

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
26. März 2009 (26.03.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2009/036741 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:

**G01R 33/28** (2006.01) **G01R 33/465** (2006.01)  
**G01R 33/30** (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2008/001542

(22) Internationales Anmeldedatum:  
16. September 2008 (16.09.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2007 044 940.4  
20. September 2007 (20.09.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **BRUKER BIOSPIN GMBH** [DE/DE]; Silber-  
streifen, 76287 Rheinstetten (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LUCHINAT, Claudio**  
[IT/IT]; Centro Risonanze Magnetiche, University of

Florence, Via Luigi Sacconi 6, I-50019 Sesto Fiorentino  
(IT). **KELLER, Tony** [DE/DE]; Odenwaldstrasse 14,  
76287 Rheinstetten (DE). **GIANOTTI, Antonio** [IT/DE];  
Klingenteichstrasse 15, 69117 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: **KOHLER SCHMID MÖBUS**; Rupp-  
mannstrasse 27, 70565 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,  
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,  
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,  
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE MAGNETIC RESONANCE MEASUREMENT OF WATER-SOLUBLE SAMPLE  
MOLECULES IN MOLECULAR RECEPTACLES, FOR EXAMPLE IN INVERSE MICELLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN DER MR-VERMESSUNG WASSERLÖSLICHER PROBENMOLEKÜLE IN MOLEKULA-  
REN BEHÄLTERN, BEISPIELSWEISE IN INVERSEN MIZELLEN

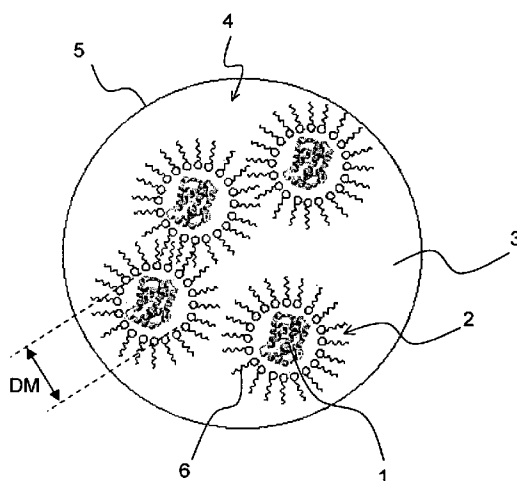


Fig. 1

(57) Abstract: A method for measuring the magnetic resonance of sample molecules (1) soluble in a polar solvent, electromagnetic high-frequency (=HF) field acting on the sample molecules (1), characterized in that the sample molecules (1) are present in a measuring emulsion (4) during measurement, wherein in the measuring emulsion (4) the sample molecules (1) are enclosed in molecular receptacles, in particular inverse micelles (2), and the molecular receptacles are distributed in a homopolar solvent (3). The invention enables the measurement of the magnetic resonance of water-soluble sample material with low apparatus-related complexity at a good signal-to-noise ratio, even at high frequencies of the irradiated HF fields.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2009/036741 A1



GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

---

**(57) Zusammenfassung:** Ein Verfahren zur Vermessung der magnetischen Resonanz von in einem polaren Lösungsmittel löslichen Probenmolekülen (1), wobei ein elektromagnetisches Hochfrequenz(=HF)-Feld auf die Probenmoleküle (1) einwirkt, ist dadurch gekennzeichnet, dass die Probenmoleküle (1) während der Vermessung in einer Messemulsion (4) vorliegen, wobei in der Messemulsion (4) die Probenmoleküle (1) in molekularen Behältern, insbesondere inversen Mizellen (2) eingeschlossen sind, und die molekularen Behälter in einem unpolaren Lösungsmittel (3) verteilt sind. Die Erfindung ermöglicht die Vermessung der magnetischen Resonanz wasserlöslichen Probenmaterials mit geringem apparativen Aufwand bei gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis auch bei hohen Frequenzen der eingestrahlten HF-Felder.

5

10

VERFAHREN DER MR-VERMESSUNG WASSERLÖSLICHER PROBENMOLEKÜLE IN MOLEKULAREN  
BEHÄLTERN, BEISPIELSWEISE IN INVERSEN MIZELLEN

15

20

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vermessung der magnetischen  
25 Resonanz von in einem polaren Lösungsmittel löslichen Probenmolekülen,  
wobei ein elektromagnetisches Hochfrequenz(=HF)-Feld auf die  
Probenmoleküle einwirkt.

Ein solches Verfahren ist zum Beispiel durch J.A. Weil et al, Electron Paramagnetic Resonance, John Wiley & Sons, New York, 1994, bekannt geworden.

- 5 In der Magnetresonanz(=MR) wird ein elektromagnetisches Hochfrequenz(=HF)-Feld auf eine Probe eingestrahlt, die sich in einem starken, statischen Magnetfeld  $B_0$  befindet. Die Wechselwirkung der Probe mit dem HF-Feld gibt Rückschlüsse auf die Probeneigenschaften, etwa in der Probe vorhandene Molekülgruppen. Wichtige Anwendungen der Magnetresonanz sind
- 10 Kernspinresonanz(=NMR)-Spektroskopie und Elektronenspinresonanz(=ESR)-Spektroskopie.

- Viele Probenmaterialien, deren Eigenschaften mit Magnetresonanz vermessen werden sollen, liegen in einem polaren Lösungsmittel, insbesondere in
- 15 wässriger Lösung, vor (da Wasser das weitaus häufigste polare Lösungsmittel ist, wird im Folgenden der Einfachheit halber von „Wasser“ und „wässrige Lösung“ gesprochen. Es versteht sich, dass dies auch andere polare Lösungsmittel und Gemische polarer Lösungsmittel einschließt). In der Regel wird dann eine wässrige Probe (bestehend aus Wasser und dem im Wasser
- 20 gelösten Probenmaterial) in ein Probengefäß eingefüllt, und das Probengefäß wird in einen Resonator verbracht, der die HF-Felder in die Probe einstrahlt. Typische HF-Felder, die im Rahmen von Magnetresonanz-Messungen in eine Probe eingestrahlt werden, werden jedoch von in der Probe enthaltenem Wasser absorbiert. Die Absorption steigt mit der Frequenz der HF-Felder an,
- 25 insbesondere die in der ESR benötigten Mikrowellen werden von Wasser stark absorbiert.

- Infolge der Absorption wird nur Probenmaterial im Randbereich einer wässrigen Probe voll von HF-Feldern bestrahlt; das Probeninnere wird bei größeren
- 30 Probendurchmessern gar nicht erreicht, so dass das vermessbare Probenmaterial einer wässrigen Probe effektiv verringert ist. Durch die Absorption sinkt auch die Güte eines Resonators, der eine wässrige Probe enthält. Durch diese beiden Effekte verschlechtert der Wassergehalt einer

Probe das Signal-zu-Rausch-Verhältnisses(=SNR) eines MR-Messsignals des Probenmaterials in der Probe. Bei starker Absorption besteht auch die Gefahr, dass der Resonator gar nicht mehr ankoppelt, und eine Messung damit nicht mehr möglich ist.

5

Der Stand der Technik begegnet dieser Problematik im Wesentlichen durch eine besondere Geometrie der Gefäße für die wässrigen Proben, die in einem Resonator angeordnet werden, vgl. dazu beispielsweise J. A. Weil et al, aaO.. Wenn ein Probengefäß bzw. dessen Probenraum in der Richtung parallel zum elektrischen Feld des HF-Felds sehr viel kleiner ist als die Wellenlänge des HF-Feldes, ist die Absorptionsproblematik stark vermindert bzw. tritt nicht auf. Die Probengefäße bzw. deren Probenräume werden daher in einer Dimension entsprechend kurz ausgebildet und in die Nullstellen der elektrischen Feldverteilung positioniert. Die räumlich Ausdehnung der E-Feld Nullstellen ist durch die Wellenlänge des HF-Felds bestimmt. Je höher die Frequenz des HF-Felds, desto kleiner ist die räumliche Ausdehnung der Nullstelle. Als Gefäße für wässrige Proben sind insbesondere Flachzellen, dünne Kapillaren oder auch Mehrfachkapillaranordnungen bekannt geworden. Eine Mehrfachkapillaranordnung für die EPR (=electron proton resonance) ist beispielsweise durch die „AquaX sample cell“ von der Firma Bruker bekannt geworden, oder auch durch US 7,088,101 B2.

Als weitere Maßnahme sind aus der NMR sogenannte „E-free“-Resonatoren bekannt, bei denen das elektrische Feld im Zentrum der wässrigen Probe minimiert wird, vgl. beispielsweise P.L. Gor'kov et al., J. Magn. Reson. 185 (2007), Seiten 77-93, oder auch C. Li et al., J. Magn. Reson. 180 (2006), Seiten 51-57.

Die Dimensionsvorgabe an das Probengefäß begrenzt grundsätzlich das Volumen an Probe, welches im Resonator vermessen werden kann. Dies wiederum begrenzt das SNR der MR-Messung. Auch können Probengefäße bzw. deren Probenräume nicht beliebig eng gefertigt werden, so dass bei höheren Frequenzen des HF-Feldes die Absorption nicht mehr durch die

Dimensionierung des Probengefäßes reduziert werden kann. Die im Stand der Technik eingesetzten speziellen Probengefäße und speziellen Resonatoren machen die Vermessung von wässrigen Proben im übrigen apparativ aufwändig und teuer.

