



————— Technical Report No. TR-117 —————

**Simulation von Basisspektren zur Frequenzdomänenanalyse  
von *in vivo*  $^1\text{H}$  NMR-Spektren mittels LCModel**

**Simulation of Basis Spectra for Frequency Domain Analysis  
of *in vivo*  $^1\text{H}$  NMR Spectra using LCModel**

Sebastian Treiber, Christoph Juchem, Nikos K. Logothetis, Josef Pfeuffer

————— July 2003 —————

Max Planck Institute for Biological Cybernetics  
Department Physiology of Cognitive Processes, Postfach 2169, Spemannstrasse 38, 72076 Tübingen, Germany  
E-mail: [josef.pfeuffer@tuebingen.mpg.de](mailto:josef.pfeuffer@tuebingen.mpg.de)



## ABSTRACT

Die  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie ist in der Lage, quantitative, chemische Analysen von Hirnmetaboliten durchzuführen. Sie ist somit eine nützliche, nicht-invasive Methode, sowohl den regulären Metabolismus des Gehirns, als auch pathologische Veränderungen, *in vivo* zu verfolgen.

Die Verwendung des Programms LCModel ist ein gängiger Weg, *in vivo* Spektroskopiedaten von Hirnmetaboliten in der Frequenzdomäne zu Quantifizieren. Das Programm LCModel verwendet Vorwissen in Form eines Satzes von Basisspektren, um das gemessene Spektrum aus einer Linearkombination von Einzelspektren der zu erwartenden Metabolite zusammensetzen.

Aufgabe des Praktikums war es, solche Sätze von Basisspektren nach Literaturwerten für verschiedene Magnetfeldstärken mittels geeigneter Software (NMR-Sim, Bruker Analytik Suite) zu simulieren.

Dadurch ist es nun möglich, *in vivo* Spektroskopie-Daten automatisch zu analysieren, zu quantifizieren und die Erscheinungsbilder von Magnet-Resonanz-Spektren bei verschiedenen Feldstärken miteinander zu vergleichen.

$^1\text{H}$  NMR spectroscopy provides a quantitative chemical analysis of brain metabolites. Thus it is a useful, non-invasive method to follow *in vivo* both the regular metabolism in the brain and the pathological changes.

LCModel is a commonly used program to quantify *in vivo* spectroscopic data of brain metabolites in the frequency domain. The program LCModel uses prior knowledge in the form of sets of basis spectra to decompose the measured spectra by means of a linear combination from the single spectra of the expected metabolites.

The task of the internship was to use the specialized software package NMR-Sim (Analytic Suite, Bruker) and to simulate such basis sets for different magnetic field strengths based on published literature values.

As a result, it is now possible to analyze and quantify the measured *in vivo* spectroscopic data automatically and to compare the appearance of the single magnetic resonance spectra at different field strengths.

## KEYWORDS

$^1\text{H}$  NMR spectroscopy, neurochemistry, brain metabolites, metabolic pathways, tissue concentration, quantification, frequency domain, LCModel, spin system, Bloch equations, chemical shift, J coupling, STEAM, short echo time, macromolecules,

Diese Praktikumsarbeit wurde von Sebastian Treiber in der Zeit vom 02.06.2003 bis zum 31.07.2003 in der Forschungsgruppe Magnetische Resonanz des Max-Planck-Instituts für Biologische Kybernetik in Tübingen absolviert.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHER HINTERGRUND</b>	<b>3</b>
	a) Entstehung von NMR-Spektren.....	3
	b) Chemische Verschiebung.....	4
	c) J-Kopplung.....	5
<b>3</b>	<b>SPEKTREN -SIMULATION MIT NMR-SIM</b>	<b>5</b>
	a) Spinsysteme: ‚ham‘-Dateien.....	6
	b) Experimentelle Parameter: ‚cfg‘-Dateien.....	8
<b>4</b>	<b>ERSTELLEN EINER BASIS FÜR DIE LCMODEL-ANALYSE</b>	<b>9</b>
	a) Erstellen der LCModel-Basis: ‚makebasis.in‘.....	9
<b>5</b>	<b>ANALYSE VON IN VIVO DATEN</b>	<b>10</b>
<b>6</b>	<b>ERWÄHNENSWERTE SCHWIERIGKEITEN</b>	<b>13</b>
	a) Inkonsistenz verwendeter Datenquellen.....	13
	b) Stickstoff- und Phosphor-Kopplungen.....	13
	c) Skalierung und Referenzierung der Basis-Spektren.....	13
	d) Makromoleküle.....	14
	e) Alpha- und Beta-Glukose.....	14
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>14</b>
<b>8</b>	<b>VERWENDETE SOFTWARE UND LITERATUR</b>	<b>15</b>

## 1) EINLEITUNG

Die  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie stellt eine Möglichkeit dar, eine quantitative, chemische Analyse von Hirnmetaboliten nicht-invasiv durchzuführen. Sie ist somit ein nützliches Werkzeug, den regulären Metabolismus des Gehirns, sowie pathologische Veränderungen *in vivo* zu verfolgen.

Die Problematik der Datenanalyse besteht darin, die verschiedenen Beiträge eines gemessenen Spektrums entsprechenden Metaboliten zuzuordnen und diese verlässlich zu quantifizieren. Eine Möglichkeit einer solchen qualitativen und quantitativen Analyse ist die, das gemessene Spektrum aus einer Linearkombination von Einzelspektren der zu erwartenden Metbolite zusammensetzen.

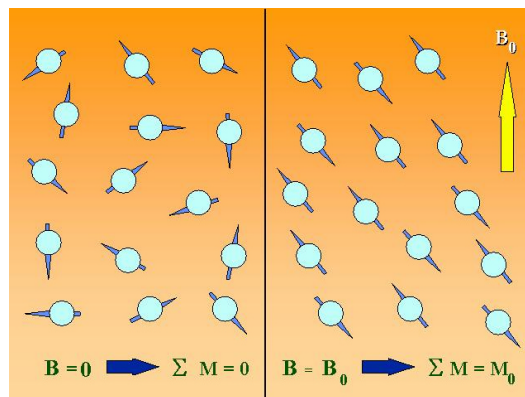
Die Aufgabe des Praktikums war es, mittels geeigneter Simulations-Software für verschiedene Feldstärken (1,5T; 3T; 4,7T; 7T; 9,4T) Sätze solcher Basisspektren, mit denen Frequenzdomänenanalysen von *in vivo* gemessenen Spektroskopiedaten bei diesen Feldstärken möglich sind, zur Verfügung zu stellen.

## 2) THEORETISCHER HINTERGRUND

### a) Entstehung eines NMR-Spektrums

Ein Weg, um die Metabolitenkonzentrationen zu messen ist die NMR Spektroskopie (NMR = nuclear magnetic resonance).

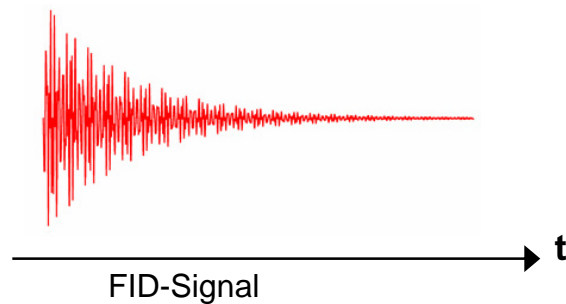
Protonen besitzen einen so genannten Spin, mit dem ein magnetisches Moment verbunden ist. Die Spin-Achsen einer grossen Anzahl von Protonen, z.B. einer Flüssigkeit, sind i.a. statistisch verteilt (siehe Graphik). Gibt man die Probe in ein starkes Magnetfeld, so richten sich die Spin-Achsen entsprechend einer Boltzmann-Verteilung parallel oder antiparallel zur Feldrichtung aus. Das aus dieser minimalen Ungleichbesetzung resultierende magnetische Moment pro Volumen wird als Magnetisierung bezeichnet.



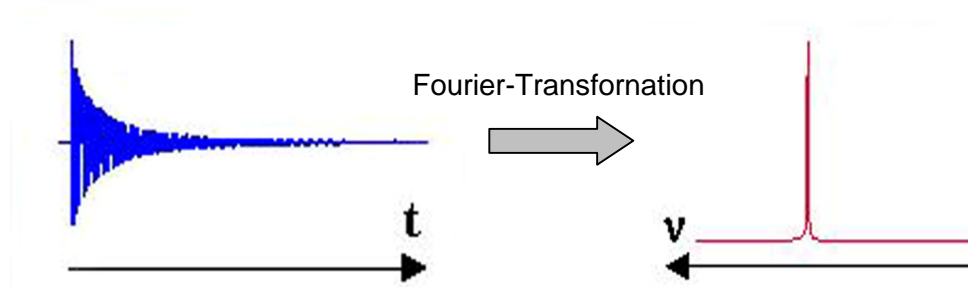
Anordnung der Spin-Achsen mit  $B=0$  und  $B=B_0$

Wird mittels einer Radiofrequenzspule ein magnetisches Wechselfeld der Larmorfrequenz  $\omega_L$  senkrecht zum Grundmagnetfeld  $B_0$  eingestrahlt, so wird die Magnetisierung ausgelenkt und anschliessend um die Hauptmagnetfeldachse präzedieren (Larmor-Präzession). Die Präzessionsfrequenz wird als Larmor-Frequenz bezeichnet und ist gegeben als  $\omega_L = \gamma \cdot B_0$ .

Der kernspezifische Proportionalitätsfaktor  $\gamma$  wird als gyromagnetisches Verhältnis bezeichnet und beträgt für Protonen 42.6 MHz/T. Die Präzession der Magnetisierung erzeugt umgekehrt in der Spule einen oszillierenden magnetischen Fluss durch die Spule, der eine entsprechende Wechselspannung induziert. Das entstehende Signal heißt „FID“ = free induction decay. Die Quermagnetisierung, die messbare Komponente der Magnetisierung senkrecht zum Grundmagnetfeld, zerfällt im Laufe der Zeit wieder, man spricht von Relaxation.



Mit einer Fourier-Transformation kann man die Frequenzanteile des FID als Peaks in einem Spektrum darstellen:



### b) Chemische Verschiebung

Aus der Larmor-Gleichung geht hervor, dass die Larmor-Frequenz direkt proportional zum Magnetfeld ist. Sind die Wasserstoffkerne nicht frei, sondern liegen als Atome vor oder sind Teil eines Moleküls, so erzeugt das Elektron bzw. erzeugen die Elektronen als bewegte Ladungen ein zusätzliches Magnetfeld am Ort des Kerns, das dem Grundfeld entgegensteht (elektronische Abschirmung). Die entsprechende Verschiebung der Peaks im Spektrum wird als „chemische Verschiebung“ bezeichnet. Die Verschiebungen sind proportional zum Grundmagnetfeld und sehr klein, so dass sie üblicherweise in ppm (parts per million) angegeben werden. Es gilt  $\delta_{\text{ppm}} = (\nu - \nu_{\text{ref}}) / \nu_{\text{ref}}$ . Durch diese effektive Normierung der chemischen Verschiebung bezüglich der Feldstärke sind die entsprechenden Werte feldunabhängig und somit für alle Feldstärken gleich.

### c) J-Kopplung

Die Peak-Amplituden im Spektrum werden von der Anzahl der Kerne mit der gleichen chemischen Verschiebung bestimmt. Allerdings können sich die Kerne eines Moleküls aufgrund ihrer magnetischen Momente auch gegenseitig beeinflussen. Man sagt, die Spins der Kerne „koppeln“ miteinander. Wird diese Kopplung durch die Bindungselektronen zwischen zwei Kernen vermittelt, so wird sie als „J-Kopplung“ bezeichnet. Sie ist dafür verantwortlich, dass sich die Peaks aufspalten. Und zwar je weiter, desto stärker die J-Kopplung. Da diese zweite Ursache von Frequenzverschiebungen in NMR-Spektren ausschließlich auf einer Spin-Spin-Kopplung der Kerne beruht, ist sie unabhängig von der Feldstärke des Grundmagnetfeldes.

Während also die chemische Verschiebung feldabhängig ist, ist die J-Kopplung feldunabhängig, so dass das letztliche Aussehen von NMR-Spektren stark von der Feldstärke abhängen wird.

### 3) SPEKTREN-SIMULATION MIT NMR-SIM<sup>1</sup>

Bei der *in vivo* <sup>1</sup>H Spektroskopie von Hirnmetaboliten liefern verschiedenste molekulare Verbindungen Beiträge zum Gesamtspektrum. Mit bloßem Augen kann man zunächst nicht erkennen, welche Metaboliten dazu beigetragen haben und in welcher Konzentration sie vorlagen. Deshalb benötigt man eine Methode, aus dem gemessenen Spektrum die einzelnen Beiträge zu bestimmen.

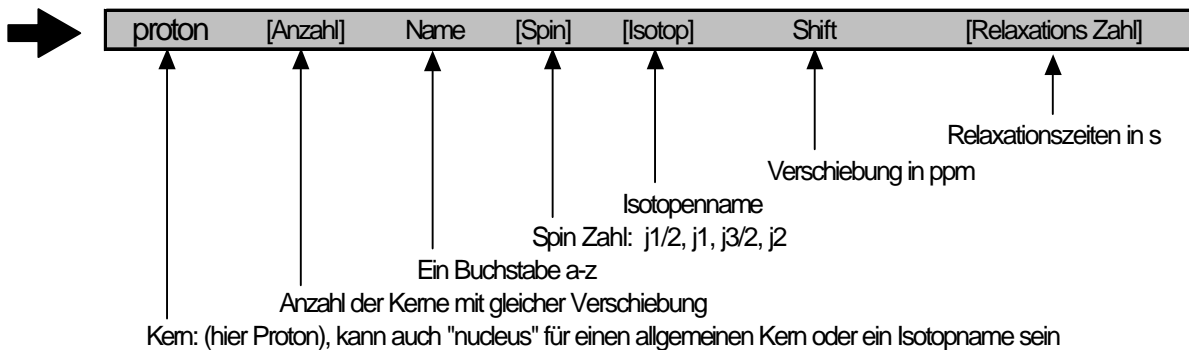
Das Programm LCMoel (Linear Combination of Model Spectra)<sup>2</sup> führt eine Frequenzdomänenanalyse durch, indem es das gemessene Spektrum durch eine Linearkombination von Modellspektren zu rekonstruieren versucht. Es wird also Vorwissen in Form von Spektren der zu erwartenden Hirnmetabolite benutzt, von deren Qualität die LCMoel-Analyse in kritischer Weise abhängt.

Eine Möglichkeit, einen solchen Satz von Modellspektren zu erhalten ist es, alle zu erwartenden Metabolite einzeln mit der Messsequenz zu spektroskopieren, die dann auch *in vivo* benutzt wird. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die Spektren bei bekannten chemischen Verschiebungen und J-Kopplungen mit eben dieser Sequenz zu simulieren.

Zur Simulation des Zeitdomänensignals einer bestimmten chemischen Verbindung mittels der Simulations Software ‚NMR-SIM‘ müssen alle relevanten Parameter bekannt sein. Das Spinsystem, definiert durch die Anzahl beitragender Kerne, ihre chemischen Verschiebungen und Kopplungen, wird hierzu in einer Textdatei mit der Erweiterung .ham(=hamiltonian, Spinsystem) definiert. Alle Messparameter, wie Larmorfrequenz, Aufnahmebandbreite, verwendetes Pulsprogramm usw. werden in einer zweiten Textdatei mit der Erweiterung .cfg (=configuration) zusammengefasst. Die Simulations-Software NMR-SIM ist nun in der Lage, hieraus den entsprechenden FID zu berechnen und legt das so synthetisierte Zeitdomänensignal (analog zu regulären Messungen) in einer Datei mit dem Namen ‚fid‘ ab.

a) Erstellen von Spinsystemen in Form von ham'-Dateien:

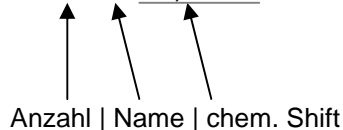
Für jeden zum Signal beitragenden Kern wird eine Zeile folgender Form benötigt:



[Eckig eingeklammert] bedeutet optional

Beispiel:

`proton 2 * a 2,178`



Zwei miteinander koppelnde Kerne werden auf folgende Weise dargestellt. Sind es zwei gleiche Kerne, z.B. zwei Protonen:

`couple [Name Teilchen 1] [Name Teilchen 2] [Kopplungskonstante]`

Beispiel:

`couple a b 1,745`

(Proton a und Proton b koppeln mit J=1,745 Hz)

Handelt es sich um zwei unterschiedliche Kerne, z.B. ein Proton und einen Stickstoff-Kern:

`weak [Name Teilchen 1] [Name Teilchen 2] [Kopplungskonstante]`

Beispiel:

`weak a n 6,458`

(Ein Proton und ein Stickstoffkern koppeln mit J=6,458 Hz)

Wenn verschiedene Moleküle mittels einer Datei, also in ein Spektrum simuliert werden sollen, verwendet man „molecule [Name] [Nummer]“ als Anfangszeile und „endmol“ als Ende der entsprechenden Moleküldefinition.



## Exemplarisch ist die ,ham'-Datei von Phosphorylcholin dargestellt:

(Text, der nach einem Semikolon steht, ist als Kommentar zu verstehen)

```
molecule main 1
; Protons:
proton a 4.2805
proton b 4.2805
proton c 3.6410
proton d 3.6410
proton 3*e 3.208
proton 3*f 3.208
proton 3*g 3.208
; Nitrogen:
nitrogen n 20; the value 20 is set arbitrarily
;
; Phosphor:
phosphor p 20; the value 20 is set arbitrarily
;
; proton-proton coupling:
couple a c 2.284
couple a d 7.231
couple b d 2.235
couple b c 7.326
;
; proton-nitrogen coupling:
weak a n 2.680
weak b n 2.772
;
; proton-phosphor coupling:
weak a p 6.298
weak b p 6.249
endmol
;
molecule format 1
proton x 8,44
endmol
```

## b) Erstellen von cfg Dateien:

cfg-Dateien sind wie die ham-Dateien Textdateien, die alle für die Simulation benötigten ‚Messparameter‘ enthalten.

Sie enthält folgende Parameter:

TD	Gesamtanzahl ‚gemessener‘ Zeitdomänen-Datenpunkte
NS	Anzahl der Puls-Programm Durchläufe
HL1..4	Radiofrequenz Feldstärke in Hz
SF	Spektrometer-Frequenz in MHz
AQ_mod	Aufnahme Modus (mögliche Werte sind qf, qsim oder qseq)
SW	Bandbreite in ppm
SW_h	Bandbreite in Hz
SFO1	Larmor-Frequenz des verwendeten Kerns $SFO1 = SF * \gamma_{(Isotop)} / \gamma_{(proton)}$
sequence	Name des Pulsprogramms
hamiltonian	Spinsystem, definiert als ham-Datei

Die cfg-Datei hat somit folgende Gestalt:

```
sequence=zg
hamiltonian=phosphocholine.ham
Relaxation=1
TD=8192
NS=4
HL1=100000
SF=300.26
AQ_mod=1
SW=20
```

Mit dieser cfg-Datei kann nun die Simulation gestartet werden. NMR-SIM schreibt automatisch eine Datei mit der Bezeichnung „fid“, in der die simulierten Zeitdomänenendaten gespeichert werden. Zur Formatierung der Daten in ein LCModel-kompatibles Format, wurden diese mit einer selbstgeschriebenen MATLAB-Software gelesen, konvertiert und im entsprechenden Datenformat in Dateien mit der Erweiterung .RAW abgelegt.

Die so simulierten Spektren sind in Anlage A abgebildet.

## 4) ERSTELLEN EINER BASIS FÜR DIE LCMODEL-ANALYSE

Zur Erstellung einer Basis von Metabolitenspektren wurde die LCModel-Funktion ‚makebasis‘ verwendet, die aus den verschiedenen Zeitdomänensignalen (RAW-Dateien) eine Basis von Modellspektren in der Frequenzdomäne erstellt. Ihre Ausführung wird durch die Textdatei ‚makebasis.in‘ gesteuert, die alle relevanten Aufnahmeparameter beinhaltet.

### a) Erstellen der Datei ‚makebasis.in‘

In der Datei makebasis.in werden allen das Experiment (bzw. die Simulation) definierenden Parametern entsprechende Werte zugewiesen

seq	Sequenz, entweder PRESS oder STEAM
echot	Echo-Zeit in ms
fwhmba	„full-width at half-maximum“ : Peak-Breite bei halber Peak-Höhe in ppm
hzppm	Hz pro ppm; effektive Feldstärkenangabe
deltat	Zeitabstand zweier aufeinanderfolgender Abtastpunkte in s
nunfil	Anzahl komplexer Daten-Punkte, ohne Apodisation
ppmst	Linker Rand des Darstellungs-Fensters
ppmend	Rechter Rand des Darstellungs-Fensters
degzer	Phasenkorrektur nullter Ordnung
degppm	Phasenkorrektur erster Ordnung
conc	Konzentration der Metaboliten in der Lösung in mM
ppmapp	Start und Ende des Intervalls, in dem der Referenz-Peak zur Frequenzkorrektur gesucht wird
ppmpk	Position, an welcher sich der Referenz-Peak befinden soll

Die Datei makebasis.in hat letztlich folgende Gestalt:

```
$seqpar
seq='zg'
$end

$nmall
hzpppm=300.26
nunfil=4096
deltat=.000166663
filbas='/usr/people/sebastian/mpi_7T/output/7T.basis'
filps='/usr/people/sebastian/mpi_7T/output/basis.ps'
autosc=T
autoph=T
idbasi='test basis set (June-2003)'
ppmst=6.0
ppmend=-0.5
$end
```

```
$nmeach
filraw='/disk_wks4/export/LCModel/mpi_7T/raw/Ala.RAW'
metabo='Ala'
conc=100.
concs=100
ppmapp=5.0, 4.0
ppmpk=0.0
$end
```

```
$nmeach
filraw='/disk_wks4/export/LCModel/mpi_7T/raw/Asp.RAW'
metabo='Asp'
conc=100.
concs=100
ppmapp=5.0, 4.0
ppmpk=0.0
$end
```

(...)

```
$nmeach
filraw='/disk_wks4/export/LCModel/mpi_7T/raw/Tau.RAW'
metabo='Tau'
conc=100.
concs=100
ppmapp=5.0, 4.0
ppmpk=0.0
$end
```

;

Wenn makebasis.in gestartet wird, werden zwei Dateien erstellt, eine .basis-Datei und eine .ps-Datei. Die Namen können frei gewählt werden und werden bei 'fileps=...' und 'filebas=...' angegeben. Im Bsp. basis.ps und 7T.basis. Die .basis-Datei beinhaltet die Datenbasis für LCModel, die .ps-Datei (.ps = 'postscript'), beinhaltet eine graphische Darstellung der erzeugten Basisspektren.

