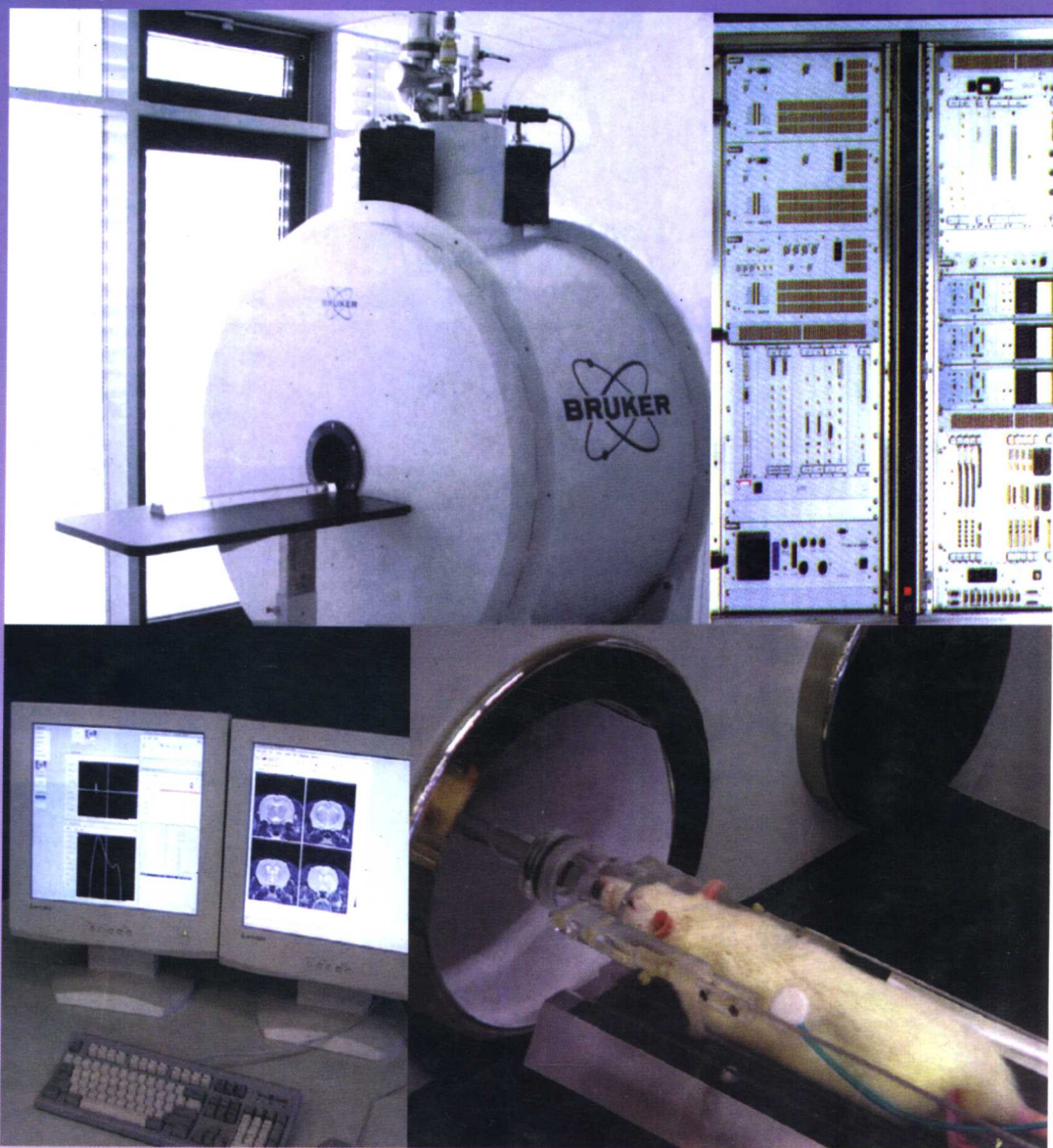


编著 田建广 夏照帆 杜泽涵

生物核磁共振

Nuclear Magnetic Resonance in Biomedicine



第二军医大学出版社

生物核磁共振

Nuclear Magnetic Resonance in Biomedicine

编著 田建广 夏照帆 杜泽涵

第二军医大学出版社

内 容 简 介

生物核磁共振主要指活体磁共振波谱。本书共分6章。第1章为磁共振技术的生物医学应用简史,有助于大家更好地把握核磁共振技术发展的历史进程。第2章为核磁共振技术的基本原理,主要是针对具有医学基础而又对核磁共振技术感兴趣的科研人员,简要介绍工作中经常遇到的一些物理参数的概念及应用。第3章介绍与生物磁共振实验相关的医学动物基本实验技术和细胞培养的基本操作。第4章介绍目前活体磁共振技术,包括常用核素如 ^1H 、 ^2H 、 ^7Li 、 ^{13}C 、 ^{19}F 、 ^{23}Na 、 ^{31}P 、 ^{87}Rb 等的谱特征以及测定原理,重点介绍定域和定量技术以及扩散谱技术。此外,还要介绍生物核磁共振所用的硬件和软件技术。第5章主要介绍生物核磁共振谱的实验研究,将从体液、细胞、器官、整体动物等各个层次进行介绍。第6章介绍生物磁共振波谱在生物医学领域的应用。

本书的目的在于为核磁共振和医学研究人员介绍核磁共振这种技术的特点,但尽量避免用过多的专业词汇描述,一方面使医学研究人员能对核磁共振技术有初步的理解,另一方面使核磁共振工作人员对其医学的应用有概括性的了解。

图书在版编目(CIP)数据

生物核磁共振/田建广,夏照帆,杜泽涵编著. - 上海:第二军医大学出版社,2001.8
ISBN 7-81060-167-9

I. 生... II. ①田... ②夏... ③杜... III. 生物学-核磁共振-技术 IV. Q6-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 039405 号

生 物 核 磁 共 振

编著 田建广 夏照帆 杜泽涵

责任编辑 高敬泉

第二军医大学出版社出版发行

(上海市翔殷路 818 号 邮编:200433)

全国各地新华书店经销

上海长阳印刷厂印刷