5

#### Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Vermessung der magnetischen Resonanz von in einem polaren Lösungsmittel löslichem Probenmaterial vorzustellen, mit dem bei geringem apparativen Aufwand ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auch bei hohen Frequenzen der HF-Felder erzielbar ist.

10

#### Kurze Beschreibung der Erfindung

15

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren der eingangs genannten Art, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Probenmoleküle während der Vermessung in einer Messemulsion vorliegen, wobei in der Messemulsion die Probenmoleküle in molekularen Behältern eingeschlossen sind, und die molekularen Behälter in einem unpolaren Lösungsmittel verteilt sind.

20

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden die (in der Regel wasserlöslichen) Probenmoleküle mittels molekularer Behälter, beispielsweise inverser Mizellen, in einem unpolaren Lösungsmittel verteilt. In jedem molekularen Behälter ist mindestens ein Probenmolekül eingeschlossen. Der molekulare Behälter kann (bezogen auf das Probenmolekül) so klein sein, dass er genau ein Probenmolekül einschließt, ohne dieses zu zerstören. In einer weiteren bevorzugten Variante sind die molekularen Behälter jedoch größer und schließen jeweils mehrere Probenmoleküle in polarer Lösung ein. Eine bevorzugte lineare Ausdehnung des molekularen Behälters liegt im Bereich von einigen zehn Nanometern, kann jedoch auch bis zu einigen Mikrometern reichen. Die molekularen Behälter werden wiederum insgesamt vom unpolaren Lösungsmittel umgeben. Das unpolare Lösungsmittel absorbiert das HF-Feld

25

30

bei der MR-Messung nicht merklich, selbst wenn das HF-Feld längere Strecken im unpolaren Lösungsmittel zurücklegen muss. Das unpolare Lösungsmittel nimmt dabei einen Großteil des Volumens einer erfindungsgemäßen Probe ein. Im Vergleich zu einer wässrigen Probe ist in der erfindungsgemäßen Probe nur eine geringe Menge Wasser enthalten (im Extremfall ist praktisch gar kein Wasser mehr in der Probe enthalten); dieses Wasser befindet sich im Inneren der molekularen Behälter. Allein schon durch den verringerten Wassergehalt verbessert sich das SNR bei der Vermessung einer erfindungsgemäßen Probe im Vergleich zu einer wässrigen Probe bei gleicher Stoffmenge an Probenmolekülen, gleichem Probenvolumen und gleichem Probengefäß. Bevorzugt enthält eine erfindungsgemäße Probe nur so viel Wasser, dass die Probenmoleküle im Inneren der molekularen Behälter gerade in Lösung bleiben können.

Zudem wirkt die Verteilung des Wassers in der erfindungsgemäßen Probe der Absorption des HF-Feldes entgegen. Die größte Länge, die das elektrische Feld in einer erfindungsgemäßen Probe am Stück zu durchdringen hat, entspricht dem Durchmesser eines molekularen Behälters. Der Durchmesser eines molekularen Behälters ist auf jeden Fall kleiner als der Innendurchmesser des Probengefäßes, in dem die erfindungsgemäße Probe enthalten ist. Durch die Verkleinerung des am Stück in Wasser zurückzulegenden Absorptionswegs, insbesondere im Vergleich zur Wellenlänge des HF-Feldes, wird die Absorption in der Probe ebenfalls verringert. Der Durchmesser eines molekularen Behälters wird durch geeignete Wahl der chemischen Reagenzien und die Prozessführung eingestellt bzw. ausgewählt. Der Durchmesser inverser Mizellen kann beispielsweise durch geeignete Wahl des unpolarem Lösungsmittels (bzw. Lösungsmittelgemisches), der grenzflächenaktiven Substanz (bzw. Substanzgemischen), den Mengenverhältnissen von unpolarem Lösungsmittel, polarem Lösungsmittel (in der Regel Wasser) und grenzflächenaktiver Substanz, pH-Einstellung sowie durch mechanische Bearbeitung (Schütteln, Ultraschallbehandlung oder dergleichen) und gegebenenfalls weiteren Parametern eingestellt werden. Insbesondere können auch Durchmesser der molekularen Behälter eingestellt bzw. ausgewählt

werden, die weit unter der minimal möglichen Dimension von Probengefäßen bzw. deren Probenräumen liegen.

Die Durchmesser inverser Mizellen liegen typischerweise im Bereich von  
5 einigen zehn Nanometern. Die Größe von Proteinen liegt im Bereich von  
typischerweise 3 bis 6 Nanometern, d.h. Proteine können sich in der wässrigen  
Lösung innerhalb der inversen Mizelle frei bewegen.

Da die molekularen Behälter in der Regel nicht –zumindest nicht exakt –  
10 kugelförmig sind, soll im Folgenden der Begriff „Durchmesser“ oder „effektiver  
Durchmesser“ der größten linearen Ausdehnung des Innenraums des  
molekularen Behälters entsprechen.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens können praktisch beliebige  
15 Probengefäße verwendet werden, ohne dass die Gefäßform bzw. die  
Dimensionierung des Probenraums merklichen Einfluss auf das SNR der MR-  
Messung hätte. Erfindungsgemäß können auch einfache Gefäße mit großem  
Probenraum und ohne Einschränkung der Gefäßdimension in der Richtung  
parallel zum elektrischen Feld verwendet werden. Dadurch kann das  
20 vermessbare Volumen an Probe, und damit auch die vermessbare Menge an  
Probenmaterial bzw. Probenmolekülen, vergrößert werden. Insbesondere  
können konventionelle Probenröhrchen mit einem Innendurchmesser  $\geq 1$  mm,  
bevorzugt 3 mm, verwendet werden. Diese Maße gelten für das X-Band der  
ESR. Im W-Band bei 94 GHz sind die entsprechenden Maße dann  $\geq 0.1$  mm,  
25 bevorzugt etwa 1 mm.

Molekulare Behälter, die für die vorliegende Erfindung grundsätzlich geeignet  
sind, beinhalten inverse Mizellen, Carcerand-Komplexe (carcerands), Hemi-  
Carcerand-Komplexe (hemi-carcerands), molekulare Körbe (molecular  
30 baskets), Fullerene, molekulare Nanokapseln (molecular nanocapsules) oder  
auch selbstorganisierende Kapselungen (self-assembled capsules).  
Verschiedene Arten von solchen molekularen Behältern sind beispielsweise  
bekannt geworden durch:

- Donald J. Cram, Nature 356 (1992), S. 29-36
- Ralf Warmuth, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 37 (2000), S. 1-38;
- Min Wie et al., J. Mater. Chem. 2005 (15), S. 1197-1203;
- 5 - Ryo E.H., Zhao Y., Org. Lett. 6(18) , 2004, S. 3187-3189.
- Ryo E.H. et al., J. Org. Chem. 2006 (19), S. 7205-7213

#### Bevorzugte Verfahrensvarianten

10 Bei einer besonders bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das polare Lösungsmittel Wasser. Wasser ist für die meisten zu untersuchenden Probenmoleküle als Lösungsmittel gut geeignet und entspricht in der Regel der natürlichen Umgebung des Probenmoleküls.

15 Vorteilhaft ist eine Verfahrensvariante, bei der die molekularen Behälter jeweils genau ein Probenmolekül enthalten. Typischerweise und bevorzugt enthält der molekulare Behälter dann auch keine oder allenfalls sehr wenige Moleküle des polaren Lösungsmittels (in der Regel Wasser). Dadurch kann die Absorption des HF-Feldes besonders stark verringert werden.

20

Bei einer vorteilhaften, alternativen Verfahrensvariante enthalten die molekularen Behälter jeweils mehrere Probenmoleküle gelöst in dem polaren Lösungsmittel. Durch das Halten der Probenmoleküle im polaren Lösungsmittel werden Beschädigungen und Reaktionen (etwa eine Denaturierung) der

25 Probenmoleküle vermieden; die Vermessung der Eigenschaften der Probenmoleküle wird durch die Probenaufbereitung für die MR-Messung nicht verfälscht.

Bevorzugt ist weiterhin eine Verfahrensvariante, bei der das polare  
30 Lösungsmittel und/oder das unpolare Lösungsmittel deuteriert sind, insbesondere wobei das polare Lösungsmittel und/oder das unpolare Lösungsmittel vollständig deuteriert sind.

Bei einer bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst die Vermessung der magnetischen Resonanz eine

- Elektronenspinresonanz(=ESR)-Messung
- und/oder eine Kernspinresonanz(=NMR)-Messung. Diese beiden Verfahren sind in der spektroskopischen Praxis besonders wichtig. Besonders bei den in der ESR benötigten HF-Feld-Frequenzen (typisch ca. 9-100 GHz, etwa X-Band mit ca. 9 GHz oder Q-Band mit ca. 34 GHz) kann es bei wässrigen Proben zu erheblichen Absorptionsproblemen kommen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung beseitigt werden können.

