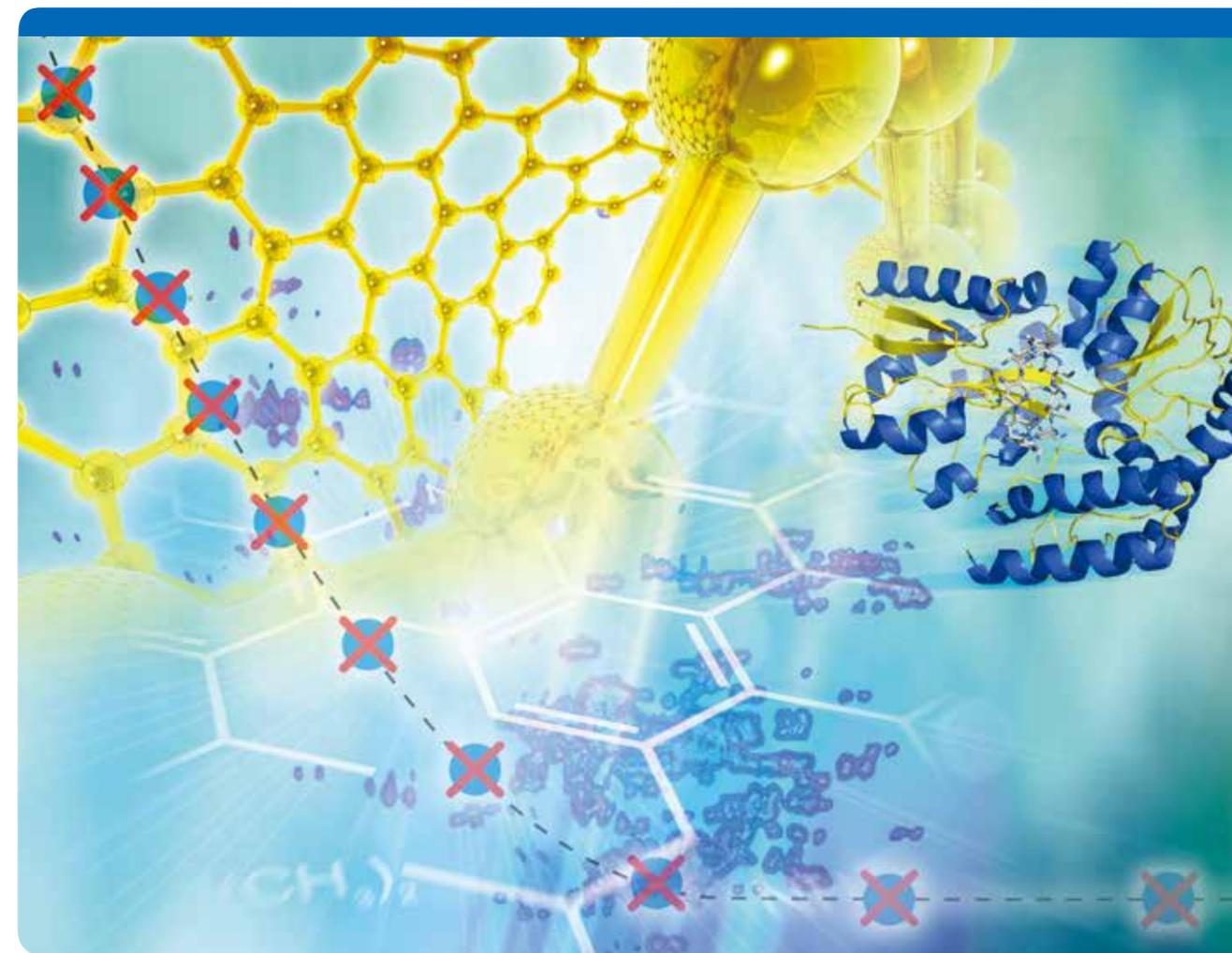
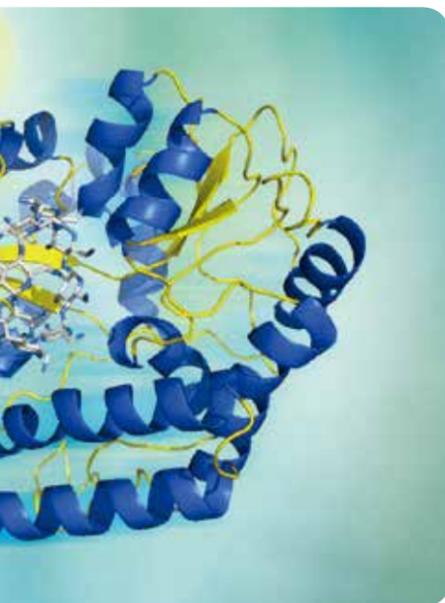