开本:787×1092 1/16 印张:16.25 字数:396千字

2001年8月第1版 2001年8月第1次印刷

印数:1~1500

ISBN 7-81060-167-9/Q·005

定价:36.80元

谨以此书献给我的良师益友

叶朝辉	李丽云	刘买利
程增江	颜贤忠	冯 锐
李光玉	董华进	黄荣清
阮金秀	司仪康	魏昌华
唐洪泰	王光毅	

—— 田建广

前言

人类认识核磁共振技术至今虽然只有 50 多年的时间,现代核磁共振理论的成熟也只是近 30 年的事情,然而其强大的实用性和广阔的应用范围却是令人瞩目的。核磁共振技术在我国已经成功地用于解决化学、医药学、化工、材料科学、影像学诊断等诸多领域内的问题。我国的核磁共振科研和技术人员通过不懈的努力和实践,形成了自己的理论特色,培养了一大批专业人员,在应用方面积累了丰富的经验,出版了 40 余部有关方面的专著。

核磁共振技术的进步得益于生命科学的飞速发展。核磁共振技术的无损性使得可以无创地诊断疾病、连续地观察疾病的进程及治疗效果。人们对生命过程本质认识的渴求成为核磁共振技术发展的强大推动力。超导材料和 Fourier 变换在核磁共振技术中的成功应用,满足了研究生命过程和现象的需要。

核磁共振技术在生命科学中的应用尽管只有 30 多年的历史,但它已发展成为一个相对独立的学科,其理论和技术趋于成熟,并已创办专业杂志进行学术交流,定期举行国际会议展开学术讨论,其应用领域相当广泛。然而这一学科在我国的发展却是不容人乐观的,主要是受到经济因素的影响。昂贵的仪器价格限制了核磁共振技术在我国生命科学中的广泛应用。尽管如此,我国的科学工作者仍然克服种种困难,开展了卓有成效的研究。1988 年第二军医大学的夏照帆博士首次在国内开创性利用核磁共振技术研究了离体心脏的能量代谢,而后将核磁共振技术应用于烧伤理论研究,在国际上首次证明了烧伤休克细胞能量代谢障碍的假说,得到国际同行的认同。军事医学科学院的杜泽涵教授在 20 世纪 80 年代初期于美国斯坦福大学客座研究期间就关注核磁共振在生命医学领域中的应用,回国后积极创造条件,自 90 年代初期在国内率先系统地建立了生物核磁共振技术,涉及生物大分子、细胞、器官、整体动物等各个领域。中国科学院武汉物理与数学研究所于 1996 年在国内引进了第一台水平宽腔高场磁共振成像波谱仪,在叶朝辉教授的指导下成功地开展了脑功能成像和波谱测定工作。

