

1D NMR-Spektroskopie

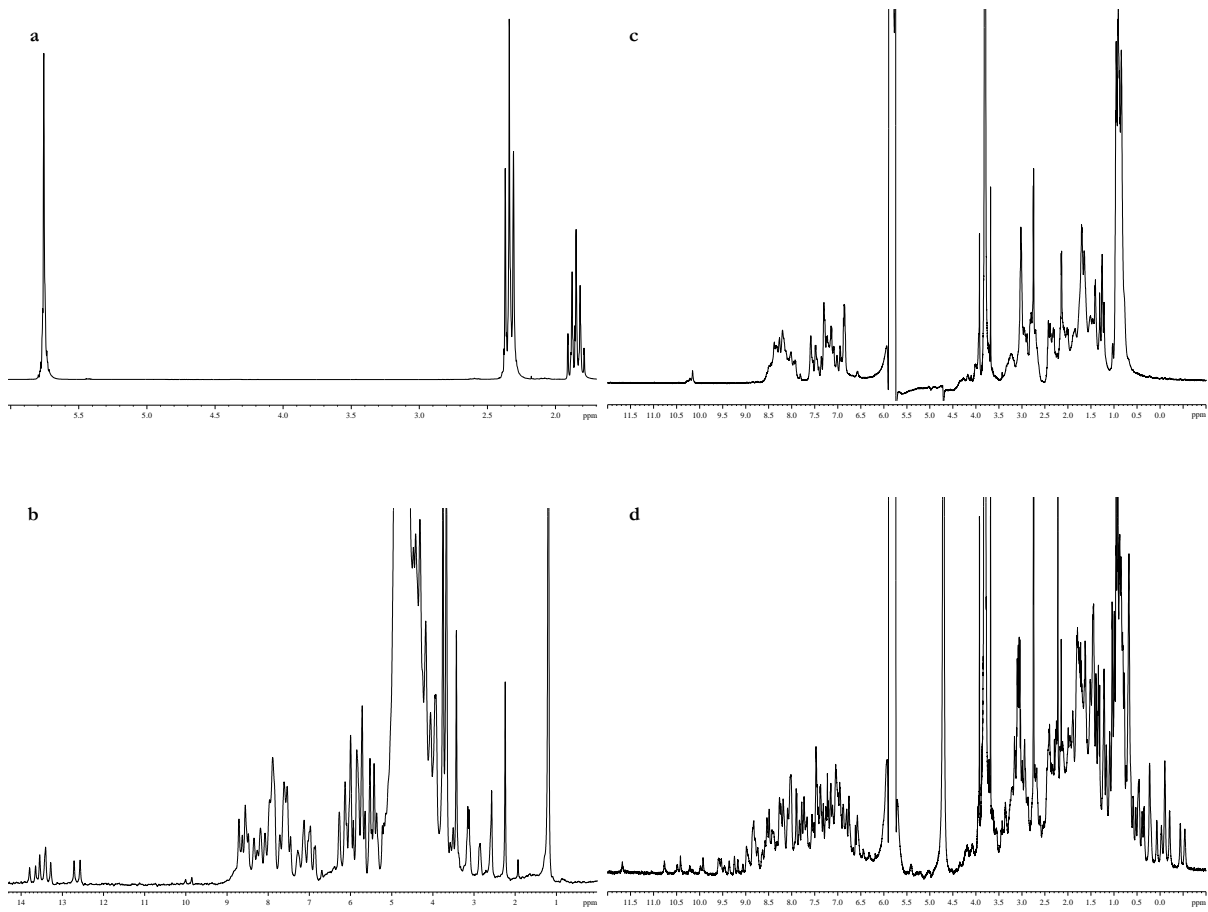


Abbildung 2.1: Eindimensionale Protonenspektren (1D-¹H-Spektren)

- von Cyclopenten (250MHz),
- einer 14mer RNA, die eine Haarnadelschleife bildet. Die Schleife wird durch die Reste UUCG gebildet, man spricht von einem UUCG-Loop (600MHz),
- eines entfalten Protein, dem entfaltetem α -Lactalbumin aus Rind
- eines gefalteten Protein, dem gefaltetem α -Lactalbumin aus Rind.

Im folgenden Kapitel wird in das 1D NMR-Experiment eingeführt. und gezeigt, was bei Anwendung auf ein System von ungekoppelten Spins zu beobachten ist. Es beschreibt den Weg von der Anregung der Spins über die Aufnahme und Prozessierung des Signals bis hin zu dem resultierenden Spektrum. Ferner wird der Begriff der chemischen Verschiebung eingeführt.

Das 1-Puls 1D NMR-Experiment

Das einfachste NMR Experiment besteht aus einem einzelnen Anregungspulse und der direkten Detektion des NMR-Signals. In der gewöhnlichen Darstellungweise der NMR-Spektroskopiker (vgl. *Journal of Magnetic Resonance*, *Journal Biomolecular NMR*) wird dieses Experiment wie folgt gezeigt:

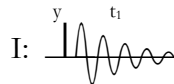
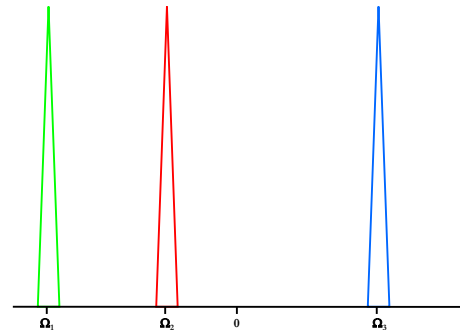


Abb. 2.2: Diese Darstellung zeigt den zeitlichen Verlauf der Aktionen, die auf die Resonanzfrequenz der Spins I angewendet werden. Die Stärke des Radiofrequenzpulses ist gegeben durch γB_1 , die Länge durch τ_p . Dünne senkrechte Striche symbolisieren 90° Pulse, die Phase, d.h. die Richtung, aus der der Pulse angewendet wird, durch einen kleinen Buchstaben oberhalb angezeigt und dicke Striche symbolisieren 180° Pulse. Die Aufnahme des Signals wird durch die Abbildung eines fiktiven FID (Free Induction Decay, freier Induktionszerfall) symbolisiert.

Wendet man diese Sequenz auf ein System aus drei ungekoppelten Spins I_1 , I_2 , I_3 an, so erhält man ein Spektrum mit drei Signalen, die gemäß ihrer chemischen Verschiebung bei drei charakteristischen Frequenzen (Ω_1 , Ω_2 , Ω_3) zur Resonanz kommen.

Rechts: Abb. 2.3: Theoretisches Spektrum von 3 ungekoppelten Spins



Was bei diesem Experiment geschieht und wie es zu diesem Spektrum kommt, wird im Folgenden dargestellt:

Man startet Magnetisierung in z -Richtung. Alle Spins präzedieren also um die z -Achse, die im rotierenden Koordinatensystem statisch ist. Hierauf wird ein Puls aus y -Richtung (Phase) so lange angewendet, bis der Flipwinkel genau 90° beträgt. Anschließend liegt Magnetisierung in der xy -Ebene vor (x -Richtung). Der angewendete Puls ist sehr kurz (typischerweise $\sim 10\mu\text{s}$ für ^1H), während dieser Zeit kann also eine gleichzeitige Wirkung der chemischen Verschiebung auf die Spins vernachlässigt werden.