10

Bevorzugt ist auch eine Weiterentwicklung dieser Verfahrensvariante, bei der die Vermessung der magnetischen Resonanz eine

- Elektron-Kern-Doppelresonanz(=ENDOR)-Messung
- und/oder eine Dynamische Kernspinpolarisation(=DNP)-Messung umfasst.

15

Bei diesen Methoden wird die Magnetisierung der Elektronenspins auf die Spins der Atomkerne übertragen; ENDOR und DNP sind insofern kombinierte ESR / NMR-Experimente. Durch die vorliegende Erfindung wird die Elektronenspin-Anregung im ESR-Teil verbessert, so dass auch ein verbessertes NMR-Spektrum erhalten wird.

20

Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden als unpolares Lösungsmittel Isooktan, Benzol, Toluol, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Mineralöl und/oder Silikonöl eingesetzt. Diese unpolaren Lösungsmittel sind in der Praxis bewährt. Das unpolare Lösungsmittel ist erfindungsgemäß im Wesentlichen transparent für das HF-Feld der MR-Messung.

25

Bevorzugt ist auch eine Verfahrensvariante, bei der die Probenmoleküle Proteine und/oder paramagnetische Moleküle umfassen. Die Untersuchung von Proteinen ist in der Praxis besonders wichtig. Paramagnetische Moleküle sind der ESR zugänglich.

30

Bevorzugt ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei der für die Vermessung der effektive Durchmesser DM der molekularen Behälter in einem

Bereich  $10 \text{ nm} \leq DM \leq 10 \text{ }\mu\text{m}$ , vorzugsweise  $10 \text{ nm} \leq DM \leq 100 \text{ nm}$ , insbesondere DM etwa 30 nm eingestellt ist. Diese Größen von molekularen Behältern haben sich in der Praxis bewährt, insbesondere bei inversen Mizellen.

5

Bei einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante ist vorgesehen, dass für die Vermessung der effektive Durchmesser DM der molekularen Behälter so eingestellt ist, dass gilt:

$DM \ll ET$ , mit ET: Eindringtiefe des HF-Feldes im polaren Lösungsmittel. Die

- 10 Eindringtiefe ET entspricht dabei einem Weg, auf dem eine  $1/e$ -Abschwächung der Intensität des HF-Feldes eintritt (e: Eulersche Zahl, ca. 2, 7183). Dabei gilt bevorzugt  $100 \cdot DM \leq ET$ . Bei dieser Behälterdimensionierung sind Absorptionsverluste durch das polare Lösungsmittel (in der Regel Wasser) besonders gering. Die so definierte ET beträgt in Wasser ca. 0.8 mm im X-
- 15 Band und 0.25 mm im W-Band und ist damit um ein Vielfaches größer als zum Beispiel der Durchmesser einer inversen Mizelle von einigen 10 Nanometern.

Ganz besonders bevorzugt ist eine Verfahrensvariante, bei der als molekulare Behälter inverse Mizellen eingesetzt werden. Bei inversen Mizellen kann die

20 Einstellung von deren Größe (etwa des Durchmessers) bei der Probenpräparation in der Regel auf einfache Weise variiert werden; die Zahl der Probenmoleküle je inverse Mizelle kann dadurch ebenfalls einfach eingestellt werden. Weiterhin können inverse Mizellen relativ kostengünstig hergestellt werden.

25

Eine bevorzugte Weiterentwicklung dieser Verfahrensvariante sieht vor, dass als grenzflächenaktive Substanz für die inversen Mizellen

- Na(AOT) = Natrium-2bis(2ethylhexyl)sulfosuccinat

- und/oder CTAB = Hexadecyltrimethylammonium-Bromid

- 30 eingesetzt wird. Diese grenzflächenaktiven Substanzen haben sich in der Praxis bewährt. Die grenzflächenaktiven Substanzen besitzen einen polaren Endabschnitt und einen unpolaren Endabschnitt und bilden die Wände der

inversen Mizellen aus.

- Besonders bevorzugt ist auch eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei der während der Vermessung die Messemulsion in einem
- 5 Probengefäß angeordnet wird, wobei das Probengefäß eine kleinste Dimension KD des Probenvolumens aufweist, wobei gilt:
- $KD \geq (1/20) \cdot \lambda$ , mit  $\lambda$ : Vakuum-Wellenlänge des HF-Feldes. Die kleinste Dimension KD des Probenvolumens (Probenraums) liegt dabei typischerweise in der Richtung parallel zum elektrischen Feld des HF-Felds im Resonator.
- 10 Ebenso besonders bevorzugt ist eine Verfahrensvariante, bei der während der Vermessung die Messemulsion in einem Probengefäß angeordnet wird, wobei das Probengefäß eine Dimension DPE des Probenvolumens parallel zum elektrischen Feld des HF-Felds aufweist, wobei gilt:
- $DPE \geq (1/20) \cdot \lambda$ , mit  $\lambda$ : Vakuum-Wellenlänge des HF-Feldes.
- 15 Solche Probengefäße können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erfolgreich und ohne nennenswerte Absorptionsverluste eingesetzt werden. Hingegen würden bei Einsatz herkömmlicher wässriger Proben erhebliche Absorptionsverluste auftreten, da die kleinste Dimension KD bzw. die Dimension DPE parallel zum elektrischen Feld nicht mehr ausreichend klein
- 20 wäre gegenüber der Wellenlänge  $\lambda$ . Bevorzugt gilt im Rahmen der Erfindung  $KD \geq (1/5) \cdot \lambda$  oder sogar  $KD \geq (1/2) \cdot \lambda$  bzw.  $DPE \geq (1/5) \cdot \lambda$  oder sogar  $DPE \geq (1/2) \cdot \lambda$ ; dann können auch sehr große Probenräume eingerichtet und entsprechend große Probenmengen vermessen werden.
- 25 In den Rahmen der vorliegenden Erfindung fällt auch eine Verwendung einer Emulsion, umfassend ein unpolares Lösungsmittel und im unpolaren Lösungsmittel verteilte molekulare Behälter, insbesondere inverse Mizellen, wobei in den molekularen Behältern Moleküle eingeschlossen sind, insbesondere in wässriger Lösung, als zu vermessende Probe in einer
- 30 Magnetresonanz-Messung.

Weitere Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung und der Zeichnung. Ebenso können die vorstehend genannten und die noch weiter

ausgeführten Merkmale erfindungsgemäß jeweils einzeln für sich oder zu mehreren in beliebigen Kombinationen Verwendung finden. Die gezeigten und beschriebenen Ausführungsformen sind nicht als abschließende Aufzählung zu verstehen, sondern haben vielmehr beispielhaften Charakter für die Schilderung der Erfindung.

5

Zeichnung und detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung ist in der Zeichnung dargestellt und wird anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigt:

5

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Messemulsion gemäß der Erfindung;

10

Fig. 2 eine schematische Darstellung eines Messaufbaus für das erfindungsgemäße Verfahren.

Fig. 3a ein EPR-Spektrum einer Probe (a) mit paramagnetischen Probenmolekülen in einer Messemulsion gemäß der Erfindung;

15

Fig. 3b ein EPR-Spektrum einer Probe (b) mit paramagnetischen Probenmolekülen in einer wässrigen Probe, bei gleicher Stoffmenge an Probenmolekülen und gleichem Probengefäß wie bei der Messung von Fig. 3a;

20

Fig. 4 ein EPR-Spektrum einer Probe (c) mit paramagnetischen Probenmolekülen in einer Messemulsion gemäß der Erfindung;

Fig. 5 ein EPR-Spektrum einer Probe (d) mit paramagnetischen Probenmolekülen in einer Messemulsion gemäß der Erfindung.

25

Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich mit der Verbesserung der Vermessbarkeit von in polaren Lösungsmitteln (und insbesondere in Wasser) löslichen Probenmolekülen im Rahmen von Magnetresonanz-Messungen wie ESR und NMR.

30

Wasser absorbiert die für MR-Messungen erforderlichen HF-Felder, was die Vermessung von wässrigen Proben erschwert, insbesondere das SNR verschlechtert, oder gar eine Vermessung der wässrigen Probe unmöglich

macht. Gleiches gilt bei Verwendung vieler anderer polarer Lösungsmittel (einschließlich Gemische verschiedener polarer Lösungsmittel); im Folgenden wird zur Vereinfachung stellvertretend nur noch auf Wasser Bezug genommen.