夏照帆、杜泽涵、叶朝辉等教授在生物核磁共振技术的国内推广方面做出了卓越的贡献,具有很深的造诣。本人在攻读博士学位以及博士后研究工作期间先后得到上面三位教授的悉心指导,对我来说是非常荣幸的事情。

在研究工作中,我们深深地感到医学工作者和核磁共振技术人员之间的交流存在着一定的障碍,原因就在于生命科学和核磁共振技术分别所属的学科领域差别较大,而能够在这些领域都有所造诣的专业人员在国内是相对缺乏的,结果导致我国的生物核磁共振研究不够规范且缺乏创新。我们认为要改变目前这种局面,惟一的办法就是加强不同学科之间的交流。但不幸的是,到目前为止,国内还没有这方面的专著,虽然有这方面的综述和研究论文可供参考,但毕竟不够系统和广泛。这一考虑是推动我们编写此书的重要和直接的原因。我们通过总结这些年来工作经验和教训,结合目前国际上的研究前沿,参考了《核磁共振百科全书》部分章节的论述而著成此书。

目前国内有些概念还没有完全规范和统一。生物核磁共振通常应包括活体磁共振波谱

和生物大分子核磁共振波谱。我们在这里所提到的生物核磁共振主要指活体磁共振波谱。

本书共分6章。第1章介绍核磁共振技术的生物医学应用简史,有助于大家更好地把握核磁共振技术发展的历史进程。第2章为核磁共振技术的基本原理,主要是针对于具有医学基础而又对核磁共振技术感兴趣的科研人员,简要介绍工作中经常遇到的一些物理参数的概念及应用。第3章主要介绍与生物磁共振相关的医学动物实验技术和细胞培养基本操作。第4章介绍目前活体磁共振技术,包括常用核素如 ^1H 、 ^2H 、 ^7Li 、 ^{13}C 、 ^{19}F 、 ^{23}Na 、 ^{31}P 、 ^{87}Rb 等的谱特征以及测定原理,重点介绍定域和定量技术以及扩散谱技术。此外,还要介绍生物核磁共振所用的硬件和软件技术。第5章主要介绍生物核磁共振谱的实验研究,将从体液、细胞、器官、整体动物等各个层次进行介绍。第6章介绍生物磁共振波谱的在重要生物医学领域的应用。

本书主要为核磁共振和医学研究人员介绍核磁共振这种技术的特点,但尽量避免用过多的专业词汇进行描述,一方面使医学研究人员能对核磁共振技术有初步的理解,另一方面使核磁共振工作人员对医学的应用有概括性的了解。我们希望大家通过本书的学习之后能够读懂有关方面的文献,从而迅速进入到研究课题中去。如果能够达到开卷有益的效果,也就达到了我们编写此书的目的。

虽然核磁共振技术的历史只有50年,但文献量已经达到浩瀚的程度。我们不得不承认我们所掌握和阅读的文献是相当有限的,这也就决定了本书的内容还是不全面的,肯定存在挂一漏十的缺陷。另外核磁共振理论、技术和应用的发展是非常迅速的,因此书中有些内容可能有过时之嫌,有些观点可能有谬误之处,因此希望读者能够给予批评和指正,去伪存真,使这一学科在国内迅速发展并逐渐完美化和科学化。

田建广

于第二军医大学长海医院
2001年4月

目 录

前言

1 核磁共振发展简史	1
1.1 核磁共振技术发展和应用历史	1
1.1.1 探索(1926~1945)	1
1.1.2 发现(1946~1955)	2
1.1.3 化学应用(1956~1965)	3
1.1.4 技术发展(1966~1975)	4
1.1.5 生物应用(1976~1985)	6
1.1.6 现代期——医学、结构生物学、物质科学(1986~2000)	8
1.2 活体核磁共振的发展	9
1.2.1 细胞和离体组织中的水和离子	10
1.2.2 高分辨研究	11
1.2.3 离体细胞和细胞器研究	12
1.2.4 完整组织和器官的灌注	13
1.2.5 整体动物的高分辨 NMR	14
1.2.6 人的高分辨 NMR 研究	15
1.3 磁共振成像技术的发展	15
1.4 活体核磁共振研究在我国的应用进展	17
2 核磁共振技术的基本原理	20
2.1 数学基础	20
2.1.1 指数函数	21
2.1.2 三角函数	21
2.1.3 微分和积分	21
2.1.4 矢量	22
2.1.5 矩阵	22
2.1.6 卷积	22
2.1.7 虚数	22
2.1.8 Fourier 变换	23
2.2 自旋核的物理特性	23
2.2.1 自旋核的性质	23
2.2.2 自旋核	23
2.2.3 能级分裂	23
2.2.4 能级跃迁	24
2.2.5 连续波 NMR 实验	24