## 5) ANALYSE VON IN VIVO DATEN

Der mit diesem Satz von 7T-Modellspektren zu analysierende *in vivo* Datensatz entstammt einer 'Single-Voxel' Spektroskopiemessung grauer Materie, gemessen in MT eines Rhesusaffen (STEAM-Lokalisierung, TE=5ms, TM=10ms, TR=4s, NA=512, 8x8x3mm<sup>3</sup>)<sup>9</sup>

In der folgenden Darstellung ist das Resultat der LCModel-Analyse (Version 6.0) auf der Grundlage des simulierten Satzes von Basisspektren wiedergegeben:

Dem Originalspektrum (schwarz) ist der LCModel-Fit als Summe der berechneten Einzelspektren überlagert (rot). Das obere, schwarze Spektrum ist das Residuum, die Differenz zwischen gemessenem Spektrum und LCModel Fit.

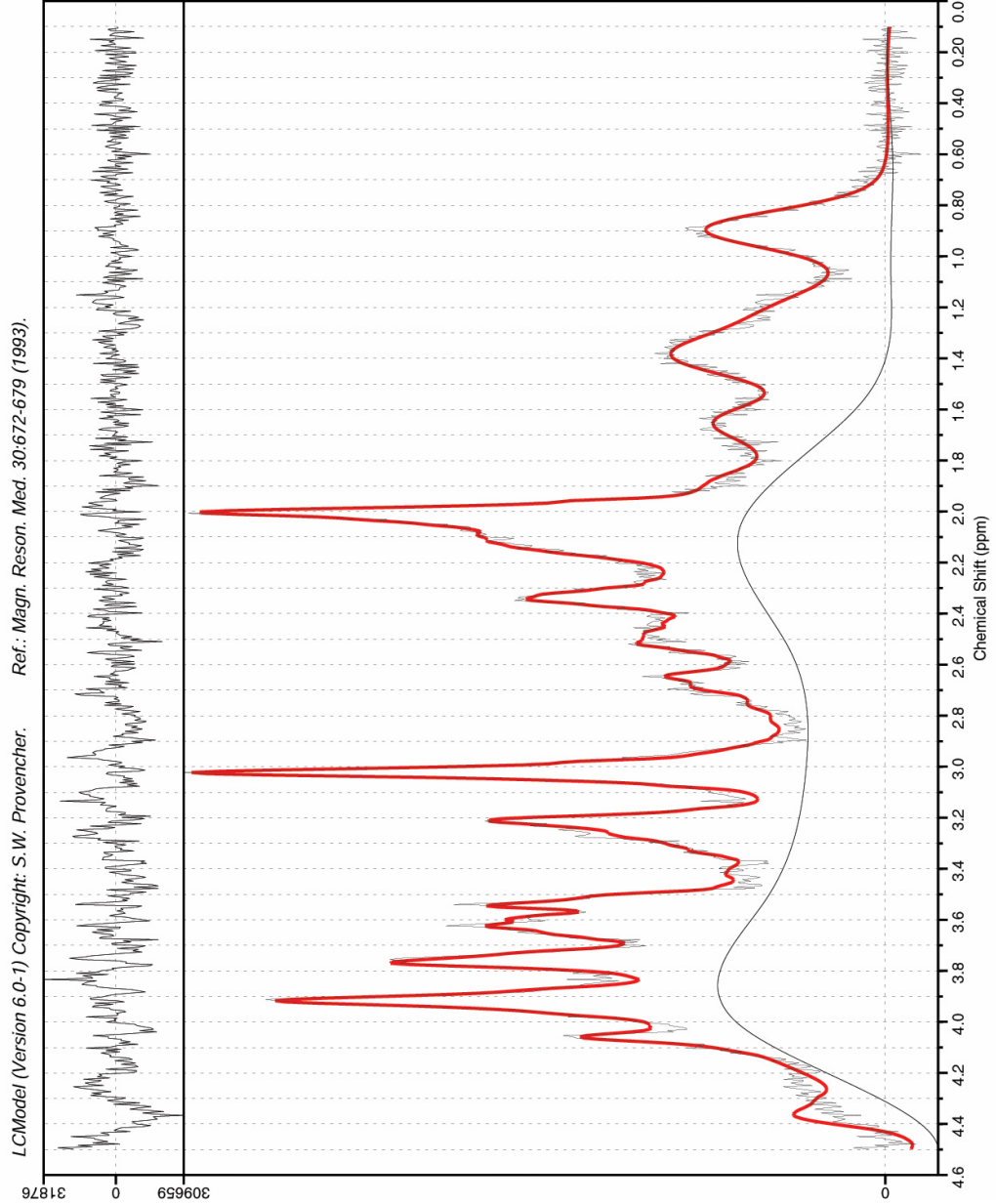
/mpidata/lcm/G02.gM1/112.lcm/

Data of: MR Imaging and Spectroscopy, Max Planck Institute for Biological Cybernetics

LCModel (Version 6.0-1) Copyright: S.W. Provencher.

Ref.: Magn. Reson. Med. 30:672-679 (1993).

05-Aug-2003 11:30



Ergebnis der LCModel-Analyse  
Oben:  
Metabolite mit zugehörigen relativen und absoluten Konzentration, sowie deren Fehlern.

Conc.	%SD	Cr+Pcr	Metabolite
0.085	20%	1.605	Asp
0.171	16%	3.242	Cr
0.039	26%	0.738	GABA
0.040	24%	0.756	Gln
0.292	5%	5.528	Glu
0.050	7%	0.955	GPC
0.057	9%	1.084	GSH
0.301	3%	5.704	Ins
0.291	5%	5.515	NAA
0.049	22%	0.925	NAAG
0.000	99%	0.000	Pcho
0.251	12%	4.758	Pcr
0.087	15%	1.647	PE
0.015	21%	0.291	Scyllo
0.043	22%	0.818	Tau
0.129	14%	2.442	Gua
0.423	3%	8.000	Cr+Pcr
0.050	7%	0.955	GPC+Pcho
0.332	5%	6.284	Glu+Gln
0.340	3%	6.440	NAA+NAAG
0.528	43%	9.992	Lip13a
0.483	12%	9.144	MM09
0.535	19%	10.130	MM20
0.231	27%	4.375	MM12
0.580	19%	12.870	MM14
0.398	22%	7.529	MM17

**DIAGNOSTICS**  
1 info MYBASI 2  
4 info's RFLASI 12  
1 info FINOUT 9

**MISCELLANEOUS OUTPUT**  
FWHM = 0.034 ppm S/N = 16  
Data shift = -0.068 ppm  
Ph: 39 deg 0 deg/ppm

**INPUT CHANGES**  
HZPPPM=300.262  
NUNFIL=1024  
DELTAT=0.0003328  
FILBAS= /usr/people/sebastian/mp1\_7T/output/7T.basis'  
FILRAW='lcm.RAW'  
PVMST=4.5  
PVMEND=0.1  
DKNTMN=0.5

Unten:  
Analysen-Diagnose (mögliche, bei der Analyse aufgetretener Fehler)

Conc.	%SD	/Cr+PCr	Metabolite
0.085	20%	1.605	Asp
0.171	16%	3.242	Cr
0.039	26%	0.738	GABA
0.040	24%	0.756	Gln
<b>0.292</b>	<b>5%</b>	<b>5.528</b>	<b>Glu</b>
<b>0.050</b>	<b>7%</b>	<b>0.955</b>	<b>GPC</b>
<b>0.057</b>	<b>9%</b>	<b>1.084</b>	<b>GSH</b>
<b>0.301</b>	<b>3%</b>	<b>5.704</b>	<b>Ins</b>
<b>0.291</b>	<b>5%</b>	<b>5.515</b>	<b>NAA</b>
0.049	22%	0.925	NAAG
0.000	999%	0.000	PCho
<b>0.251</b>	<b>12%</b>	<b>4.758</b>	<b>PCr</b>
0.087	15%	1.647	PE
0.015	21%	0.291	Scyllo
0.043	22%	0.818	Tau
<b>0.129</b>	<b>14%</b>	<b>2.442</b>	<b>Gua</b>
<b>0.423</b>	<b>3%</b>	<b>8.000</b>	<b>Cr+PCr</b>
<b>0.050</b>	<b>7%</b>	<b>0.955</b>	<b>GPC+PCho</b>
<b>0.332</b>	<b>5%</b>	<b>6.284</b>	<b>Glu+Gln</b>
<b>0.340</b>	<b>3%</b>	<b>6.440</b>	<b>NAA+NAAG</b>
0.528	43%	9.992	Lip13a
<b>0.483</b>	<b>12%</b>	<b>9.144</b>	<b>MM09</b>
0.535	19%	10.130	MM20
0.231	27%	4.375	MM12
0.680	19%	12.870	MM14
0.398	22%	7.529	MM17

Die absolute Konzentration der Metaboliten steht in der linken Spalte. Der Fehler der Analyse ist in der mittleren Spalte zu finden; die Konzentrationen relativ zu Cr / PCr sind in der rechten Spalte aufgelistet.

Die von LCModel mit einer Standardabweichung (untere Cramer-Rao-Grenze) von unter 20% quantifizierten Metabolite sind:  
 Cr 3,2mM, Glu 5,5mM, GSH 1,1mM, Ins 5,7mM,  
 NAA 5,5mM, NAAG 0,9mM, PCr 4,8mM,  
 Tau 0,8mM, NAA+NAAG 6,4mM,  
 Cr+PCr 8mM, Glu+Gln 6,2mM

Die Makromoleküle werden in der neuen LCModel Version 6.0 extra analysiert und dargestellt.

Die Angabe absoluter Konzentrationen gestaltet sich bei der *in vivo* Spektroskopie von Hirnmetaboliten schwierig, weil gemessene Signalstärken von den verschiedensten Parametern wie Kabelverlusten und Verstärkereigenschaften auf der einen Seite bis hin zur verwendeten Spulengeometrie bezüglich des Messvolumens auf der anderen Seite abhängen. Aus diesem Grund verwendet man i.a. Kreatin als internen Standard für die Metabolitenspektroskopie des Gehirns unter der Annahme, dass die Konzentrationen in grauer und weisser Materie relativ konstant sind. Die relativen Konzentrationen sind somit die primär interessierenden Ausgabewerte der Analyse. Die gemeinsame Betrachtung benachbarter Resonanzen (z.B. Cr + PCr) führt zu geringeren Fehlern und liefert somit verlässlichere Ergebnisse, als die separate Analyse der Verbindungen.

## 6) ERWÄHNENSWERTE SCHWIERIGKEITEN

### a) Druckfehler in der Tabelle

Die Werte für die J-Kopplung und die chemische Verschiebung der verschiedenen Metabolite wurden einem Artikel von Govindarayu et al. entnommen<sup>4</sup>. Bei den Verbindungen Phosphorylethanolamin und Taurin ist zweimal der Verbindungszusammenhang 1-2' angegeben (anstatt 1-2' und 1'-2'). Wir gehen in diesem Zusammenhang von einem Druckfehler aus, weil die analoge Tabelle mit genau diesen Änderungen auf der Internetseite von Govindarayu zu finden ist.

### b) Stickstoff- und Phosphor-Kopplungen

In der Tabelle von Govindarayu et al.<sup>4</sup> sind Kopplungen von Protonen mit Stickstoff- und Phosphorkernen angegeben. Stickstoff und Phosphor haben in diesem Zusammenhang keine chemische Verschiebung. Da das Programm NMR-SIM für alle Kerne die Angabe chemischer Verschiebungen verlangt, wurden diese willkürlich auf 20 bzw. 30 ppm gesetzt.

### c) Skalierung und Referenzierung der Basis-Spektren

Für eine quantitative Analyse mit LCModel ist es unerlässlich, dass alle Basis-Spektren konsistent skaliert sind. NMR-SIM simuliert jedoch die Spektren mittels einer internen und nicht zugänglichen Skalierung so, dass die Amplituden der FID's in einen sinnvollen Zahlen-Bereich fallen. Das heißt, dass zunächst einmal alle Spektren unterschiedliche Skalierungsfaktoren besitzen. Das wäre für die Analyse allerdings verheerend, weil so die Konzentrationsverhältnisse entsprechend verfälscht würden. Der LCModel-Algorithmus zur Erstellung eines Basis-Satzes erlaubt es, die Spektren bzgl. eines als quantitative Referenz fungierenden Format-Peaks entsprechend zu skalieren. In Anlehnung an die direkte Messung von Modellspektren wurde deshalb für jeden Metaboliten eine quantitative Referenz mitsimuliert. Auf diese Weise wird die Problematik unterschiedlicher Skalierungen durch NMR-SIM wieder aufgehoben, ohne dass die jeweiligen Skalierungsfaktoren bestimmt werden mussten. Der Singlet-Peak des als quantitative Referenz verwendeten Formats bei 8,44ppm liegt ausserhalb der für die Spektroskopie von Hirnmetaboliten relevanten Frequenzbereiche und beeinflusst die LCModel-Analyse somit nicht. Entsprechende Skalierungsfaktoren lagen zwischen 0.192 für Glycin und 45.012 für Glukose (siehe Anhang A).

Für real gemessene Basisspektren ist es weiterhin notwendig, jeder Verbindung einen Frequenzstandard (i.a. DSS = 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure) zuzugeben, um bei der Erstellung der Basis Frequenzkorrekturen vornehmen zu können. In Analogie hierzu wurde ein entsprechender Referenzpeak bei 0 ppm mitsimuliert. Aus Gründen der Einfachheit wurde nicht jede einzelne Simulation um einen weiteren Kern ergänzt, sondern der ‚DSS-Peak‘ wurde im Rahmen der Datenkonvertierung mit MATLAB dem Zeitdomänensignal beigefügt. Bezüglich der Peakhöhe des DSS-Peaks wurde den unterschiedlichen NMRSIM-Skalierungen der FID's dadurch Rechnung getragen, dass die Amplitude des DSS-FID's auf 1% des Metabolitensignals gesetzt bzw. abgeschätzt wurde. Da DSS ausschließlich zur Frequenzjustierung verwendet wird, sind

entsprechend unterschiedliche DSS-Peakhöhen nicht von Bedeutung bei der Erstellung der LCModel-Basis.

#### d) Makromoleküle

Außer den beschriebenen Metaboliten tragen noch andere Substanzen zu *in vivo* NMR-Spektren bei. Ein Grossteil der makromolekularen Signale, die in  $^1\text{H}$  NMR-Spektren des Gehirns zu einer breitbandigen Veränderung der Basislinie führen, haben ihren Ursprung in cytosolischen Proteinen<sup>6,7,8</sup>

Am 07.07.03 wurde LCModel Version 6.0<sup>5</sup> zur Verfügung gestellt. Während bei vorherigen Versionen der Makromolekülanteil als ein Beitrag zum Spektrum betrachtet wurde, ist die neue Version nun in der Lage, Beiträge verschiedener Verbindungen zum Makromolekül-Spektrum getrennt voneinander zu analysieren. Um eine noch genauere Analyse zu erhalten, wurden die Makromoleküle einzeln nachsimuliert und mit der LCModel-Analyse verglichen. Auf diese Weise soll es in Zukunft möglich sein, die Makromolekülzusammensetzungen von bestimmten Hirnregionen anhand experimenteller Daten als ein zusätzliches Makromolekülspektrum nachzusimulieren und somit die Anzahl freier Parameter weiterer LCModel-Analysen und somit benötigte Rechenzeiten deutlich zu reduzieren.

#### e) Alpha- und Beta-Glukose

Im Gehirn kommt Glukose in zwei verschiedenen Anomeren vor, bezeichnet als Alpha- und Beta-Glukose. Die relative Häufigkeit von  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Glukose beträgt 36% / 64%.<sup>4</sup> Glukose wurde unter Beachtung dieses Verhältnisses aus zwei verschiedenen Molekülen entsprechend simuliert.

## 7) ZUSAMMENFASSUNG

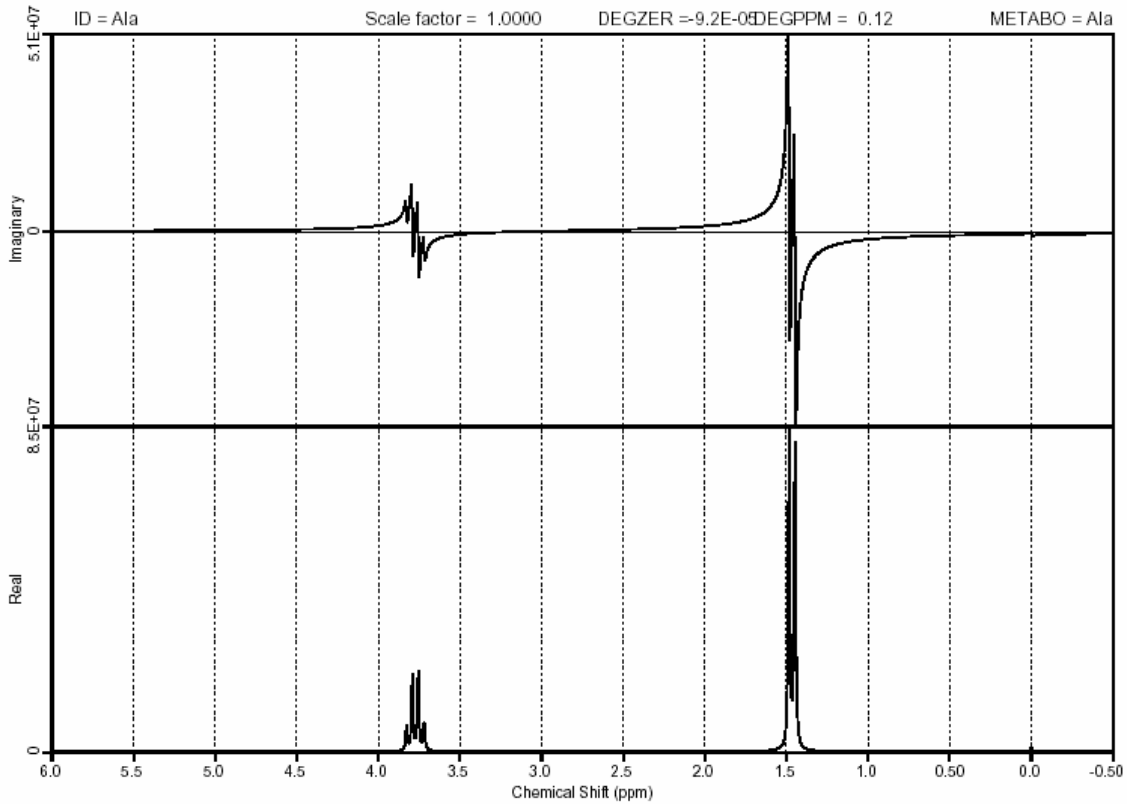
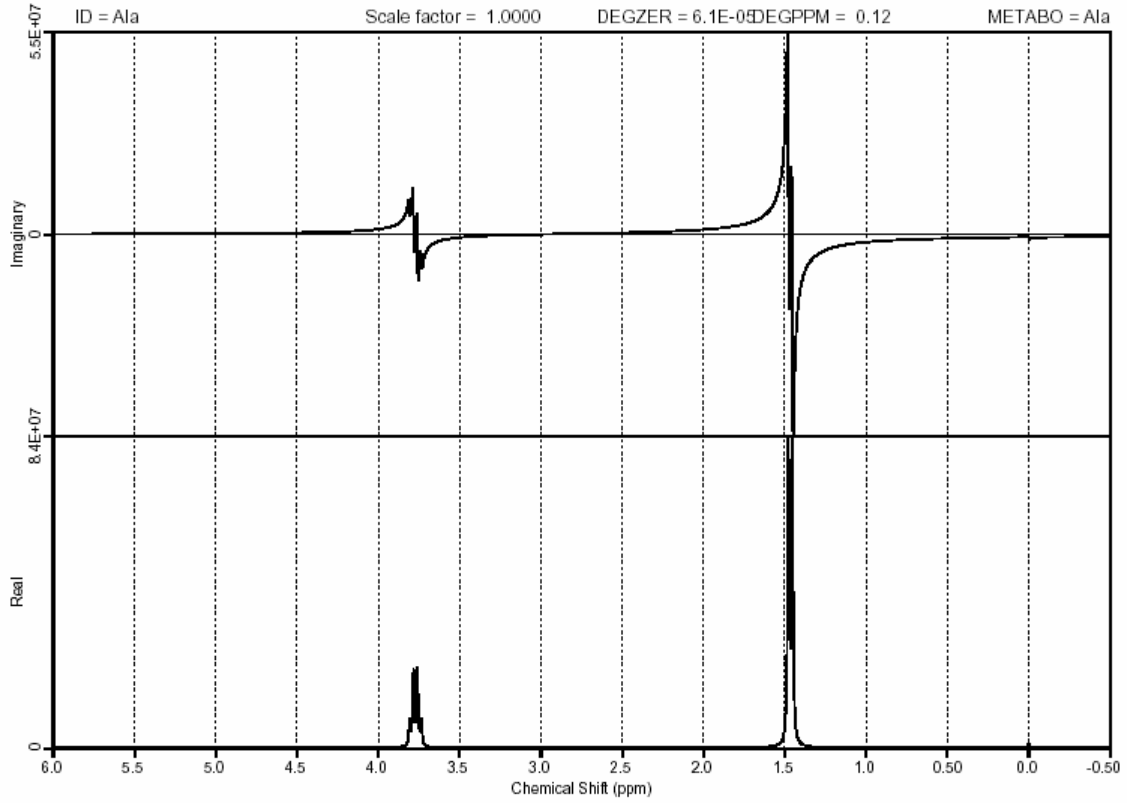
Es wurden insgesamt 20 Spektren simuliert. Jeweils für die Feldstärken 9,4T; 7T; 4,7T; 3T und 1,5T. Mit den erstellten Basisdatensätzen können gemessene *in vivo* Daten bei diesen Feldstärken analysiert werden. Dank der Flexibilität der Programme und der guten Zugänglichkeit aller Parametern ist es innerhalb kurzer Zeit möglich, Basisdatensätze für beliebige Parameterkombination (Feldstärken, Pulssequenzen, ...) zu erzeugen. Darüber hinaus ist es jederzeit problemlos möglich, neue Metaboliten in die Basis aufzunehmen.



