

Beispiellose Verstärkung von Kohlenstoffsignalen in der Flüssigphasen-NMR-Spektroskopie

György Pintér und Harald Schwalbe*

Dynamische Kernpolarisation · Empfindlichkeitsverstärkung · Hohes Magnetfeld · NMR-Spektroskopie

Hartmut Oshkinat zum
60. Geburtstag gewidmet

„Die Schwäche der Kernspinwechselwirkungen, die bislang als Vorteil dargestellt wurde, führt allerdings zu gravierenden Schwierigkeiten bei der Detektion. Eine große Zahl von Spins ist notwendig, um die schwachen Signale vom Rauschen unterscheiden zu können. Unter optimalen Bedingungen [...] benötigt man 10^{14} – 10^{15} Spins einer Art, um nach einer einstündigen Messung ein Signal zu detektieren. Das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis ist der am stärksten limitierende Faktor in der Anwendung von Kernresonanzmethoden. Jegliche Verbesserung dieses Verhältnisses durch technische Mittel wird den NMR-Anwendungsbereich bedeutend erweitern.“^[1]

Dieses Zitat aus Richard Ernsts Nobelpreisvortrag gab den Anstoß für zahlreiche Studien und Ansätze zur Verbesserung des Signal-Rausch(S/N)-Verhältnisses in der NMR-Spektroskopie. Über die letzten Jahre wurden entsprechend viele Methoden zur Verbesserung des S/N-Verhältnisses entwickelt, Beispiele sind PHIP,^[2] SABRE,^[2] hyperpolarisierte Edelgase,^[3] MAS-DNP,^[4] Stickstoffvakanzan in Diamanten,^[5] Dissolution-DNP^[6] und DNP im festen Zustand.^[7] Eine Zusammenfassung dieser Techniken findet sich in einem neueren Aufsatz in der *Angewandten Chemie*.^[8]

Ein besonders wichtiger Ansatz für die Signalverstärkung ist die dynamische Kernpolarisation (DNP; dynamic nuclear polarization), eine erstmals durch Overhauser und Abragam beschriebene Technik, die vor allem durch Bob Griffin über viele Jahre erforscht und ausgearbeitet wurde. Bei dieser Technik wird die Empfindlichkeit der NMR erhöht, indem die höhere Spinmagnetisierung des Elektrons über die Hyperfeinwechselwirkungen zwischen Elektronen- und Kernspins auf einen Kern übertragen wird. Die Probe wird zunächst mit einem stabilen Radikal dotiert, dann werden Mikrowellen (MW) im Bereich der Larmor-Frequenz in die

Elektronenspinübergänge des Radikals eingestrahlt,^[9] woraufhin ein verstärktes NMR-Signal detektiert wird.

Eine Vielzahl von Anwendungen der DNP-Technik im festen Zustand wurde veröffentlicht, z. B. die Charakterisierung von Photointermediaten verschiedener Rhodopsine^[10] und funktionellen Gruppen auf der Oberfläche von Katalysatoren^[11] oder die Detektion von Zellrezeptoren bei nativen Konzentrationen, um nur einige aktuelle Beispiele zu nennen.^[12]

Die in diesem Highlight vorgestellte Veröffentlichung von Bennati et al.^[14] beschreibt neuartige Methoden für DNP im flüssigen Zustand. Die Verstärkung ε hängt in diesem Fall von einer Reihe experimenteller Parameter ab:

$$\varepsilon = 1 - \xi f s \frac{|\gamma_S|}{\gamma_I} \quad (1)$$

$\gamma_{S,I}$ sind die gyromagnetischen Verhältnisse der Elektronen- und Kernspins, s ist der Sättigungsfaktor der Elektronenspins, f ist der Streufaktor und ξ der Kopplungsfaktor. s und f können zwischen 0 und 1 liegen. Das theoretische Maximum der Verstärkung resultiert aus den gyromagnetischen Verhältnissen, diese betragen $\gamma_e/\gamma_H = -658$ für ^1H und $\gamma_e/\gamma_C = -2618$ für ^{13}C . Um den zugrundeliegenden Mechanismus der DNP-Verstärkung bei hohem Magnetfeld im flüssigen Zustand zu verstehen, sind Messungen des Kopplungsfaktors ξ essenziell.