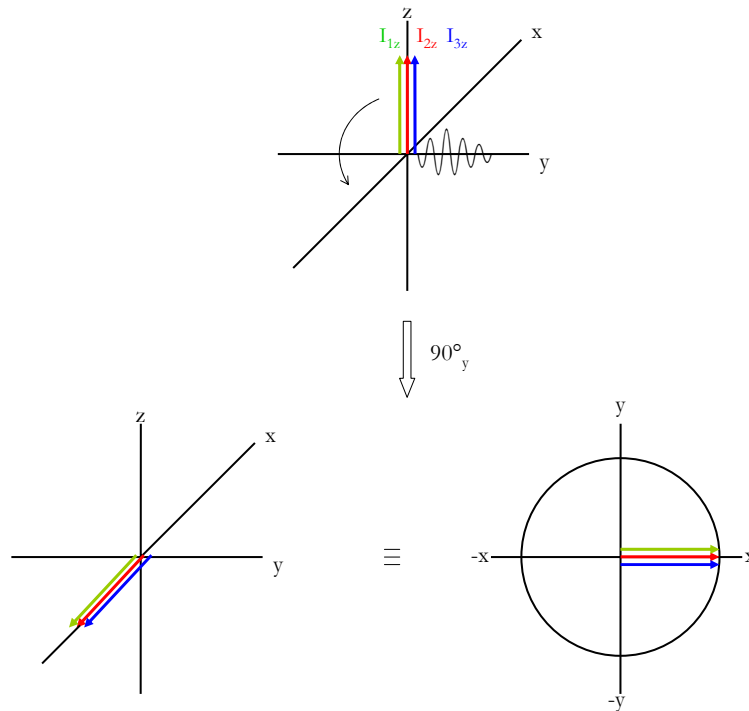


Abbildung 2.4: Wirkung des 90°_y -Pulses auf 3 ungekoppelte Spins im Vektorformalismus

Befinden sich die Spins nun in der transversalen Ebene (xy-Ebene), so wirkt auf sie der Operator der chemischen Verschiebung, der formal einer Drehung um die z-Achse (Richtung des statischen Magnetfeldes B_0) entspricht. Das transversale Feld (B_1 -Feld) des Radiofrequenzpulses ist ausgestaltet, es liegt transversale Magnetisierung vor, die um die z-Achse rotiert. Die Rotation eines Spins i entspricht dabei einer Kreisbewegung um die z-Achse mit einer relativen Rotationsfrequenz von $\Omega_i = \omega_i - \omega_0$, diese relative Rotationsfrequenz nennt man chemische Verschiebung. Der Wert der chemischen Verschiebung liegt bei einem Magnetfeld von 600MHz im Kilohertz-Bereich und ist abhängig von der chemischen Umgebung der Spins (siehe Infokasten 1).

Betrachtet man sich die Darstellung der Spins im Vektormodell, so erkennt man, dass sich aus reiner Magnetisierung in x-Richtung Magnetisierung entwickelt hat, die sowohl durch einen Operator in x- (cosinus-moduliert) als auch in y-Richtung (sinus-moduliert) beschrieben werden muss. Das Winkelargument, um das sich die Spins dabei im rotierenden Koordinatensystem dreht, entspricht dabei dem Produkt aus chemischer Verschiebung Ω und der Zeit t , in der die Rotation um die z-Achse (B_0) andauert.

In der formalen Darstellung wird die Wirkung des Operators der chemischen Verschiebung auf einen Kernspin folgend beschreiben:

$$I_x \xrightarrow{\Omega_x} I_x \cos \Omega t + I_y \sin \Omega t$$

Ursache der chemischen Verschiebung

Atomkerne sind von Elektronen umgeben, die um den Kern rotieren und dadurch ein Magnetfeld induzieren (B'). Dieses Magnetfeld ist abhängig von der Art (Orbitale) und Anzahl der Elektronen, die um den Kern rotieren. Das effektive Magnetfeld B_{gesamt} , welches der Kern erfährt, setzt sich aus dem von außen angelegten Magnetfeld B_0 und dem Betrag des induzierten Magnetfeldes B' zusammen.

Anders ausgedrückt gilt $B_{\text{gesamt}} = B_0(1 - \sigma_{\text{iso}}^i)$, wobei σ_{iso}^i die Abschirmkonstante ist und von den Elektronen, die den Kern umgeben, abhängig ist. Das ist auch der Grund, weshalb die Protonen einer Probe bei unterschiedlichen Frequenzen zur Resonanz kommen. Die Variationen in σ_{iso}^i liegen im ppm-Bereich. Ausgedrückt wird dies in der chemischen Verschiebung δ , d.h. ob nun ein Kern tieffeld- (hohe δ , starke Entschirmung) oder hochfeldverschoben (niedrige δ , schwache Entschirmung) ist, gemessen gegen eine Referenzsubstanz.

$$\delta = 10^6 \frac{\nu - \nu_{\text{Referenz}}}{\nu_{\text{Referenz}}} [\text{ppm}]$$

Die chemischen Verschiebung werden von kovalenten und nicht kovalenten Bindungen, Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, Wasserstoffbrückenbindungen, Orientierung von aromatischen Ringen, Wirkungen von Carbonylgruppen etc beeinflusst.

Die Verwendung der chemischen Verschiebung zur Strukturaufklärung von (Makro-)molekülen bietet sich an, da sie einer der am genauesten und einfachsten messbaren Parameter bei NMR-Messungen darstellt. Je mehr Informationen über die chemische Verschiebung bekannt sind, desto genauer fällt die mögliche Strukturvorhersage aus.

Die beobachtete chemische Verschiebung setzt sich aus folgenden Effekten zusammen:

- primär (intrinsisch): charakteristisch für eine spezielle chemische Gruppe (CH, CH₂, OH etc.)
- sekundär: kommt durch den Einfluss anderer magnetischer Kerne, die in räumlicher Nachbarschaft liegen. So unterscheiden sich beispielsweise die Spektren eines Proteins im gefalteten vom ungefalteten Zustand (konformationeller Einfluss auf chemische Verschiebung)

Beeinflussung der chemischen Verschiebung, phänomenologische Beschreibung

Zur Interpretation der chem. Verschiebung sind hierbei Kenntnisse über die Abschirmung der Probenkerne nötig. Beispielsweise spielt die Beziehung der Abschirmung und der molekularen, elektronischen Struktur eine Rolle. Die chemische Verschiebung nimmt mit steigender Elektronegativität zu.

- Short-range Wechselwirkungen, die zwischen Atomen, die über chemische Bindungen verknüpft sind, stattfinden, beeinflussen die chem. Verschiebung ebenso wie die
- Long-range Effekte. Diese finden zwischen Atomen statt, die nicht über chem. Bindungen verknüpft sind, und können in drei Arten untergliedert werden:

1. Effekte durch die Magnetisierbarkeit von Nachbargruppen, wobei eine benachbarte Gruppe einen gewissen Beitrag zum induzierten magnetischen Feld leisten kann, z. B. Anisotropien, Ringstromeffekte

Magnet. Anisotropie:

Ein äußeres Magnetfeld B_0 induziert in einer Nachbargruppe des beobachteten Kernes ein magnetisches Moment μ . Dieses magnetische Moment kann unterschiedlich groß sein, je nachdem ob B_0 parallel oder senkrecht zur Symmetrieachse der Nachbargruppe liegt. Wenn die Größe des magnetischen Momentes eines Atoms von der Orientierung des angelegten Magnetfeldes abhängt, so handelt es sich um ein anisotropes Atom. Die Wirkung des Magnetfeldes μ auf nahe Kerne (Protonen) können Tieffeld- oder Hochfeldverschiebungen sein.

Letztendlich hat die Orientierung einer Nachbargruppe Einfluss auf die chemische Verschiebung des betrachteten Kernes, wenn der Kern der Nachbargruppe ein anisotropes Atom ist.

Ein Sonderfall des Nachbargruppeneffektes tritt in aromatischen Verbindungen auf. Hier tritt ein Ringstrom in den Orbitalen auf, wobei die Elektronen um den Ring zirkulieren. So werden die Protonen in der Ringebene tieffeldverschoben, hingegen Protonen die sich oberhalb oder unterhalb der Ringebene befinden werden hochfeldverschoben.