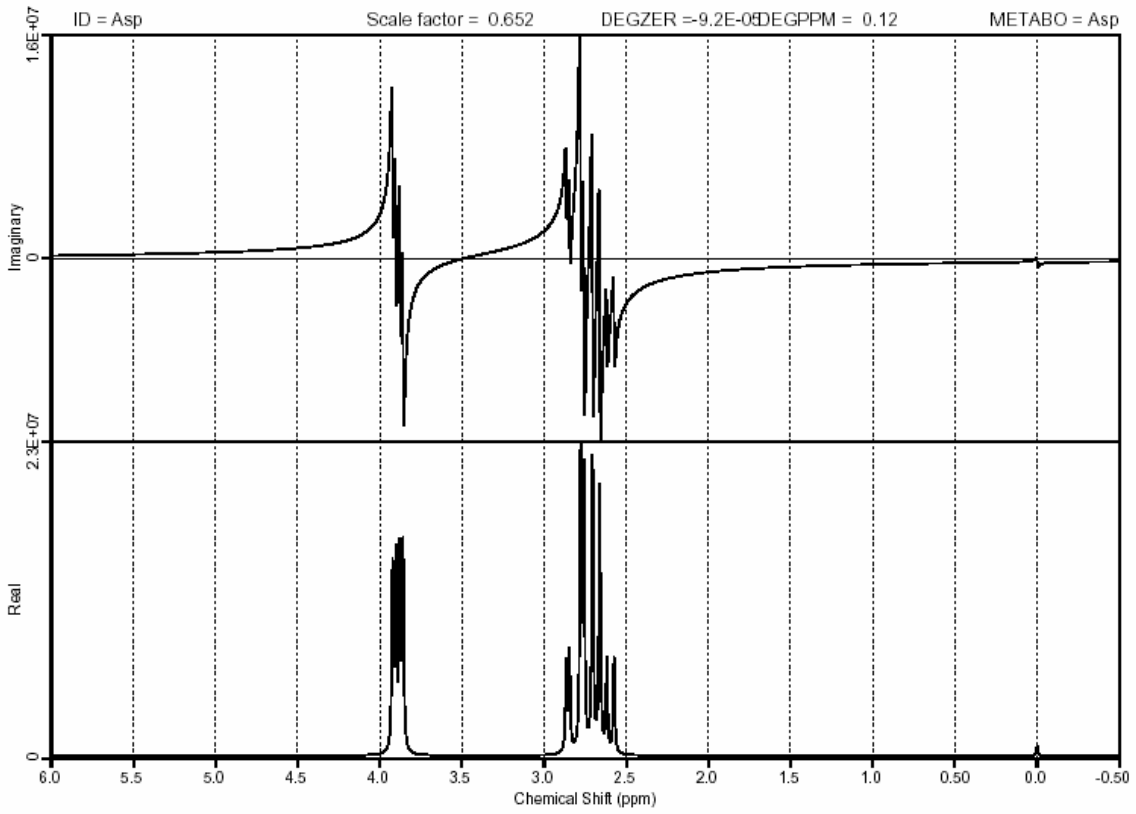
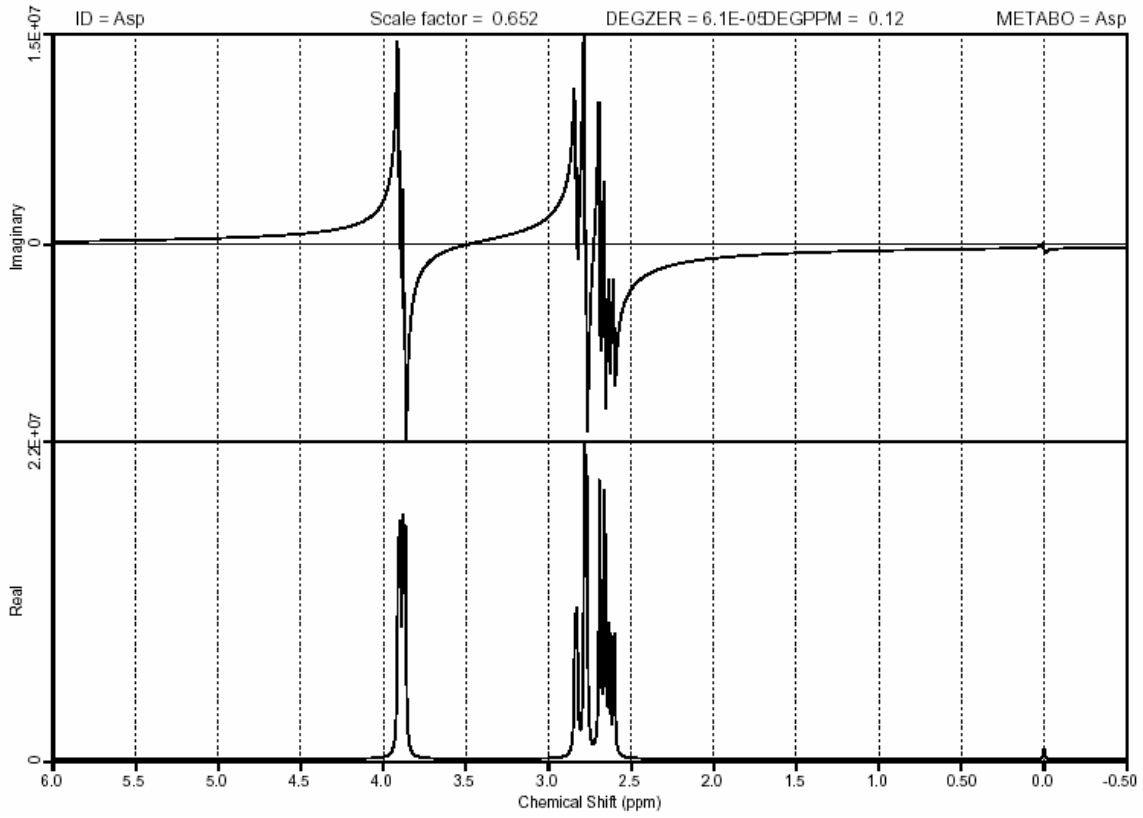
## 8) VERWENDETE SOFTWARE UND LITERATUR:

- 1) NMR-SIM® (Vers. 2.6, Teil des XWIN-Pakets)
- 2) LCModel® (Vers. 5.2-2, erschienen am 09.01.2001)
- 3) Matlab® (Mathworks Inc., Vers. 6.5, erschienen am 18.06.2002)
- 4) V. Govindaraju, K. Young, A. A. Maudsley, 'Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites', NMR in Biomed.,13:129-156; 2000
- 5) LCModel® (Vers. 6.0, erschienen am 07.07.2003)
- 6) K.L. Behar, T. Ogino, 'Characterization of Macromolecule Resonanz in the <sup>1</sup>H NMR Spektrum of Rat Brain', MRM 30:38-44; 1993
- 7) K.L. Behar, D. L. Rothman, D. D. Spencer, O. A. C. Petroff, 'Analysis of Macromolecule Resonances in <sup>1</sup>H NMR Spectra of Human Brain', MRM 32:294-302;1994
- 8) U.Klose '*In vivo* proton spectroscopy in presence of eddy currents', MRM 14:26-30; 1990
- 9) J. Pfeuffer, C. Juchem, H. Merkle, N. K. Logothetis, 'Proton MR Spectroscopy at 7Tesla in the Macaque monkey', Proc. ISMRM 2003, Toronto

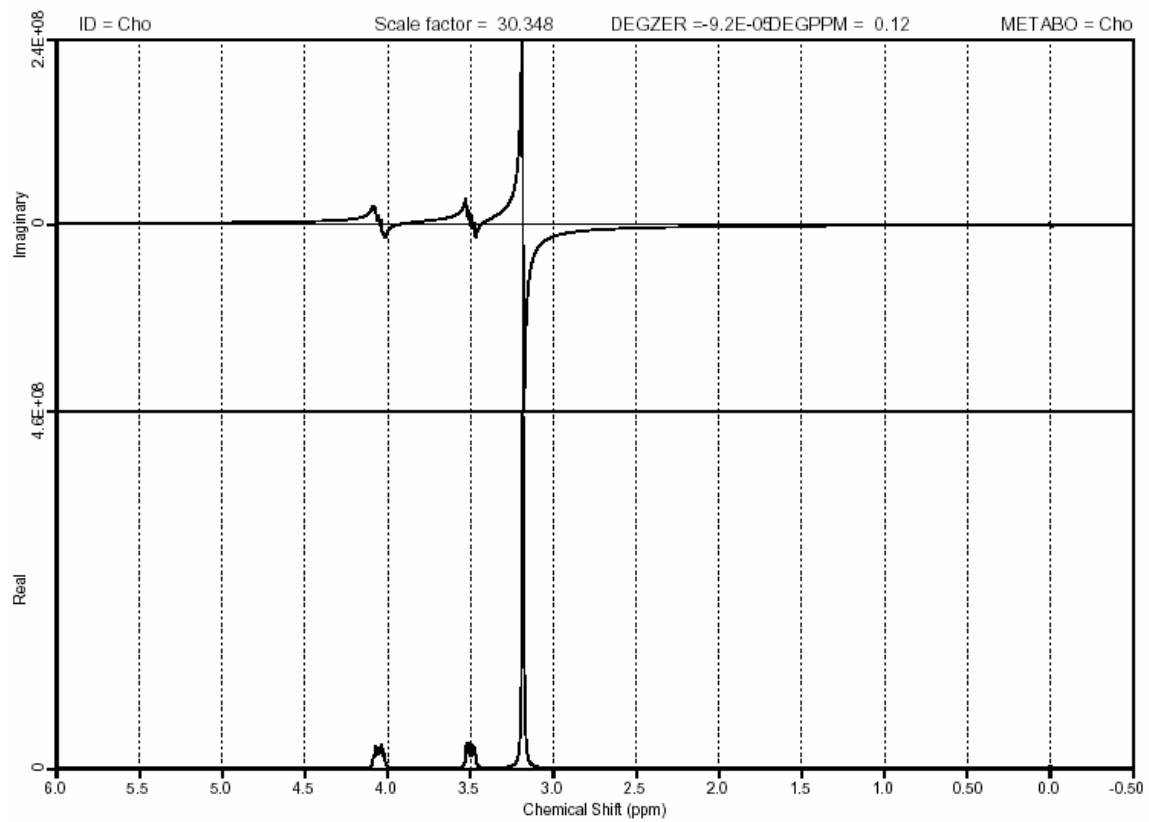
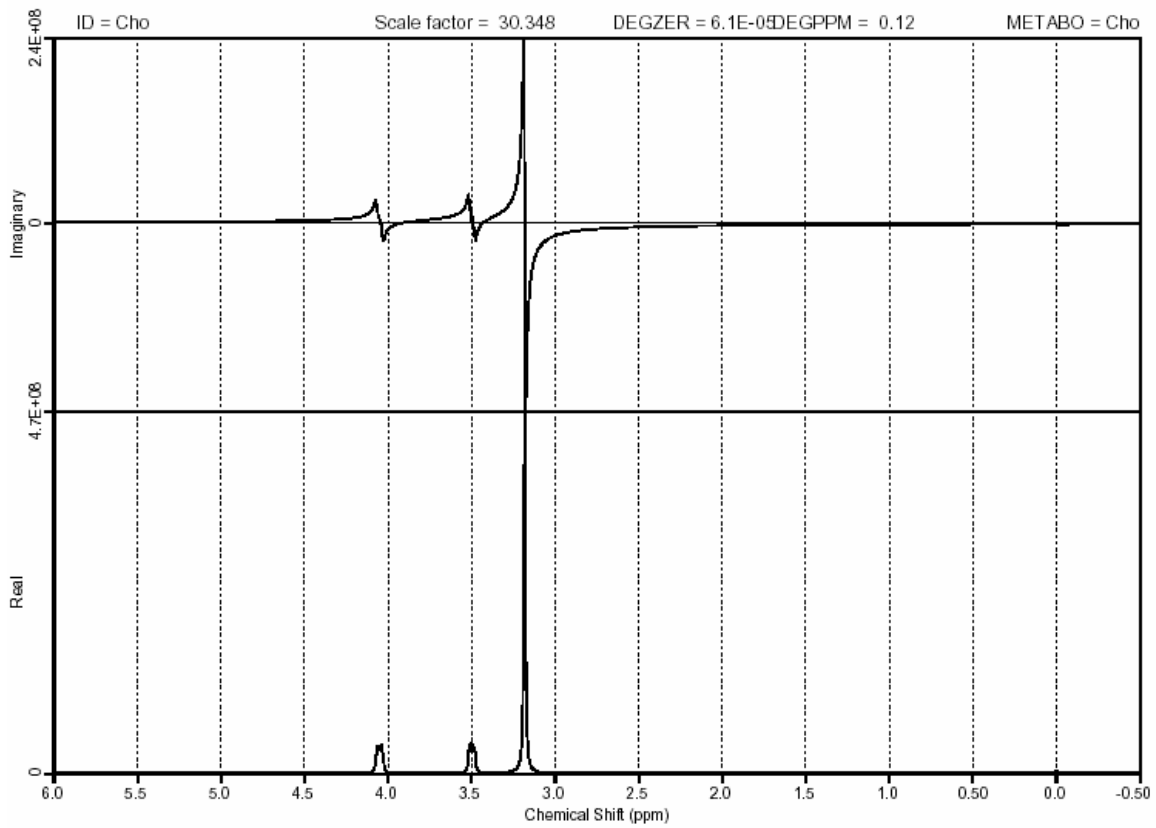
**Alanin**



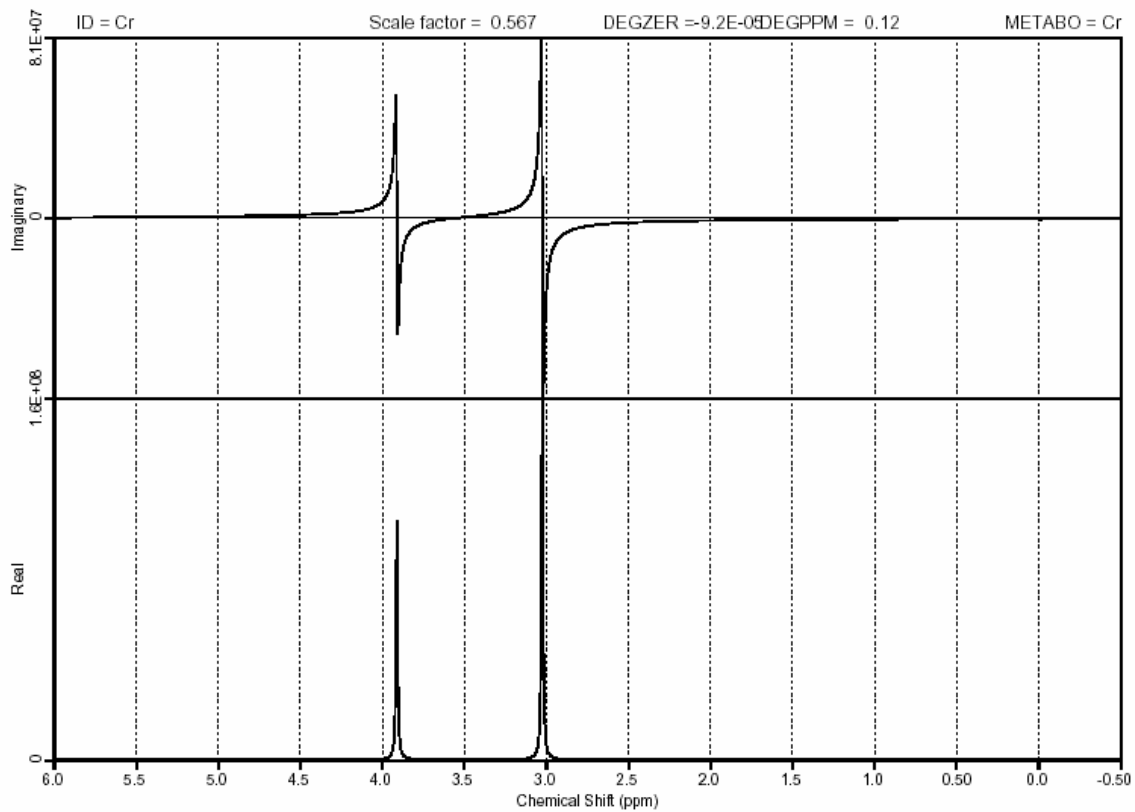
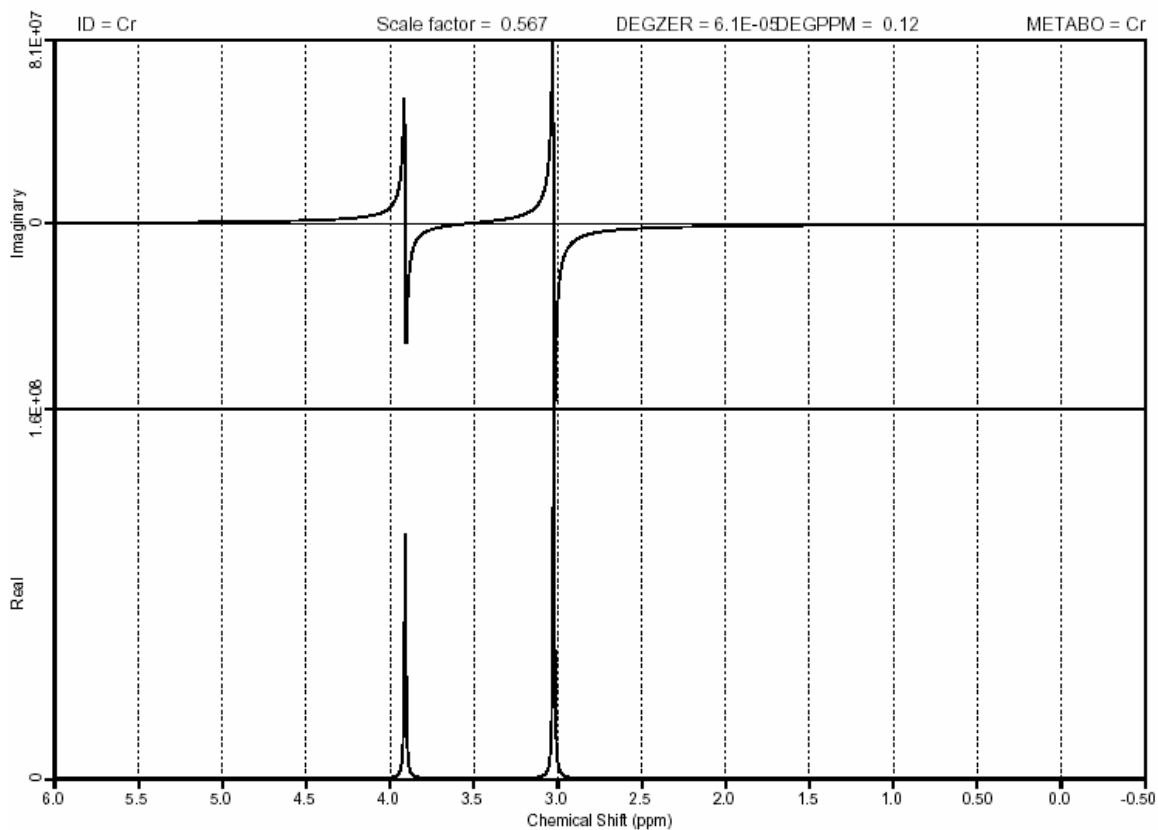
# Aspartat