结语

本文概述了核磁共振波谱法背后的理论,为希望了解这项技术的科学家介绍了相关背景知识。强大的核磁共振技术已经应用于许多不同的应用领域,其中包括化学分析、结构生物学、药物开发和材料科学,以及医学等,并已证明在实验室中是至关重要的,而对于临床应用,磁共振成像(MRI)已成为医疗环境中不可或缺的组成部分。如今,人类对核磁共振的关注前所未有的。



什么是NMR?

● 核磁共振



布鲁克NMR微信公众号

● 布鲁克(北京)科技有限公司

网址: www.bruker.com
E-mail: sales.bbco.cn@bruker.com
布鲁克应用技术咨询: 400-898-5858
布鲁克售后技术支持: 400-898-1088

布鲁克(北京)科技有限公司

北京市海淀区西小口路66号中关村东升科技园B-6号楼C座8层
邮编: 100192
电话: (010)58333000
传真: (010)58333299

上海办公室

上海市闵行区合川路2570号1号楼9楼
邮编: 200233
电话: (021)51720800
传真: (021)51720810

广州办公室

广州市海珠区新港东路618号南丰汇6楼A12单元
电话: (020) 22365885/
(020) 22365886

© Bruker BioSpin 01/15 T153283

● 核磁共振

你可能听说过核磁共振 (NMR) 这个词, 但你对此究竟了解多少呢? 对实验室的科学家来说, 核磁共振是一项很有价值的分析技术, 而作为与之类似但并不完全相同的技术, 磁共振成像 (MRI) 已成为不可或缺的医疗诊断工具。

在现代化医院, 磁共振成像是一种常见的诊断工具。做过磁共振成像扫描的人都看到过它所生成的令人惊叹的身体内部详细图像, 这有助于医生在无需进行侵入性和昂贵的外科探查手术的情况下做出诊断, 譬如, 对膝盖的关节镜检查。另一方面, 核磁共振对科学实验室以外的大多数人来说可能仍是一个谜。

1938年Isidor Rabi首先发现了核磁共振现象, 如今这项技术已发展成为成熟而强大的物理工具, 能用来通过测量核磁相互作用开展物质研究。在 1946 年才真正开始重视这项技术作为一种探究方法研究普通物质的好处, 当时哈佛大学的Edward Mills Purcell在1公斤石蜡中检测到第一个固态核磁共振信号。几乎在同一时间, 斯坦福大学的Felix Bloch成功的在水中进行了首次液态核磁共

振实验; 这两项成果后来共同荣获1952年诺贝尔物理学奖。令人难以置信的是, 至少有八位来自世界各地的诺贝尔奖得主是因为核磁共振技术的发现、发展和应用而获得物理学、化学和医学方面的荣誉!

如今, 有大量核磁共振实验方法能助力我们获取丰富深入的信息, 了解难以置信的复杂分子的结构和动态特征。核磁共振技术用途广泛, 能应用于不同科学领域, 其中包括物理学、化学、生物学、生物化学、材料科学、食品、地质学、药物研究和医学等。随着核磁共振方法及相关技术在高校和工业领域的不断发展, 未来将有无限可能。