2.2.6 Boltzmann 分布	24
2.2.7 磁化矢量	25
2.2.8 T_1 弛豫过程	25
2.2.9 进动	26
2.2.10 T_2 弛豫过程	26
2.2.11 旋转坐标系	26
2.2.12 脉冲磁场	27
2.2.13 自旋弛豫	28
2.2.14 自旋交换	28
2.2.15 Bloch 方程	29
2.3 磁共振波谱	30
2.3.1 化学位移	30
2.3.2 自旋偶合	31
2.3.3 NMR 的时域信号	33
2.4 Fourier 变换	35
2.4.1 频率的正负	35
2.4.2 Fourier 变换	36
2.4.3 相位校正	36
2.4.4 Fourier 变换对	37
2.4.5 卷积理论	39
2.4.6 数字化 FT	39
2.4.7 二维 FT	39
2.5 脉冲序列	39
2.5.1 单脉冲序列	39
2.5.2 自旋回波序列	41
2.5.3 翻转恢复序列	41
2.6 核磁共振的硬件	42
2.6.1 磁体	42
2.6.2 锁场	42
2.6.3 匀场线圈	44
2.6.4 样品探头	44
2.6.5 RF 线圈	46
2.6.6 梯度线圈	46
2.6.7 正交检测器	47
2.6.8 数字滤波	47
2.6.9 NMR 操作注意事项	49
2.7 核磁共振实验技术	49
2.7.1 探头连接部件	49
2.7.2 探头调谐	49

2.7.3 匀场	49
3 医学动物实验与细胞培养技术	52
3.1 医学常用实验动物	52
3.1.1 犬	52
3.1.2 大鼠	53
3.1.3 小鼠	54
3.1.4 实验动物的种系分类	55
3.2 动物实验的基本技术操作	55
3.2.1 动物的抓取和固定	56
3.2.2 动物的编号和标记	57
3.2.3 动物的麻醉	57
3.2.4 实验动物的给药途径	59
3.2.5 实验动物的取血方法	63
3.2.6 动物体液的采集	64
3.2.7 动物的处死方法	65
3.3 动物实验常用指标的测量	65
3.3.1 一般指标	65
3.3.2 特殊指标	66
3.4 细胞培养技术	68
3.4.1 培养细胞的特性	68
3.4.2 培养细胞的生长条件	71
3.4.3 细胞培养方法	72
3.4.4 细胞培养的设备条件	73
3.4.5 培养细胞的保存	75
3.4.6 培养细胞的细胞生物学检测	75
4 活体磁共振波谱技术	77
4.1 活体磁共振波谱	77
4.1.1 ^1H MRS	77
4.1.2 ^2H MRS	82
4.1.3 ^7Li MRS	83
4.1.4 ^{13}C MRS	83
4.1.5 ^{14}N MRS	83
4.1.6 ^{15}N MRS	84
4.1.7 ^{19}F MRS	84
4.1.8 ^{23}Na MRS	85
4.1.9 ^{31}P MRS	87
4.1.10 ^{87}Rb MRS	89
4.1.11 ^{133}Cs MRS	89
4.2 活体核磁共振的硬件及相关技术	89