In protonendetektierenden DNP-Experimenten bei hohem Feld wurden bisher nur kleine Signalverstärkungen ($< 10^2$) beobachtet.^[7] Die Hyperpolarisation wird in diesem Fall von den Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Elektron und Kern dominiert, die mit steigender Feldstärke verschwinden. Nur eine einzelne Hochfeldanwendung wurde für ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F und ^{31}P berichtet, wobei signifikante Beiträge skalarer Wechselwirkungen beobachtet wurden.^[13] Das allgemein verwendete Modell zur Vorhersage von DNP-Verstärkungen beruht auf der Annahme von Spins auf sphärischen Molekülen sowie translationaler Diffusion, und eine solche Behandlung ermöglicht die Beschreibung von DNP in geschlossener analytischer Form. Dieses Modell konnte experimentelle ^1H -DNP-Verstärkungen für verschiedene Lösungsmittel und Radikale bei verschiedenen Feldstärken reproduzieren.

In der hier vorgestellten Arbeit von Bennati et al. wird über die Verstärkung von ^{13}C -Lösungsmittelkernen in einem

[*] G. Pintér, Prof. Dr. H. Schwalbe
Biomolekulares Magnetresonanz-Zentrum (BMRZ)
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

© 2017 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

Magnetfeld von 3.4 T (144 MHz Protonen-, 36.4 MHz Kohlenstoff- und 94 GHz Elektronen-Larmorfrequenz) und von ^{13}C -markierten Verbindungen dotiert mit ^{15}N -markiertem TEMPONE (4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-*N*-oxyl) berichtet.^[14] In allen Fällen wurden Signalverstärkungen von mindestens zwei Größenordnungen beobachtet. Im Fall von CCl_4 resultierte eine beispiellose Signalverstärkung von 930 ± 100 (Abbildung 1). Im Fall von Acetoacetat, Diethylmalonat und Brenztraubensäure – mit den in Abbildung 1 gezeigten ^{13}C -Markierungen – wurden 100- bis 300-fache Verstärkungen beobachtet. Diese Werte stellen die höchsten bisher durch Overhauser-DNP erzielten Verstärkungen dar und können mit den bisherigen allgemeinen Mechanismen nicht erklärt werden.

Um den Mechanismus hinter diesem Phänomen zu verstehen, bestimmten die Autoren den Streufaktor f und den Sättigungsfaktor s in separaten Messungen und konnten daraus anhand von Gleichung (1) den Kopplungsfaktor ξ und die Temperaturabhängigkeit von f und s berechnen. Zusätzlich wurde die ^{13}C -Spin-Gitter-Relaxation T_{1n} gemessen, um die skalare Relaxationswahrscheinlichkeit zu bestimmen. Um weiteren Einblick in die durch skalare Relaxation dominierten Wechselwirkungen zwischen Elektronen- und Kernspins zu gewinnen, wurde ferner die kernmagnetische Relaxationsdispersion (NMRD) von ^{13}C in CHCl_3 und CCl_4 bis zu 1 T Feldstärke gemessen. Die experimentellen Ergebnisse konnten in guter Übereinstimmung mit dem neuen Modell reproduziert werden. Aus den Angleichparametern ließ sich folgern, dass bei hohen Feldern die ^{13}C -Relaxation von skalaren Hyperfeinwechselwirkungen vermittelt durch das Chloratom dominiert wird und auf einer sehr schnellen Zeitskala (um 1 ps) moduliert. Dies steht im Gegensatz zur Tieffeld-Overhauser-DNP, wo durch dipolare Wechselwirkungen vermittelte Einzelquantenübergänge den Kopplungsfaktor zwischen Elektron- und Kernspins dominieren. Die durch skalare Relaxation vermittelte Hyperpolarisation skaliert günstig bei höheren Magnetfeldern verglichen mit