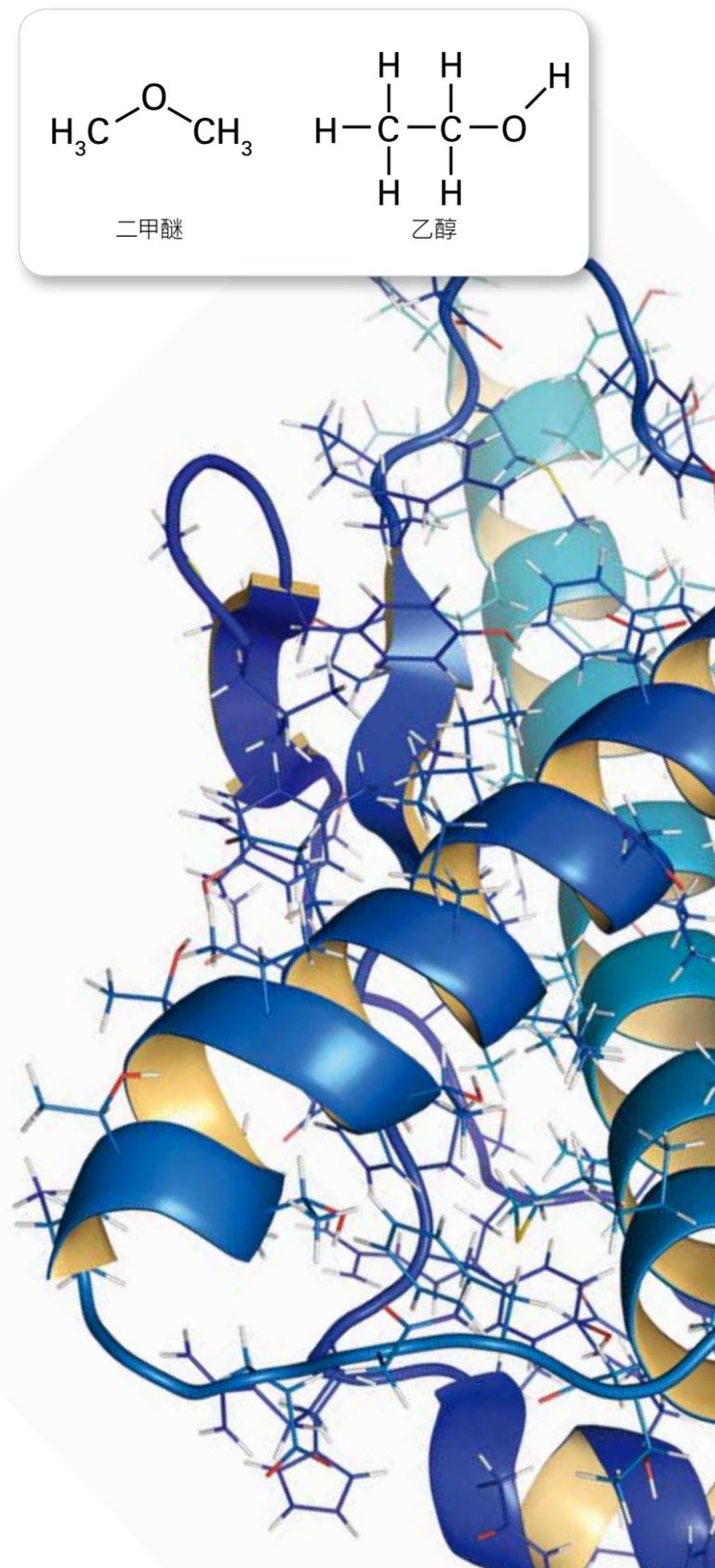
● 我们为什么需要核磁共振技术?

分子本质上是原子的结合体, 具有不同的结构, 而这取决于存在哪些原子及其数量以及它们彼此连接的方式。但我们为什么要了解分子结构呢?

分子结构对物质的物理和化学性质有很大的影响, 而这些性质又决定分子间如何反应或如何影响生物体。譬如, 乙醇 (也称为无水酒精) 和二甲醚由相同类型和数量的原子组成: 两个碳原子、六个氢原子和一个氧原子。不过, 它们的结构完全不同, 因此性质完全不同。乙醇是液体, 而二甲醚是有毒气体!