4.2.1	射频系统	89
4.2.2	NMR 探头	91
4.2.3	射频线圈	97
4.2.4	正交检波	101
4.2.5	梯度场	101
4.2.6	形状 RF 脉冲	104
4.3	定域技术	109
4.3.1	细胞和离体器官的空间分辨率	109
4.3.2	整体动物或人的定域技术	109
4.4	定量技术	116
4.4.1	数据分析	116
4.4.2	代谢物浓度与信号强度	117
4.5	扩散谱技术	121
4.5.1	扩散谱原理	121
4.5.2	扩散谱实验技术	122
4.5.3	生物组织内代谢物的扩散谱特性	125
4.6	磁共振成像与波谱技术的安全性	126
4.6.1	强静磁场	126
4.6.2	随时间变化的梯度场	127
4.6.3	射频场(RF)的致热效应	128
4.6.4	噪声	129
4.6.5	造影剂的不良作用	130
5	活体磁共振波谱的实验研究	133
5.1	体液	133
5.1.1	体液的种类	133
5.1.2	样品制备和 NMR 数据采集	135
5.1.3	体液的诊断作用	139
5.1.4	体液中分子的相互作用	142
5.1.5	体液中药物和毒物的作用	142
5.2	组织与细胞的提取物	144
5.2.1	分离提取技术	144
5.2.2	组织提取物与谱峰归属	145
5.2.3	组织提取物与代谢研究	145
5.2.4	组织提取物与药学	147
5.2.5	组织提取物与医学诊断	147
5.3	培养细胞	147
5.3.1	悬浮细胞	148
5.3.2	灌流系统	149
5.3.3	细胞球	153

5.3.4 细胞 MRS 的相关技术	154
5.3.5 细胞 MRS 的应用	155
5.4 离体组织和器官	157
5.4.1 离体心脏灌注技术	157
5.4.2 ^{31}P NMR 在心血管药理学研究中的应用	159
5.5 整体动物	162
5.5.1 动物模型	162
5.5.2 MR 设备	164
5.5.3 定位方法	164
5.5.4 动物固定及处理	165
5.5.5 谱图处理和定量	165
5.5.6 应用	166
6 活体磁共振波谱的应用	172
6.1 细胞内 pH 的测定	172
6.1.1 原理	172
6.1.2 可靠性	173
6.1.3 应用	174
6.2 细胞内游离钙的测定	175
6.2.1 细胞内钙离子测定方法	175
6.2.2 含氟钙指示剂	176
6.2.3 解离常数(K_D)的测定	178
6.2.4 ^{19}F NMR 方法的优越性和局限性	179
6.2.5 ^{19}F NMR 在细胞内钙离子测定中的应用	180
6.3 细胞内游离钠的测定	182
6.3.1 活体 ^{23}Na NMR 方法	182
6.3.2 ^{23}Na NMR 谱信号归属	184
6.3.3 ^{23}Na MRS 的应用	186
6.4 ^{19}F MRS 在生物医学研究中的应用	187
6.4.1 体内药物代谢	188
6.4.2 细胞内离子的测定	189
6.4.3 细胞内 pH 的测定	190
6.4.4 氧浓度或氧压力的测定	190
6.4.5 膜电位	191
6.4.6 温度	192
6.4.7 血液容积	192
6.4.8 细胞容积	193
6.5 心脏 MRS	193
6.5.1 定域技术	194
6.5.2 代谢物定量	195

6.5.3 临床研究	195
6.6 肝脏 MRS	197
6.6.1 正常肝脏的波谱	198
6.6.2 肝脏 MRS 的方法学特点	199
6.6.3 正常肝脏中蛋白质、糖和脂质代谢的 MRS 研究	200
6.6.4 弥散性肝疾病	202
6.6.5 局部肝病	203
6.6.6 药物和肝	204
6.7 大脑 MRS	205
6.7.1 大脑发育和代谢	206
6.7.2 疾病和毒物对大脑的影响	207
6.7.3 药物代谢和药理作用	208
6.7.4 现代神经生理学	209
6.8 肿瘤 MRS	213
6.8.1 ^{31}P MRS	214
6.8.2 ^2H MRS	216
6.8.3 ^{13}C MRS	216
6.8.4 ^{19}F MRS	217
6.8.5 ^1H MRS	218
6.9 细胞凋亡的 MRS 研究	219
6.9.1 凋亡机制的研究	220
6.9.2 凋亡发生的标示	222
6.9.3 抗肿瘤药物作用机制研究	224
6.10 扩散 MRS	224
6.10.1 亲和 MRS——药物筛选新技术	224
6.10.2 细胞代谢物的扩散 MRS	230
附录 1 常用核磁共振技术词汇	238
附录 2 国内出版的核磁共振波谱图书概况	247