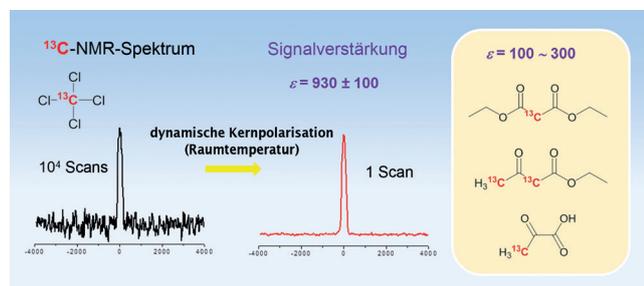


Abbildung 1. Links: ^{13}C -NMR-Spektrum von ^{13}C -markiertem CCl_4 im thermischen Gleichgewicht. Mitte: ^{13}C -NMR-Spektrum von CCl_4 mit nur einem Scan nach MW-Bestrahlung; gemessener Verstärkungsfaktor = 930 ± 100 . Rechts: ^{13}C -markierte Verbindungen mit gebundenen Protonen zeigen 100- bis 300-fache Verstärkung.

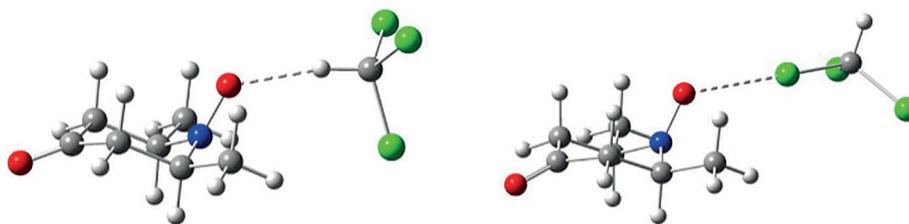


Abbildung 2. Zwei geometrieoptimierte (Gaussian 09) Orientierungen des Komplexes aus nicht-methyliertem TEMPONE-Derivat und CHCl_3 , der zur Berechnung der ^{13}C -Hyperfeinkopplungskonstanten verwendet wurde. In der linken Struktur koordiniert das H-Atom von CHCl_3 mit dem O-Atom des Radikals, in der rechten Struktur ist es das Cl-Atom. Farben: C grau, Cl grün, H weiß, N blau, O rot.

dem Fall der dipolaren Relaxation. Um die Stärke der ^{13}C -Hyperfeinkopplung vorherzusagen, berechneten die Autoren den Spinradikal-Chloroform-Komplex (Abbildung 2) mithilfe quantenchemischer Methoden.

Die Autoren untersuchten dann die allgemeine Eignung von ^{13}C -DNP-Messungen für biologisch relevante Moleküle mit unterschiedlichen chemischen Umgebungen. In allen Fällen konnten sie eine 100- bis 200-fache Verstärkung für Kohlenstoffkerne mit einem gebundenen Proton nachweisen. Für die α -Kohlenstoffe von Diethylmalonat wurde eine positive Verstärkung beobachtet, die von skalaren Wechselwirkungen verursacht wird. Schlussendlich erlauben sowohl proton- als auch chlorvermittelte Hyperfeinwechselwirkungen signifikante DNP-Signalverstärkungen durch einen skalaren Mechanismus.

Die hier vorgestellten Ergebnisse verweisen auf eine konzeptionelle Beschränkung früherer Modelle, die eine niedrige DNP-Verstärkung bei hohem Feld im flüssigen Zustand vorhergesagt haben. Die aufwändige Analyse des Mechanismus der DNP-Wechselwirkungen mittels MD- und DFT-Rechnungen kann zur gezielten Entwicklung von neuen Radikalen und eines experimentellen Hochfeld-Setups genutzt werden, wie es in der Hochauflösungs-NMR der Standard ist. Noch immer bestehende Einschränkungen bezüglich des Probevolumens könnten mithilfe neuer Mikrowellen-Technologien überwunden werden, was die Anwendung von DNP in Standard-Flüssigphasen-NMR-Messungen ermöglichen würde. Solche methodischen Verbesserungen dürften weitreichende Anwendung finden. Im Bereich der Metabolomik, On-Chip-NMR, Mikrofluidikdetektion oder HPLC-gekoppelter Experimente, wo mit begrenzten Probenmengen gearbeitet wird, könnte dank der von Bennati et al. entwickelten DNP-Verstärkung die NMR-Spektroskopie zur Detektionsmethode der Wahl werden. In der Metabolomik liegt die untere Nachweisgrenze bisher im mikromolaren Bereich. Mit DNP könnte der nanomolare Bereich erreicht werden, was für die Detektion niedermolekularer Verbindungen bei ihren physiologischen Konzentrationen und für die metabolomische Flussanalyse erforderlich wäre.