- 5 Wird Wasser in einem HF-Resonator angeordnet, so sinkt die Resonatorgüte ab. Aufgrund dielektrischer Verluste gilt bei einem üblichen, mit einer wässrigen Probe gefüllten Probenröhrchen mit Innenradius  $r$

$$1/Q_E \sim r^m$$

10

- wobei  $Q_E$  der Güteanteil des Resonators aufgrund dielektrischer Verluste ist, und  $m$  eine natürliche Zahl ist. Bei einem zylindrischen Probenröhrchen in einem  $TE_{102}$  Resonator (ein Rechteckresonator) beträgt beispielsweise  $m=4$ . Grundsätzlich können Güteverluste durch einen kleineren Innenradius des Probenröhrchens verringert werden; gleichzeitig sinkt dabei aber das Volumen an vermessbarer Probe. Bei Anordnung von mehreren Probenröhrchen im Resonator kann das vermessbare Probenvolumen wiederum gesteigert werden (Mehrfachkapillaranordnung), was aber apparativ aufwändig ist. Außerdem kann der Innenradius von Probenröhrchen nur in einem begrenzten Bereich gefertigt werden.
- 15
- 20

- Die Erfindung schlägt hingegen vor, wasserlösliche Probenmoleküle in einer besonderen Art der Aufbereitung der Proben zu vermessen. Als Basis dafür wird ein unpolares Lösungsmittel eingesetzt. Um die wasserlöslichen Probenmoleküle in dem unpolaren Lösungsmittel verteilen zu können, werden die Probenmoleküle in molekularen Behältern eingeschlossen. Im Inneren des molekularen Behälters befindet sich dazu ein Hohlraum, der ein oder mehrere Probenmoleküle in der Regel zusammen mit etwas Wasser aufnehmen kann. Die Wandung des molekularen Behälters wird gebildet durch ein Molekül oder mehrere zusammengelagerte Moleküle. Diese molekularen Behälter sind im unpolaren Lösungsmittel gut (d.h. gleichmäßig) verteilbar, in der Regel aufgrund ihrer äußeren Oberflächeneigenschaften.
- 25
- 30

Eine Probe, die bereit ist für eine Vermessung in einem erfindungsgemäßen Verfahren zeigt schematisch die **Figur 1** anhand eines Beispiels basierend auf inversen Mizellen als molekulare Behälter.

- 5 Die zu vermessenden wasserlöslichen Probenmoleküle 1, beispielsweise paramagnetische Proteinmoleküle, sind in sogenannten inversen Mizellen 2 eingeschlossen. Die inversen Mizellen 2 enthalten außer den Probenmolekülen 1 auch Wasser. Das Innere der inversen Mizellen 2 ist also von einer wässrigen Lösung der Probenmoleküle 1 erfüllt. Die inversen Mizellen 2 sind wiederum in
- 10 einem unpolaren Lösungsmittel 3 verteilt. Unpolares Lösungsmittel 3 liegt also nur außerhalb der inversen Mizellen 2 vor. Die Gesamtheit von unpolarem Lösungsmittel 3 und den darin verteilten inversen Mizellen 2 wird als Messemulsion 4 bezeichnet.
- 15 Die Messemulsion 4 wird für die MR-Messung als Probe im Probenvolumen (Probenraum) eines Probengefäßes angeordnet (siehe dazu auch Fig. 2); der Rand des Probengefäßes ist in Fig. 1 mit Bzz. 5 versehen.

Die inversen Mizellen 2 weisen jeweils eine Wand auf, die gebildet wird durch

20 eine Vielzahl von Molekülen einer grenzflächenaktiven Substanz 6. Die Moleküle der grenzflächenaktiven Substanz 6 weisen jeweils einen nach innen gerichteten, hydrophilen Endabschnitt („Kopf“, in Fig. 1 als Kreis dargestellt) und einen nach außen gerichteten, hydrophoben Endabschnitt („Schwanz“, in Fig. 1 als Wellenlinie dargestellt) auf. Die Köpfe werden beispielsweise durch

25 Carboxylat-Gruppen ausgebildet, die Schwänze werden beispielsweise durch Alkyl-Gruppen ausgebildet.

Die Moleküle der grenzflächenaktiven Substanz 6 lagern sich bei geeigneten Bedingungen, insbesondere Mischungsverhältnissen, spontan (von selbst) zu

30 inversen Mizellen 2 zusammen, wobei sie das vorhandene Wasser und die darin gelösten Probenmoleküle 1 in ihrem Inneren einschließen. Man beachte, dass die Anzahl der Probenmoleküle 1, die in jeweils einer inversen Mizelle 2 eingeschlossen ist, von der Größe der inversen Mizelle 2 abhängt. Die Größe

der inversen Mizellen 2 kann durch an sich bekannte Maßnahmen eingestellt werden, insbesondere die Auswahl des unpolaren Lösungsmittels 3, der grenzflächenaktiven Substanz 6, den Mischungsverhältnissen in der Messemulsion 4, und mechanischer Behandlung der Messemulsion. Die Größe  
5 der inversen Mizellen 2 wird im Rahmen der Erfindung durch den effektiven Durchmesser DM beschrieben; im Falle einer nicht vernachlässigbaren Wandstärke wird DM als der Innendurchmesser der inversen Mizelle (bzw. des molekularen Behälters) bestimmt (siehe Fig. 1).

10 In der Regel stehen die zu vermessenden Probenmoleküle 1 zunächst als reine wässrige Lösung (Probenmoleküle in Wasser gelöst) zur Verfügung, und werden im Rahmen der Erfindung insbesondere durch Zusatz von unpolarem Lösungsmittel 3 und grenzflächenaktiver Substanz 6 in eine Messemulsion 4 überführt.

15

Man beachte, dass für die erfindungsgemäße Vermessung die Probenmoleküle 1 in lokal wässriger Umgebung, nämlich innerhalb der inversen Mizellen 2, verbleiben können. Dies ist insbesondere von Vorteil, wenn die Probenmoleküle 1 durch einen Entzug des Wassers verändert oder zerstört  
20 werden würden.

**Figur 2** zeigt schematisch einen Messaufbau für die erfindungsgemäße Vermessung der magnetischen Resonanz wasserlöslicher Probenmoleküle.

25 Die zu vermessenden wasserlöslichen Probenmoleküle sind erfindungsgemäß in einer Messemulsion verteilt, welche als Probe 14 in das Probenvolumen (den Probenraum) 11 eines Probengefäßes 12 eingefüllt ist. Das Probengefäß 12 ist in einem Resonator 13 angeordnet, der ein Hochfrequenz(=HF)-Feld in die Probe 14 einstrahlen kann. Das HF-Feld umfasst ein elektrisches Feld  $E_{HF}$ ,  
30 welches sich in Fig. 2 in Pfeilrichtung 15 von links nach rechts erstreckt, und ein magnetisches Feld  $B_{HF}$ , welches sich von unten nach oben erstreckt, vgl. Pfeilrichtung 16. Man beachte, dass das HF-Feld im Resonator 13 als eine räumliche stehende Welle vorliegt, bei der das Maximum von  $B_{HF}$  dem

Minimum von  $E_{HF}$  entspricht. (Anmerkung: Eine konventionelle wässrige Probe kann nur im Minimum von  $E_{HF}$  positioniert werden und wird dadurch in ihrer Größe stark eingeschränkt.)

- 5 Das Probengefäß 12 ist röhrenförmig mit einem kreisrunden Querschnitt (senkrecht zur Zeichenebene von Fig. 2) aufgebaut. Der Probenraum 11 weist somit insbesondere parallel der Pfeilrichtung 15 seine kleinste Dimension KD auf. Diese kleinste Dimension KD ist im gezeigten Messaufbau identisch mit der Dimension DPE des Probenraums 11 gemessen parallel zur Richtung 15  
10 des elektrischen Feldes  $E_{HF}$ .

- Der Resonator 13 strahlt beispielsweise im Rahmen einer ESR-Messung ein HF-Feld mit einer Frequenz von 100 GHz in die Probe 14 ein. Die Vakuumwellenlänge  $\lambda$  des HF-Felds beträgt dann ca. 3 mm. Als Probengefäß  
15 12 wird im Rahmen der Erfindung ein Röhrchen mit einem Innendurchmesser von 1 mm eingesetzt, so dass in diesem Fall gilt  $KD \approx \lambda/3$  bzw.  $DPE \approx \lambda/3$ . Obwohl die Dimension des Probenraums 11 parallel zum elektrischen Feld nicht mehr als klein gegenüber der Wellenlänge  $\lambda$  des HF-Felds angesehen werden kann, sind durch die erfindungsgemäße Probenaufbereitung MR-  
20 Messungen an der Probe 14 gut möglich. Insbesondere absorbiert das in der Probe enthaltene unpolare Lösungsmittel das HF-Feld nur unwesentlich.

- Die verbesserten Vermessungsmöglichkeiten der magnetischen Resonanz wasserlöslicher Probenmoleküle durch die Erfindung im Vergleich zum Stand  
25 der Technik verdeutlichen ESR-Vergleichsmessungen, die in den **Figuren 3a und 3b** dargestellt sind.