乙醇和二甲醚清楚地表明化学结构如此重要的原因之一, 但这种知识在有机合成领域也至关重要, 可以成功地创造出一种与现有物质相当的合成物, 或合成新型化合物。对分子结构的深入了解, 在尼龙和塑料等材料的生产及药物发现等化学和制药行业中尤为重要。对科学家来说, 核磁共振是提供这种重要信息的一种关键工具。

另外, 核磁共振技术还用于确定蛋白质结构鉴定, 蛋白质是非常大的具有重要生物学意义的分子, 它们可以调节对生命至关重要的几乎所有的人体功能及生化过程。譬如, 胰岛素蛋白质调节血糖水平; 另一种蛋白质, 血红蛋白, 在血液中携带氧气运往全身各处; 以及抗体, 即免疫球蛋白, 使免疫系统能够识别和中和外毒素, 如细菌和病毒。必须对这种分子及与其相关的过程进行详细研究, 而如果要开发新药或新疗法, 还要做全面了解。这不仅需要了解分子结构, 还要了解蛋白质的动态。核磁共振技术是唯一能以原子分辨率提供生物分子在其生理环境下的结构和动态信息的分析方法。

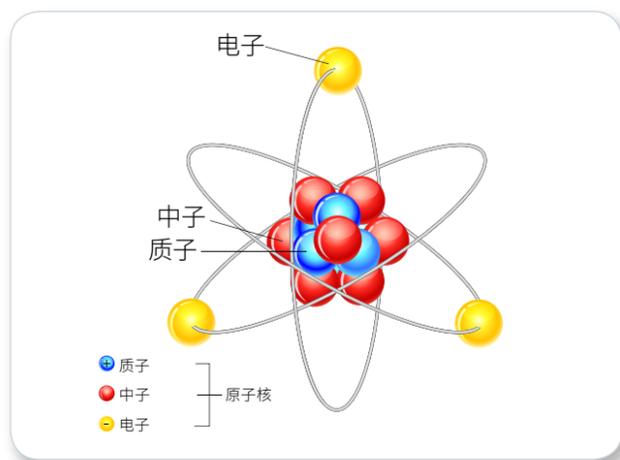
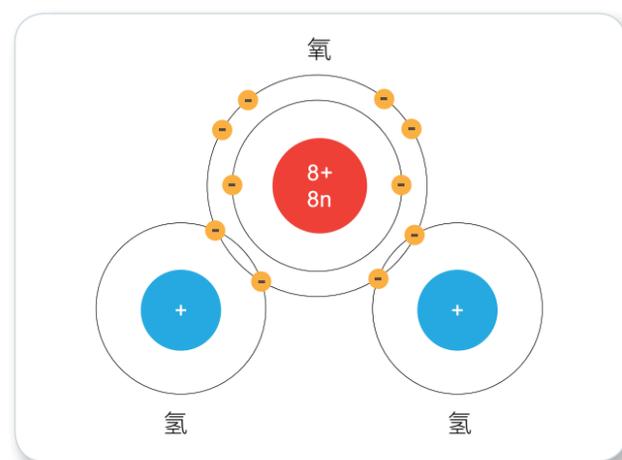


原子、原子核和分子

为了解核磁共振，我们需要首先考虑原子、原子核与分子之间的关系。

到目前为止，人类已经发现了包括氢、碳和氧在内的118种元素。元素是纯粹的化学物质，由原子序数不同的一种原子组成。虽然古希腊人认为原子（以意思为不可分割的希腊词atomos命名）是物质的最小单位，但实际上它们还可以细分为更小的粒子。每个原子都包含一个带正电荷的原子核，原子核含有质子（带正电）和中子（不带电），原子核被带负电的电子云环绕。

分子是以独特的分子结构结合在一起的原子结合体，存在多种形状和大小，从诸如水之类的小化合物到由成千上万个原子组成的更大的化合物等，不一而足。在每种情况下，分子结构都可以决定化合物的物理和化学性质。为了更好地理解这个模型，我们可以想想水分子，它由一个氧原子结合两个氢原子组成。一个雨滴含有 4×10^{21} 个水分子。如果一个水分子有足球大小，那么一个雨滴就跟地球的大小差不多。这有点像大海捞针的意思。分子，即使是非常大的分子，也非常微小，即使是用最强大的传统显微镜也看不见它们；需要通过其他方法来确定分子结构。



核磁共振技术是确定分子结构最适合的方法之一。当一个分子暴露于外部磁场时，每个原子都将受到略有不同的、有所改变的磁场的影响，这取决于相邻电荷的磁屏蔽效应——原子核和电子。