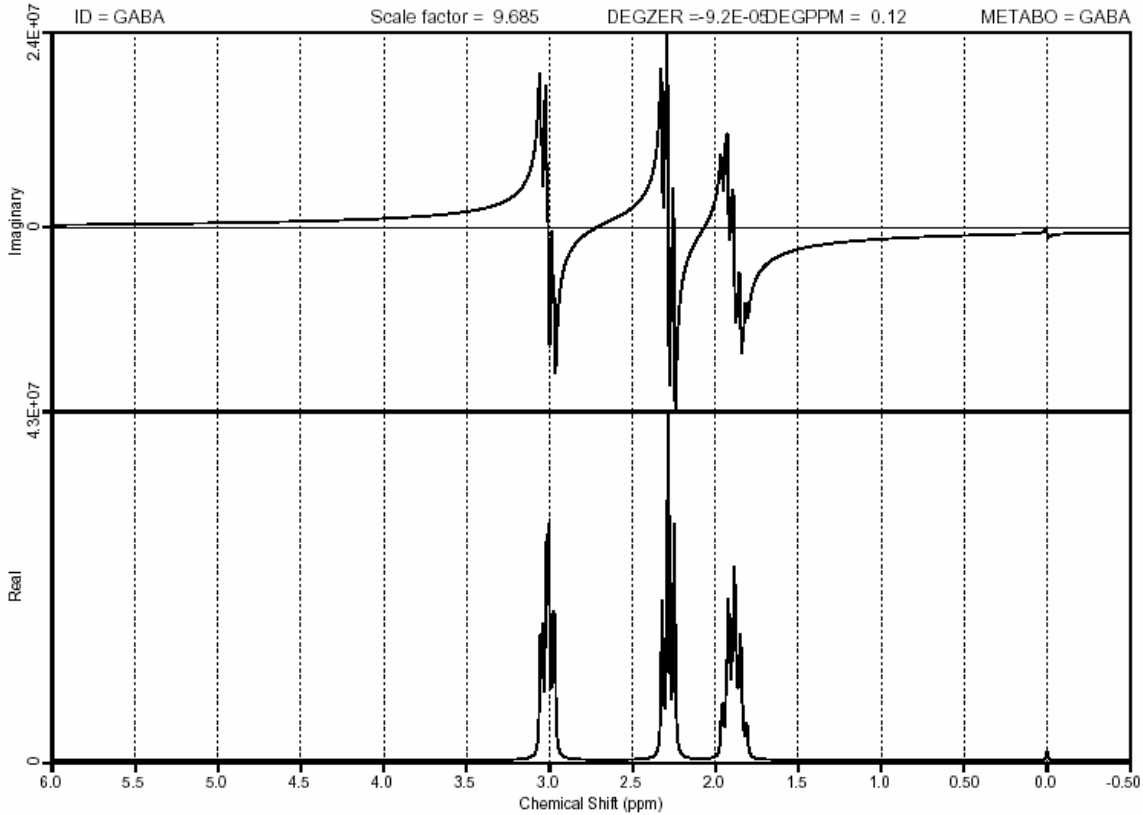
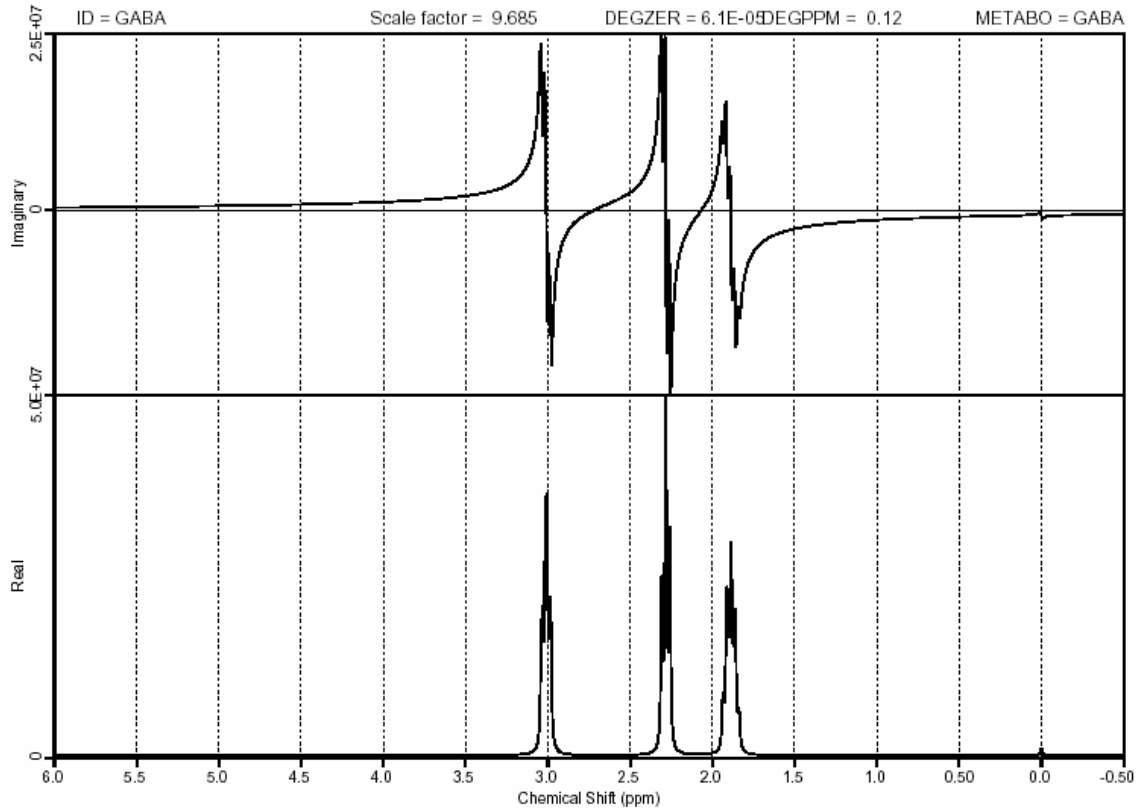
# Cholin



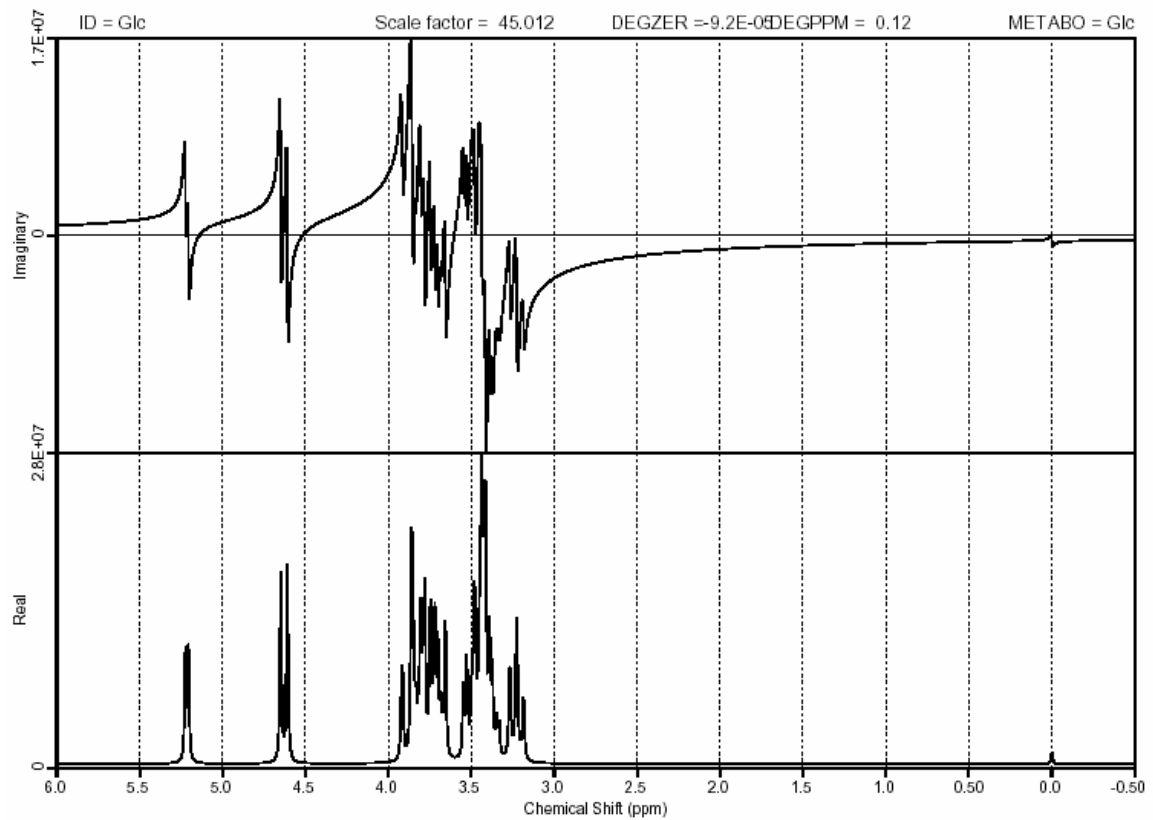
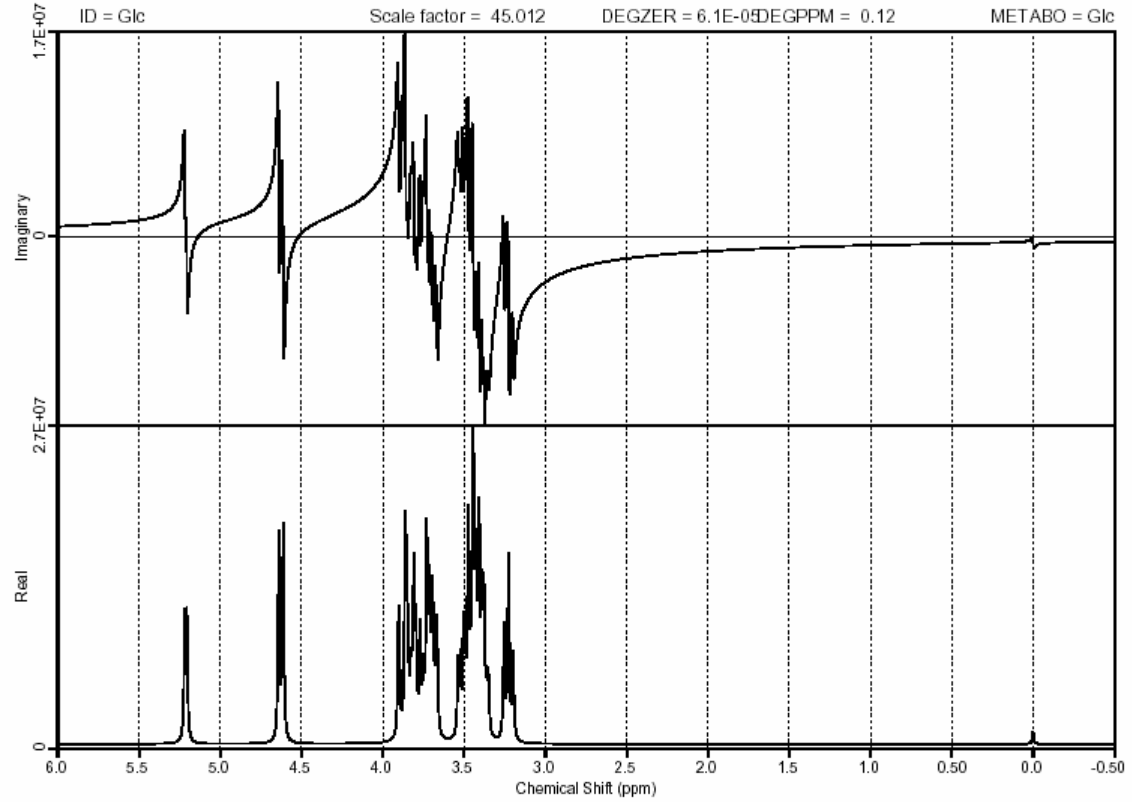
# Kreatin



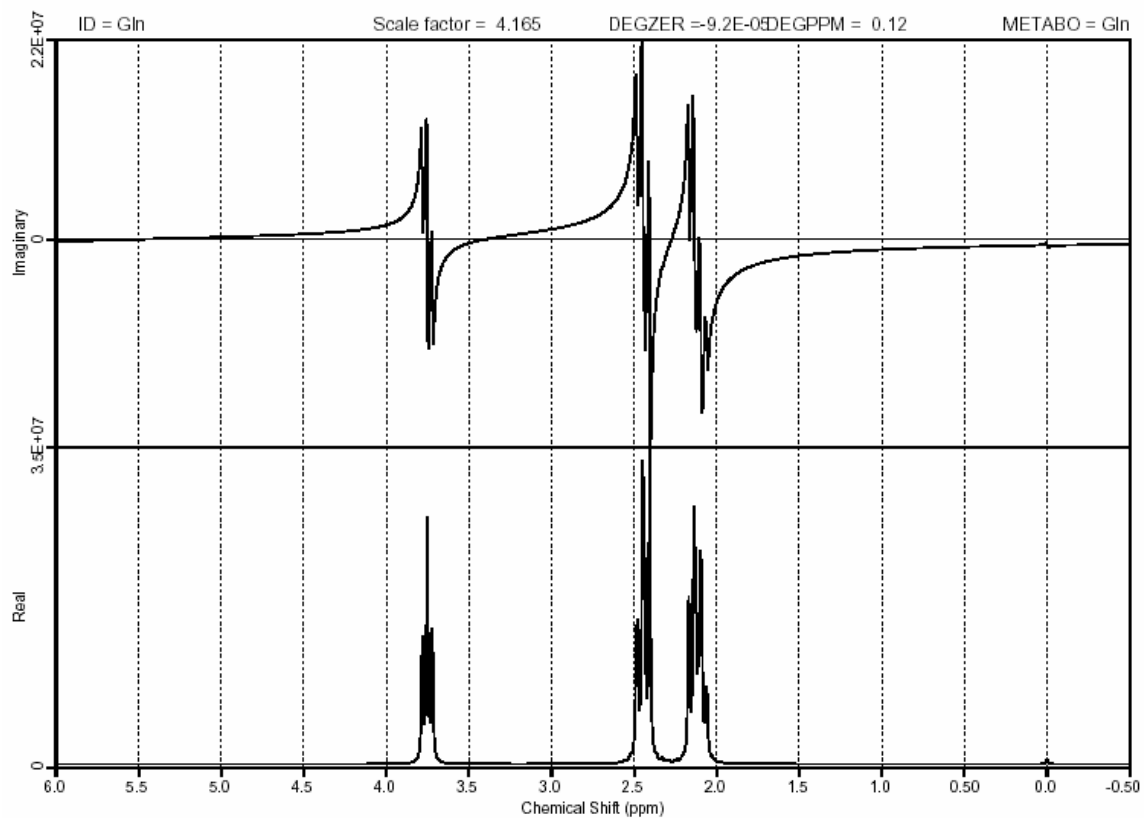
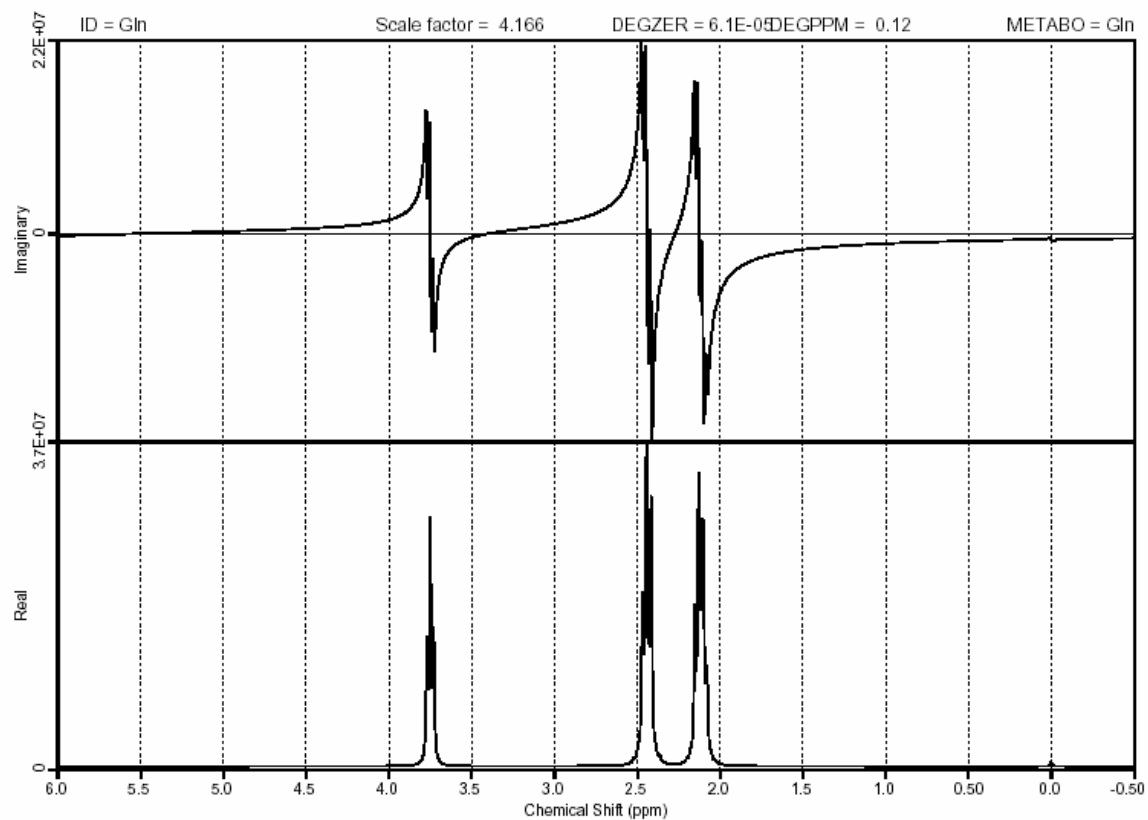
# Gamma-aminobutyric-acid



**Glukose (Kombination aus 36% des  $\alpha$ - und  
64% des  $\beta$ -Anomers)**

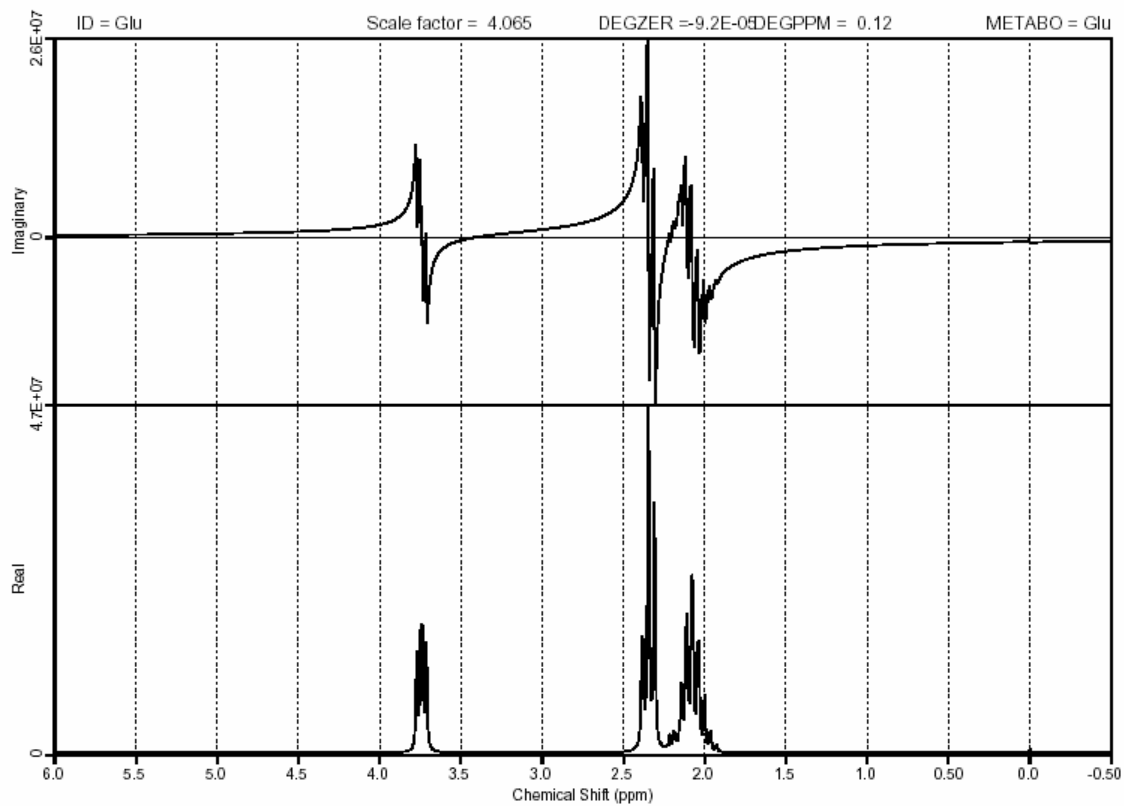
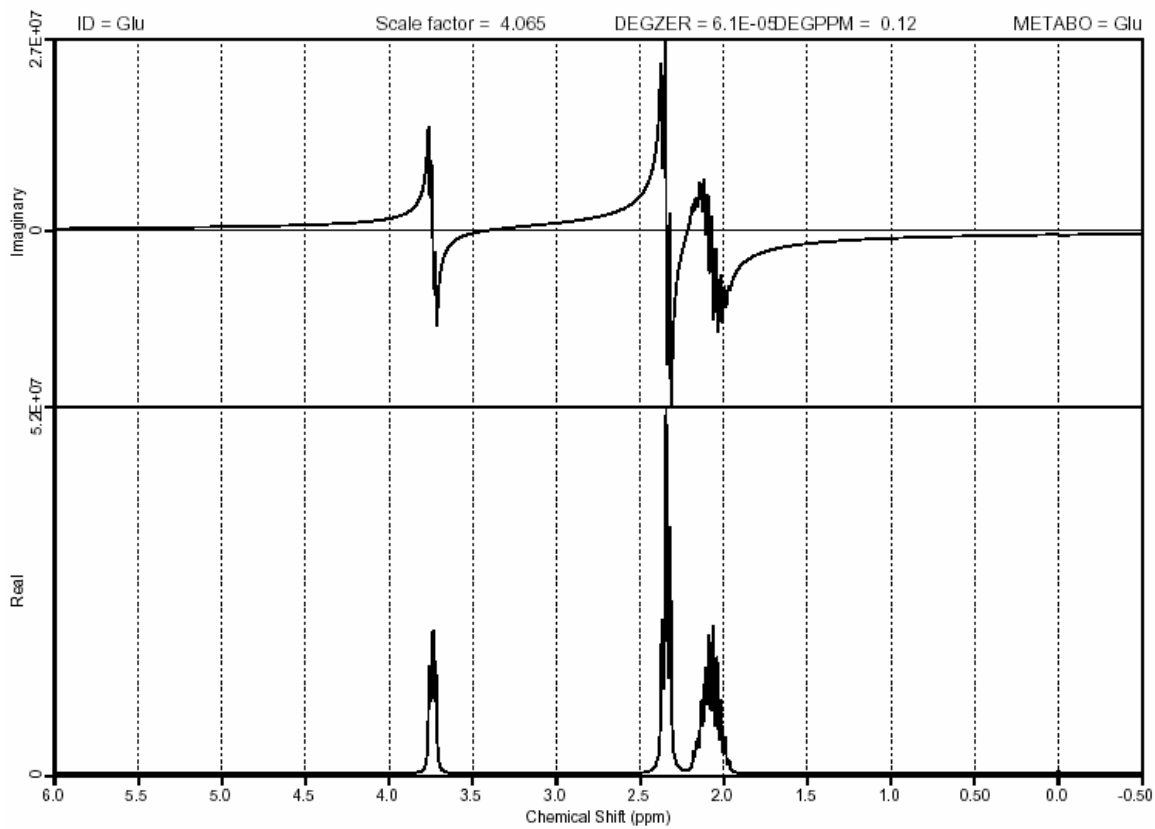