2. Effekte des elektrischen Feldes. Hier wird das effektive elektrische Feld direkt am Kern durch Nachbargruppen, die geladen oder Dipole sein können, beeinflusst. Die Ladungen üben einen indirekten Effekt auf die Abschirmung aus, indem sie die Bindungen polarisieren.

Close-contact-Wechselwirkungen, die durch Überlappen von Elektronenwolken nicht benachbarter Gruppen mit der des Probenkerns entstehen. Dies tritt besonders bei Lösungsmittelschiebungen und Wasserstoffbrücken auf und wird wahrscheinlich durch Austausch-Repulsions-Wechselwirkungen bedingt.

Infokasten 2

Blochgleichung

Die Blochgleichung beschreibt die Bewegungsgleichung einer Magnetisierung unter Einwirkung von einen oder mehreren Magnetfeldern. Wir hatten abgeleitet, dass im thermischen Gleichgewicht der α -Zustand etwas höher populiert ist, die Überschussmagnetisierung M_{0z} liegt entlang der z-Achse, wenn das externe Magnetfeld entlang z ausgerichtet ist. Wenn wir zunächst die Relaxation vernachlässigen, ist die Bewegung der Magnetisierung um magnetische Felder mathematisch gegeben durch den Ausdruck:

$$\dot{M} = \frac{dM(t)}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})$$

Die Gleichung besagt, dass die zeitliche Änderung der Magnetisierung \dot{M} gleich dem Kreuzprodukt des angelegten Feldes \vec{B} mit der Magnetisierung \vec{M} ist ($\gamma(\vec{M} \times \vec{B})$). Die zeitliche Änderung steht senkrecht zur Richtung des Feldes und senkrecht zur Magnetisierung selbst.

Definition des Kreuzprodukts:

Das Kreuzprodukt $\vec{c} = \vec{a} \times \vec{b}$ der dreidimensionalen Vektoren \vec{a} und \vec{b} ist gegeben durch folgenden Ausdruck:

$$\vec{c} = (a_y \cdot b_z - a_z \cdot b_y) \vec{i} + (a_z \cdot b_x - a_x \cdot b_z) \vec{j} + (a_x \cdot b_y - a_y \cdot b_x) \vec{k} = \begin{vmatrix} \vec{i} & \vec{j} & \vec{k} \\ a_x & a_y & a_z \\ b_x & b_y & b_z \end{vmatrix}$$

Präzession transversaler Magnetisierung und rotierendes Koordinatensystem:

Zu Beginn des Experiments haben wir die Überschussmagnetisierung M_{0z} vorliegen. Das statische Magnetfeld ist entlang der z-Achse. Wir erhalten also:

$$\dot{M} = \frac{dM(t)}{dt} = \gamma(M_{0z} \times B_{0z}) = 0.$$

Diese Gleichung besagt nichts anderes, als dass die Überschussmagnetisierung (die sogenannte Boltzmann-Magnetisierung) zeitlich invariant und konserviert ist.

Für die M_{0x} und M_{0y} finden wir:

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma [\vec{M} \times \vec{B}]_x = \gamma B_0 M_y$$

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma [\vec{M} \times \vec{B}]_y = -\gamma B_0 M_x$$

Man kann diese Differentialgleichung noch mal differenzieren und das jeweilige Ergebnis wechselseitig einsetzen und erhält:

$$\frac{d^2 M_x(t)}{dt^2} = -(\gamma B_0)^2 M_x$$

$$\frac{d^2 M_y(t)}{dt^2} = -(\gamma B_0)^2 M_y$$

Die Lösung dieser beiden Gleichungen kennt man von der klassischen Oszillatorgleichung, sie ist gegeben durch:

$$M_x(t) = M_x(0) \cos(\gamma B_0 t) - M_y(0) \sin(\gamma B_0 t)$$

$$M_y(t) = M_y(0) \sin(\gamma B_0 t) + M_x(0) \cos(\gamma B_0 t)$$

Diese beiden Gleichungen kann man auch in Matrizenform aufschreiben, man erhält dann:

$$\begin{pmatrix} M_x(t) \\ M_y(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(\gamma B_0 t) & -\sin(\gamma B_0 t) \\ \sin(\gamma B_0 t) & \cos(\gamma B_0 t) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_x(0) \\ M_y(0) \end{pmatrix}$$

Die Magnetisierung vollführt eine Präzessionsbewegung mit einer Winkelgeschwindigkeit von $\omega_L = \gamma B_0$. Die Präzessionsfrequenz ω_L (im Laborsystem, siehe unten), die auch Larmorfrequenz genannt wird, gilt für alle Kerne der gleichen Kernsorte, also z.B. alle Protonen, in gleicher Weise. Die Variation der chemischen Verschiebung wurde in Infokasten 1 eingeführt. Durch Variation des magnetischen Feldes am Orte des Kerns ergibt je nach chemischer Umgebung ein leicht unterschiedliches Feld $B_0(1 - \sigma_{iso}^i)$ und damit die individuelle Präzessionsfrequenz eines Kerns i zu: $\omega_i = B_0(1 - \sigma_{iso}^i)$.

Um die kleinen Variationen des Hauptfelds durch die chemische Umgebung separieren zu können, führt man ein rotierendes Koordinatensystem ein, das mit einer festen Rotationsfrequenz $\omega_0 = \gamma B_0$ der Rotation der Magnetisierung folgt.

In der Analogie des Vaters, der sein Kind auf einem vertikal sich auf und nieder bewegenden Pferd eines Jahrmarktkarussells sitzend betrachtet, springt der Vater bei Transformation in das rotierende Koordinatensystem auf das Karoussel auf. Nun kann er die Vertikalbewegung des Kindes allein und nicht mehr überlagert durch die Kreiselbewegung betrachten.

Die Rotationsfrequenz wird so gewählt, dass sie in der Mitte der in einer Probe vorkommenden chemischen Verschiebungen liegt (ω_0 liegt im MHz-Bereich, $\omega_i - \omega_0 = \Omega_i$ im kHz Bereich).

Im rotierenden Koordinatensystem haben wir also folgende Blochgleichung (ohne Relaxation):

$$\vec{M} \cdot = \frac{d\vec{M}(t)}{dt} = \gamma \left(\vec{M} \times \left(B_{0z} (1 - \sigma_{iso}) - \frac{\omega_0}{\gamma} \right) \right).$$

Entsprechend erhält man im rotierenden Koordinaten für einen Kern der chemischen Verschiebung Ω_i :

$$\begin{pmatrix} M_x(t) \\ M_y(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(\Omega_i t) & -\sin(\Omega_i t) \\ \sin(\Omega_i t) & \cos(\Omega_i t) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_x(0) \\ M_y(0) \end{pmatrix}$$

Beeinflussung der chemischen Verschiebung, mathematische Ableitung

Die chemische Verschiebung enthält einen richtungsunabhängigen, isotropen Anteil und einen richtungsabhängigen, anisotropen Anteil. Die chemische Verschiebung eines Kerns in einem Molekül hängt von der Orientierung des Kerns im Magnetfeld B_0 ab. Ein gutes Beispiel, um diesen Effekt zu erklären, ist die chemische Verschiebung eines Wasserstoffkerns am Benzolring. Im Magnetfeld wird ein diamagnetischer Ringstrom des 6π -Elektronensystems erzeugt. Dieser Ringstrom erzeugt ein Magnetfeld, das dem äußeren Magnetfeld entgegengesetzt ist. Der induzierte Ringstromeffekt hängt von der Orientierung des Benzolrings relativ zum B_0 -Feld ab: Man erzielt einen maximalen Ringstrom, wenn die Fläche des Benzolrings senkrecht auf dem B_0 -Feld steht (Abbildung 2.6, links) oder gleichbedeutend, wenn die Normale auf dem Benzolring parallel zum äusseren Feld ist. Die in dieser Orientierung beobachtete chemische Verschiebung nennen wir δ^{\max} . Steht das B_0 -Feld senkrecht auf der Normalen des Benzolrings (Abbildung 2.6, rechts), so wird kein Ringstrom erzeugt.