对历史的回顾是必要的。曾经为核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)做出过巨大贡献的科学家还在为 NMR 的进步努力工作, 仍然在闪烁着他们的智慧光芒。从他们身上我们可以获得前进的巨大动力。

1946 年斯坦福大学的 Bloch、Hansen 和 Packard 与哈佛大学的 Purcell、Torrey 和 Pound 最早利用 NMR 对大量物质进行了研究。1952 年 Bloch 和 Purcell 获得诺贝尔物理奖, 表明他们的发现具有重要的意义。

在过去的 50 多年中, NMR 已发展壮大成为分析化学领域内的一种重要工具。NMR 研究范围非常广泛, 涉及的学科包括物理学、化学、生物化学、医学和材料科学等。NMR 是可与晶体 X-射线衍射相竞争的一种大分子结构测定的生物学技术, 而且测定的是生理状态下分子溶液结构的构象和相互作用。NMR 是临床成像诊断的一种常规技术, 也是研究人和动物代谢功能的一条途径。NMR 在物质、材料科学领域也不断发展。

NMR 仪器和技术的不断进步促进了崭新的和重要的应用。对 NMR 方法重要性进一步的认识得益于 Ernst 等人发展的 FT-NMR, 在 1991 年他为此获得诺贝尔化学奖。他在介绍 NMR 应用历史时, 曾形象地将其比喻成一棵大树, 发展最早和应用最早的领域是在物理学即树根, 而后是在化学有机分子结构领域的应用即树干, 再后来是枝繁叶茂的生物化学和医学应用。NMR 技术就像是一架梯子, 使得我们取得越来越多的硕果。

本章分 4 节介绍。第 1 节叙述 NMR 技术发展和应用历史, 重点介绍发展历史中具有里程碑意义的几个事件。但 NMR 的发展是连续的, 为叙述方便起见, 且以 1946 年首次发表文章算起, 将其发展历史以 10 年为一单位划分成几个时间段。在第 2 节则主要侧重于活体 NMR 的发展, 节选了一些历史事件, 有助于理解后几章节的内容。第 3 节简要介绍 MRI 的技术发展和应用。最后一节简要介绍我国在活体 NMR 研究中的应用进展。

1.1 核磁共振技术发展和应用历史

1.1.1 探索(1926~1945)

在 20 世纪 20 年代早期, 物理学就有了电子自旋(electron spin)和电磁矩(electronic momentum)的概念。尤其是在 Stern-Gerlach 的实验中, 他根据电磁矩的方向, 在非均匀磁场中将原子束分离开。到 20 年代中期, 科学家认识到只要某些原子核具有自旋和磁矩就可说明原子谱中出现的许多特征。1933 年对 Stern-Gerlach 的实验做校正时证实了这一观点。

1939 年 Rabi 等设法使一束氢分子通过了非均匀和均匀磁场, 从而使粒子束技术取得较大进展。在磁场中的氢分子易受射频(radio frequency, RF)电磁能量的作用, 分子可吸收窄频率范围的能量, 而且在吸收能量后粒子束会产生一个较小但可检测到的偏离, 这是首次

观察到 NMR, Rabi 因此项发现于 1944 年荣获诺贝尔奖。

1936 年 Gorter 试图通过测定吸收共振能时产生的热, 观测固体氟化锂 (LiF) 和其他无机盐的核磁共振, 结果未获成功; 1937 年有人证明了低温下 (约 2K) 氢核磁矩 (magnetic momentum) 对强磁场的敏感性, 但该方法有诸多的局限性。1942 年, Gorter 再次进行实验, 这次是研究射频场的反常分布。这些尝试的失利主要是由于错误地选择了实验对象, 因为 LiF 具有较长的弛豫时间常数。

1.1.2 发现(1946~1955)

Bloch 知道施加射频能量会使宏观磁化矢量 (magnetization) 从平行于外加静磁场的平衡位置偏离。根据物理学定律, 这个偏离的磁化矢量将在磁场中以某一特定的频率进动 (precession)。因此他推论这一进动的磁化矢量有可能在一位置合适的铜线圈中诱导出电信号, 电信号的频率应在射频范围内。Bloch、Hansen 和 Packard 利用水进行实验, 结果获得成功, 观察到了 NMR 现象。