# Glutamin

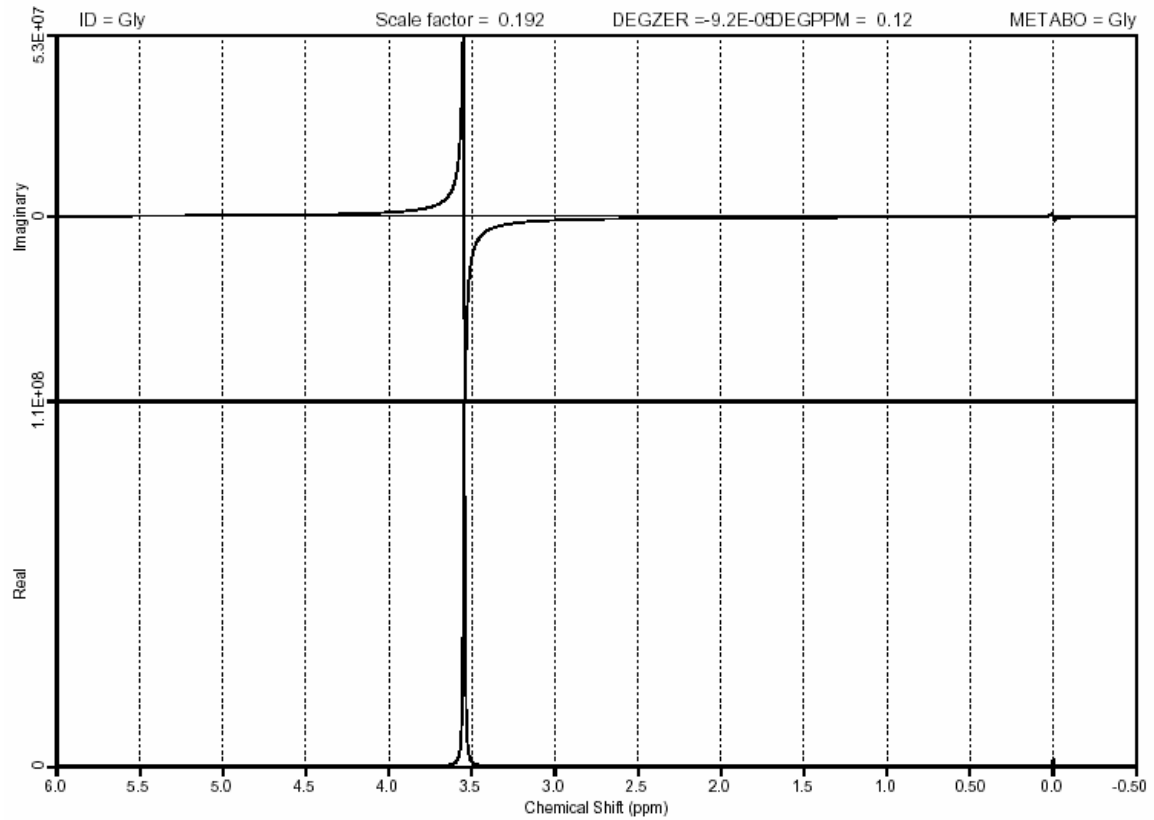
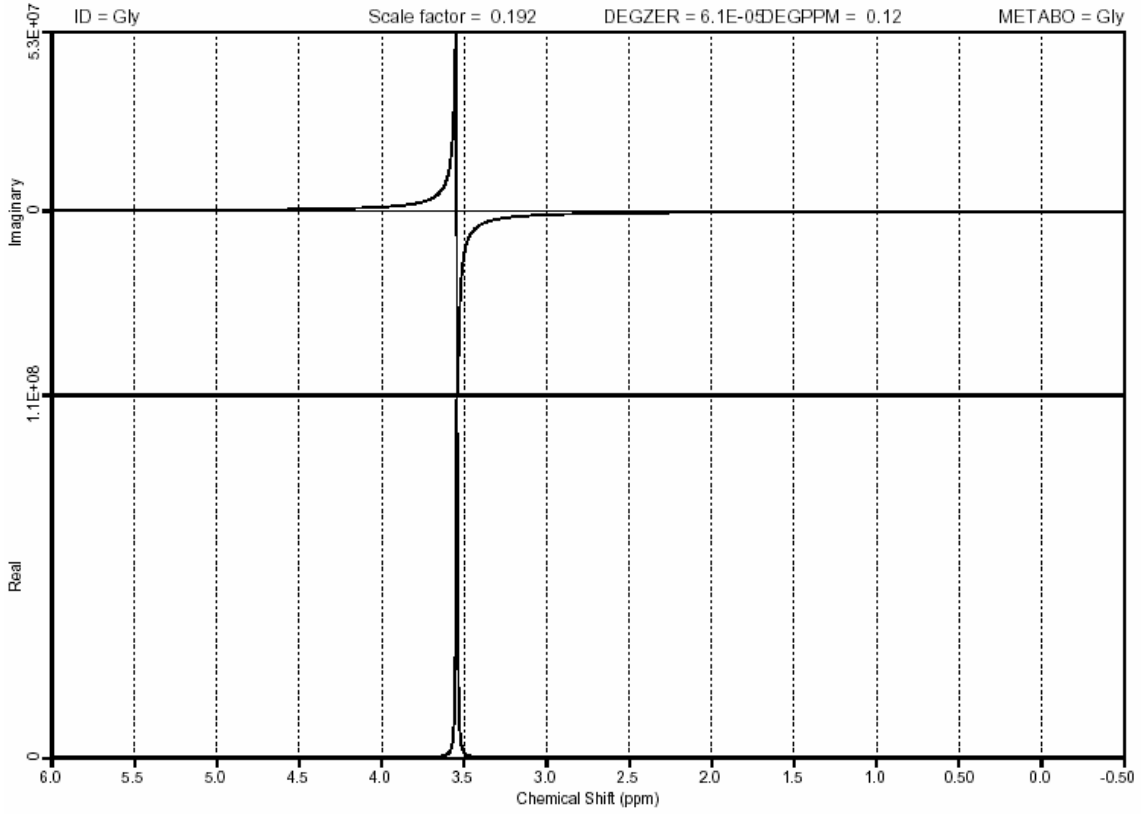




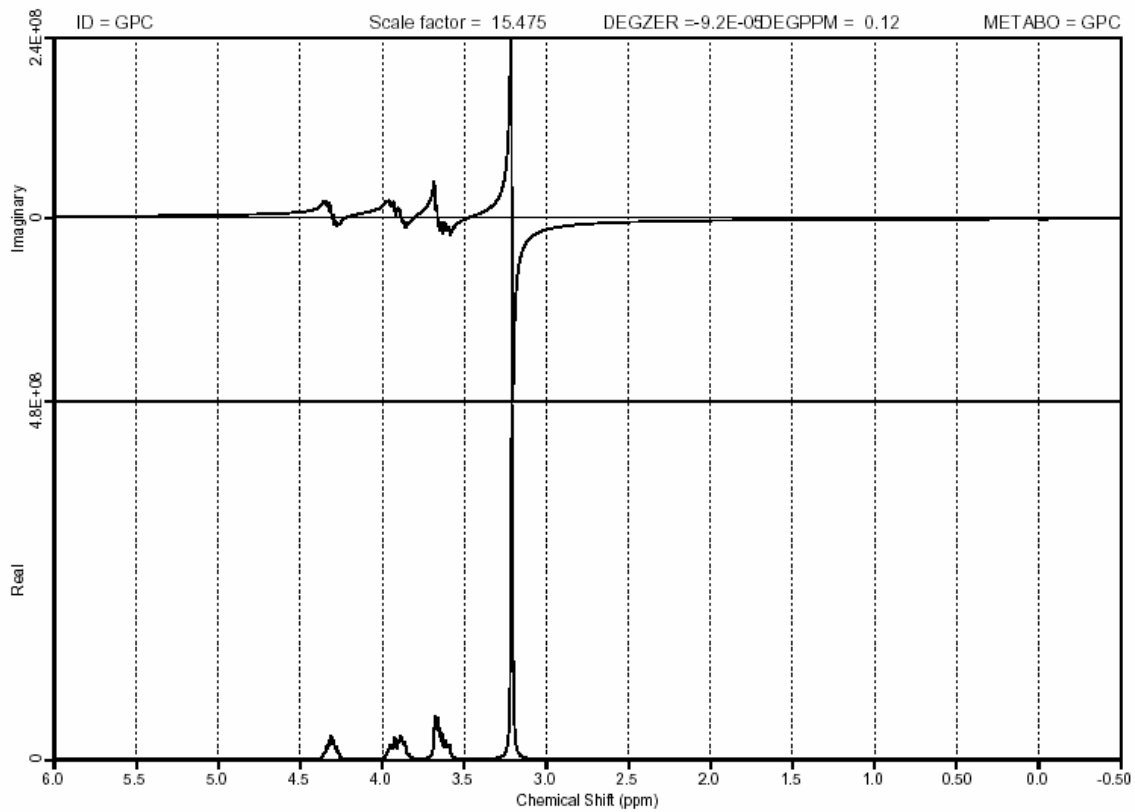
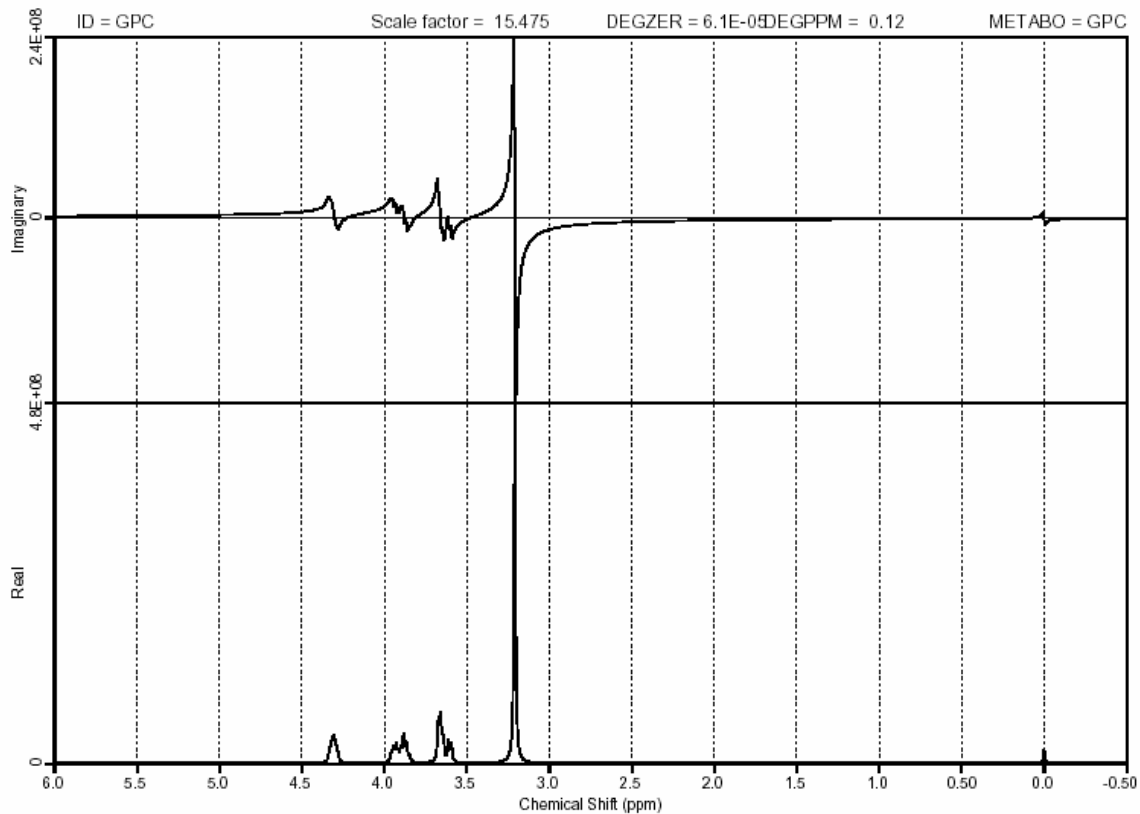
# Glutamat



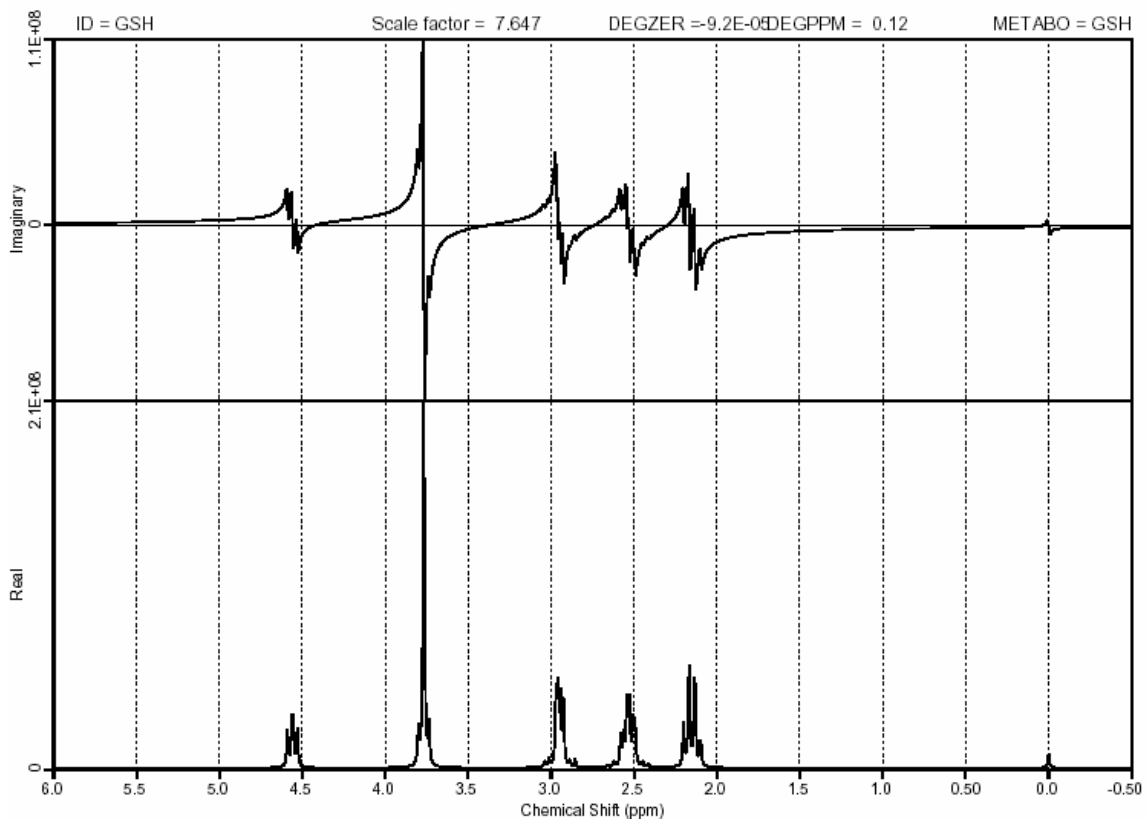
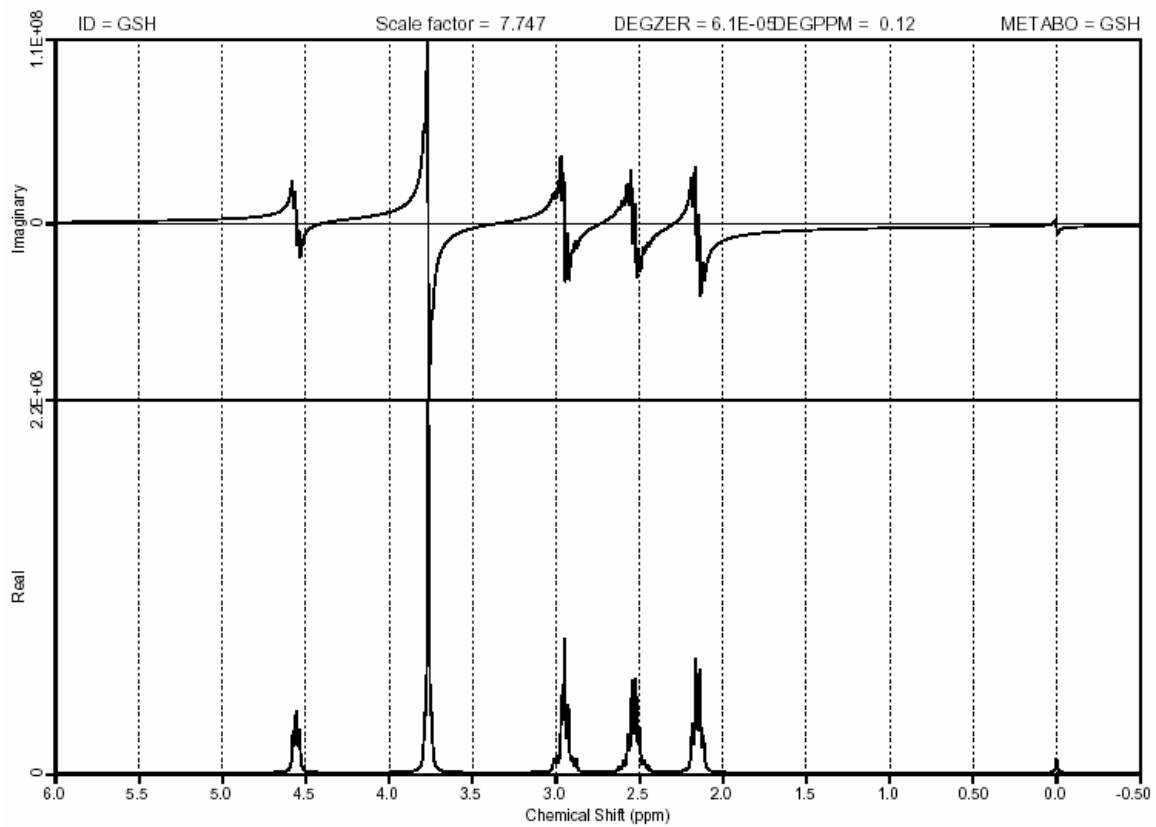
# Glycin