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

NaAOT: Natrium-2bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat

- 30 GdDTPA: Gadolinium-Diethylen-Triamin-Pentaacetat

EPR: Elektronen-paramagnetische Resonanz (electron paramagnetic resonance)

### *I. Herstellung der erfindungsgemäßen Probe (a)*

In Isooktan als unpolarem Lösungsmittel wurde NaAOT als grenzflächenaktive Substanz unter starkem Schütteln zugesetzt, bis eine völlig transparente  
5 Mikroemulsion mit einer Konzentration von 200 Millimol NaAOT pro Liter Isooktan erhalten wurde. Weiterhin wurde GdDTPA als paramagnetisches Probenmaterial in Wasser gelöst; hierbei wurde mit verdünnter Natronlauge (NaOH) ein pH von 7,2 und weiterhin eine Konzentration von 3,81 Millimol GdDTPA pro Liter Wasser eingestellt. 200 µl der wässrigen GdDTPA-Lösung  
10 wurden zu 2 ml der Mikroemulsion zugesetzt, und die neue Mikroemulsion wurde geschüttelt, bis völlige Transparenz erreicht war. Die geschüttelte neue Mikroemulsion dient als Messemulsion. Es ergibt sich eine Konzentration von 346 Mikromol GdDTPA pro Liter Messemulsion.

15 Aufgrund der Löslichkeitseigenschaften der wässrigen Lösung in der Mikroemulsion befinden sich die Moleküle des paramagnetischen Probenmaterials anschließend innerhalb von inversen AOT-Mizellen.

### *II. Herstellung der Vergleichsprobe (b)*

20 GdDTPA wurde in Wasser gelöst, bis eine Konzentration von 346 Mikromol pro Liter Wasser erreicht war. Diese wässrige GdDTPA-Lösung wird für die Vergleichsprobe verwendet.

### *III. Vergleichsmessung*

25 Baugleiche Probenkapillaren mit einem Innendurchmesser von 1 mm wurden mit jeweils gleichen Volumina der Messemulsion (Probe (a)) und der wässrigen GdDTPA-Lösung (Probe (b)) vollständig gefüllt.

30 Von beiden Proben (a) und (b) wurden sodann EPR-Messungen im X-Band (ca. 9,8 GHz) durchgeführt.

Das Ergebnis der beiden Messungen ist in den Diagrammen der Figuren 3a und 3b dargestellt. Es ist jeweils in identischem Maßstab nach rechts das statische Magnetfeld  $B_0$  in Gauß, und nach oben die Intensität des EPR-Signals aufgetragen.

5

Das EPR-Signal der erfindungsgemäß präpariert vermessenen Probe (a) (Messemulsion) ist ca. 5-mal stärker als das EPR-Signal der Vergleichsprobe (b) (wässrige Probe), obwohl in beiden Proben (a) und (b) identische Stoffmengen der paramagnetischen Probenmoleküle vorliegen. Durch die erfindungsgemäße Probenpräparation kann also das SNR deutlich verbessert werden.

10

Die **Figuren 4 und 5** zeigen ebenfalls die Verbesserungen in der Vermessung wässriger Probenmoleküle durch die Erfindung anhand der Proben (c) und (d).

15

Die Messemulsion für die Proben (c) und (d) wurden analog Probe (a) präpariert, wobei jedoch abweichend 400  $\mu$ l (statt 200  $\mu$ l) von wässriger GaDTPA-Lösung in 2 ml Mikroemulsion gelöst wurden. Es ergibt sich eine Konzentration von 635 Mikromol GdDTPA pro Liter Messemulsion.

20

Mit dieser Messemulsion wurde für Probe (c) in ein Probenröhrchen mit 3mm Innendurchmesser befüllt, und für Probe (d) wurde eine Kapillare mit 1mm Innendurchmesser befüllt. An Probe (c) wurde eine EPR-Messung im X-Band (ca. 9,8 GHz) durchgeführt, und an Probe (d) wurde eine EPR-Messung im Q-Band (34 GHz) durchgeführt.

25

Die erfindungsgemäß präpariert vermessenen Proben (c), siehe Fig. 4, und (d), siehe Fig. 5, gestatten beide eine qualitativ akzeptable Vermessung des EPR-Signals der enthaltenen paramagnetischen Probenmoleküle. Es ist wiederum nach rechts das statische Magnetfeld  $B_0$  nach oben die Signalintensität aufgetragen.

30

Hingegen haben die Erfinder festgestellt, dass reine wässrige Proben (GdDTPA gelöst in Wasser) mit gleicher Konzentration von 635 Mikromol GdPTDA pro Liter Wasser unter sonst gleichen Bedingungen (bezüglich Probe (c):

Röhrchen-Innendurchmesser 3mm und X-Band, bezüglich Probe (d): Kapillar-

5 Innendurchmesser 1mm und Q-Band) keine EPR-Messungen mehr erlauben.

Unter den Bedingungen von Probe (c) zerstört die große Wassermenge die EPR-Tauglichkeit des Resonators. Unter den Bedingungen von Probe (d)

macht sich die mit zunehmender Messfrequenz abnehmende Wasserverträglichkeit des Resonators bemerkbar.

10

Mit dem erfindungsgemäßen Messverfahren können bei den üblichen Frequenzen des HF-Felds (etwa in der ESR im Bereich ca. 1-100 GHz) konventionelle Probengefäße und Resonatoren eingesetzt werden, oder auch höhere Messfrequenzen als bisher üblich (etwa in der ESR im Bereich ca. 100-

15 600 GHz) für wasserlösliche Probenmoleküle erschlossen werden. Besonders bei gekoppelten ESR/NMR-Experimenten sind oft hohe HF-Feldfrequenzen einzustrahlen, beispielsweise beträgt beim  $B_0$ -Feld eines 400MHz NMR-Magneten die entsprechende ESR-Einstrahlfrequenz 263 GHz. Bei Übergang zu leistungstärkeren NMR-Magneten (wie etwa 800 MHz oder 1000MHz) muss  
20 dann die Probe auch entsprechend höhere ESR-Einstrahlfrequenzen für gekoppelte ESR/NMR-Frequenzen geeignet sein, um von der Kopplung voll zu profitieren. Dies kann mit der vorliegenden Erfindung geleistet werden.

Zusammenfassend beschreibt die Erfindung eine Präparation von

25 wasserlöslichem Probenmaterial, das einer Magnetresonanz-Messung unterzogen werden soll. Im Rahmen der Präparation wird das Probenmaterial in wässriger Lösung in molekularen Behältern eingeschlossen. Bevorzugt werden als molekulare Behälter inverse Mizellen eingesetzt. Hierbei wird das Probenmaterial in einer kleinen Menge Wasser gelöst und zusammen mit einer  
30 grenzflächenaktiven Substanz (Tensid) in ein unpolares, für die HF-Felder der MR-Messung transparentes Lösungsmittel gegeben. Es stellen sich inverse Mizellen ein, deren Wand durch das Tensid gebildet wird. Im Inneren der inversen Mizellen ist das wasserlösliche Probenmaterial zusammen mit der

geringen Menge Wasser eingeschlossen, und die inversen Mizellen sind ihrerseits im unpolaren Lösungsmittel gelöst. Eine solchermaßen präparierte erfindungsgemäße Probe wird der Vermessung unterzogen. Durch die erfindungsgemäße Probenpräparation kann das SNR von MR-Messungen verglichen mit Probenmaterial in reiner Wasserlösung erheblich gesteigert werden. Insbesondere kann mehr Probenraum im Resonator eingerichtet werden, ohne dass Güteverluste des Resonators die Vermessbarkeit beeinträchtigen würden.

### **Patentansprüche**

1. Verfahren zur Vermessung der magnetischen Resonanz von in einem  
5 polaren Lösungsmittel löslichen Probenmolekülen (1), wobei ein  
elektromagnetisches Hochfrequenz(=HF)-Feld auf die Probenmoleküle  
(1) einwirkt,

dadurch gekennzeichnet,

10 dass die Probenmoleküle (1) während der Vermessung in einer  
Messemulsion (4) vorliegen, wobei in der Messemulsion (4) die  
Probenmoleküle (1) in molekularen Behältern eingeschlossen sind, und  
die molekularen Behälter in einem unpolaren Lösungsmittel (3) verteilt  
15 sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das polare  
Lösungsmittel Wasser ist.

20 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
dass die molekularen Behälter jeweils genau ein Probenmolekül (1)  
enthalten.

25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
dass die molekularen Behälter jeweils mehrere Probenmoleküle (1)  
gelöst in dem polaren Lösungsmittel enthalten.

30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch  
gekennzeichnet, dass das polare Lösungsmittel und/oder das unpolare  
Lösungsmittel (3) deuteriert sind, insbesondere wobei das polare  
Lösungsmittel und/oder das unpolare Lösungsmittel (3) vollständig

deutert sind.

- 5 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Vermessung der magnetischen Resonanz eine
- Elektronenspinresonanz(=ESR)-Messung
  - und/oder eine Kernspinresonanz(=NMR)-Messung umfasst.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Vermessung der magnetischen Resonanz eine
- Elektron-Kern-Doppelresonanz(=ENDOR)-Messung
  - und/oder eine Dynamische Kernspinpolarisation(=DNP)-Messung umfasst.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als unpolares Lösungsmittel (3) Iso-Oktan, Benzol, Toluol, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Mineralöl und/oder Silikonöl eingesetzt wird.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenmoleküle (1) Proteine und/oder paramagnetische Moleküle umfassen.
- 25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Vermessung der effektive Durchmesser DM der molekularen Behälter in einem Bereich  $10 \text{ nm} \leq DM \leq 10 \text{ }\mu\text{m}$ , vorzugsweise  $10 \text{ nm} \leq DM \leq 100 \text{ nm}$ , insbesondere DM etwa 30 nm eingestellt ist.
- 30 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Vermessung der effektive Durchmesser DM

der molekularen Behälter so eingestellt ist, dass gilt:  
 $DM \ll ET$ , mit ET: Eindringtiefe des HF-Feldes im polaren  
Lösungsmittel.