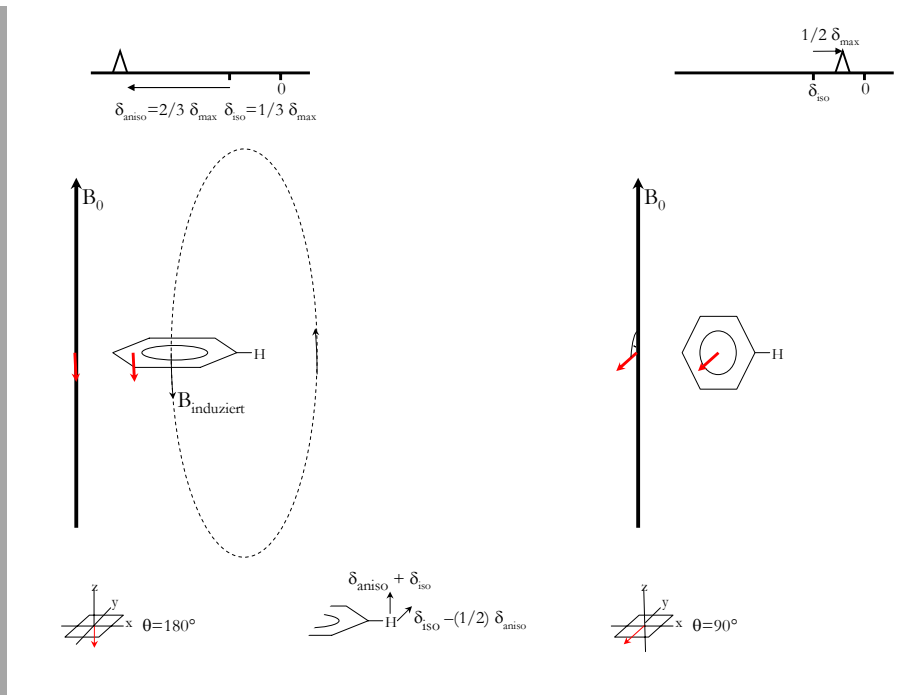


Abbildung 2.6: Ringstromeffekt und chemische Verschiebung; links: der Winkel zwischen der Normale der Ebene des Benzolrings beträgt 180° es fließt ein Ringstrom im konjugierten System und ein zu B_0 entgegengespoltes Feld wird induziert; rechts: der Winkel zwischen der Normale der Ebene des Benzolrings beträgt 90° , kein Ringstromeffekt

Den isotropen Anteil der chemischen Verschiebung erhält man, wenn man über alle möglichen Orientierungen mittelt bzw. wenn durch Bewegung sämtliche Orientierungen gemittelt werden. Das Resultat ist, dass der isotrope Anteil $1/3$ des maximalen anisotropen Anteils ist.

Dies kann man auch mathematisch ableiten, indem man die orientierungsabhängige chemische Verschiebung für jede beliebige Orientierung des Benzolrings berechnet. Dabei wird angenommen, dass die Normale auf der Benzolfläche jede beliebige Orientierung auf der Kugel einnehmen kann und mittels dann über die orientierungsabhängigen chemischen Verschiebungen für alle möglichen Orientierungen. Der induzierte Ringstrom hängt vom Winkel θ der Normalen zum B_0 -Feld ab: der Ringstrom ist proportional $\cos \theta$ als direkte Folge der Maxwell'schen Gleichung: $\vec{E}^* = \vec{\nabla} \times \vec{B}$. Die z-Komponente des induzierten Magnetfelds ist dann gleich $\cos \theta$ des gesamten induzierten Magnetfelds, so dass der vom Ringstrom abhängige Teil der chemischen Verschiebung proportional zu $\cos^2 \theta$ ist: $\delta = \delta^{\max} \cos^2 \theta$. Die Wahrscheinlichkeit dP einer Orientierung zwischen θ und $d\theta$ auf der Kugeloberfläche ist:

$$\frac{2\pi \sin \theta d\theta}{4\pi} = 0.5 \cdot d \cos \theta$$

Die Verteilung der chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit von θ lautet also: $d\delta = \cos^2 \theta \cdot 0.5 \cdot d \cos \theta$. Integration von $\cos \theta = 1$ bis $\cos \theta = -1$ ergibt: $\delta^{\text{iso}} = 1/3 \delta^{\max}$. Die chemische Verschiebung ist auch: $\delta = \delta^{\text{iso}} + \delta^{\text{aniso}} (3 \cos^2 \theta - 1) / 2$ mit $\delta^{\text{iso}} = 2/3 \delta^{\max}$.

Detektion des Signals

Das Herzstück eines NMR-Spektrometers bildet eine rf-Spule, die senkrecht zum statischen Magnetfeld B_0 orientiert ist und die um die Probe anliegt (siehe Abbildung 2.6). Sie wird zum einen dazu benutzt, einen rf-Puls anzuwenden, zum anderen dient sie zur Detektion von Magnetisierung in xy-Ebene (Aufnahme des NMR-Signals).

Die detektierten elektromagnetischen

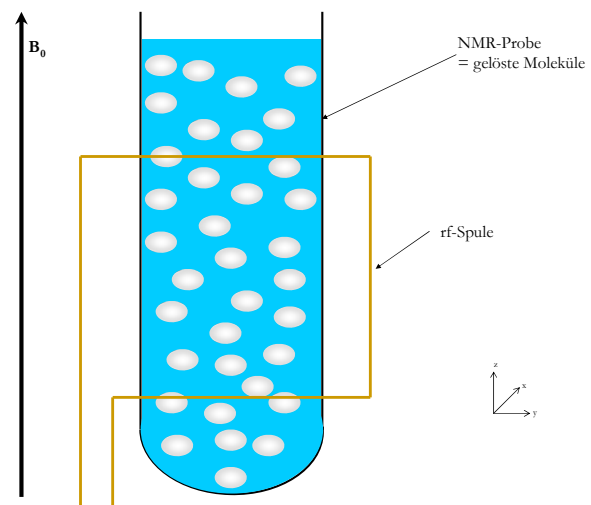


Abbildung 2.7: rf-Spule eines NMR-Spektrometers

Wellen, welche durch die präzedierenden Spins induziert werden, besitzen eine Frequenz von $\omega_1 = \omega_{\text{rf}} + \Omega_1$. Dabei ist $\omega_{\text{rf}}/2\pi$ die Spektrometerfrequenz und Ω_1 ist die Resonanzdifferenz, die der chemischen Verschiebung entspricht.

Das aufgenommene Signal wird mit der Spektrometerfrequenz derart „gemischt“, dass nur Wellen mit der Frequenz der chemischen Verschiebung digitalisiert werden. Die Spektrometerfrequenz ist somit die Frequenz mit der sich das rotierende Koordinatensystem im Laborkoordinatensystem um die z-Achse bewegt (Geschwindigkeit des Karussell). Die Phase der Spektrometerfrequenz ist genau definiert, so wird quasi genau entlang einer definierten Achse des rotierenden Koordinatensystems das Signal aufgenommen. Durch einen mathematischen „Trick“, der so genannten *quadrature detection* wird das Signal entlang beider transversalen Achsen (senkrecht zu B_0) detektiert.

