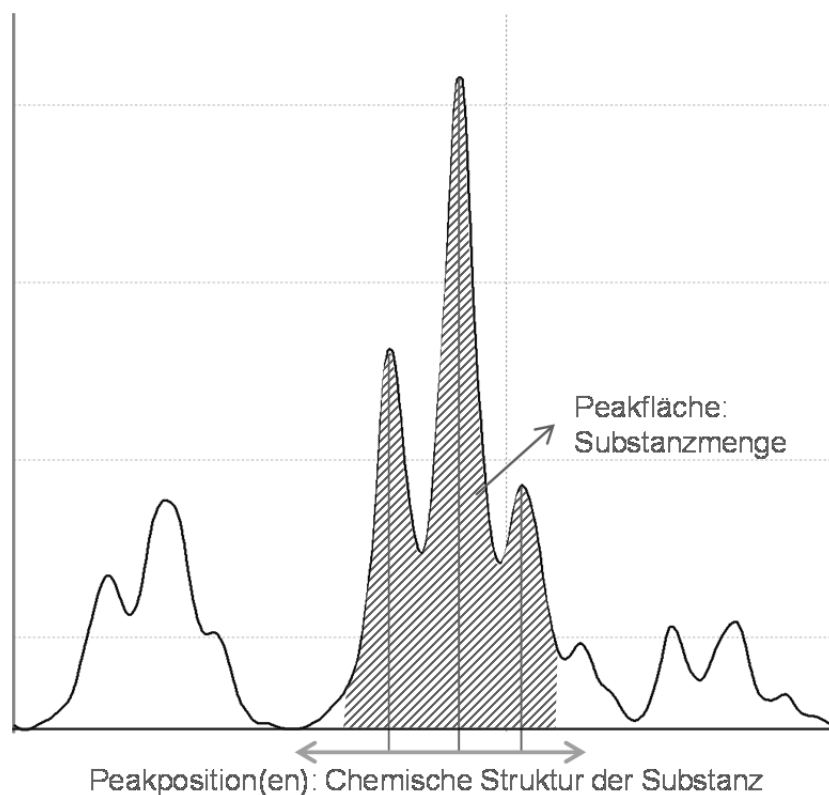


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines NMR-Spektrums (Ausschnitt). Die Fläche unterhalb der Peaks hängt von der Substanzmenge ab. Die Position der Peaks ist durch die chemische Struktur einer Substanz bestimmt.

Hintergrundinformationen zur Kernspinresonanzspektroskopie

Die Eigenschaften der NMR-Spektroskopie bergen viele entscheidende Vorteile. Zum einen sind arbeitsintensive und fehleranfällige labortechnische Schritte im Vorfeld der Analyse (=Präanalytik) in der Regel nicht erforderlich. Dadurch entfällt das Hantieren mit Chemikalien. Zum anderen werden alle organischen Substanzen in einer einzigen Messung erfasst. Schließlich kann die zu untersuchende Probe nach einer Messzeit von wenigen Minuten nahezu unverändert für andere Analysen zur Verfügung stehen. Die Methode ist folglich schnell, einfach anzuwenden, und sehr gut reproduzierbar.