5 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch  
gekennzeichnet, dass als molekulare Behälter inverse Mizellen (2)  
eingesetzt werden.

10 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass als  
grenzflächenaktive Substanz (6) für die inversen Mizellen (2)  
- Na(AOT) = Natrium-2bis(2ethylhexyl)sulfosuccinat  
- und/oder CTAB = Hexadecyltrimethylammonium-Bromid  
eingesetzt wird.

15 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch  
gekennzeichnet, dass während der Vermessung die Messemulsion (4) in  
einem Probengefäß (12) angeordnet wird, wobei das Probengefäß (12)  
eine kleinste Dimension KD des Probenvolumens (11) aufweist, wobei  
gilt:

20  $KD \geq (1/20) \cdot \lambda$ , mit  $\lambda$ : Vakuum-Wellenlänge des HF-Feldes.

25 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch  
gekennzeichnet, dass während der Vermessung die Messemulsion (4) in  
einem Probengefäß (12) angeordnet wird, wobei das Probengefäß (12)  
eine Dimension DPE des Probenvolumens (11) parallel zum elektrischen  
Feld des HF-Feldes aufweist, wobei gilt:

$DPE \geq (1/20) \cdot \lambda$ , mit  $\lambda$ : Vakuum-Wellenlänge des HF-Feldes.

30 16. Verwendung einer Emulsion (4), umfassend ein unpolares Lösungsmittel  
(3) und im unpolaren Lösungsmittel (3) verteilte molekulare Behälter,  
insbesondere inverse Mizellen (2), wobei in den molekularen Behältern

Moleküle (1) eingeschlossen sind, insbesondere in wässriger Lösung, als zu vermessende Probe (14) in einer Magnetresonanz-Messung.

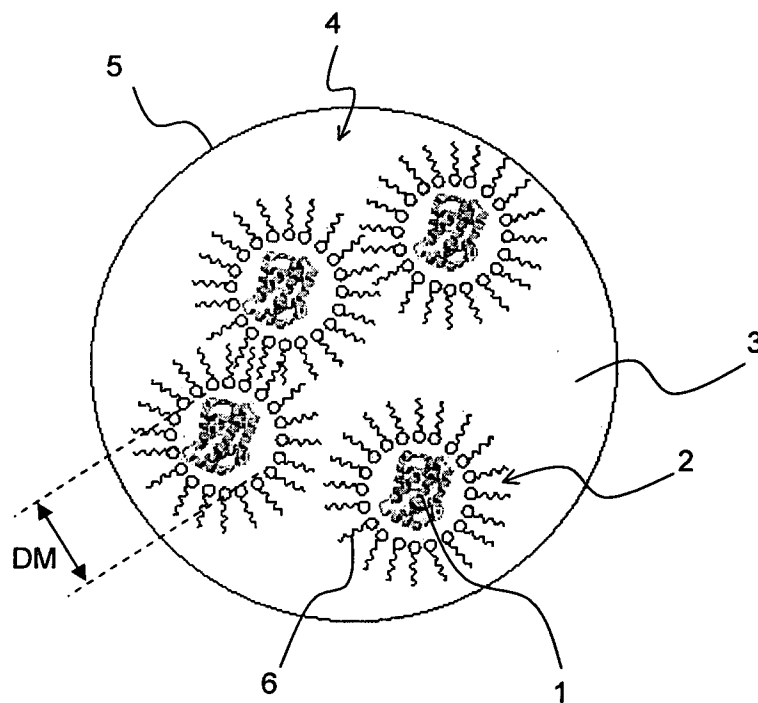


Fig. 1

2 / 6

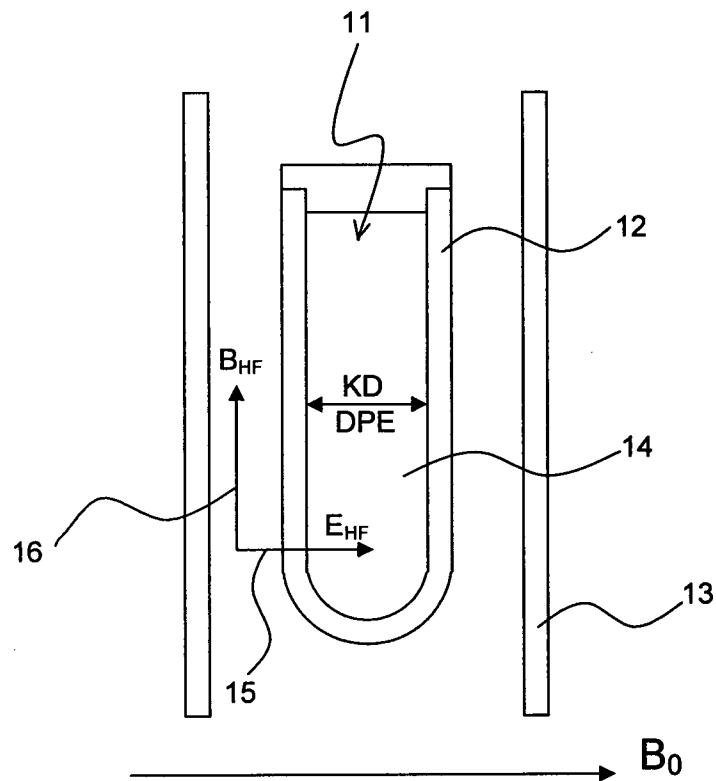
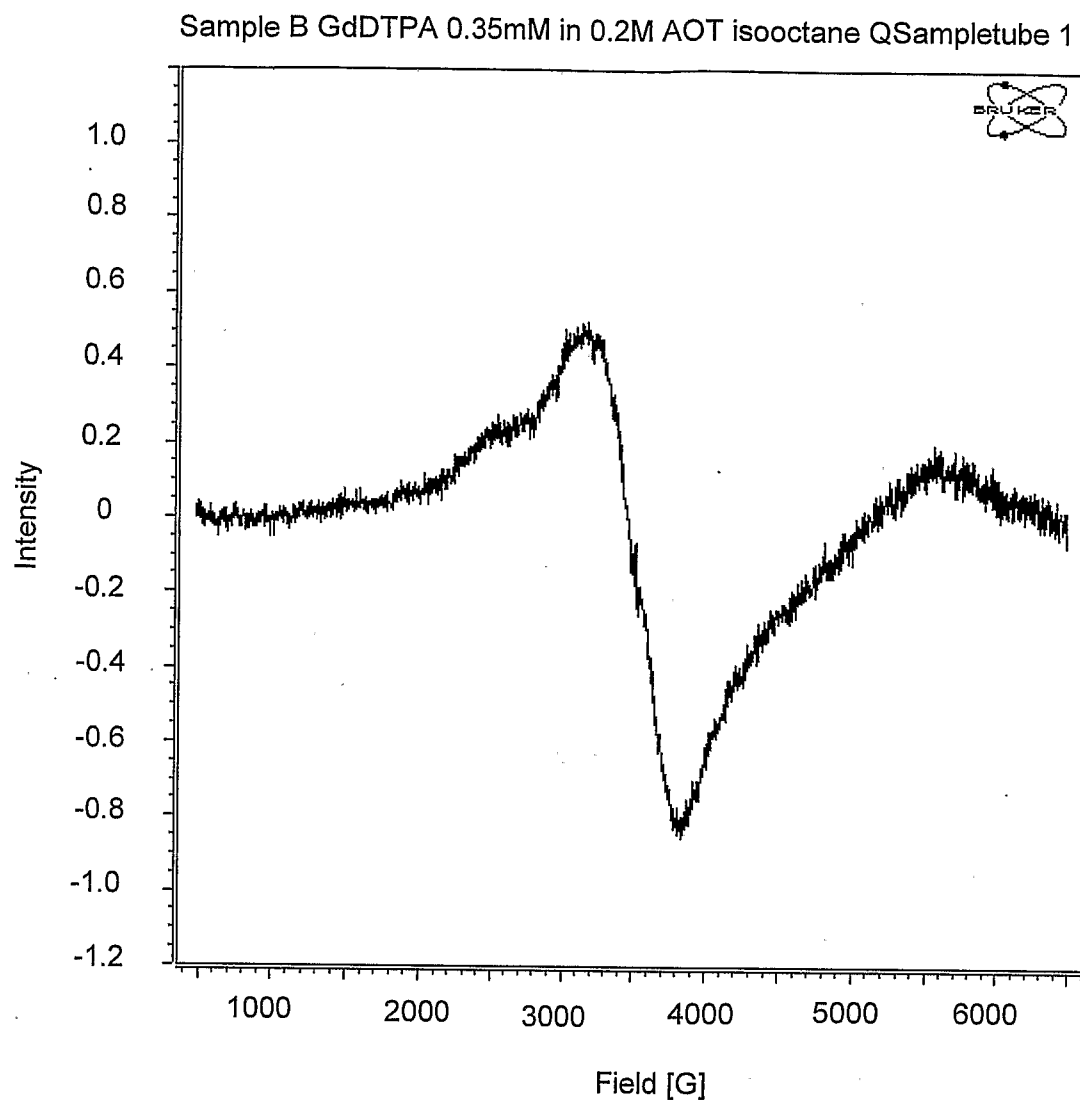
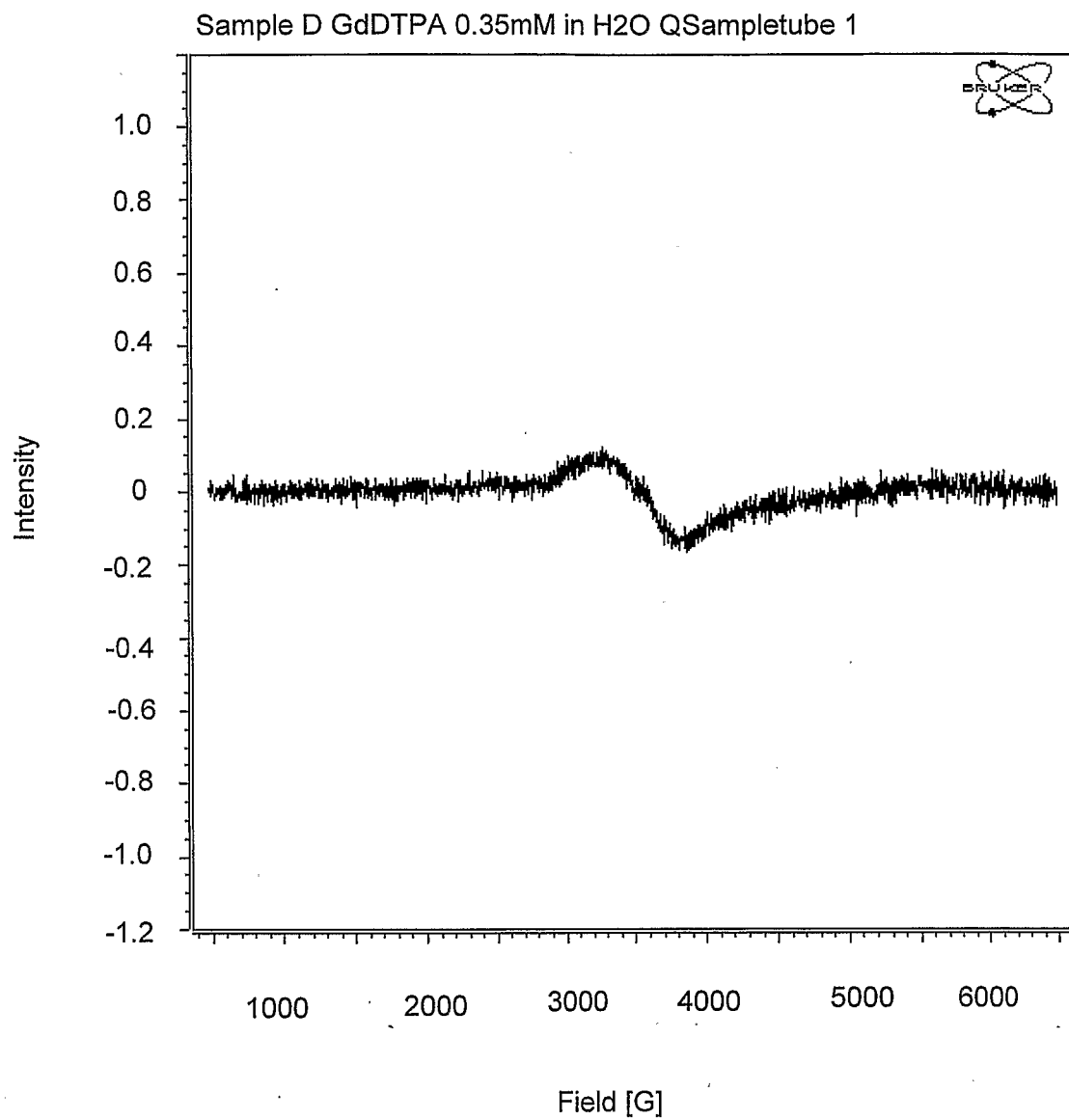


