

NMR-Spektroskopie von Festkörpern

Bisher hat vor allem die Materialforschung von der Festkörper-NMR-Spektroskopie profitiert. Wichtige Einsatzgebiete sind z. B. die Untersuchung poröser Materialien und Katalysatoren,¹⁻³⁾ Polymere,^{4,5)} Gläser,^{6,7)} Fulleren⁸⁾ und Hochtemperatursupraleiter.⁹⁾ Apparative und methodische Neu- und Weiterentwicklungen wie die Erprobung des ersten 750-MHz-Festkörper-NMR-Spektrometers mit weiter Bohrung erschlossen der Festkörper-NMR-Spektroskopie im vergangenen Jahr neue Anwendungen. Dazu gehören Studien an festen Proteinen und Peptiden. Bildgebende Verfahren (NMR-Mikroskopie) werden zunehmend auch in der Materialforschung eingesetzt – eine weitere wichtige Entwicklung.

Grundlage des bisherigen Erfolges der Festkörper-NMR-Spektroskopie war die Entwicklung von Methoden zur Unterdrückung der für Festkörper charakteristischen anisotropen magnetischen Wechselwirkungen, insbesondere der Probenrotation um den magischen Winkel (magic angle spinning, MAS).¹⁰⁾ In vielen Fällen ist die spektrale Auflösung der Festkörper-MAS-NMR-Spektren jedoch noch deutlich geringer als die hochauflösender Flüssigkeits-NMR-Spektren. Wesentlich für die Unterdrückung linienverbreiternder magnetischer Wechselwirkungen ist die Erhöhung der Probenrotationsfrequenz ν_r und die Erhöhung des äußeren magnetischen Feldes B_0 . ν_r beeinflusst speziell dann die Restlinienbreite, wenn die Spins einer starken homonuklearen magnetischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung unterliegen, d.h. wenn Atomkerne mit großem gyromagnetischen Verhältnis wie ^1H oder ^{19}F in hoher Konzentration vorliegen. Die Restlinienbreite der MAS-NMR-Signale ist dann durch Gleichung 1 gegeben,¹¹⁾ wobei $\Delta\nu_{ij}$ den homonuklearen Beitrag zur statischen Linienbreite bezeichnet. Auf dem Markt sind bereits seit einigen Jahren MAS-Turbinen mit Probenrotationsfrequenzen bis etwa 35 kHz.

Apparative und methodische Neuentwicklungen und ihre möglichen Konsequenzen für biologische Systeme

Im vergangenen Jahr gab es sowohl hinsichtlich der verfügbaren Probenrotationsfrequenz als auch des äußeren magnetischen Feldes wichtige Neuentwicklungen. Samoson¹²⁾ konstruierte ein MAS-System, welches Probenrotationsfrequenzen bis zu 50 kHz gestattet. Die Erhöhung der Probenrotationsfrequenz ist z. B. für biologische Systeme wie Proteine und Peptide mit hoher Konzentration an ^1H -Kernen interessant. Viele für die Flüssigkeits-NMR-spektroskopische Strukturbestimmung grundlegende mehrdimensionale Korrelationsexperimente beruhen auf der Detektion der ^1H -Magnetisierung. Dies setzt jedoch eine ausreichend hohe spektrale Auflösung der ^1H -NMR-Spektren voraus. Typische Linienbreiten hochaufgelöster Flüssigkeits-NMR-Spektren von Proteinen betragen ca. 10 – 20 Hz, was für feste Proteine bislang noch nicht erreicht ist. Deshalb wird bei isotoopenmarkierten festen Proteinen und Peptiden in der Regel nicht die ^1H -Magnetisierung, sondern z.B. die ^{13}C -Magnetisierung detektiert.