这意味着每个原子所受到的磁场都是分子的局部性质，这取决于它的几何形状。核磁共振能够测量原子对局部磁场的反应（现代仪器对小到十亿分之一的局部磁场变化很敏感），由这个信息可以确定分子结构；甚至能以惊人的准确度来确定分子量而复杂的分子结构，如蛋白质。这在药物研究领域尤为重要，苏黎世联邦理工学院（ETH Zürich）的Kurt Wüthrich教授因在这一领域所做的贡献而荣获2002年诺贝尔化学奖。



核磁共振工作原理

核磁共振利用强磁场的影响。许多原子核都具有一种被称为自旋的物理性质。简言之，自旋就是原子核绕着自身轴线旋转。旋转的带电原子核会自带一个磁场，称为磁矩——描述各种物体与外部磁场对齐趋势的物理量，这用绿色箭头和红色箭头图示出来。这可以被看作是一个像陀螺那样围绕磁轴旋转的微型条形磁体。与指南针类似，可通过磁场来操纵原子核。通常，不会发生对于全体原子的宏观磁化，因为其中每一个小“磁体”都是随机定向的，指向完全不同的方向。这意味着产生的磁场相互抵消。不过，核磁矩可通过置于足够强的磁场来保持一致。由此产生的宏观全体磁化使核磁共振成为可能。

核磁共振实验涉及将待检物质样品置于很强的静磁场中。这迫使核磁矩与施加的磁场平行——用黄色箭头表示，获得宏观磁化。然后，样品就称为被极化或磁化。尽管现代核磁共振波谱仪的磁场可高达24特斯拉，但排列自旋的总数仅处于万分之一的数量级，这几个原子核必须提供关于所研究分子的足够多的信息。不过，由于核磁矩非常微弱，所以，它们几乎不会干扰分子的自由度。其意义在于分子结构不会被核磁共振波谱所改变。

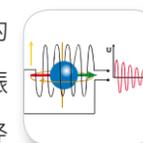
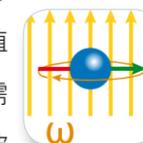
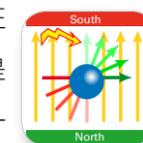
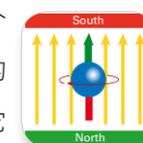
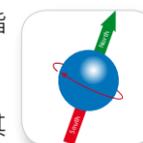
在很宽范围内，不同共振频率的原子核都可以和一个长度仅为几微秒的射频脉冲产生共振，这是一个瞩目的物理事实；这就是傅里叶变换核磁共振（FT-NMR）背后的概念。样品受到短电磁脉冲的辐射，其特征是广义的无线电波或共振频率。它的作用是迫使核磁矩从与磁场平行的平衡位置进入一个垂直平面。

分子中的每个原子核都会对特定的共振频率作出反应，这可以提供存在于分子中的原子的类型及其位置的信息。

偏转的核磁矩开始旋转运动，被称为进动，围绕静磁场进行（黄色箭头）。这种进动的频率 ω ，主要取决于磁场的强度和原子的类型，以及（在很小但可检测到的程度上）取决于原子在分子中的位置。分子中原子核的特征进动频率包含很有价值的信息，可以用来推断分子本身的结构。需要测量这些频率的一种手段：核磁共振波谱仪。

在核磁共振波谱仪中，将样品放置于一个小线圈中。旋转（进动）磁矩会在线圈中产生交流电压（可以把它比作自行车发电机）：核磁共振信号。这种核磁共振信号通常是许多振荡电信号的叠加，每个振荡信号的频率对应于产生它的磁矩的进动频率。当磁矩自发地逐渐回到与垂直轴平行的平衡状态时，观察到的电压的振幅发生衰减。微小的初始样品磁化意味着核磁共振信号极其微弱；照此类推，如果用于照射原子核的射频脉冲的强度是珠穆朗玛峰般大小，那么在核磁共振实验中测量的输出信号将比人类头发的直径小1万倍。需要利用非常精密的电子产品来检测信号。

最后，傅里叶变换是一种可以解开所有单个频率的数学运算，让核磁共振信号可以显示为核磁共振波谱，其中，进动的核磁矩的特征频率显示为不同的峰值，被称为共振谱线。譬如，乙醇的核磁共振波谱显示两组不同的峰。它们的位置或频率由分子的原子结构确定，从而确定乙醇的分子结构。