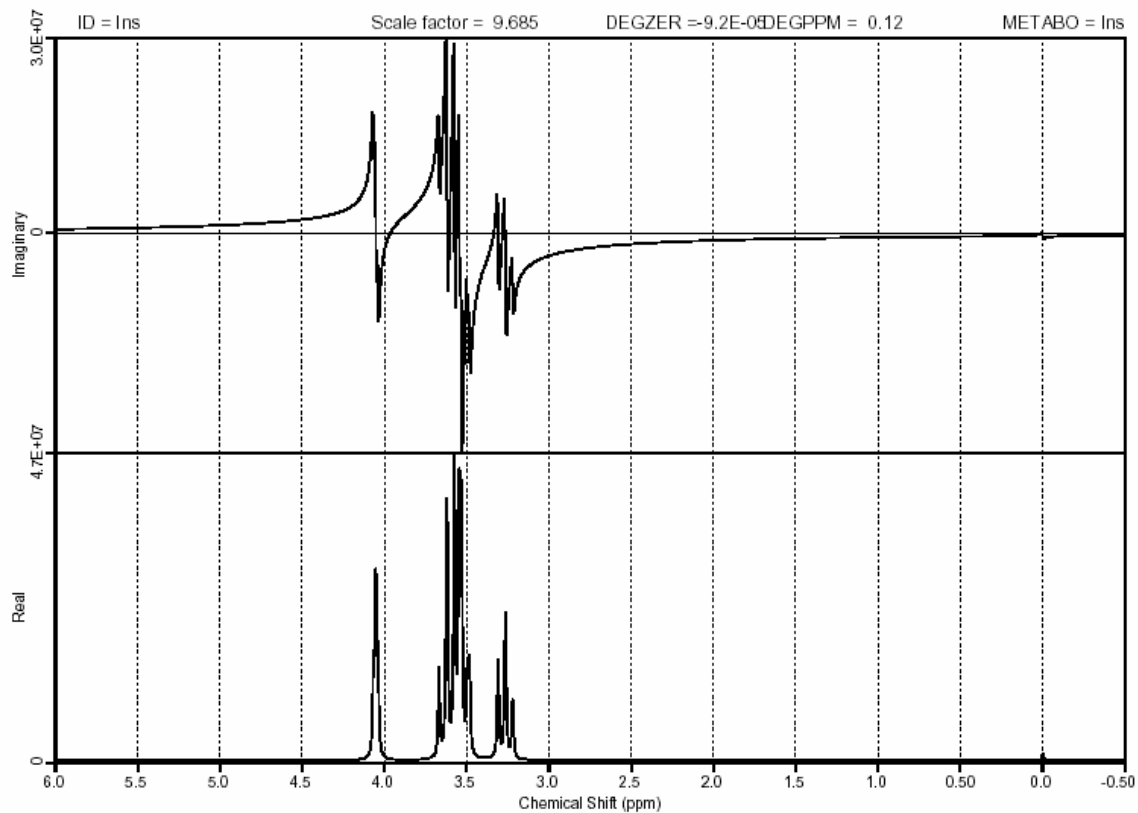
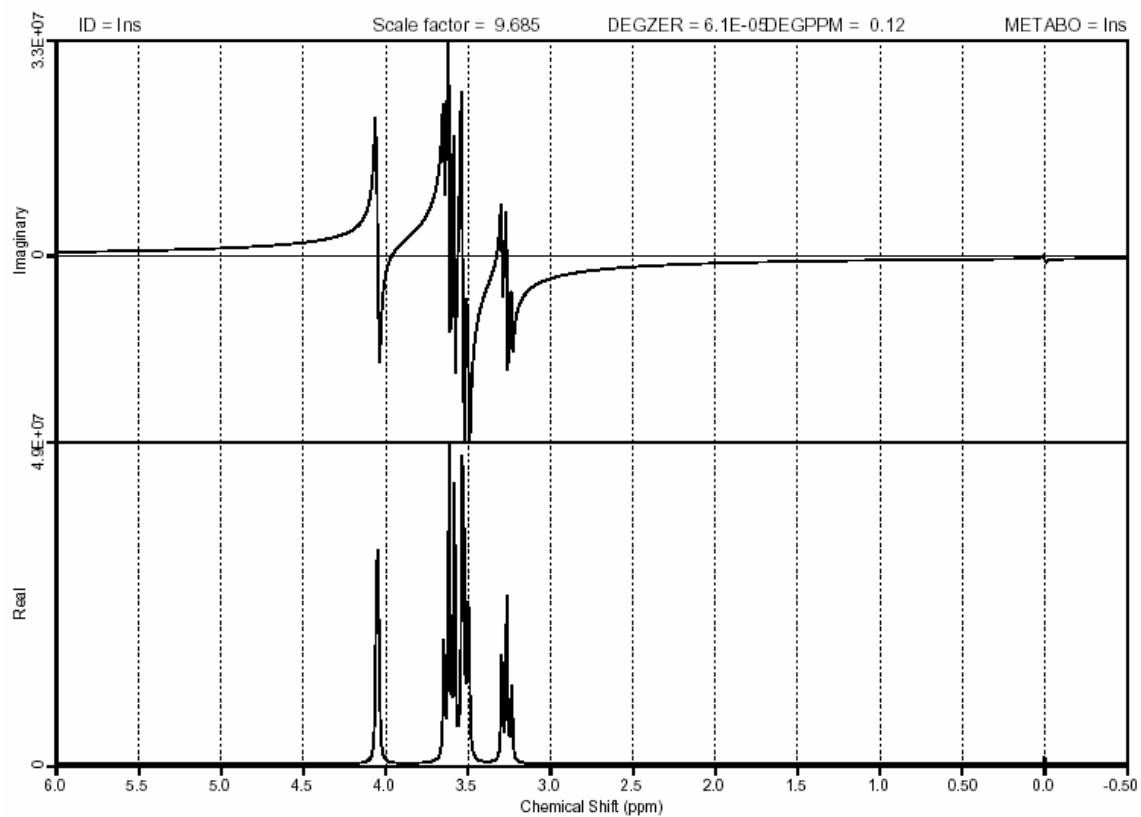
# Glycerophosphocholin



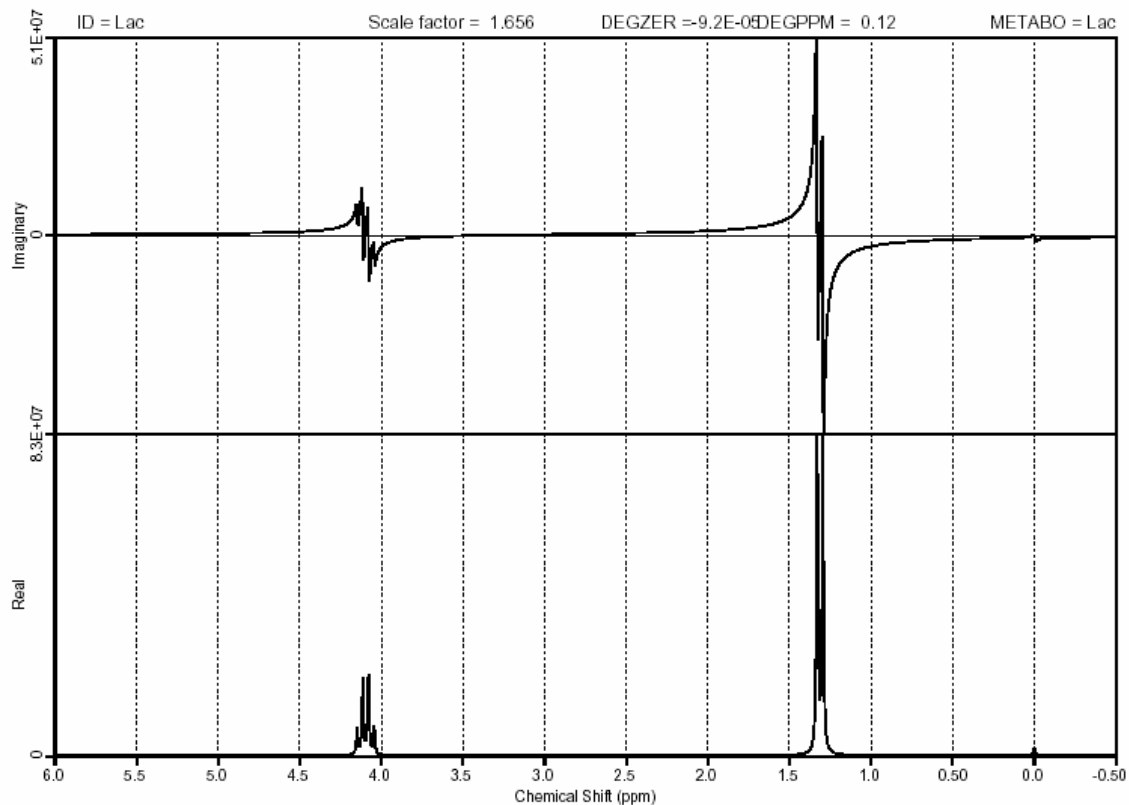
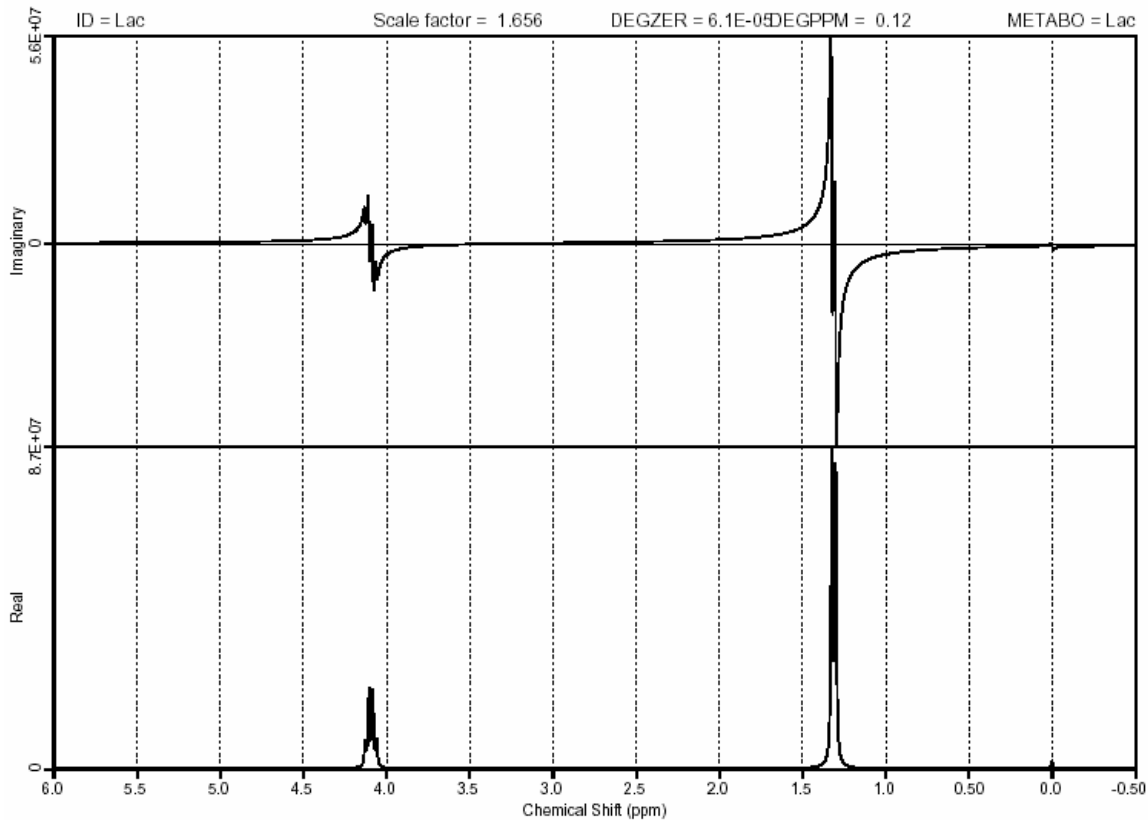
# Glutathion



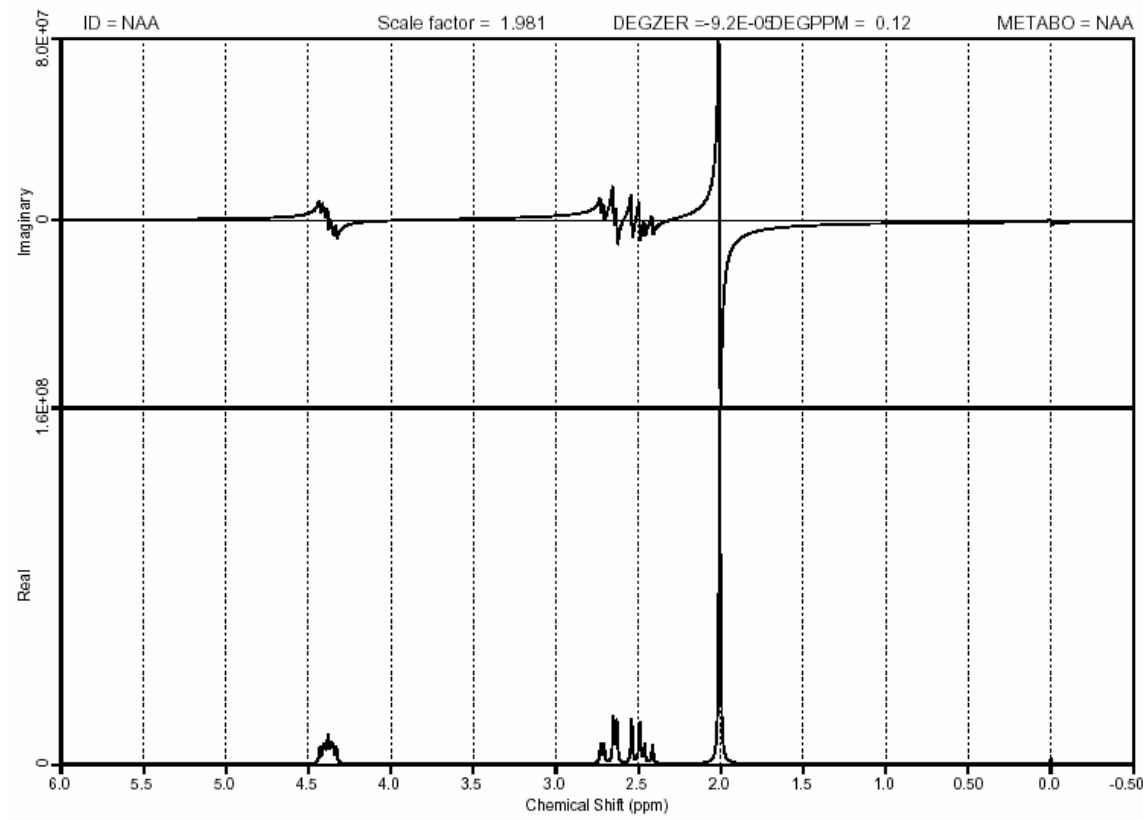
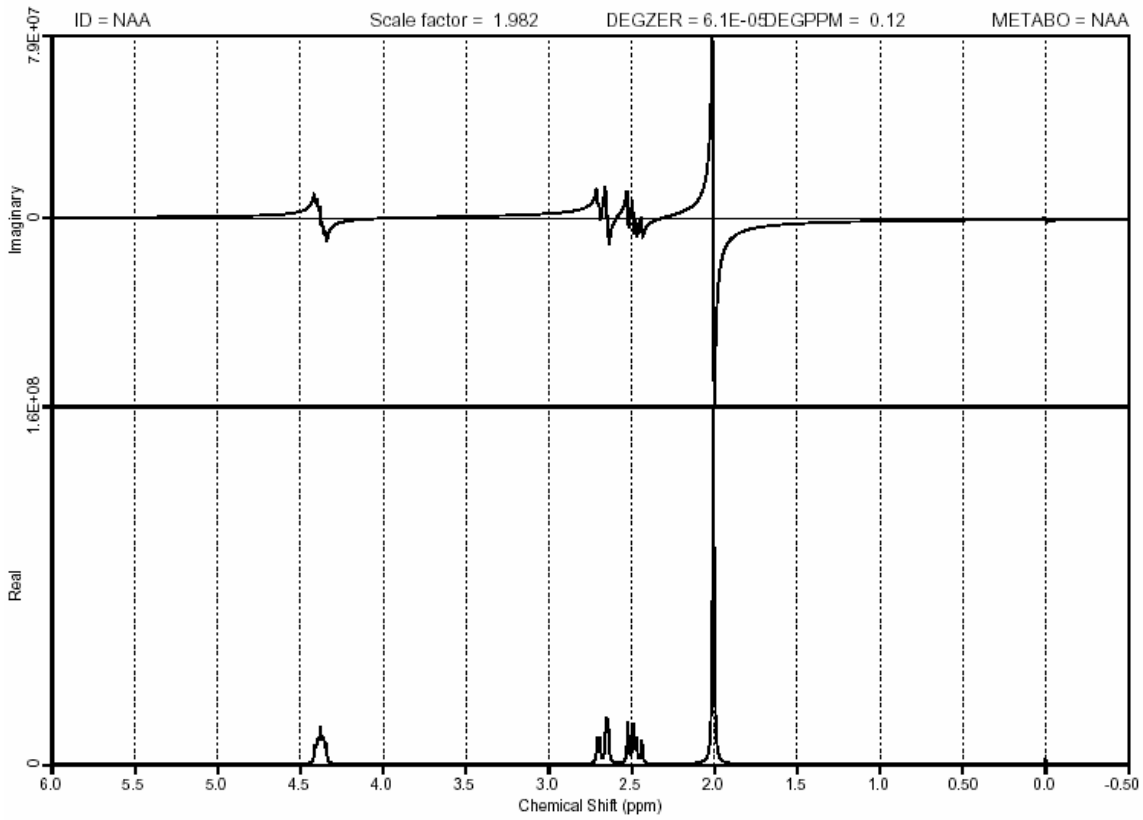
# Myo-Inositol



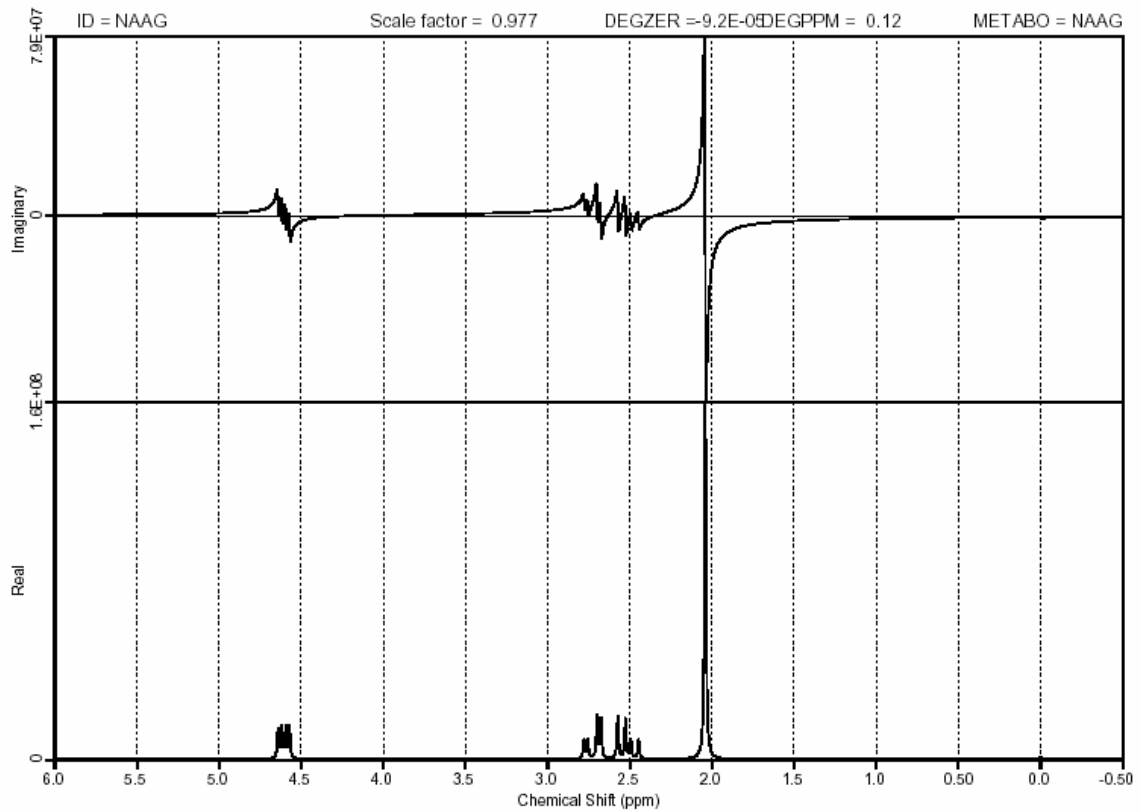
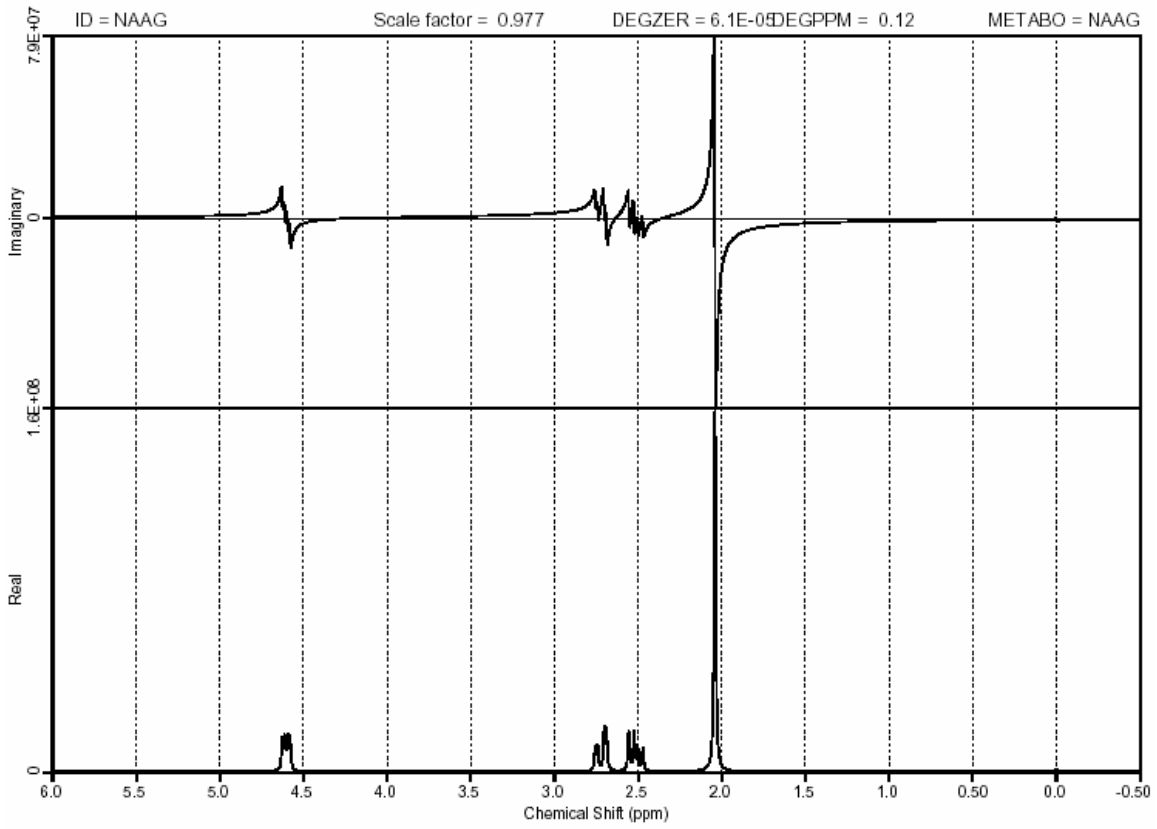
# Laktat