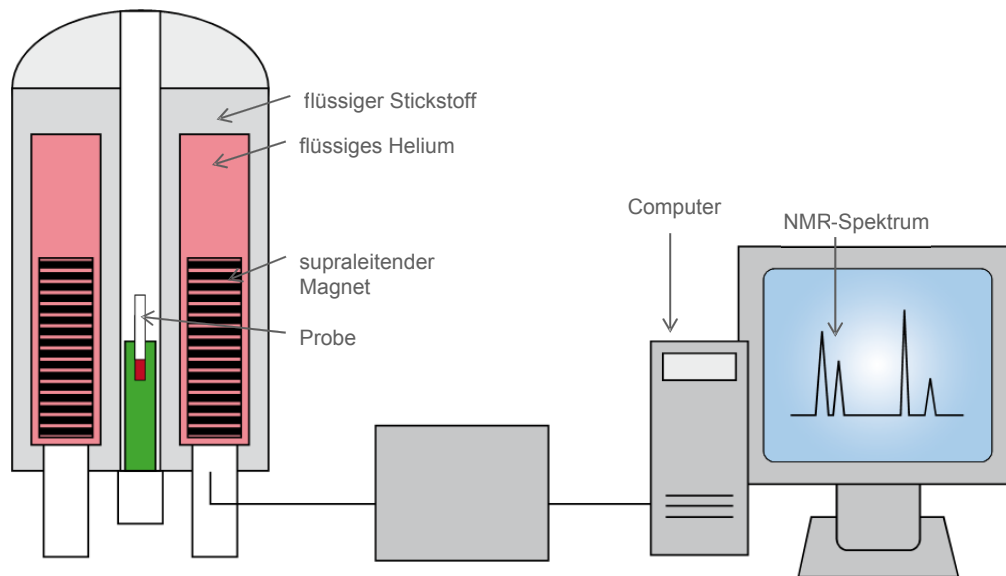


Abbildung 2: Aufbau eines heliumgekühlten NMR-Spektrometers. Für moderne NMR-Spektroskopie-Anwendungen ist es mit Hilfe supraleitender Magneten möglich, die notwendigen Magnetfeldstärken zu erzeugen. Um diese weltweit stärksten Felder für technische Anwendungen zu generieren, werden supraleitende Spulen mit Hilfe von flüssigem Helium bis nahe an den absoluten Nullpunkt (-273°C) heruntergekühlt.

Anwendungen der Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie

Einige der zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten der NMR-Spektroskopie, darunter auch die in der Medizin eingesetzte, bildgebende Kernspintomographie (einem Sonderfall der NMR-Spektroskopie) sind in Tabelle 1 dargestellt:

Anwendungen der NMR in Medizin, Life Sciences, Chemie u.a. Disziplinen		
Life science	Medizin	Kernspintomographie (MRT, „Kernspin“)
		Labordiagnostik
		Metabolomics
		Molekülfaltung, -dynamik, -interaktionen
		Aufklärung von Proteinstrukturen in Lösung
(Petro-)Chemie, Materialwiss. u.a.	Pharma	Qualitätskontrolle von Arzneimitteln, Arzneibuchanalytik
		Strukturbestimmung
		Qualitätskontrolle
		Prozesskontrolle

Tabelle 1: Auswahl an Anwendungen der Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie.

Hintergrundinformationen zur Kernspinresonanzspektroskopie

Anwendung der NMR in der Medizin

Für die NMR gibt es in der medizinischen Diagnostik und Forschung zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten. In der medizinischen Diagnostik ist vor allem die Kernspintomographie oder Magnetresonanztomographie (MRT = deu: Magnetresonanztomographie oder MRI = engl.: magnetic resonance imaging) weit verbreitet. Die MRT erlaubt die Darstellung der Gewebestrukturen im Körperinneren und wird deshalb als bildgebendes Verfahren bezeichnet. Bei diesem Verfahren werden Schnittbilder des menschlichen Körpers erzeugt, auf denen krankhafte Organveränderungen für den Arzt sichtbar werden. Viele Organe lassen sich durch MRT besser darstellen als durch andere bildgebende Verfahren, und zwar ohne dass eine ionisierende Strahlung auf den Patienten einwirkt. Neben der Struktur kann mittels spezieller Verfahren auch die Funktion untersucht werden. Diese Vorteile haben in den letzten Jahren zu einem starken Anstieg in der Verbreitung von Kernspintomographen geführt.

Im Bereich der biomedizinischen Forschung findet die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) breite Anwendung. Sie wird zum einen eingesetzt, um die Struktur und Dynamik von Nukleinsäuren, Aminosäuren, Peptiden und Proteinen aufzuklären aber auch um deren Interaktion mit Wirkstoffen zu entschlüsseln. Bei der Strukturaufklärung mittels NMR können die Moleküle - im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse - direkt in Lösung vermessen werden. 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.