Neben der Erhöhung der Probenrotationsfrequenz ist für Proben, bei denen die Restlinienbreite durch Gleichung (1) bestimmt wird, auch die Erhöhung von B_0 wesentlich. Man erwartet eine linear mit B_0 zunehmende Auflösung der Spektren, weil der Frequenzabstand der verschiedenen Signale mit B_0 linear ansteigt, während die Linienbreite in Frequenzeinheiten konstant bleibt. van Rossum et al.¹³⁾ haben aber nachgewiesen, daß die Auflösung stärker als erwartet, d. h. nichtlinear mit B_0 zunimmt. Die für die Linienverbreiterung nach Gleichung (1) verantwortlichen „Flip-flop“-Prozesse werden wegen des zunehmendem Frequenzabstandes zwischen den verschiedenen Spins immer unwahrscheinlicher. Ein wichtiger Fortschritt bei der Erhöhung von B_0 war die erfolgreiche Erprobung des ersten kommerziell erhältlichen 750-MHz-Festkörper-NMR-Spektrometers ($B_0 = 17,6$ T) mit weiter Magnetbohrung (Hersteller: Bruker, Karlsruhe) in Leiden (Niederlande). Damit konnten unter anderem mehrdimensionale Korrelationsspektren aufgenommen werden, anhand derer sich die ^{13}C - und ^{15}N -Signale eines Proteins (SH3-Domäne des α -Spectrins) im immobilisierten Zustand zuordnen ließen¹⁴⁾ (Abbildung 1). Mit einem 600-MHz-Festkörper-NMR-Spektrometer ($B_0 = 14,1$ T) gelang Detken et al.¹⁵⁾ vor kurzem auch die Aufnahme hochaufgelöster Korrelationsspektren eines cyclischen Decapeptids im mikrokristallinen Zustand (Abbildung 2). Diese Resultate beweisen, daß die Festkörper-NMR-Spektroskopie unter den nunmehr erreichten Bedingungen Experimente ermöglicht, welche bislang der hochauflösenden Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie vorbehalten waren. Die geschilderten apparativen und methodischen Entwicklungen der jüngsten Zeit eröffnen damit neue Anwendungsmöglichkeiten der Festkörper-NMR-Spektroskopie besonders in der Strukturbiologie. Seit kurzem sind auch supraleitende Magnete mit enger Bohrung und $B_0 = 21,1$ T (900-MHz- ^1H -NMR-Frequenz, Hersteller: Bruker, Karlsruhe, und Oxford Instruments, Wiesbaden) verfügbar.^{16a)} Im Grenoble High Magnetic Field Laboratory wird zur Zeit in Kooperation mit Oxford Instruments und der Universität Stuttgart an der Entwicklung eines 21 T-Magneten mit weiter Bohrung (> 100 mm) für NMR-Zwecke (Projekt Giga-NMR) gearbeitet.^{16b)}

Angeregt durch die genannten apparativen Neuentwicklungen werden in jüngster Zeit vermehrt Anstrengungen unternommen, um neue Korrelationsexperimente¹⁷⁻²⁰⁾ sowie Experimente zur Gewinnung von Parametern, die Strukturinformation wie Kern-Kern-Abstände enthalten, zu entwickeln.²¹⁻²⁴⁾ Bemerkenswert ist ein ^1H - ^{15}N -Korrelationsexperiment, welches Ishii und Tycko¹⁷⁾ unter anderem am festen Tripeptid AlaGyGly testeten. Dabei konnte – bedingt durch die inzwischen erreichte Verbesserung der Auflösung – die ^1H -Magnetisierung detektiert werden. Es besteht deshalb durchaus Grund zu der Annahme, daß ^1H -detektierte Spektren in Zukunft auch für feste Proteine und Peptide

verstärkt Anwendung finden werden.

Fritzhanns et al.²³⁾ publizierten Untersuchungen zur Kreuzrelaxation in „soft matter“ unter den Bedingungen sehr schneller Probenrotation um den magischen Winkel, welche auch für die Strukturbestimmung von biologischen Makromolekülen im festen oder partiell immobilisierten Zustand von Bedeutung sind.