Somit kann sowohl die Projektion des Spin-Vektors auf die y-Achse, als auch die Projektion auf die x-Achse beobachtet werden.

Diese gewonnenen Signale werden nach $e^{ix} = \cos x + i \sin x$ gemischt und es ergibt sich dann ein komplexes Signal der Form: $I_x \cos \Omega t + I_y \sin \Omega t = e^{i\Omega t}$.

Das Signal wird jedoch nicht kontinuierlich aufgenommen, sondern punktuell/digital [engl. digit Stelle]. Der Abstand der aufgenommenen Punkte ist dabei genau $\frac{1}{\text{SpektraleWeite}}$ und wird als

Dwell Time bezeichnet.

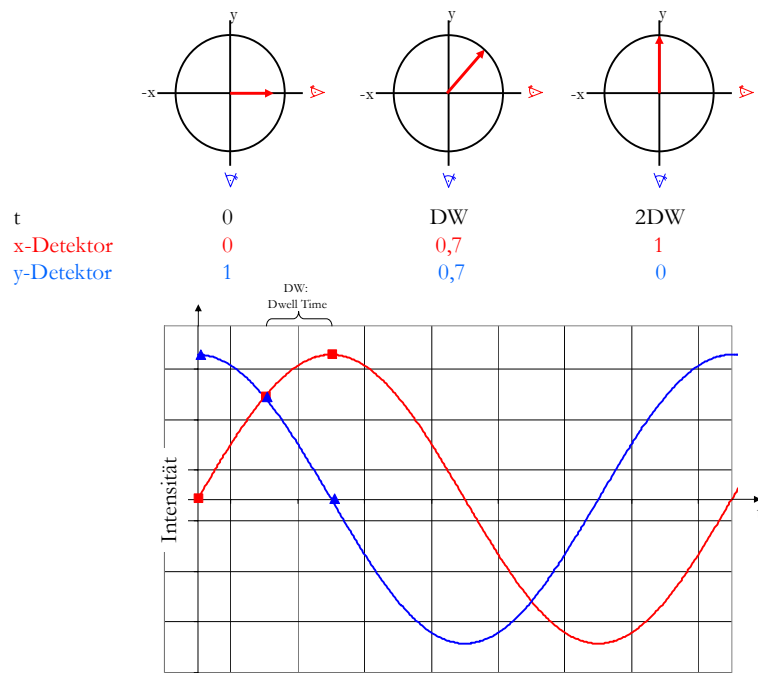


Abbildung 2.8: Digitalisierung des NMR Signals

Das aufgenommene Signal ist somit in der Zeit-, als auch in der Intensitätsdimension digitalisiert. Idealisierte NMR-Signale entsprechen cosinus- oder sinus-modulierten Wellen mit einer Frequenz gemäß ihrer chemischen Verschiebung, die sich unendlich ausbreiten. Durch das Phänomen der Relaxation (siehe vorheriges Kapitel) kommt es nun aber zu einer Überlagerung dieser Wellen mit einem exponentiellen Abfall der Intensität, so dass die Amplitude des Signal mit der Zeit abnimmt.

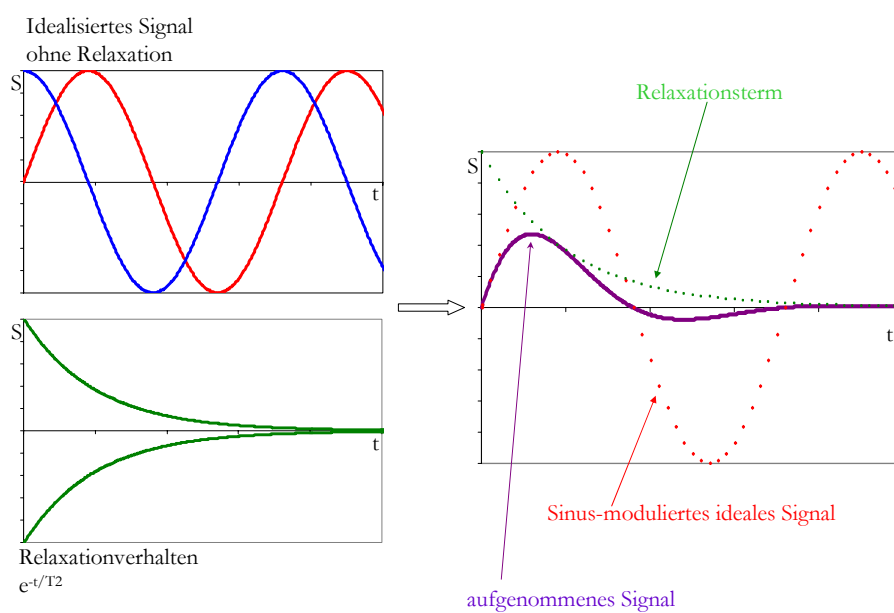


Abbildung 2.9: Idealisiertes Signal und Relaxation

Der mathematische Term, der das NMR-Signal beschreibt, muss daher um den Faktor der Relaxation ($e^{(-t/T_2)}$) erweitert werden. Es ergibt sich somit als Beschreibung des Signals eines Spins in Abhängigkeit von der Zeit

$$s_i(t) = a_i [\cos \Omega_i t + i \sin \Omega_i t] e^{(-t/T_2^i)}$$

$$s_i(t) = a_i e^{(i\Omega_i t)} e^{(-t/T_2^i)}$$

Für ein Molekül aus mehreren verschiedenen chemischen Kernen ergibt sich die Summe aus den einzelnen Signalen

$$S(t) = \sum_i s_i(t) = \sum_i a_i e^{\left(i\Omega_i - \frac{1}{T_2^i}\right)t}$$

Das so erhaltene Signal beschreibt das Verhalten der Spins in Abhängigkeit von der Zeit. Ein NMR-Spektrum jedoch ist immer die Darstellung des Signals/Intensität in Abhängigkeit von der Frequenz.

$$\begin{array}{ccc} & \text{FT} & \\ S_{\text{ges}}(t) & \rightarrow & S_{\text{ges}}(\nu) \\ \text{[s]} & & \text{[s}^{-1}\text{=Hz]} \end{array}$$

Um diese gewünschte Darstellung der Daten zu erhalten, ist es nötig, das detektierte Signal mittels Fourier-Transformation umzuwandeln.

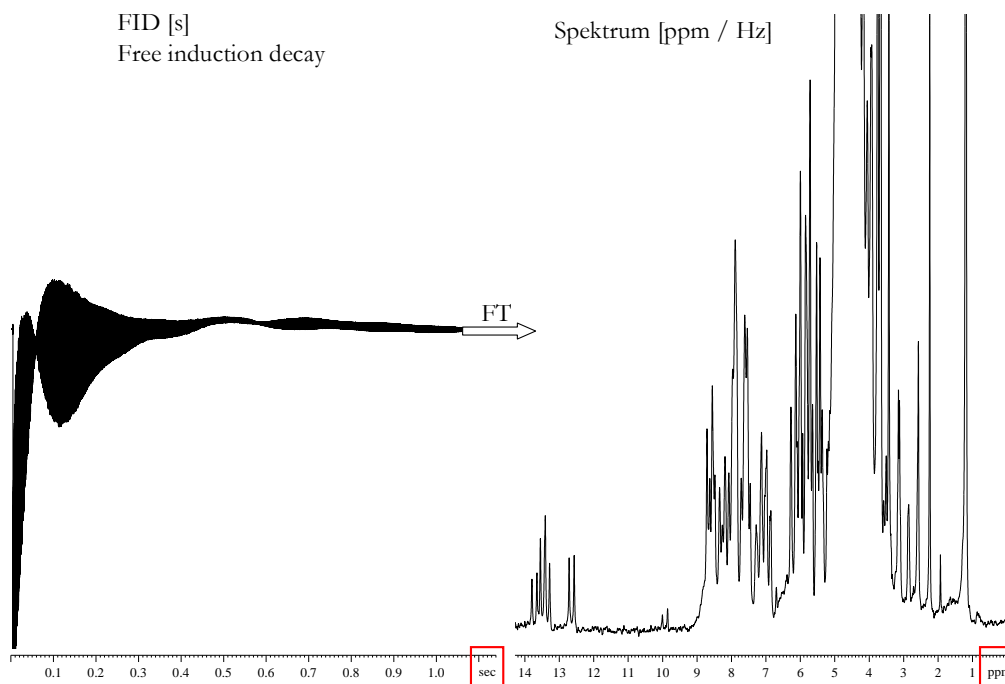


Abbildung 2.10: FID und dazugehöriges 1D ¹H-Spektrum eines RNA Moleküls bei 600MHz