Die hochauflösende NMR-Spektroskopie ist darüber hinaus eine Schlüsseltechnologie im Bereich der Metabolom-Forschung (umfasst sowohl die Metabolomik (engl.: Metabolomics), als auch die Metabonomik (engl.: Metabonomics)). Mit dem Metabonomics-Ansatz wird die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte genutzt, um daraus Rückschlüsse auf physiologische oder pathophysiologische Stoffwechselzustände zu ziehen. Die gezielte Analyse von Zusammenhängen in Netzwerken bzw. Stoffwechselwegen (Metabolomic Pathways) kann normale Stoffwechselschwankungen von Mustern unterscheiden, die z.B. durch einen Krankheitsprozess hervorgerufen werden. Mit Hilfe dieser Herangehensweise lassen sich viele komplexe Fragestellungen in verschiedenen biologischen Systemen beantworten. Bisher wird die Metabolomik vorwiegend in der Forschung eingesetzt. In Zukunft wird diese leistungsfähige Methodik und damit die NMR-Spektroskopie sicherlich breitere Anwendung finden, insbesondere auch in der Labordiagnostik.

Anwendung der NMR in der Labordiagnostik

Im Bereich der Labordiagnostik werden NMR-Techniken zunehmend erfolgreich eingesetzt, um die Konzentrationen von Stoffwechselprodukten (Metaboliten) in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Serum oder Urin zu bestimmen. Eine solche In-vitro diagnostische Untersuchung kann zur Risikoabschätzung und Diagnose zahlreicher Erkrankungen eingesetzt werden, aber auch Therapieentscheidungen unterstützen und zur Verlaufskontrolle (Monitoring) von Krankheitsverläufen und Therapien dienen.

Die NMR-Spektroskopie kann nicht nur gleichzeitig zahlreiche Standardlaborparameter der klinischen Chemie (z.B. Cholesterin, HDL, LDL und Glukose im Serum, Kreatinin, Glukose und Harnstoff im Urin etc.) liefern, sondern darüber hinaus auch Metaboliten in Humanproben erfassen, die für Standardmethoden der Labordiagnostik nur schwer zugänglich sind (z.B. Größenverteilung von Lipoproteinpartikeln, siehe unten).

Ein weiterer wesentlicher Vorteil der NMR Methodik ist die gleichzeitige Erfassung aller Stoffwechselprodukte, die in der Probe enthalten sind. Mit dem NMR-Spektrum wird also bildlich gesprochen der „metabolische Fingerabdruck“ genommen. Bestimmte Krankheiten führen zu charakteristischen Veränderungen in diesem Fingerabdruck. Spezielle Auswertalgorithmen sind in der Lage, diese charakteristischen Veränderungen im NMR-Spektrum aufzuspüren. Das Nutzen der gesamten Information und die Betrachtung von Zusammenhängen in Netzwerken ermöglicht auch dort eine Diagnose, wo die Veränderungen einzelner Stoffwechselprodukte für sich betrachtet nicht aussagekräftig genug wäre, um eine Klassifikation vorzunehmen.

Hintergrundinformationen zur Kernspinresonanzspektroskopie

Ein konkretes Beispiel: Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ist es möglich, die Verteilung von Lipoproteinpartikeln in menschlichem Blut aufgeschlüsselt nach ihrer Größe zu ermitteln. Dieses detaillierte Lipoproteinprofil erlaubt eine wesentlich genauere Abschätzung des Risikos für koronare Herzkrankheit (KHK) als dies mit konventionellen Cholesterin-Messungen möglich ist. Im Gegensatz zu anderen Methoden wie der Ultrazentrifugation oder der Gelelektrophorese können die Analysen sehr genau, schnell und günstig durchgeführt werden.