Saalwächter und Schmidt-Rohr²⁴⁾ führten das Rider-Experiment (relaxation-induced dipolar exchange with recoupling) ein, welches die Messung heteronuklearer Kern-Kern-Abstände erlaubt. Im Unterschied zu den üblichen Doppelresonanzexperimenten wie Redor (rotational echo double resonance) erfolgt dabei aber die Hochfrequenzeinstrahlung nur auf einen der beiden Spins.

Andere neue biologische Anwendungen der Festkörper-NMR-Spektroskopie

Abgesehen von den eben geschilderten neuen biologischen Anwendungen hat die Festkörper-NMR-Spektroskopie bereits seit längerer Zeit Bedeutung für die Untersuchung von Membranproteinen.²⁵⁾ In den letzten Jahren ist von Glaubitz und Watts²⁶⁾ eine interessante Technik entwickelt worden. Lipid/Protein-Mischungen werden auf Glasplättchen aufgebracht. Es bilden sich dann die bekannten Lipid-Doppelschichten so aus, daß die Schichtnormalen senkrecht zum Glasplättchen stehen, d. h. es entsteht eine orientierte Probe. Die Plättchen werden dann im MAS-Rotor übereinander geschichtet. Mit Hilfe dieser Methode, welche MAS- NMR-Untersuchungen an Membranproteinen erlaubt, konnten im vergangenen Jahr²⁷⁾ lichtinduzierte Veränderungen der Struktur des Retinals im Rhodopsin nachgewiesen werden. Diese Methode zur Orientierung von Lipid/Peptid-Mischungen auf Glasplättchen ermöglichte auch die ¹⁹F-NMR-spektroskopische Bestimmung der Lage von membrangebundenen Peptiden (Gramicidin A und S, Abbildung 3) bezüglich der Lipidmembran²⁸⁾ (dabei wurden Peptide mit ¹⁹F-substituierten Aminosäuren verwendet).

Ein weiterer Beleg für die zunehmende Bedeutung der Festkörper-NMR-Spektroskopie in der Biologie sind die ³¹P MAS NMR-spektroskopischen Untersuchungen, welche Stumber²⁹⁾ in Verbindung mit Einkristall-³¹P-NMR-Untersuchungen benutzte, um die Existenz mehrerer unterschiedlicher Molekülkonformationen bei GTP-bindenden Proteinen im festen Zustand nachzuweisen.

van Beek et al.³⁰⁾ gelang mit dem Doqsy-Experiment (double quantum/single quantum correlation spectroscopy) die Bestimmung der Sekundärstruktur der Seide von *Samia cynthia ricini*, einer Seidenraupe.

Materialwissenschaftliche Anwendungen der Festkörper-NMR-Spektroskopie und NMR-Mikroskopie

Die eingangs genannten apparativen Neuentwicklungen eröffnen auch neue Perspektiven für die materialwissenschaftlichen Anwendungen der Festkörper-NMR-Spektroskopie. Methoden, die auf der Anregung von „Mehrquantenkohärenzen“ beruhen, finden zunehmend Anwendung.³¹⁻³⁵⁾ Eine wichtige Eigenschaft der Mehrquanten-NMR-Spektroskopie ist die Möglichkeit zur Bestimmung der Größe von Spin-Clustern („spin counting“).³²⁾ Eine neue Methode zum „spin counting“ bei schneller MAS wurde von Geen et al.³³⁾ entwickelt. Auch Quadrupolkerne werden zunehmend mit Mehrquanten-MAS-NMR-Spektroskopie untersucht.³⁴⁾ So wurden beispielsweise hochaufgelöste ¹⁷O-Mehrquanten-MAS-NMR-Spektren von Gerüstsauerstoffatomen in Zeolithen aufgenommen.³⁵⁾