# N-Acetylaspartat

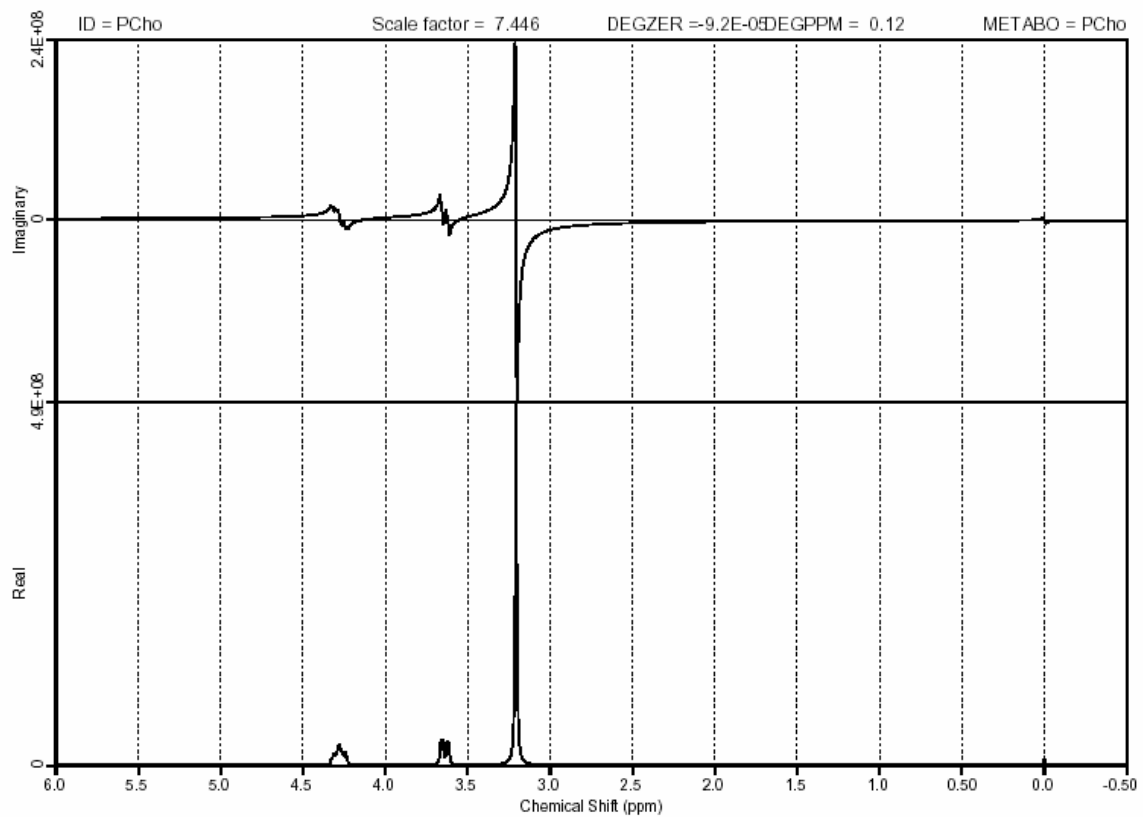
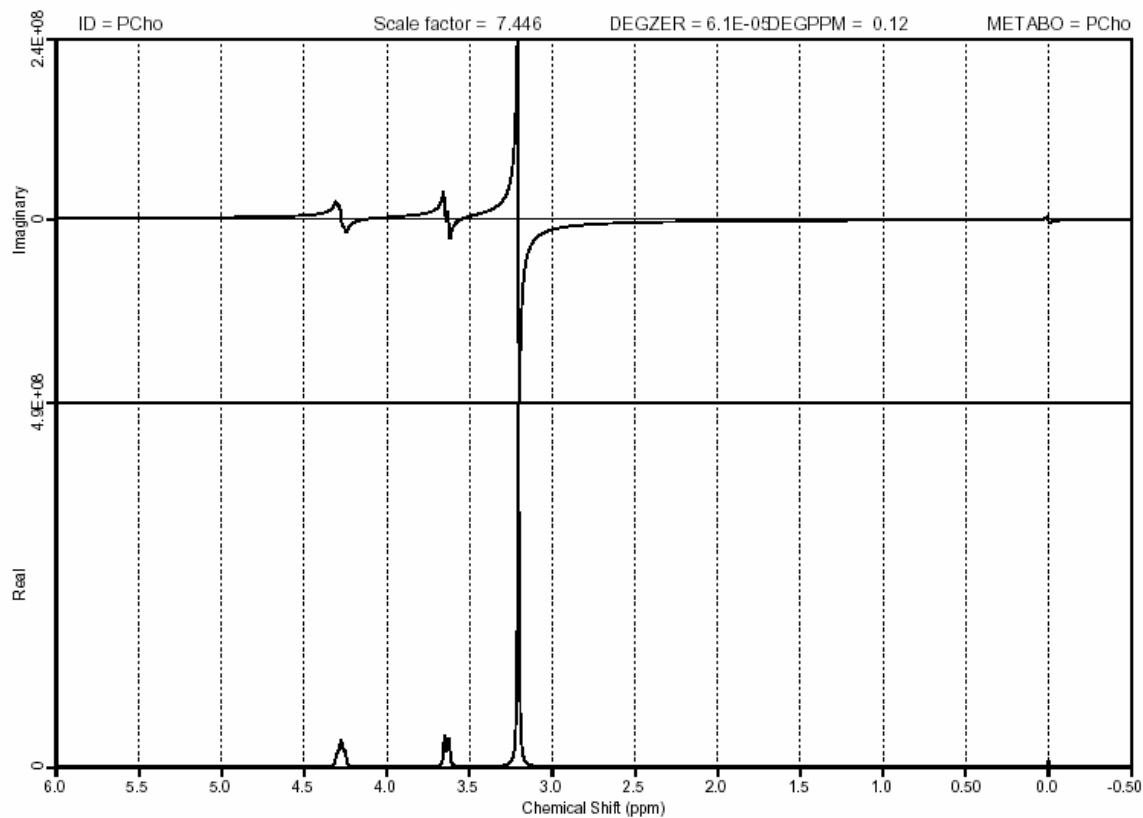


# N-Acetylaspartat-Glutamat

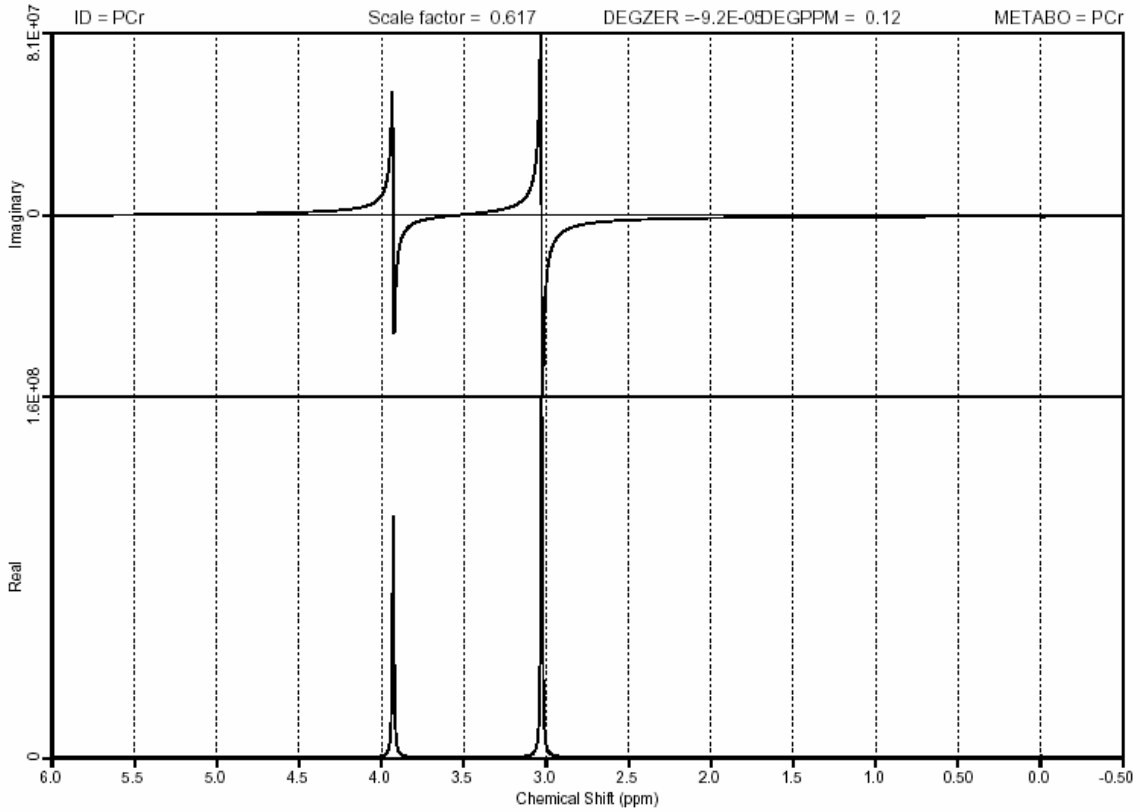
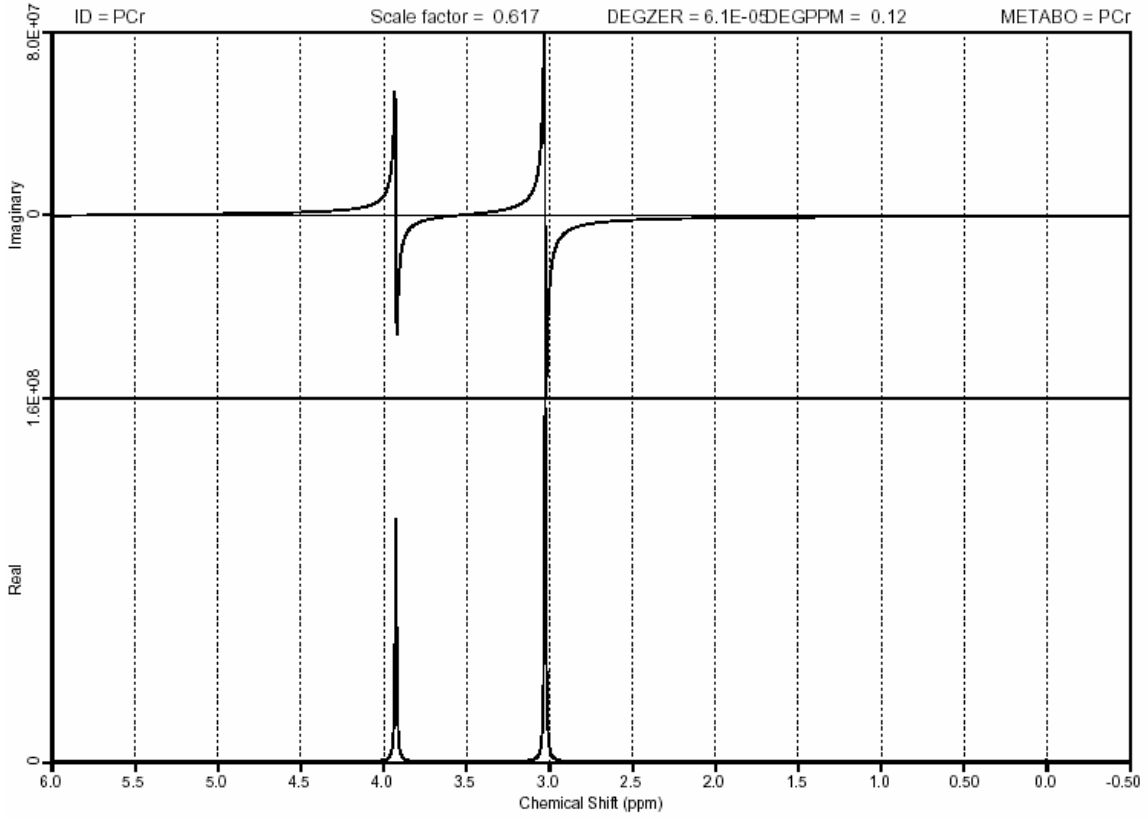




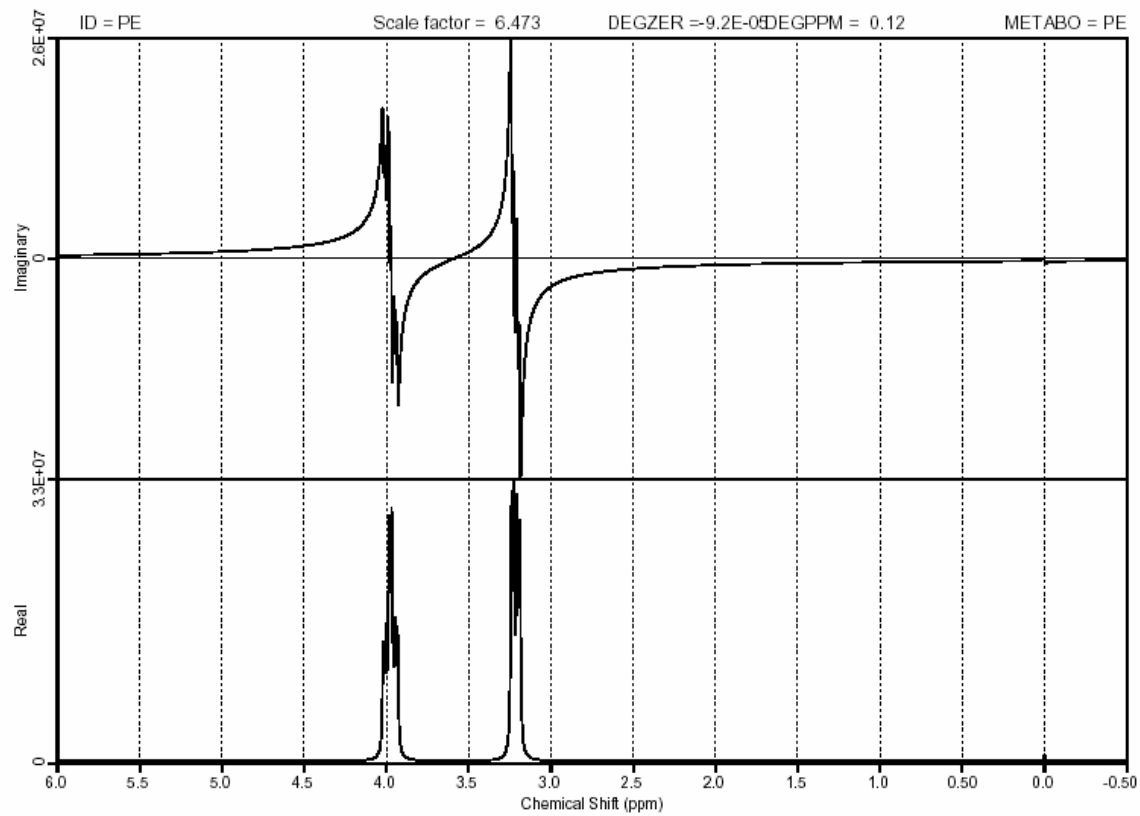
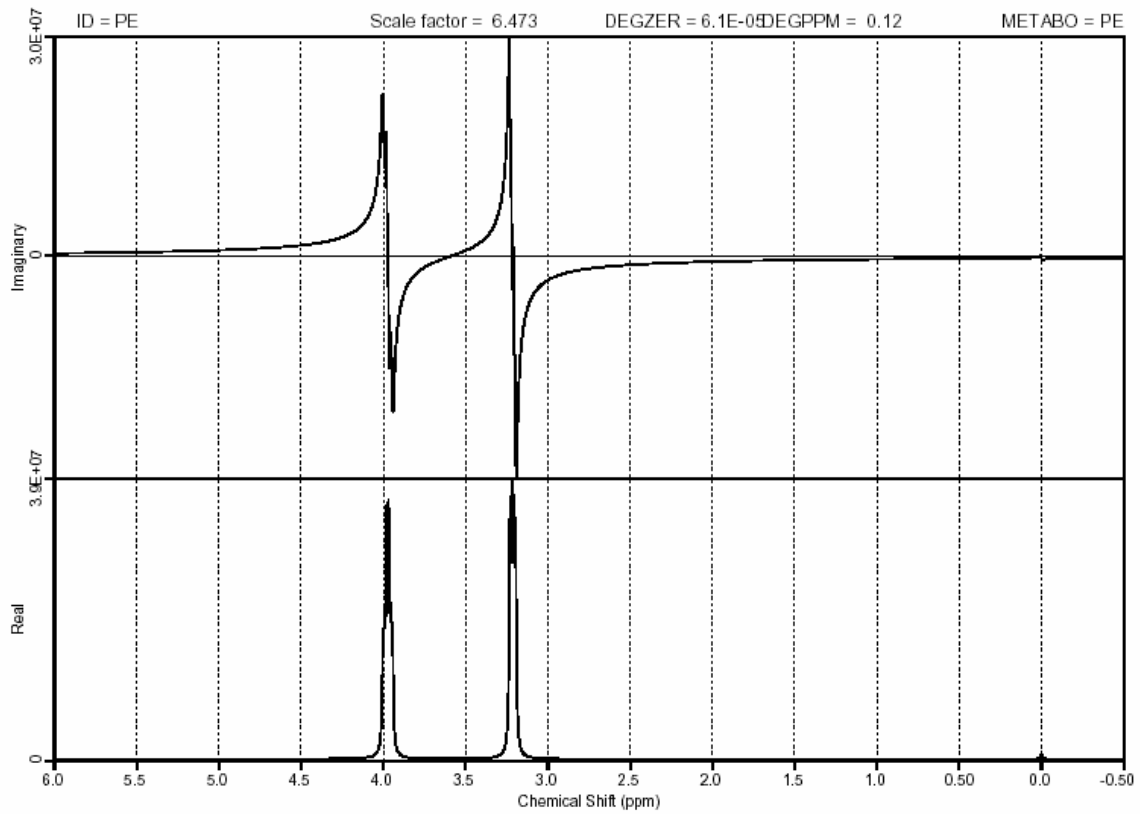
# Phosphorylcholin