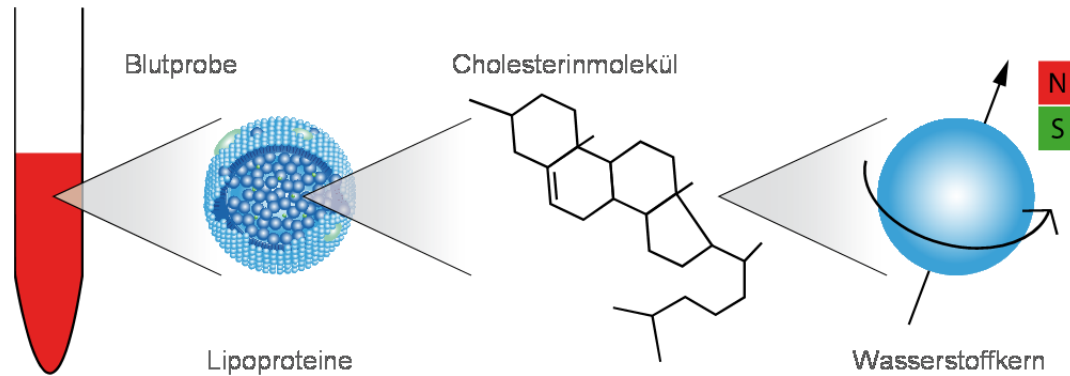


Abbildung 3: Bestimmung von Lipoproteinpartikeln in Blutproben. In jeder biologischen Probe, in jeder körpereigenen Substanz, befinden sich unzählige Wasserstoffatome. Diese Wasserstoffatome erfahren, je nach ihrer direkten Umgebung, einen unterschiedlichen Einfluss des starken äußeren Magnetfelds, das bei NMR-Messungen anliegt. Damit ist es möglich, zu unterscheiden, ob Cholesterinmoleküle Teil eines großen oder kleinen Lipoproteinpartikels sind. So kann die Anzahl von Lipoproteinpartikeln aufgeschlüsselt nach ihrer Größe in Blut, Serum oder Plasma bestimmt werden.

Anwendung der NMR in der Chemie

Durch ihren hohen Informationsgehalt pro Messung wird die NMR heute routinemäßig für vielfältige Aufgaben in der Chemie verwendet, z.B. für die

- Analytik in der Synthese
- Strukturbestimmung in Lösung
- Analyse von intermolekularen Wechselwirkungen und molekularer Dynamik

Ihre ausgezeichneten selektiven Eigenschaften in der Strukturanalytik haben sie in fast jedem chemisch forschenden Labor unabkömmlich gemacht, z.B. bei der Überwachung des Herstellungsprozesses von chemischen Verbindungen. Darüber hinaus findet die hochauflösende ^1H - und ^{13}C -NMR immer mehr Anwendung in der quantitativen Analytik. Typische Anwendungen der quantitativen NMR (qNMR) in der analytischen Chemie umfassen

- Gehaltsanalyse
- Reinheitsanalyse
- Identitätsanalyse

Die NMR-Spektroskopie hat unter anderem Eingang in die europäischen (Ph.Eur) und US-amerikanischen (USP) Arzneibücher (Pharmakopöen) gefunden, wo sie zur Überprüfung von Arzneimitteln hinsichtlich Reinheit und Identität angewendet wird.

Hintergrundinformationen zur Kernspinresonanzspektroskopie

Anwendung der NMR in Physik und Technik

In den vergangenen Jahren wurden NMR-Geräte entwickelt, die klein und transportabel sind, und zur Untersuchung einfach auf das Objekt aufgelegt werden. Hierdurch ergeben sich viele neue Möglichkeiten zur zerstörungsfreien Prüfung organischer Werkstoffe und Produkte, z.B. für die Prozess- oder Qualitätskontrolle. Insbesondere können Material-Inhomogenitäten und Veränderungen bei Belastungstests und im Betrieb erfasst werden. Ebenso sind diese Geräte z. B. zur Bestimmung von stofflicher Dichte und Netzwerkdichte in Gummiprodukten, zur Zustandsbewertung von Polyethylenrohren und sogar zur Untersuchung von Gemälden, Mumien oder alten Büchern geeignet.

Funktionsprinzip der NMR - einfach erklärt

Das Phänomen der Kernspinresonanz (NMR), auch kernmagnetische Resonanz, magnetische Kernresonanz oder (Kern-) Magnetresonanz genannt, 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 = engl.: Drehung, Drall), den NMR-aktive Atomkerne haben. Dies wird leichter verständlich, wenn man sich den Kern als ein geladenes Teilchen vorstellt, das um seine Achse rotiert und dadurch ein kleines Magnetfeld erzeugt (vgl. Abbildung 4).