Danksagung

G.P. wird durch den EU-Grant Europol unterstützt und ist Mitglied im DFG-Graduiertenkolleg CLIC. Das BMRZ wird durch das Land Hessen unterstützt.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8332–8334
Angew. Chem. **2017**, *129*, 8448–8450

-
- [1] R. R. Ernst, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 805; *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 817.
- [2] R. A. Green, R. W. Adams, S. B. Duckett, R. E. Mewis, D. C. Williamson, G. G. R. Green, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, *67*, 1–48.
- [3] B. Goodson, *J. Magn. Reson.* **2002**, *155*, 157–216.
- [4] Q. Ni, E. Daviso, T. V. Can, E. Markhasin, S. K. Jawa, T. M. Swager, R. J. Temkins, J. Herzfeld, R. Griffin, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1933–1941.
- [5] D. Suter, F. Jelezko, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2017**, *98–99*, 50–62.
- [6] J. H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10158–10163.
- [7] C. Griesinger, M. Bennati, H. M. Vieth, C. Luchinat, G. Parigi, P. Höfer, F. Engelke, S. J. Glaser, V. Denysenkov, T. F. Prisner, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, *64*, 4–28.
- [8] J. H. Ardenkjær-Larsen, G. Boebinger, A. Comment, S. Duckett, A. Edison, F. Engelke, C. Griesinger, R. Griffin, C. Hilty, H. Maeda, G. Parigi, T. Prisner, E. Ravera, J. Van Buntum, S. Vega, A. Webb, C. Luchinat, H. Schwalbe, L. Frydman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9162–9185; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 9292–9317.
- [9] T. Maly, G. Debelouchina, V. Bajaj, K.-N. Hu, C.-G. Joo, M. Mak-Jurkauskas, J. Sirigiri, P. van der Wel, J. Herzfeld, R. Temkin, R. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052211.
- [10] a) M. Mak-Jurkauskas, V. Bajaj, M. Hornstein, M. Belenky, R. Griffin, J. Herzfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 883–888; b) J. Becker-Baldus, C. Bamann, K. Saxena, H. Gustmann, L. Brown, R. Brown, C. Reiter, E. Bamberg, J. Wachtveitl, H. Schwalbe, C. Glaubitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 9896–9901; c) K. Frederick, V. Michaelis, B. Corzilius, T.-C. Ong, A. Jacavone, R. Griffin, S. Lindquist, *Cell* **2015**, *163*, 620–628.
- [11] A. Zagdoun, G. Casano, O. Ouari, G. Lapadula, A. Rossini, M. Lelli, M. Baffert, D. Gajan, L. Veyre, W. Maas, M. Rosay, R. Weber, C. Thieuleux, C. Coperet, A. Lesage, P. Tordo, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2284–2291.
- [12] M. Kaplan, S. Narasimhan, C. de Heus, D. Mance, S. van Doorn, K. Houben, D. Popov-Čeleketić, R. Damman, E. Katrukha, P. Jain, W. Geerts, A. Heck, G. Folkers, L. Kapitein, S. Lemeer, P. van Bergen en Henegouwen, M. Baldus, *Cell* **2016**, *167*, 1241–1251.
- [13] N. Loening, M. Rosay, V. Weis, R. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8808–8809.
- [14] G. Liu, M. Levien, N. Karschin, G. Parigi, C. Luchinat, M. Bennati, *Nat. Chem.* **2017**, <https://doi.org/10.1038/nchem.2723>.

Manuskript erhalten: 16. März 2017

Endgültige Fassung online: 23. Mai 2017