Fourier-Transformation

Wie schon beschrieben, wird das Signal aus der Zeitdimension in die Frequenzdimension mittels Fourier-Transformation überführt. Um zu verstehen, wie die Anwendung dieser mathematischen Operation funktioniert, geht man von einem idealisierten Signal aus.

Das idealisierte Signal sei eine ungedämpfte cosinus-modulierte Welle und laufe in der Zeitdimension von $-\infty$ bis $+\infty$, die Frequenz der Welle entspreche der chemischen Verschiebung Ω .

Ein Synthesizer generiere nun cosinus-modulierte Wellen über den gleichen Zeitraum jedoch mit Frequenzen ω , wobei gelte $-\frac{SW}{2} \leq \omega \leq +\frac{SW}{2}$. Diese generierten Wellen werden nun einzeln

gemäß der Fourier-Transformation $\int_{-\infty}^{+\infty} S(t) \cdot \cos(\omega t) dt$ mit den experimentellen Daten (hier: die idealisierte Welle) multipliziert und schließlich über den Bereich von $-\infty$ bis $+\infty$ integriert. Stimmt die Frequenz ω der generierten Welle mit der Frequenz der experimentellen Welle (=chemische Verschiebung) überein, so ist das Integral ungleich 0 (gleich ∞). Sind beide Frequenzen jedoch verschieden, so ergibt sich das Integral zu 0.

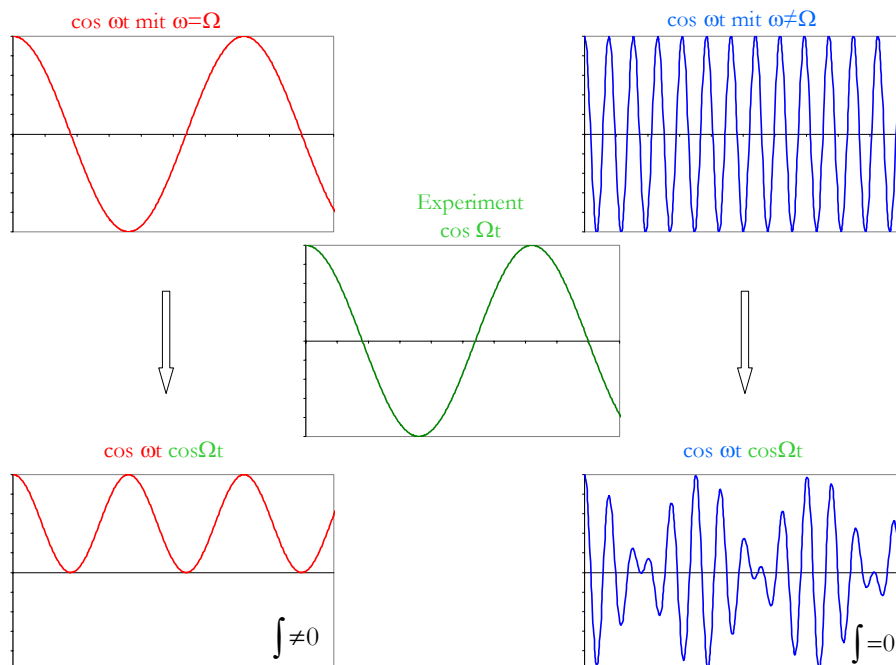


Abbildung 2.11: Kombinationen von generierten und experimentellen Wellenfunktion bei der Fourier-Transformation

Die Fourier-Transformation kann nicht nur für einen einzelnen Spin mit einer einzigen chemischen Verschiebung durchgeführt werden, sondern ist auch auf ein Molekül mit mehreren

verschiedenen Kernen anwendbar. Dies ist möglich, da es sich bei der FT um eine lineare Operation handelt, bei welcher gilt:

$$FT[f(t) + g(t)] = FT[f(t)] + FT[g(t)]$$

In Worten ausgedrückt, kann man sagen: Trifft die Frequenz einer generierten Welle die Resonanzfrequenz einer einzelnen Kernsorte im Molekül, so ist das gebildete Integral verschieden von null. Stimmt jedoch keine einzige Frequenz aus dem Ensemble der Wellenfunktion mit der Frequenz der generierten Funktion überein, so bleibt das Integral gleich null.

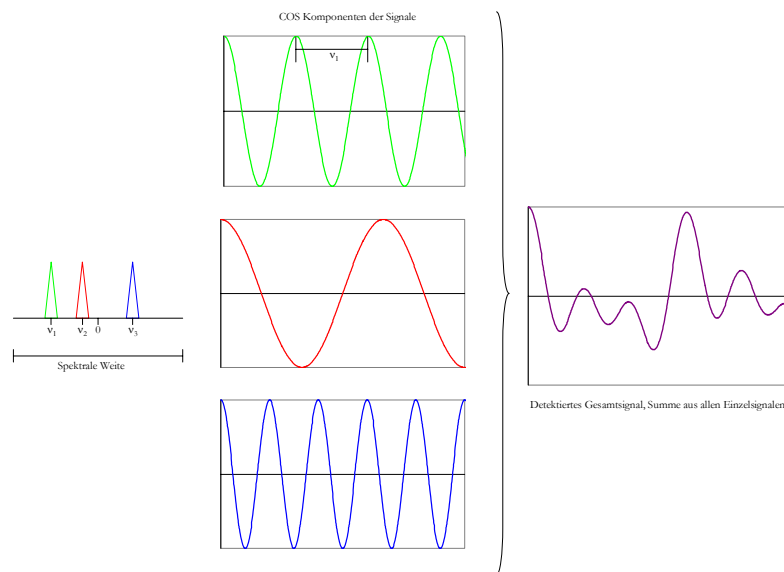


Abbildung 2.12: Kombination von einzelnen Wellen zu einem FID

Die Auflösung in der Frequenzdimension wird durch die Anzahl der mittels FT generierten Wellenfunktionen bestimmt. Eine Auflösung von 1024 Punkten bei einer Spektralen Weite von 6000Hz bedeutet also, dass 1024 Wellenfunktionen erzeugt, deren Frequenzmodulation von -3000Hz bis +3000Hz reicht und die einzelnen Frequenzen mit 5,86Hz aufgelöst sind.

Die durch FT erhaltenen Signale besitzen die Form

$$S(\omega) = A(\Delta\omega) - iD(\Delta\omega)$$

mit

$$A(\Delta\omega) = \frac{\frac{1}{T_2}}{\left(\frac{1}{T_2}\right)^2 + (\Delta\omega)^2} \quad D(\Delta\omega) = \frac{\Delta\omega}{\left(\frac{1}{T_2}\right)^2 + (\Delta\omega)^2}$$

Hierbei wird $A(\Delta\omega)$ als absorptives oder reales und $D(\Delta\omega)$ als dispersive oder imaginäres Signal bezeichnet. Beide Signalformen sind auf die phasensensitive Detektion mittels zweier um 90° phasenverschobener Detektoren zurückzuführen. Das absorptive Signal kann als die Fourier-Transformierte des cosinus-modulierten FIDs angesehen werden, das dispersive Signal als die Transformierte des sinus-modulierten FIDs.