Eine bemerkenswerte Entwicklung ist der zunehmende Einsatz bildgebender (NMR-Mikroskopie) und ortsaufgelöster spektroskopischer Verfahren zur Untersuchung fester Materialien.³⁶⁾ Blümich et al.³⁷⁾ entwickelten ein transportables Gerät, die NMR-Mouse (mobile universal surface explorer, Abbildung 4 unten), welches die lokale Messung von NMR-Parametern (vor allem der transversalen Relaxationszeit T_2) von Spins an Oberflächen bei Eindringtiefen bis zu ca. 10 mm erlaubt. Dieses Gerät wurde bisher beispielsweise zur Untersuchung von Elastomeren³⁸⁾ und Sehnen³⁹⁾ (auch in vivo) eingesetzt. In jüngster Zeit wird darüber hinaus versucht, die NMR-Mouse im Rahmen einer Eureka-Initiative zur Zustandsbewertung von Kulturgütern zu verwenden (Abbildung 4).

Ein anderer interessanter Trend ist die ortsaufgelöste Untersuchung von Stofftransportvorgängen, z. B. von Gasen in porösen Materialien (dynamische NMR-Mikroskopie). Diese Methode wird besonders durch die Verwendung Laser-polarisierter Edelgase wie ¹²⁹Xe unter kontinuierlichem Fluß⁴⁰⁾ praktikabel, da dadurch eine enorme Erhöhung der Empfindlichkeit der NMR-Signale erreicht wird. Erste Experimente, welche die Anwendbarkeit Laser-polarisierter Edelgase in der dynamischen NMR-Mikroskopie zeigten, wurden von Brunner et al.⁴¹⁾ durchgeführt (Abbildung 5). Inzwischen sind mit Hilfe dieser Methode z. B. Studien zur Gas- adsorption und zum Gasfluß durch Katalysatorschüttungen ausgeführt worden.^{42,43)}

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zum Stofftransport sei abschließend auf Weiterentwicklungen bei der Messung von Diffusionskoeffizienten mit der PFG- (pulsed field gradient) NMR hingewiesen. Es gelang, die Richtungsabhängigkeit des Selbstdiffusionskoeffizienten adsorbierter Moleküle in nano- und mikroporösen Festkörpern nachzuweisen (Abbildung 6 zeigt die Messung des anisotropen Diffusionstensors von Wasser im Kanalsystem von MCM-41. Die Kanäle sind parallel zueinander orientiert und hexagonal angeordnet).^{44,45)} Die Existenz eines von Null verschiedenen Wertes für D_{senk} deutet darauf hin, daß die SiO₂-Wände von MCM-41 für Wasser durchlässig sind oder die

Kanäle über die beobachteten Diffusionslängen nicht die aus der Röntgenstruktur postulierte ideale Ausrichtung aufweisen. Beide Komponenten sind kleiner als der Selbstdiffusionskoeffizient des freien unterkühlten Wassers bei gleicher Meßtemperatur (durchgezogene Linie).

Eike Brunner, Institut für Biophysik und physikalische Biochemie, Universität Regensburg, E-Mail eike.brunner@biologie.uni-regensburg.de