Fig. 2

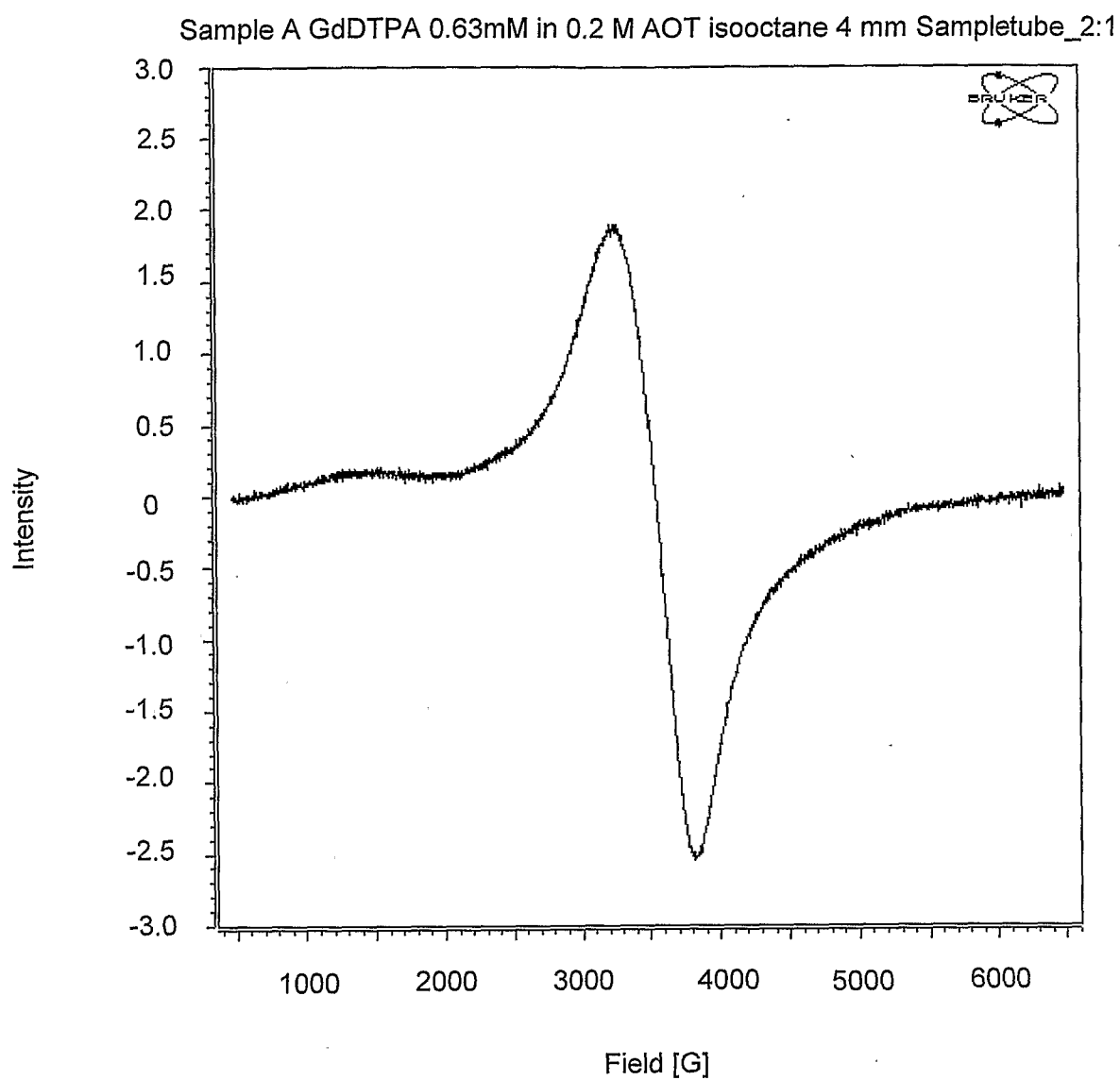
3 / 6

**Fig. 3a**

4 / 6

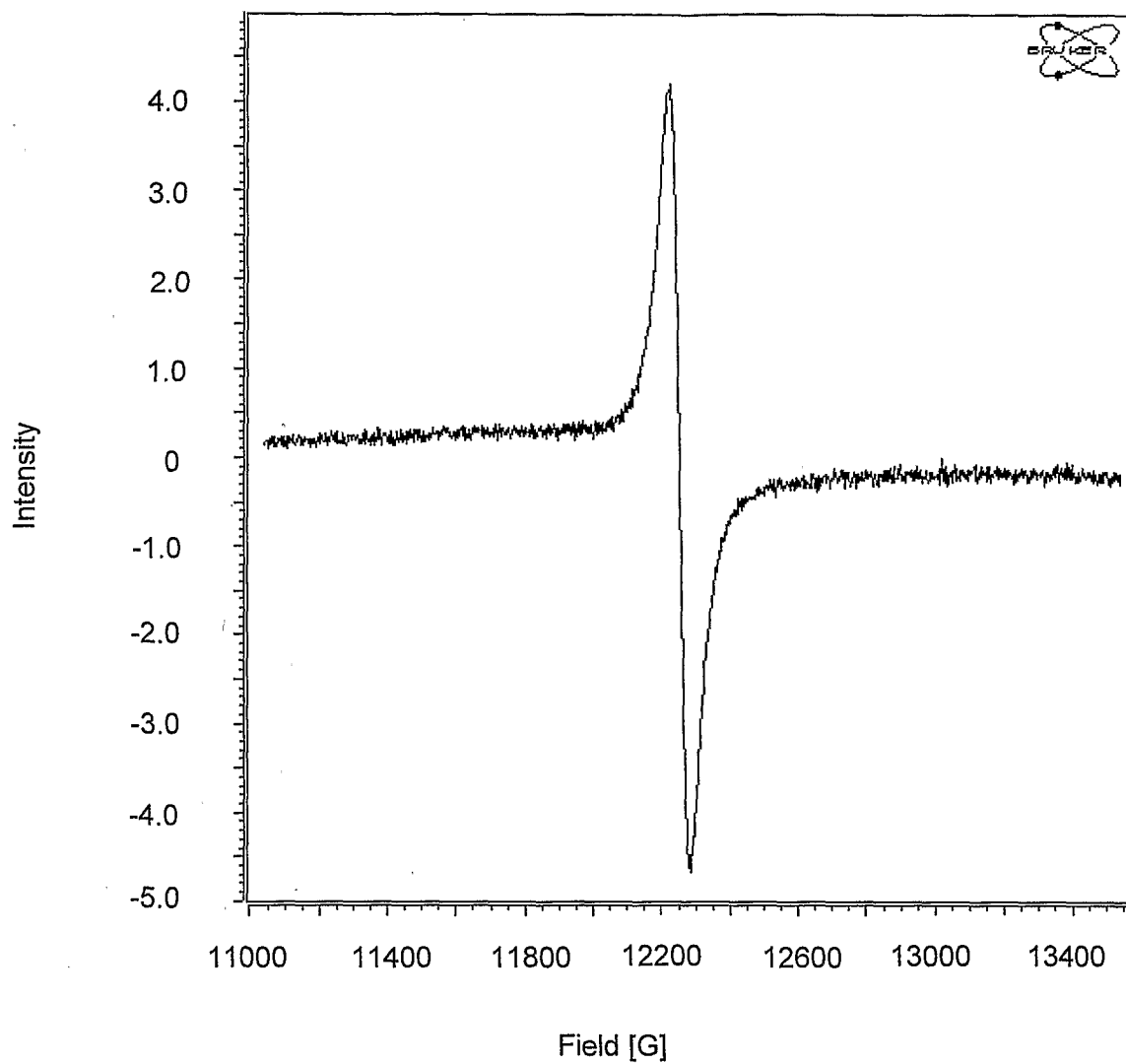
**Fig. 3b**

5 / 6

**Fig. 4**

6 / 6

QBand Sample A GdTPA 0.63mM in 0.2M AOT isooctane

**Fig.5**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DE2008/001542

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01R33/28 G01R33/30 G01R33/465

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01R G01N G01V A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, COMPENDEX, INSPEC, BIOSIS, EMBASE, IBM-TDB

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 01/01165 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE [US]) 4 January 2001 (2001-01-04)<br>page 1, lines 8-10<br>page 2, line 23 - page 5, line 22                                         | 1-16                  |
| X         | US 6 198 281 B1 (WAND A JOSHUA [US] ET AL)<br>6 March 2001 (2001-03-06)<br>column 1, lines 14-18<br>column 2, line 64 - column 8, line 63<br>column 12, lines 14-57<br>figure 1 | 1-16                  |
|           | -----<br>-/--                                                                                                                                                                   |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 Februar 2009

Date of mailing of the international search report

20/02/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Streif, Jörg Ulrich

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DE2008/001542

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | MURPHY M K ET AL: "A COMPARISON OF THREE RADIOFREQUENCY COILS FOR NMR STUDIES OF CONDUCTIVE SAMPLES"<br>MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, ACADEMIC PRESS, DULUTH, MN, US,<br>vol. 12, no. 3,<br>1 December 1989 (1989-12-01), pages<br>382-389, XP000102296<br>ISSN: 0740-3194<br>the whole document | 1-16                  |
| A         | ROE J E ET AL: "A MULTIPURPOSE MRI PHANTOM BASED ON A REVERSE MICELLE SOLUTION"<br>MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, ACADEMIC PRESS, DULUTH, MN, US,<br>vol. 35, no. 1,<br>1 January 1996 (1996-01-01), pages<br>136-141, XP000580462<br>ISSN: 0740-3194<br>the whole document                       | 1-16                  |
| A         | ROE J E ET AL: "Application of dense microemulsions to magnetic resonance imaging"<br>PHYSICA A, NORTH-HOLLAND, AMSTERDAM, NL,<br>vol. 231, 1 January 1996 (1996-01-01),<br>pages 359-367, XP002459181<br>ISSN: 0378-4371<br>the whole document                                                    | 1-16                  |
| P,A       | WO 2008/014445 A (KONINKL PHILIPS ELECTRONICS NV [NL]; STEEN PHILLIP EDWARD [US]) 31 January 2008 (2008-01-31)<br>the whole document                                                                                                                                                               | 1-16                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2008/001542

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0101165                                | A  | 04-01-2001          | AU 5880800 A               | 31-01-2001          |
| US 6198281                                | B1 | 06-03-2001          | NONE                       |                     |
| WO 2008014445                             | A  | 31-01-2008          | NONE                       |                     |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2008/001542

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. G01R33/28 G01R33/30 G01R33/465

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

G01R G01N G01V A61B

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, COMPENDEX, INSPEC, BIOSIS, EMBASE, IBM-TDB