Dieses Bild entspricht einer klassischen und stark vereinfachten Vorstellung. Die exakte quantenmechanische Beschreibung der NMR-Spektroskopie ist für das prinzipielle Verständnis aber nicht notwendig und würde außerdem den Rahmen dieser kurzen Einführung sprengen. Wir bleiben deshalb bei dem gewählten klassischen Bild, und stellen uns den Atomkern als einen kleinen, rotierenden Kreisel vor.

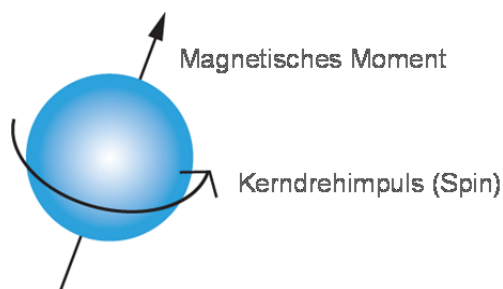


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Atomkerns als rotierender Kreisel. Neben dem Wasserstoffkern (Proton) besitzen noch viele andere Atomkerne eine physikalische Eigenschaft, die als Kerndrehimpuls (Spin) bezeichnet wird. Dieser Spin sorgt dafür, dass sich diese Atome wie winzige Kreisel verhalten, die in ihrer Kreiselachse ein kleines magnetisches Moment besitzen.

Der bedeutendste Atomkern für die NMR ist das Proton, der Kern des Wasserstoffs (^1H), der in praktisch allen organischen Verbindungen in großer Zahl vorkommt. Daneben gibt es aber noch andere magnetisch aktive Kerne, von denen vor allem ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P für NMR-basierte Untersuchungen an organischen Proben wichtig sind.

Wird eine organische Probe in einem NMR-Gerät nun einem starken Magnetfeld ausgesetzt, richten sich die NMR-aktiven Kerne mit ihren magnetischen Momenten in diesem externen Feld aus. Bei ^1H -Atomkernen (Protonen) ist die Ausrichtung im Magnetfeld aufgrund quantenmechanischer Phänomene nur in zwei Richtungen, der Physiker spricht hier von Zuständen, möglich. Die magnetischen Momente der Protonen können sich entweder mit oder entgegen dem Magnetfeld ausrichten

(Abbildung 5). Die energieärmere Ausrichtung entlang der Magnetfeldrichtung ist dabei leicht bevorzugt. Aufgrund dieser Bevorzugung befinden sich relativ gesehen mehr Kerne im energiearmen als im energiereichen Zustand. Es ergibt sich ein Populationsunterschied. Addiert man daher alle magnetischen Momente der Probe auf, so

Hintergrundinformationen zur Kernspinresonanzspektroskopie

erhält man eine sog. makroskopische Magnetisierung, die in diesem Fall entlang der Magnetfeldrichtung ausgerichtet ist. Wichtig ist hierbei, dass die makroskopische Magnetisierung eine messbare Größe darstellt. Ein einfaches NMR-Experiment ist daher, den Populationsunterschied zu manipulieren und die Veränderung der Makroskopischen Magnetisierung zu beobachten.