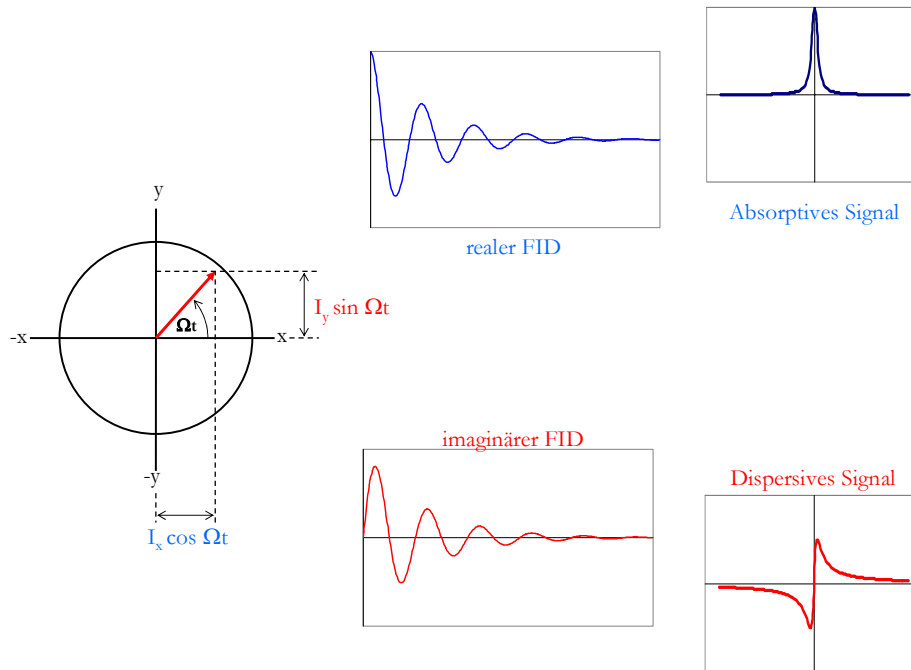


Abbildung 2.13: Darstellung der dispersiven und absorptiven Signalform

Weiterhin kann durch die komplexe Mischung der beiden Signale eine Vorzeichenunterscheidung erreicht werden. Betrachtet man sich ausschließlich das Signal des Detektors in Richtung der y-Achse des Koordinatensystems, so zeichnet dieser nur das cos-modulierte Signal auf. Nach FT ergeben sich daraus zwei positive Signale (mit dem Wert $\frac{1}{2}$) bei Ω und $-\Omega$. Das Signal, das der Detektor in x-Achsenrichtung aufzeichnet ist im vorliegendem Fall sin-moduliert und resultiert nach Fourier-Transformation in einem Signalmuster, bei dem ein negativer Peak (genau genommen mit dem Wert $i/2$) bei $-\Omega$ und ein positiver

Peak bei $+\Omega$ erscheint. Nach der komplexen Verrechnung beider Signale – entspricht der Addition der beiden Spektrenergebnisse ein Spektrum, das nur einen positiven Peak bei $+\Omega$ enthält.

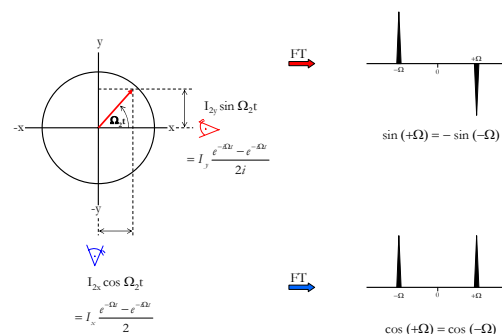


Abb. 2.14: Vorzeichenunterscheidung mittels FT

Linienformen und Relaxation

Der erste Parameter, der aus einem einfachen 1D-Experiment gewonnen werden kann, ist die chemische Verschiebung. Sie wird durch die Position des Signals im Spektrum bestimmt. Es kann aber auch ein weiterer Parameter einem 1D-Experiment extrahiert werden: die Relaxationszeit. Wie in einem der obigen Abschnitte dargestellt, hat die T_2 -Zeit Einfluss auf die Form des Peaks und dies sowohl im dispersiven als auch des absorptiven Teil im Spektrum.

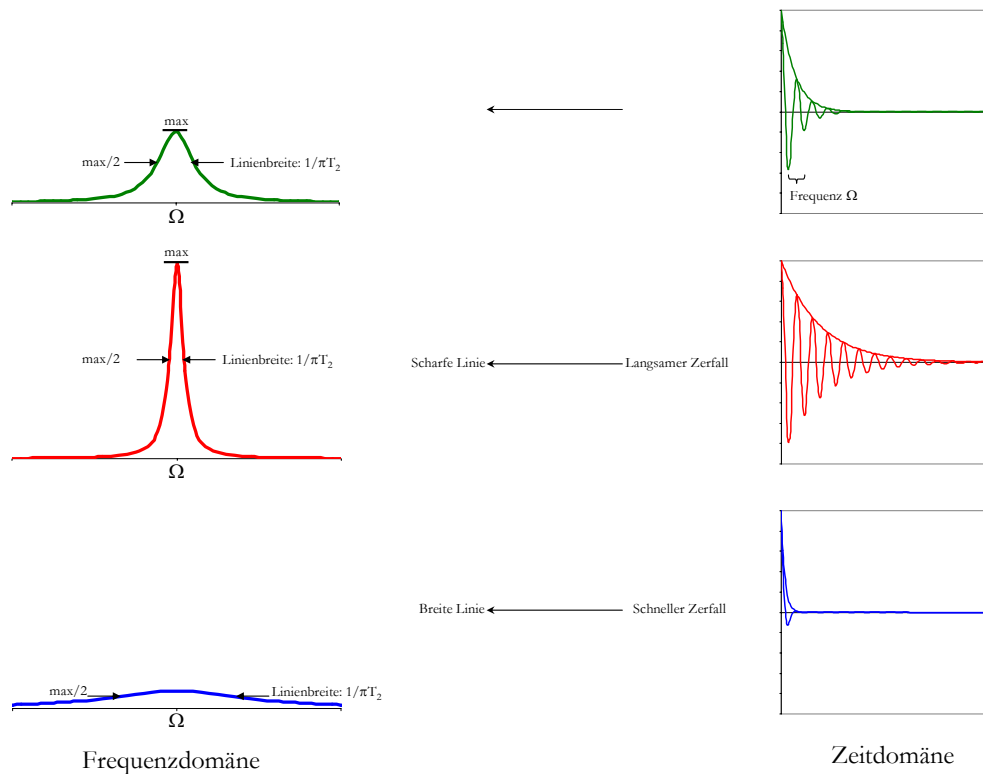


Abbildung 2.15: Zusammenhang zwischen Linienform und Relaxation

Je langsamer der Zerfall des Signals, je größer also die Relaxationszeit ist, desto schärfer ist die Peaklinie. Für einen breiten Peak ist ein schneller Zerfall, also eine kurze Relaxationszeit verantwortlich. Dies lässt sich durch die FT erklären. Da bei der FT das Integral über einen unendlichen Zeitraum gebildet wird, das Signal jedoch nur endlich von null unterscheidbar ist, muss die Bedingung für die FT derart abgeändert werden, dass nicht nur eine Frequenz die FT-Bedingung erfüllt, sondern ein ganzer Frequenzbereich. Je schneller das Signal nun relaxiert und damit nicht von null unterschiedlich ist, desto breiter wird der resultierende Peak.