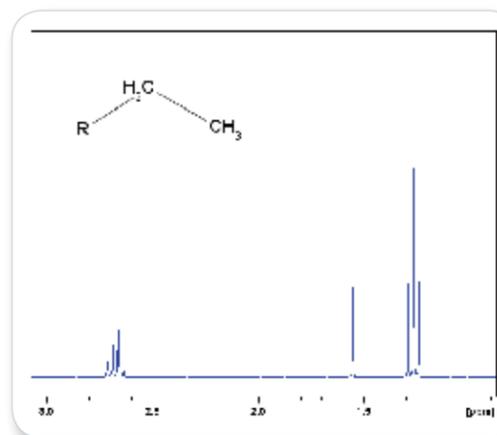
核磁共振波谱:化学位移和自旋耦合

位移

除磁场外,各个原子的确切的共振频率还受到化学环境的影响。这些频率差通常在给定原子核的基本共振频率的百万分之一范围内。这些频率差还取决于磁场的强度。化学位移用来比较不同仪器的波谱,这与频率无关。根据方程,以百万分之一(ppm)形式表示:

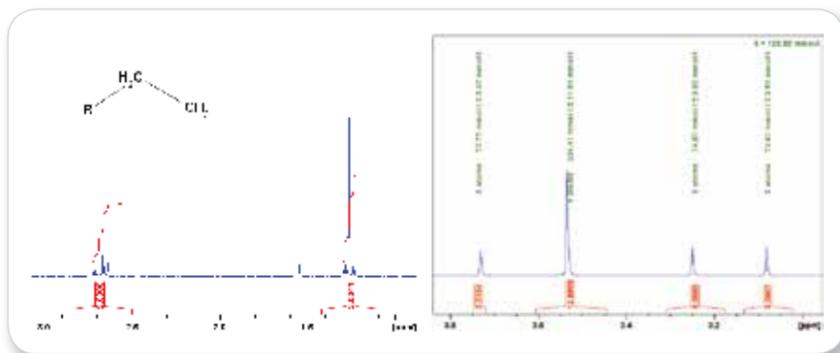
$$\delta \text{ (ppm)} = \frac{\text{信号的频率 (Hz)} - \text{参考频率 (Hz)}}{\text{参考频率 (MHz)}}$$

对于所有核磁共振活性核都需要用一些化合物作为化学位移的参照品。譬如,四甲基硅烷的化学位移在¹H和¹³C波谱中被指定为0 ppm。



耦合

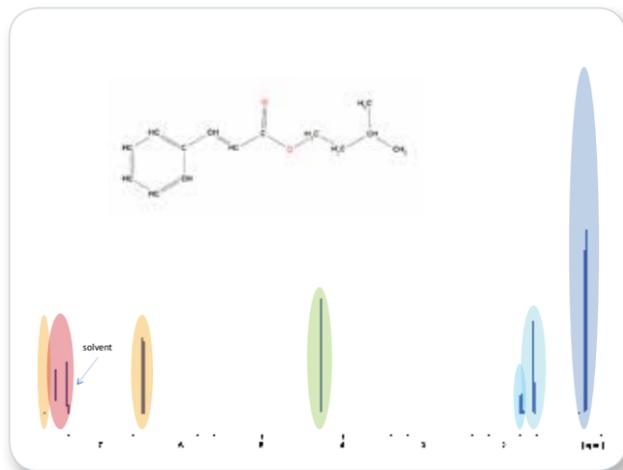
除了与磁场相互作用外,原子核还通过分子间的化学键相互作用,在核磁共振信号中生成精细结构,这被称为耦合,对于表征分子中的相邻原子非常有用。根据2nI+1规则,每个自旋都会受到几个键之外的自旋的影响,其中,n是自旋数,I是自旋量子数。对于自旋=1/2原子核,如质子等,这被简化为n+1。一个邻近的自旋导致共振分裂成两条谱线,两个自旋产生三条谱线等。谱线的强度与帕斯卡三角形的系数有关。