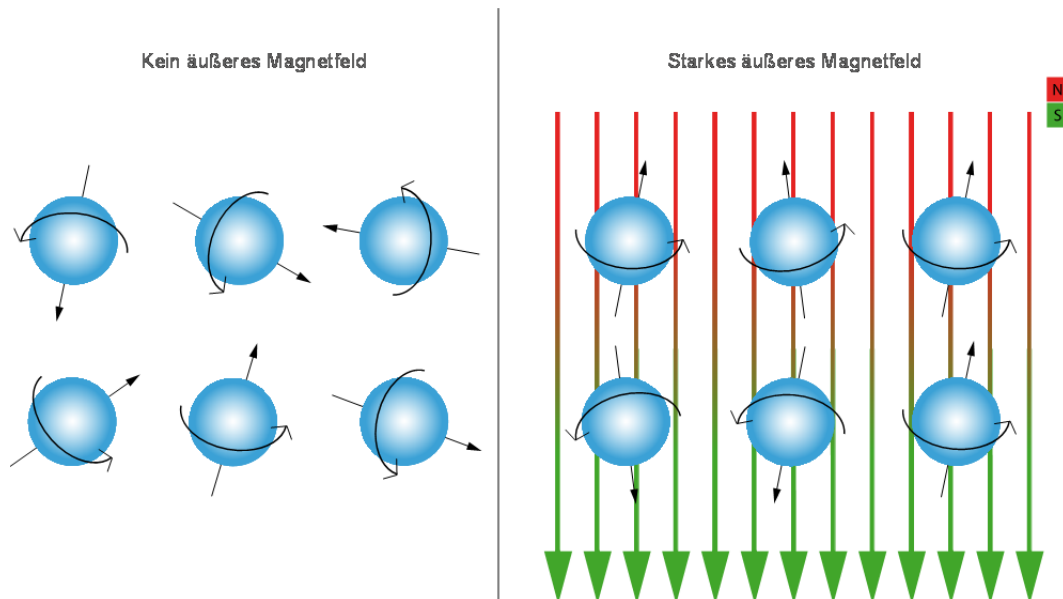


Abbildung 5: Verhalten magnetisch aktiver Atomkerne im Magnetfeld: Aufgrund ihres magnetischen Moments richten sich magnetisch aktive Atomkerne wie z.B. Wasserstoffatome ($1H$ -Kerne = Protonen) in einem starken äußeren Magnetfeld aus. Quantenmechanische Gesetzmäßigkeiten erlauben ihnen dabei nur eine Ausrichtung parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld.

Um Populationsunterschiede manipulieren zu können, senden moderne NMR-Geräte einen kurzen Puls elektromagnetischer Wellen (Radiofrequenzpuls) aus. Dessen Energie entspricht dabei genau der Energiedifferenz zwischen den beiden (für Protonen) erlaubten Zuständen (siehe oben). Die eingestrahelte elektromagnetische Welle kann daher mit den Wasserstoffkernen interagieren und regt einige von ihnen an, in den energetisch höher gelegenen Zustand zu wechseln. Die eigentliche Messung erfolgt sodann direkt nach Abschalten des Pulses durch Beobachten der makroskopischen Magnetisierung. Die Protonen kehren innerhalb von Sekunden wieder in ihre Gleichgewichtsverteilung zurück (Abbildung 6).

Um die Grundlagen der NMR-Spektroskopie noch besser zu verstehen, müssen wir auf einen weiteren Effekt eingehen, die sogenannte Präzession. Dies ist eine Drehbewegung, zu der die Kerne aufgrund quantenmechanischer Gesetze gezwungen werden. Sie rotieren (präzessieren) hierbei mit ihrem magnetischen Moment um die Achse des angelegten äußeren Magnetfeldes. Sie ähneln dabei einem Kreisel im Schwerfeld der Erde. Die Präzessionsgeschwindigkeit hängt von den intrinsischen Eigenschaften der Kernspezies sowie der Stärke des Magnetfeldes am Ort des Kerns ab. Da benachbarte Kerne das angelegte äußere Magnetfeld leicht verändern können, ist die Stärke des Feldes auch abhängig von der chemischen Umgebung des Kerns. Diese Beeinflussung ist gering, aber mit modernen Geräten sehr gut messbar. Als Resultat ergibt sich somit auch eine veränderte Präzessionsgeschwindigkeit. Da die Präzessionsbewegung sich natürlich auch auf die detektierbare makroskopische Magnetisierung niederschlägt heißt das, dass mittels NMR Informationen über die unmittelbare Umgebung der beobachteten Kerne gewonnen werden können. So ist z.B. die unterschiedliche Position der Peaks im Spektrum (siehe Abbildung 1), der Chemiker verwendet hierfür den Begriff „chemische Verschiebung“, eine direkte Folge der Anordnung der Kerne im Molekül.