- 1) G. Engelhardt, D. Michel, High-Resolution Solid-State NMR of Silicates and Zeolites, Wiley, Chichester, 1987.
- 2) H. Pfeifer, NMR Basic Princ. Prog. 1994, 31, 31.
- 3) E. Brunner, J. Mol. Struct. 1995, 355, 61.
- 4) K. Schmidt-Rohr, H. W. Spiess, Multidimensional Solid State NMR and Polymers, Academic Press, New York, 1994.
- 5) B. Fuchs, U. Scheler, Macromolecules 2000, 33, 120.
- 6) P. F. Mutolo, M. Witschas, G. Geglski, J. Schmedt auf der Guenne, H. Eckert, J. Non-Crystalline Solids 1999, 256/257, 63.
- 7) C. Jäger, P. Hartmann, R. Witter, M. Braun, J. Non-Crystalline Solids 2000, 263/264, 61.
- 8) T. M. de Swiet, J. L. Yarger, T. Wagberg, J. Hone, B. J. Gross, M. Tomaselli, J. J. Titman, A. Zettl, M. Mehring, Phys. Rev. Lett. 2000, 84, 717.
- 9) S. Kramer, M. Mehring, Phys. Rev. Lett. 1999, 83, 396.
- 10) E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, Nature 1958, 182, 1659.
- 11) E. Brunner, D. Fenzke, D. Freude, H. Pfeifer, Chem. Phys. Lett. 1990, 169, 591.
- 12) A. Samoson, Advances in sample spinning technology: MAS at 50 kHz, Proceedings of the 41st ENC, Asilomar, CA/USA 2000.
- 13) B.-J. van Rossum, G. J. Boender, H. J. M. de Groot, J. Magn. Reson. A 1996, 120, 274.
- 14) J. Pauli, M. Baldus, B. van Rossum, H. de Groot, H. Oschkinat, Chem. Bio. Chem. im Druck.
- 15) A. Detken, M. Ernst, B. H. Meier, Triple-resonance experiments for backbone assignment in solid peptides, Proceedings of the XIX ICMRBS, Florenz/Italien 2000, S. 245.
- 16) a) Siehe dazu H. Kessler, Nachr. Chem. 2001, 49, 138; b) G. Aubert, C. Berthier, F. Debray, M. Horvatic, W. Joss, G. Martinez, E. Mossang, J. C. Picoche, A. Bonito-Oliva, M. Wilson, S. Kramer, M. Mehring, IEEE Transactions on Applied Superconductivity 2000, 10, 732.
- 17) Y. Ishii, R. Tycko, J. Magn. Reson. 2000, 142 199.
- 18) Z. Gu, S. J. Opella, J. Magn. Reson. 1999, 138, 193.
- 19) M. Hong, J. Biomol. NMR 1999, 15, 1.
- 20) A. Lesage, D. Sakellariou, S. Steuernagel, L. Emsley, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 13194.
- 21) B. Reif, M. Hohwy, C. P. Jaroniec, C. M. Rienstra, R. G. Griffin, J. Magn. Reson. 2000, 145, 132.
- 22) C. P. Jaroniec, B. A. Tounge, C. M. Rienstra, J. Herzfeld, R. G. Griffin, J. Magn. Reson. 2000, 146, 132.
- 23) T. Fritzmann, D. E. Demco, S. Hafner, H. W. Spiess, Mol. Phys. 1999, 97, 931.
- 24) K. Saalwächter, K. Schmidt-Rohr, J. Magn. Reson. 2000, 145, 161.
- 25) F. M. Marassi, M. Che, J. J. Gesell, S. J. Opella, J. Magn. Reson. 2000, 144, 156.
- 26) C. Glaubitz, A. Watts, J. Magn. Reson. 1998, 130, 305.
- 27) G. Gröbner, J. J. Burnett, C. Glaubitz, G. Choi, A. J. Mason, A. Watts, Nature 2000, 405, 810.
- 28) S. L. Grage, Dissertation, Jena 2000.
- 29) M. Stumber, Dissertation, Heidelberg 2000.
- 30) J. D. van Beek, L. Beaulieu, H. Schäfer, M. Demura, T. Asakura, B. H. Meier, Nature 2000, 405, 1077.
- 31) M. Edén, A. Brinkmann, H. Luthman, L. Eriksson, M. H. Levitt, J. Magn. Reson. 2000, 144, 266.
- 32) J. Baum, M. Munowitz, A. N. Garroway, A. Pines, J. Chem. Phys. 1985, 83, 2015.
- 33) H. Geen, R. Graf, A. S. D. Heindrichs, B. S. Hickman, I. Schnell, H. W. Spiess, J. J. Titman, J. Magn. Reson. 1999, 138, 167.
- 34) J.-P. Amoureux, C. Fernandez, Solid State Nucl. Magn. Reson. 1998, 10, 211.
- 35) U.-T. Pingel, J.-P. Amoureux, T. Anupold, F. Bauer, H. Ernst, C. Fernandez, D. Freude, A. Samoson; Chem. Phys. Lett. 1998, 294, 345.
- 36) B. Blümich, NMR Imaging of Materials, Clarendon Press, Oxford 2000.
- 37) B. Blümich, P. Blümmler, G. Eidmann, A. Guthausen, R. Haken, U. Schmitz, K. Saito, G. Zimmer, Magn. Reson. Imaging 1998, 16, 479.
- 38) G. Zimmer, A. Guthausen, B. Blümich, Solid State Nucl. Magn. Reson. 1998, 12, 183.
- 39) R. Haken, B. Blümich, J. Magn. Reson. 2000, 144, 195.
- 40) E. Brunner, Magn. Reson. Chem. 1999, 37, 14.
- 41) E. Brunner, M. Haake, L. Kaiser, A. Pines, J. A. Reimer, J. Magn. Reson. 1999, 138, 155.
- 42) L. G. Kaiser, T. Meersmann, J. W. Logan, A. Pines, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 2414.
- 43) I. L. Moudrakovskii, S. Lang, C. I. Ratcliffe, B. Simard, G. Santyr, J. A. Ripmeester, J. Magn. Reson. 2000, 144, 372.
- 44) F. Stallmach, J. Kärger, Adsorption 1999, 5, 117.
- 45) F. Stallmach, C. Krause, J. Kärger, M. Jeschke, U. Oberhagemann, J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 9237.