定量

核磁共振是一种主要的比例分析方法。每个信号的面积与产生该信号的原子数成正比。信号面积通过信号的积分或反卷积确定。

混合物中不同组分的定量测定也可以通过内标物或外标物来获得,从而可以直接测定含量。



核磁共振仪器

早期的核磁共振实验都是用一种称为连续波(CW)技术进行的。磁场保持恒定,无线信号扫描一定的频率范围。这会依次使每个原子核产生共振。随着实验的进行,波谱被实时绘制在图表记录器上。这意味着只有通过减慢频率扫描和相应的记录笔运动才能提高分辨率。

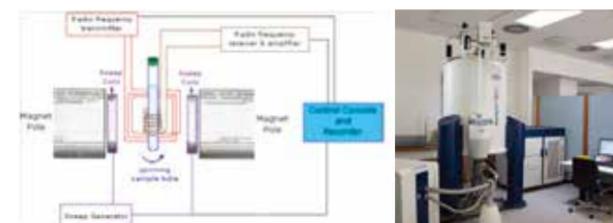
20世纪70年代,傅里叶变换核磁共振技术取代了上述的连续波技术。傅里叶变换核磁共振是苏黎世联邦理工学院教授Richard Ernst发现的,他于1991年荣获诺贝尔化学奖,傅里叶变换核磁共振所带来的是高速和高灵敏度技术,这为后来数百个核磁共振实验奠定了基础。

傅里叶变换核磁共振带来如下优势:

- 信号平均法:重复测量可以提高信噪比
- 分辨率:自由感应衰减(FID)(所有核磁共振信号的合成)可以用大量的点进行采样,以确保解析精细结构
- 多功能性:傅里叶变换波谱不局限于单脉冲实验,能够操纵给定分子中的各种自旋

核磁共振波谱仪最重要的组成部分是磁体,它会产生使样品核磁矩定向排列和产生磁化的磁场。样品中只有极小部分的核自旋方向可以有效地与磁场保持一致,这会限制可以达到的磁化程度;由于磁化与磁场的强度大致成正比,所以应用高磁场至关重要。

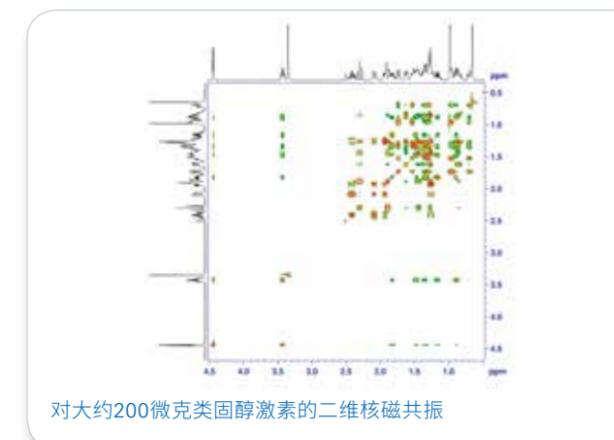
现在的核磁共振波谱仪利用超导磁体能产生高达24特斯拉磁场,这几乎是地球磁场的100万倍。将这些磁体浸入低温恒温器控制的液氦腔,操作温度范围2K-4K,约



为-270°C。内置于波谱仪探头的线圈系统作为样品与磁体之间的物理界面,会产生无线电波脉冲。液态或固态样品放入探头,其位于无线电波线圈和进行信号检测所需电子器件的中心。现代所谓的低温探头,利用外部冷却装置可以降温至10-20 K。这可以减小电子噪音,从而帮助提高灵敏度并能检测到其他不可见的小信号。另外,波谱仪还含有一个前置放大器来放大初始信号,以及一个机柜,用来放置产生无线电波脉冲并检测核磁共振信号所需的精密电子元件。数据采集和处理由软件控制。

开发新的实验机会

傅里叶变换核磁共振打开了令人振奋的全新实验机会的大门。傅里叶变换核磁共振技术相比之前使用的连续波技术而言更快更灵敏,现已在这项技术的基础上开发了数百个核磁共振实验。一个特别重要的发展是二维(2D)核磁共振,可以解析有数千个原子的大分子的结构,采集时间通常为几分钟到几小时不等,具体取决于仪器和质量要求。其中一个例子是类固醇激素的二维核磁共振,类固醇激素是一种具有极度重叠共振谱线的复杂分子,在这个例子中,该技术已证明非常有效。



对大约200微克类固醇激素的二维核磁共振