Hintergrundinformationen zur Kernspinresonanzspektroskopie

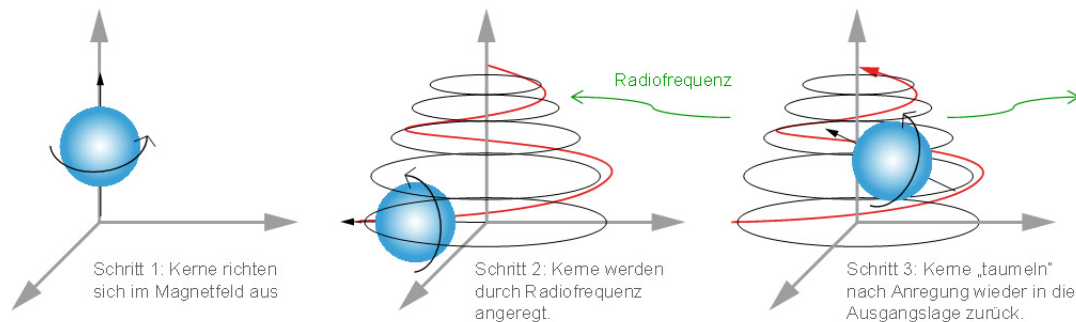


Abbildung 6: Prinzip einer NMR-Messung. Werden die durch das äußere Magnetfeld ausgerichteten Atomkerne (Schritt 1) einem Radiowellenpuls mit geeigneter Frequenz ausgesetzt, wird Ihre Ausrichtung gestört (Schritt 2). Nach dem Abschalten des Radiowellenpulses brauchen die Atomkerne nun eine gewisse Zeit 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 ihrer 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 richten sich die NMR-aktiven Kerne aus und besetzen unterschiedliche Energieniveaus (Zustände). Zwischen diesen kann ein Übergang induziert werden, sofern man Radiowellen mit einer Frequenz einstrahlt, die dem Energieunterschied zwischen ihnen entspricht.

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 (Massachusetts Institute of Technology) 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 continuous wave (CW) -Methode benutzt. Dabei wurde entweder in einem konstanten äußeren Magnetfeld ein Hochfrequenzfeld eingestrahlt, dessen Frequenz einen bestimmten Bereich durchlief (frequency sweep) oder die Frequenz des eingestrahlten Feldes wurde konstant gehalten und das äußere Magnetfeld variiert (field sweep). Diese Technik war durch ihr schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis gekennzeichnet. Durch Mittelung konnte allerdings das Signal-Rausch-Verhältnis wesentlich verbessert werden. Später ermöglichte der Einsatz der Fourier-Transformation-NMR (FT-NMR), mit der gleichzeitig viele Resonanzfrequenzen analytisch zugänglich wurden, eine schnellere Aufnahme der Spektren. Dieses Verfahren wurde zuerst von Richard R. Ernst verwendet, der für seine Arbeiten 1991 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Bei der FT-NMR wird in das externe Magnetfeld 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.

Hintergrundinformationen zur Kernspinresonanzspektroskopie

Später wurde dieses Verfahren durch die Verwendung mehrerer Pulse hintereinander zu einer zweidimensionalen und höherdimensionalen NMR ausgebaut. Damit können z.B. Abstandsmessungen im Molekül durchgeführt und intermolekulare 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 zur 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.

Da die Stärke des NMR-Signals und die Detektionsmöglichkeiten mit der Stärke des Magnetfeldes steigen, begünstigte diese Technik die Entwicklung von sehr starken Magneten, momentan bis zu 1 GHz.

Für die Entwicklung einer Methodik, mit der die Kernspinresonanz unter dem Namen Magnetresonanztomografie als bildgebendes Verfahren in der Medizin angewandt wird, erhielten Paul C. Lauterbur und Sir Peter Mansfield im Jahr 2003 den Nobelpreis für Medizin.

Quellen:

Timothy D.W. Claridge: High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Tetrahedron Organic Chemistry Series Volume 19. 1999 Elsevier Ltd.

http://ir.bruker.com/phoenix.zhtml?c=121496&p=irol-newsArticle_print&ID=1294089, abgerufen am 09.01.2014