Abb. 1. **Double-Quantum- (DQ)-NCACB-Korrelationsexperiment eines isotopenmarkierten Proteins (SH3-Domäne des α -Spectrins) im immobilisierten Zustand, aufgenommen am 750-MHz-Festkörper-NMR-Spektrometer in Leiden.¹⁴⁾ (Daten von Dr. M. Baldus, Göttingen)**

Abb.2. **Überlagerung zweier $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren eines mikrokristallinen und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten, cyclischen Decapeptids (schwarz: NCA-Korrelationsspektrum, blau/gelb: N(CA)CB-Korrelationsspektrum, blau markierte Kreuzsignale haben eine negative Intensität, d. h. 180° -Phasenverschiebung gegenüber gelb markierten Signalen). (Daten¹⁵⁾ von Dr. A. Detken aus der Abteilung von Prof. Dr. B. Meier, Zürich)**

Abb. 3. **^{19}F -NMR-spektroskopisch bestimmte Orientierung der Peptide Gramicidin A und S bezüglich der Lipidmembran.²⁸⁾ Die ^{19}F -substituierten Aminosäuren sind angegeben, schwarze Punkte markieren die Positionen der ^{19}F -Kerne. (Abbildung von Prof. Dr. A. Ulrich, Jena)**

Abb. 4. **Erste Resultate von T_2 -Messungen an Zementoberflächen mit der transportablen NMR-Mouse.** (Daten von Dipl.-Chem. Shatrughan Sharma aus der Abteilung von Prof. Dr. B. Blümich, Aachen)

Abb. 5. **Geschwindigkeitsprofil eines Gasstroms durch zwei verschiedene Schaumstoffe mit unterschiedlichem Porendurchmesser. Die Profile wurden mit Hilfe der dynamischen NMR-Mikroskopie (orts aufgelöstes „pulsed gradient spin echo experiment“) unter Verwendung von Laser-polarisiertem ^{129}Xe aufgenommen.**⁴¹⁾

Abb. 6. **PFG-NMR-Messungen der parallelen (entlang der Kanäle, D_{par} :■) und der dazu senkrechten (D_{senk} :●) Komponente des axialsymmetrischen Diffusionstensors von Wasser im Kanalsystem von MCM-41**⁴⁵⁾ (Daten von Dr. F. Stallmach aus der Abteilung von Prof. Dr. J. Kärger, Leipzig)