Phasenkorrektur

Im Haupttext wurde eingeführt, dass nach komplexer Fouriertransformation ein absorptives und ein dispersives Signal vorliegt. Die durch FT erhaltenen Signale besitzen die Form

$$S(\omega) = A(\Delta\omega) - iD(\Delta\omega)$$

mit

$$A(\Delta\omega) = \frac{\frac{1}{T_2}}{\left(\frac{1}{T_2}\right)^2 + (\Delta\omega)^2} \quad D(\Delta\omega) = \frac{\Delta\omega}{\left(\frac{1}{T_2}\right)^2 + (\Delta\omega)^2}$$

Das absorptive Signal kann als die Fourier-Transformierte des cosinus-modulierten FIDs angesehen werden, das dispersive Signal als die Transformierte des sinus-modulierten FIDs.

Häufig erhält man ein Signal, bei dem man den Real- und Imaginärteil des Signals neu abstimmen muss. Diesen Prozess nennt man Phasenkorrektur. Bei der Phasenkorrektur unterscheidet man zwischen einer frequenzunabhängigen Phasenkorrektur nullter Ordnung und einer frequenzabhängigen Phasenkorrektur erster Ordnung.

Phasenkorrektur nullter Ordnung:

Zur Phasenkorrektur nullter Ordnung kommt es, falls der Detektor für das Signal nicht entlang der Richtung liegt, in der die Magnetisierung bei $t=0$ liegt. Man erhält dann für die Magnetisierung:

$$\begin{aligned} M_x(t) &= M(0)(\cos\phi_0 \cos\Omega t + \sin\phi_0 \sin\Omega t) = M(0)\cos(\Omega t + \phi_0) \\ M_y(t) &= M(0)(\sin\phi_0 \cos\Omega t + \cos\phi_0 \sin\Omega t) = M(0)\sin(\Omega t + \phi_0) \end{aligned}$$

Für das komplexe Signal $M^+(t)$ ergibt sich damit:

$$M^+(t) = \cos(\Omega t + \phi_0) + i \sin(\Omega t + \phi_0) = e^{i(\Omega t + \phi_0)}$$

Die Fouriertransformation von $M^+(t)$ ergibt:

$$S(\omega) = FT(M^+(t)) = e^{i\phi_0} L(\omega) = \cos\phi_0 A(\omega) - \sin\phi_0 D(\omega) + i(\sin\phi_0 A(\omega) - \cos\phi_0 D(\omega))$$

Hierbei ist $L(\omega)$ das phasenungestörte Signal. Der Absorptionsteil und der Dispersionsteil sind also jeweils mit von der Phase ϕ_0 abhängigen sinus- und cosinus-Termen multipliziert worden.

Man sagt dazu, Absorptionsteil und der Dispersionsteil sind „mit sinus und cosinus gemischt worden“. Multipliziert man nun $S(\omega)$ mit $e^{-i\phi_0}$, dann kann man den Phasenfehler eliminieren:

$$e^{-i\phi_0} S(\omega) = e^{-i\phi_0} \cdot e^{i\phi_0} L(\omega) = L(\omega)$$

Phasenkorrektur erster Ordnung:

Man beobachtet eine frequenzabhängigen Phasenkorrektur erster Ordnung, weil die Aufnahme des FID, also des NMR-Signals, nicht direkt nach dem Puls beginnen kann, sondern erst nach einer kurzen Wartezeit Δ (im Engl. Delay), der normalerweise einige μs lang ist. Dann haben die Magnetisierungsvektoren für verschiedene Kerne schon ein wenig chemische Verschiebung entwickelt. Die Phase im rotierenden Koordinatensystem ist also abhängig von der Differenz der chemischen Verschiebung Ω_i relativ zur Trägerfrequenz Ω_0 , die Phasenkorrektur, die man anwenden muss, ist demnach frequenzabhängig.

Die Magnetisierung M_0 lässt sich mathematisch wie folgt beschreiben:

$$M^+(t) = \cos(\Omega(t + \Delta)) + i \sin(\Omega(t + \Delta)) = e^{i(\Omega(t + \Delta))} = e^{i\Omega t} e^{i\Omega\Delta}$$

und die Fouriertransformation ganz analog:

$$\begin{aligned} S(\omega) &= FT(M^+(t)) = e^{i\Delta t} L(\omega) \\ &= \cos \Omega\Delta A(\omega) - \sin \Omega\Delta D(\omega) + i(\sin \Omega\Delta A(\omega) - \cos \Omega\Delta D(\omega)) \end{aligned}$$

Man korrigiert den Phasenfehler, indem man eine linear frequenzabhängige Phasenkorrektur $e^{-i\omega\Delta}$ anwendet, was dazu führt, dass in der Mitte des Spektrums ($\omega = \omega_0$) ein rein absorptives Signal zu beobachten ist.

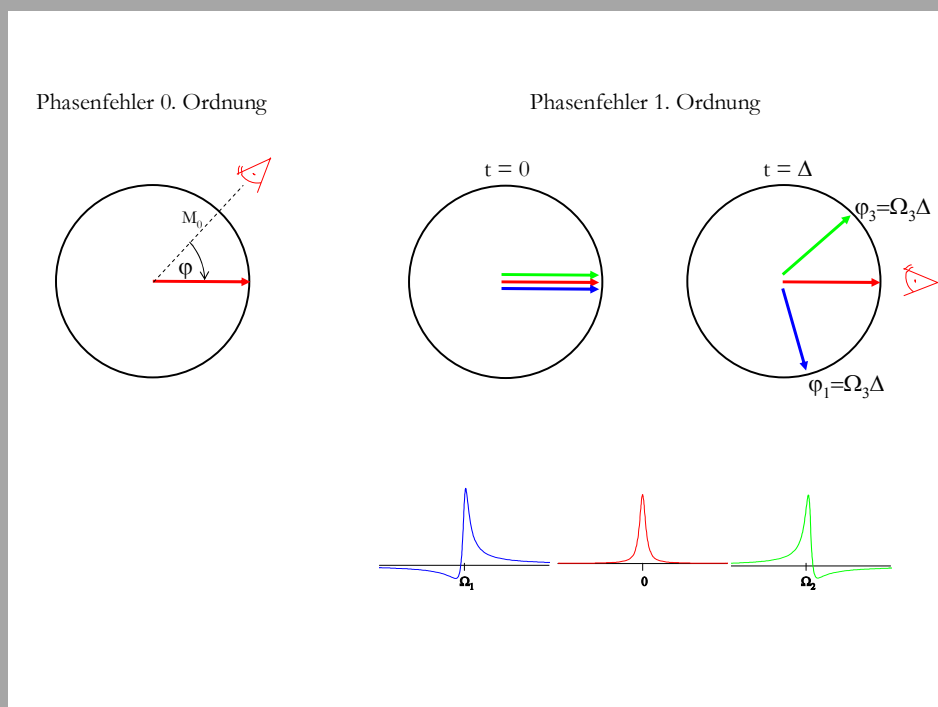


Abbildung 2.16: Phasenfehler 0. und 1. Ordnung; rechts: Phasenfehler 1. Ordnung, er kommt zustande, dass die Akquisition des FID nicht direkt nach dem Puls beginnt, sondern erst nach einem Delay Δ ; bis dato haben einige Spins schon chemische Verschiebung entwickelt und damit einen frequenzabhängigen Phasenunterschied zueinander; links: Phasenfehler 0. Ordnung, entsteht falls der Detektor zum Zeitpunkt $t=0$ nicht entlang der Magnetisierungsachse liegt.