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                                  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X          | WO 01/01165 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE [US]) 4. Januar 2001 (2001-01-04)<br>Seite 1, Zeilen 8-10<br>Seite 2, Zeile 23 - Seite 5, Zeile 22                                       | 1-16               |
| X          | US 6 198 281 B1 (WAND A JOSHUA [US] ET AL) 6. März 2001 (2001-03-06)<br>Spalte 1, Zeilen 14-18<br>Spalte 2, Zeile 64 - Spalte 8, Zeile 63<br>Spalte 12, Zeilen 14-57<br>Abbildung 1 | 1-16               |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

\*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Februar 2009

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20/02/2009

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Streif, Jörg Ulrich

| C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                    |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Kategorie*                                            | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                                                                                                                                                                           | Betr. Anspruch Nr. |
| A                                                     | <p>MURPHY M K ET AL: "A COMPARISON OF THREE RADIOFREQUENCY COILS FOR NMR STUDIES OF CONDUCTIVE SAMPLES"</p> <p>MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, ACADEMIC PRESS, DULUTH, MN, US,<br/>Bd. 12, Nr. 3,<br/>1. Dezember 1989 (1989-12-01), Seiten 382-389, XP000102296<br/>ISSN: 0740-3194<br/>das ganze Dokument</p> <p>-----</p> | 1-16               |
| A                                                     | <p>ROE J E ET AL: "A MULTIPURPOSE MRI PHANTOM BASED ON A REVERSE MICELLE SOLUTION"</p> <p>MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, ACADEMIC PRESS, DULUTH, MN, US,<br/>Bd. 35, Nr. 1,<br/>1. Januar 1996 (1996-01-01), Seiten 136-141, XP000580462<br/>ISSN: 0740-3194<br/>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>                        | 1-16               |
| A                                                     | <p>ROE J E ET AL: "Application of dense microemulsions to magnetic resonance imaging"</p> <p>PHYSICA A, NORTH-HOLLAND, AMSTERDAM, NL,<br/>Bd. 231, 1. Januar 1996 (1996-01-01),<br/>Seiten 359-367, XP002459181<br/>ISSN: 0378-4371<br/>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>                                                  | 1-16               |
| P,A                                                   | <p>WO 2008/014445 A (KONINKL PHILIPS ELECTRONICS NV [NL]; STEEN PHILLIP EDWARD [US]) 31. Januar 2008 (2008-01-31)<br/>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                    | 1-16               |

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

**PCT/DE2008/001542**

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument |    | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie |           | Datum der<br>Veröffentlichung |
|----------------------------------------------------|----|-------------------------------|-----------------------------------|-----------|-------------------------------|
| WO 0101165                                         | A  | 04-01-2001                    | AU                                | 5880800 A | 31-01-2001                    |
| US 6198281                                         | B1 | 06-03-2001                    | KEINE                             |           |                               |
| WO 2008014445                                      | A  | 31-01-2008                    | KEINE                             |           |                               |