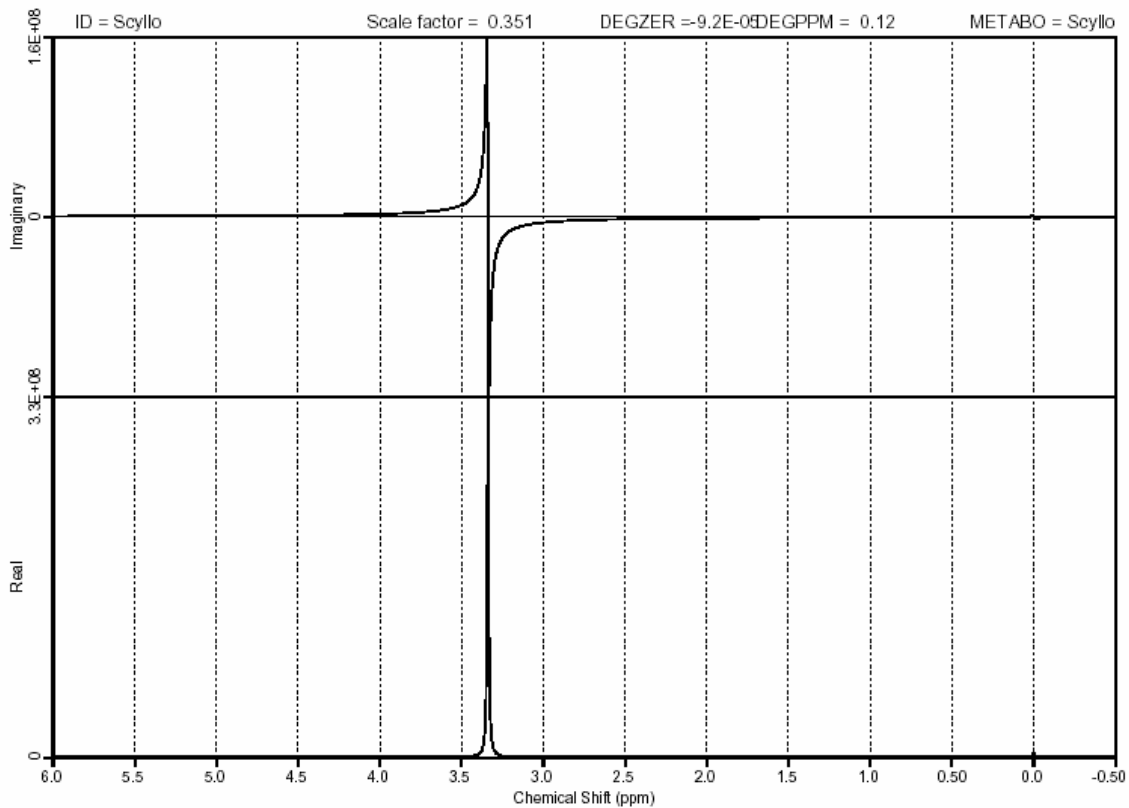
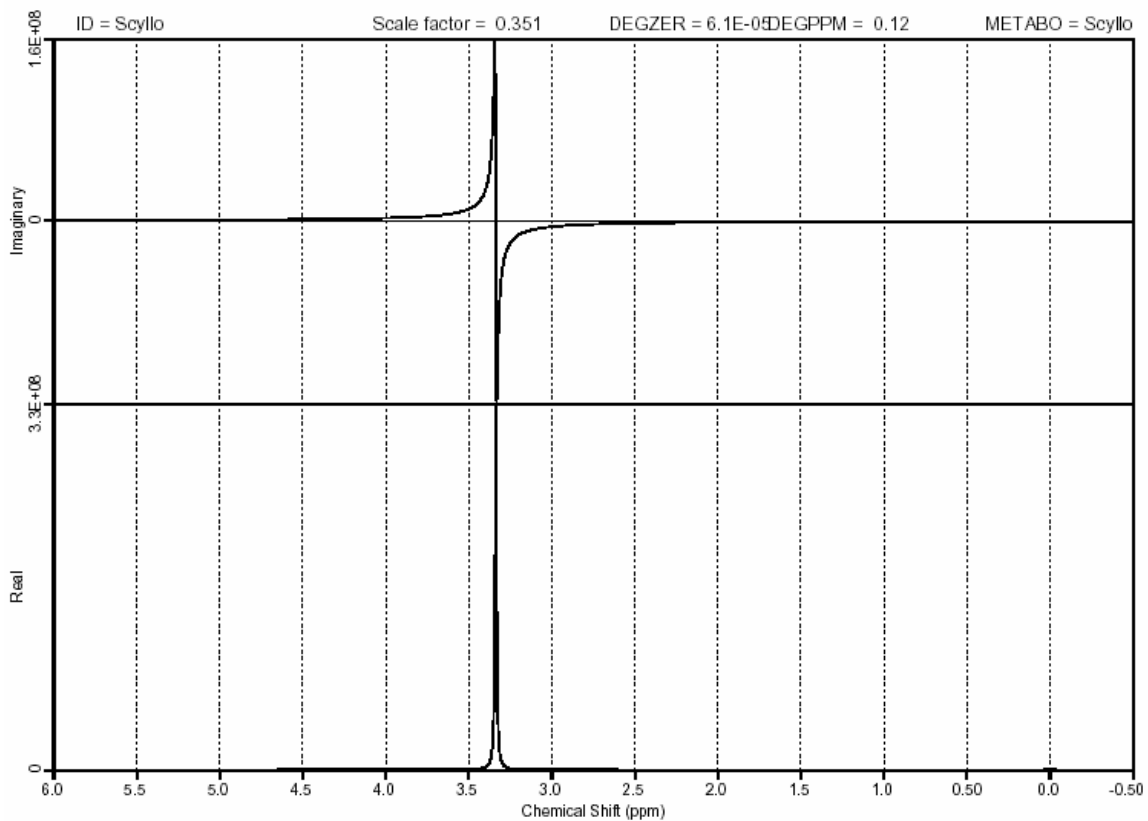
# Phosphorkreatin



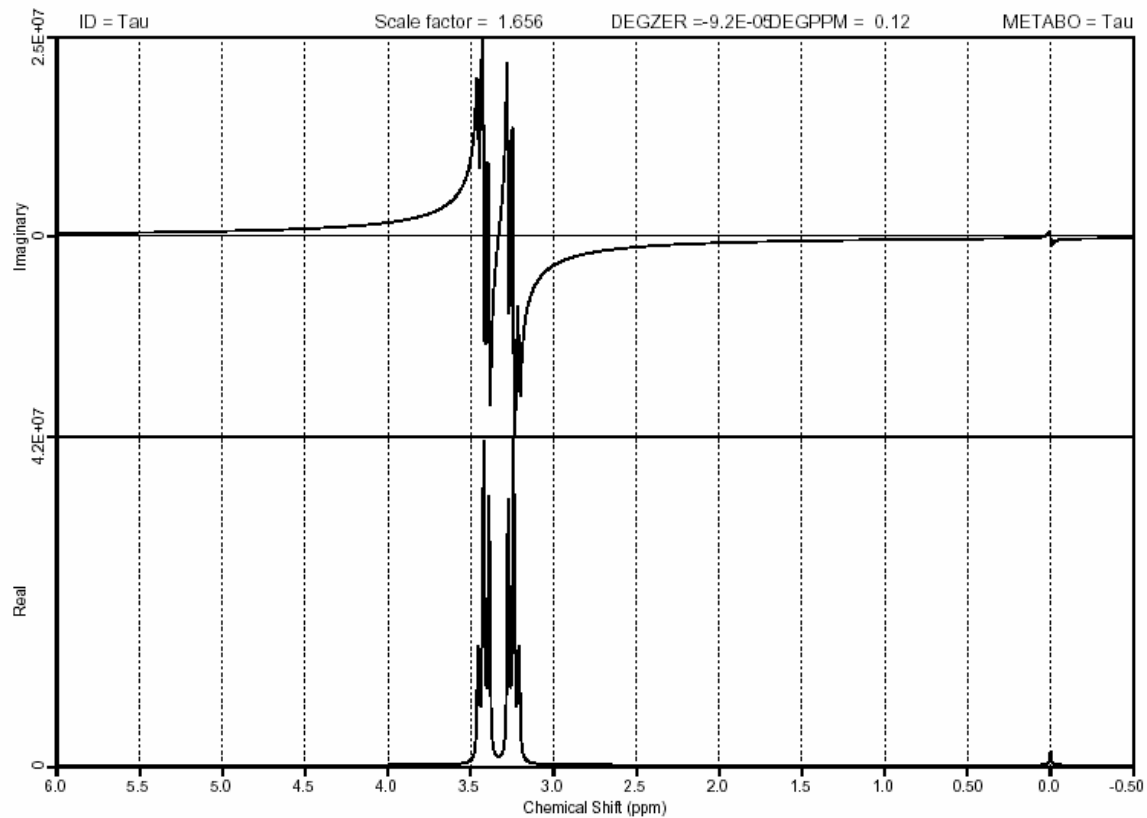
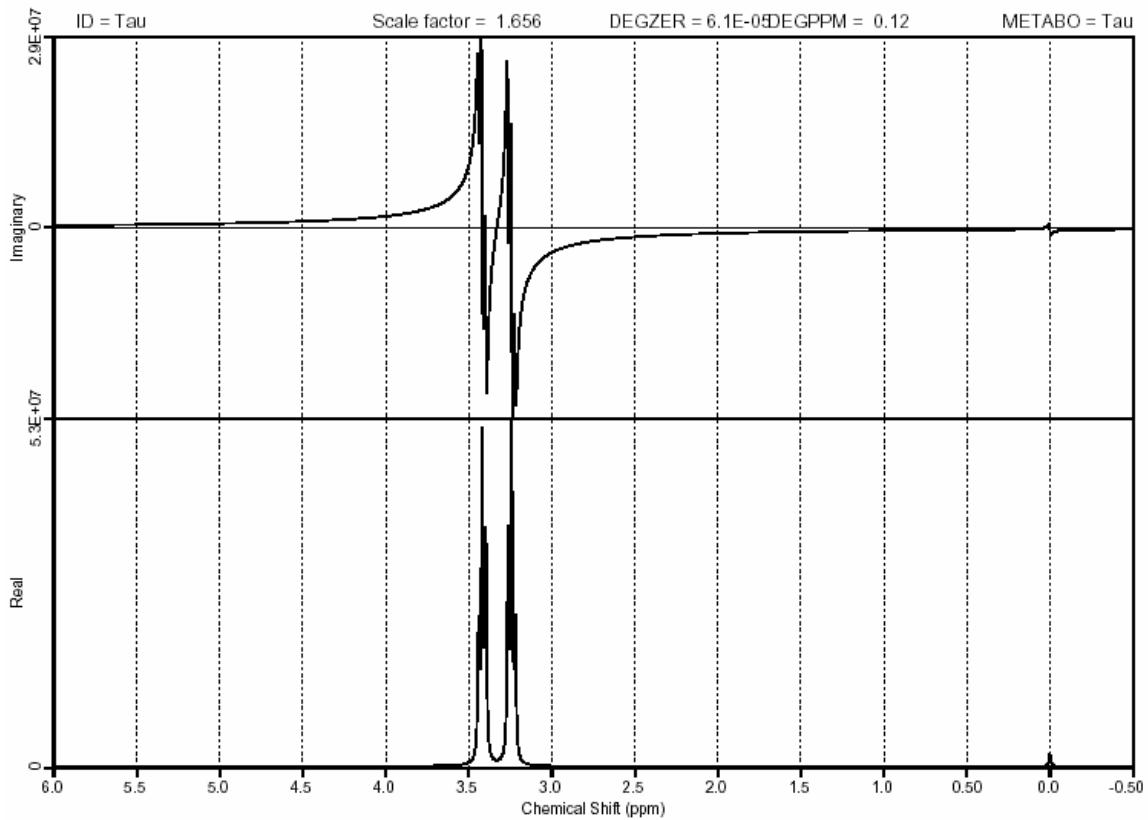
# Phosphorylethanolamin



# Scyllo-Inositol



# Taurin



## Anhang B:

```
Ala:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Alanine:
;
;
; molecule main 1
;
; CH-group (C#2):
; proton a 3.7746
; CH3-group (C#3):
; proton 3*b 1.4667
; proton c 1.4667
; proton d 1.4667
;
; proton-proton coupling:
; couple a b 7.234
; couple b c -14.366
; couple b d -14.366
; couple c d -14.366
;
; endmol
;
; molecule format 1
; proton x 8.44
;
; endmol
```

```
Asp:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Aspartate:
;
;
; molecule main 1
;
; CH-group (C#2):
; proton a 3.8914
; CH2-group (C#3):
; proton b 2.8011
; proton c 2.6533
;
; proton-proton coupling:
; couple a b 3.647
; couple a c 9.107
; couple b c -17.426
;
; endmol
;
; molecule format 1
; proton x 8.44
;
; endmol
```

```
Cho:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Choline
;
;
; molecule main 1
;
; N(CH3)3 group: one CH3 is interacting
; with the nitrogen (see below)
; proton 3*a 3.185
; proton 3*b 3.185
; proton 3*c 3.185
; Nitrogen
; nitrogen n 20; the value 20 is
; arbitrarily set
;
; CH2 group (C#1):
; proton d 4.054
; proton e 4.054
;
; CH2 group (C#2)
; proton f 3.501
; proton g 3.501
;
; proton-proton coupling:
; couple d f 3.14
; couple d g 6.979
; couple e g 3.168
; couple e f 7.011
;
; proton-nitrogen coupling
; weak d n 2.572
; weak e n 2.681
; weak a n 0.57
;
; endmol
;
; molecule format 1
; proton x 8.44
;
; endmol
```

```
Cr:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Creatine
;
;
; molecule main 1
;
; N(CH3)-group:
; proton 3*a 3.027
; CH2-group (C#2):
; proton 2*b 3.913
; NH-group:
; proton c 6.649
;
; no coupling
;
; endmol
;
; molecule format 1
; proton x 8.44
;
; endmol
```

```
DSS:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
;
; DSS
;
proton a 0.0
```

```
GABA:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolit: GABA
;
;
; molecule main 1
;
; CH2-Group (C#2):
proton a 3.0128
proton b 3.0128
;
; CH2-Group (C#3):
proton c 1.8890
proton d 1.8890
;
; CH2-Group (C#4):
proton e 2.2840
proton f 2.2840
;
; Proton-Proton coupling:
couple a c 5.372
couple a d 7.127
couple b c 10.578
couple b d 6.982
couple c e 7.755
couple c f 7.432
couple d e 6.173
couple d f 7.933
;
endmol
;
; molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol
```

```
Glc (alpha and beta anomeres):
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: D-Glucole (alpha and beta anomere) (spectra in D2O)
;
;
; alpha-D-Glucose (36%)
; molecule a 0.36
;
; CH-Group (C#1):
proton a 5.216
; CH-Group (C#2):
proton b 3.519
; CH-Group (C#3):
proton c 3.698
; CH-Group (C#4):
proton d 3.395
; CH-Group (C#5):
proton e 3.822
; CH-Group (C#6):
proton f 3.826
; CH-Group (C#6):
proton g 3.749
;
; proton-proton coupling:
couple a b 3.8
couple b c 9.6
couple c d 9.4
couple d e 9.9
couple e f 1.5
couple e g 6.0
couple f g -12.1
endmol
;
;
; beta-D-Glucose (64%)
; molecule b 0.64
;
; CH-Group (C#1):
proton a 4.630
; CH-Group (C#2):
proton b 3.230
; CH-Group (C#3):
proton c 3.473
; CH-Group (C#4):
proton d 3.387
; CH-Group (C#5):
proton e 3.450
; CH-Group (C#6):
proton f 3.882
; CH-Group (C#6):
proton g 3.707
;
; proton-proton coupling:
couple a b 8.0
couple b c 9.1
couple c d 9.4
couple d e 8.9
couple e f 1.6
couple e g 5.4
couple f g -12.3
endmol
;
;
; molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol
```

```

Gln:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Glutamine
;
molecule main 1
;
; CH-group (C#2):
proton a 3.7530
; CH2-group (C#3):
proton b 2.1290
proton c 2.1090
; CH2-group (C#4):
proton d 2.4320
proton e 2.4540
; NH2-group:
proton f 6.8160
proton g 7.5290
;
; proton-proton coupling:
couple a b 5.847
couple a c 6.500
couple b c -14.504
couple b d 9.165
couple b e 6.347
couple c d 6.324
couple c e 9.209
couple d e -15.371
;
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol

```

```

Glu:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Glutamat
;
molecule main 1
;
; CH-group (C#2):
proton a 3.7433
; CH2-group (C#3):
proton b 2.0375
proton c 2.1200
; CH2-group (C#4):
proton d 2.3378
proton e 2.3520
;
; proton-proton coupling:
couple a b 7.331
couple a c 4.651
couple b c -14.849
couple b e 8.406
couple c e 6.875
couple b d 6.413
couple c d 8.478
couple d e -15.915
;
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol

```

```

Gly:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Glycine
;
molecule main 1
;
proton 2*a 3.5480
;
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol

```

```

GPC:
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Glycero-phosphocholine:
molecule a 1
;
; Glycerol moiety:
; CH2-group (C#1):
proton a 3.605
proton b 3.672
; CH-group (C#2):
proton c 3.903
; CH2-group (C#3):
proton d 3.871
proton e 3.946
;
; Phosphor
phosphor p 20; the value 20 is set arbitrarily
;
; proton-phosphor coupling
weak d p 6.03
weak e p 6.03
;
; proton-proton coupling:
couple a c 5.77
couple c d 5.77
couple b c 4.53
couple c e 4.53
endmol
;
molecule b 1
;
; Choline moiety:
; CH2-group (C#7):
proton f 4.312
proton g 4.312
; CH2-group (C#8):
proton h 3.659
proton i 3.659
;
; Nitrogen:
nitrogen n 20; the value 20 is set arbitrarily
;
; Phosphor
phosphor p 30; the value 30 is set arbitrarily
;
couple f h 3.10
couple g i 3.10
couple g h 5.90
couple f i 5.90
;
; proton-nitrogen coupling:
weak f n 2.67
weak g n 2.67
;
; proton-phosphor coupling
weak f p 6.03
weak g p 6.03
endmol
;
molecule c 1
;
proton 3*j 3.212
proton 3*k 3.212
proton 3*l 3.212
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol

```



```

GSH:
; > NMR-Simulation<
;
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Glutathione
;
; molecule main 1
;
; Glycine moiety
; CH2-group (C#10):
; proton 2*a 3.769
; NH-group (N#9):
; proton b 7.154
;
; Cystein moiety
; CH-group (C#7):
; proton c 4.5608
; CH2-group (C#7'):
; proton d 2.9264
; proton e 2.9747
; NH-group (N#6):
; proton f 8.1770
;
; Glutamate moiety
; CH-group (C#2):
; proton g 3.769
; CH2-group (C#3):
; proton h 2.159
; proton i 2.146
; CH2-group (C#4):
; proton j 2.510
; proton k 2.560
;
; proton-proton coupling:
; couple c d 7.09
; couple c e 4.71
; couple d e -14.06
; couple g h 6.34
; couple g i 6.36
; couple h i -15.48
; couple h j 6.7
; couple h k 7.6
; couple i j 7.6
; couple i k 6.7
; couple j k -15.92
;
; endmol
;
; molecule format 1
; proton x 8.44
;
; endmol

```

```

Ins:
; > NMR-Simulation<
;
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Myo-inositol
;
; molecule main 1
;
; CH-group (C#1):
; proton a 3.5217
; CH-group (C#2):
; proton b 4.0538
; CH-group (C#3):
; proton c 3.5217
; CH-group (C#4):
; proton d 3.6144
; CH-group (C#5):
; proton e 3.2690
; CH-group (C#6):
; proton f 3.6144
;
; proton-proton coupling:
; couple a b 2.889
; couple a f 9.998
; couple b c 3.006
; couple c d 9.997
; couple d e 9.485
; couple e f 9.482
;
; endmol
;
; molecule format 1
; proton x 8.44
;
; endmol

```

```

Lac:
; > NMR-Simulation<
;
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Lactate
;
; molecule main 1
;
; CH-group (C#2):
; proton a 4.0974
; CH3-group (C#3):
; proton b 1.3142
; proton c 1.3142
; proton d 1.3142
;
; proton-proton coupling:
; couple a b 6.933
; couple a c 6.933
; couple a d 6.933
;
; endmol
;
; molecule format 1
; proton x 8.44
;
; endmol

```

```

NAA:
; > NMR-Simulation<
;
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: NAA
;
; molecule main 1
;
; Acetyl moiety
; CH3-group (C#2):
; proton 3*a 2.0080
;
; Aspartate moiety
; CH-group (C#2):
; proton b 4.3817
; CH2-Group (C#3):
; proton c 2.6727
; proton d 2.4863
; NH-Group:
; proton e 7.8205
;
; proton-proton coupling:
; couple b c 3.861
; couple b d 9.821
; couple c d -15.592
; couple b e 6.400
;
; endmol
;
; molecule format 1
; proton x 8.44
;
; endmol

```

```

NAAG:
; > NMR-Simulation<
;
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: NAAG (spectra in D2O)
;
molecule main 1
;
; Acetyl moiety:
; CH3-Group (C#2):
proton 3*a 2.042
;
; Aspartyl moiety:
; CH-Group (C#2):
proton b 4.607
; CH2-Group (C#3):
proton c 2.721
proton d 2.519
;
; Glutamate moiety:
; CH-Group (C#2):
;proton e 4.128
; CH2-Group (C#3):
;proton f 1.881
;proton g 2.049
; CH2-Group (C#4):
;proton h 2.190
;proton i 2.180
;
; proton-proton coupling:
couple b c 4.412
couple b d 9.515
couple c d -15.910
;
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol

```

```

PCho:
; > NMR-Simulation<
;
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Phosphoryl choline
;
molecule main 1
;
; CH2-group (C#1):
proton a 4.2805
proton b 4.2805
; CH2-group (C#2):
proton c 3.6410
proton d 3.6410
; N(CH3)3-group
proton 3*e 3.208
proton 3*f 3.208
proton 3*g 3.208
; Nitrogen:
nitrogen n 20; the value 20 is set
; arbitrarily
;
; Phosphor:
phosphor p 20; the value 20 is set
; arbitrarily
;
; proton-proton coupling:
couple a c 2.284
couple a d 7.231
couple b d 2.235
couple b c 7.326
;
; proton-nitrogen coupling:
weak a n 2.680
weak b n 2.772
;
; proton-phosphor coupling:
weak a p 6.298
weak b p 6.249
;
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol

```

```

PCr:
; > NMR-Simulation<
;
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Phosphocreatine
;
molecule main 1
;
; N(CH3)-group:
proton 3*a 3.029
; CH2-group (C#2):
proton 2*b 3.93
; NH-group:
proton c 6.5810
; NH-group:
proton d 7.2960
;
; no coupling
;
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol

```

**PE:**

```
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Phosphoryl ethanolamine
;
molecule main 1
;
; CH2-group (C#1):
proton a 3.9765
proton b 3.9765
; CH2-group (C#2):
proton c 3.2160
proton d 3.2160
; Nitrogen:
nitrogen n 20
; Phosphor:
phosphor p 30
;
;
; proton-proton coupling:
couple a c 3.182
couple b c 7.204
couple a d 6.716
couple b d 2.980
;
; proton-nitrogen coupling:
weak a n 0.464
weak b n 0.588
;
; proton-phosphor coupling:
weak a p 7.288
weak b p 7.088
;
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol
```

**Scyllo:**

```
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Scyllo-inositol
;
molecule main 1
;
; CH-groups (C#1-6):
proton a 3.3400
proton b 3.3400
proton c 3.3400
proton d 3.3400
proton e 3.3400
proton f 3.3400
;
; no coupling
;
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol
```

**Tau:**

```
; > NMR-Simulation<
;
; design: Sebastian Treiber
; June-2003
;
; Metabolite: Taurine
;
molecule main 1
;
; CH2-Group (C#1):
proton a 3.4206
proton b 3.4206
; CH2-group (C#2):
proton c 3.2459
proton d 3.2459
;
; proton-proton coupling:
couple a c 6.742
couple b c 6.403
couple a d 6.464
couple b d 6.792
;
endmol
;
molecule format 1
proton x 8.44
;
endmol
```