与此同时, Purcell、Torrey 和 Pound 已经能够直接测定石蜡质子磁矩对射频能的微量吸收。尽管他们的实验与 Bloch 的迥然不同, 但却展示了相同的现象, 两种方法有异曲同工之妙。Bloch 和 Purcell 的文章发表时间相差仅几周, 有意思的是在此前两人从未谋面。

NMR 技术早期的发展是激动人心的, 基本原理被阐明, 新方法应用被探索出来。磁体结构的均匀性和稳定性使液体中分子的 NMR 谱线宽度相当窄。由于用来检测微弱 NMR 信号的早期元件受热效应影响不可避免地产生电噪音, 所以当时主要的精力放在了电路的设计和构造上。NMR 的飞速发展主要应归因于 Russell Varian 的制造商品化均匀稳定磁体的决策。研究人员可以购买一套基本的 NMR 系统, 虽然需要进行一些调节, 但确实免去了从原始部件制造磁体和放大器的麻烦。

Bloembergen、Purcell 和 Pound 早期的工作解释了核磁弛豫 (relaxation) 的概念, 揭示了固体样品比液体样品 NMR 信号宽几个数量级的原因, 液体中分子的快速布朗运动使得核磁偶极-偶极相互作用平均为零。随着磁体均匀性的提高, 液体中分子的共振线变得越来越窄, 因而可以精确地测量共振频率。

基本的 NMR 关系式如下:

$$\omega = \gamma B_0 \quad (1.1)$$

共振频率 ω 依赖于磁旋比 (magnetogyric ratio) γ (核的属性) 和施加在核上的外加磁场 B_0 。从上式可知, 对于某一种核, 不论其在何种化学分子中, 在某一给定的磁场中, 其共振频率应该相同。在 1949 和 1950 年, 研究 ^{19}F 和 ^{31}P 的信号时却发现不同分子的共振频率有变化, 远超出了实验误差范围。据此推测围绕在核外的电子所具有的磁特性产生了对所施加磁场 B_0 的屏蔽 (shielding) 效应 σ 。因而式 (1.1) 可写成:

$$\omega = \gamma B_0 (1 - \sigma) \quad (1.2)$$

σ 的大小取决于核外价电子的密度和形状。这种由于核外电子化学环境不同而引起的共振频率在谱图上的位移称做化学位移 (chemical shift)。最初使物理学家甚感烦恼的是他们感到化学位移限制了精确测定磁旋比, 但化学位移现象的发现却成为将 NMR 应用于化学领域的里程碑。

^1H 的化学位移是在磁场的均匀性和稳定性进一步提高后才得到的, 因为质子核外电子

的屏蔽效应要比其他核小几个数量级。1951 年获得了乙醇中 ^1H 的化学位移,从而使化学家清楚地认识到 NMR 波谱可作为一种结构分析方法。

在分辨率提高以后,研究人员发现共振峰在很多情况下可有裂分。Gutowsky 和 McCall 的分析结果表明,这些多重谱线裂分是由邻近核自旋的存在造成的。既然快速翻转的分子磁偶极相互作用平均为零,那么就应有一个新的机制来说明这种现象,因此出现间接自旋-自旋偶合或标量偶合(scalar coupling)的概念。不久,发现某些自旋偶合(如乙醇中的羟基)不能产生所预期的多重峰(multiplet),进而产生了化学交换的概念。

在当时的设备条件下要观测一个共振信号所要经历的步骤通常如下:通过调节磁场强度使满足共振条件,在示波器(oscilloscope)上显示并记录偏向。这种连续波(continuous wave)方法允许连续地观察谱图中的每一条共振线,因而应用了许多年。然而这种方法的不足在于:完成一次全谱的扫描,要求 NMR 设备在扫描时间内有良好的稳定性。如果需要重复累加扫描,对仪器设备的稳定性要求更高。

Bloch 建议改用短脉冲进行激发。1949 年 Hahn 表明这一方法确实可产生自由进动信号,另外他还发现通过适当的脉冲序列可产生自旋回波(spin echo)形式的附加信息。脉冲序列(pulse sequence)主要是被物理学家用来研究单个谱线特征,如固体样品的宽线。由于激发脉冲产生的自由感应衰减(free induction decay, FID)信号过于复杂,所以在很长的一段时间里这种方法没有得到化学家青睐。

1.1.3 化学应用(1956~1965)

到 20 世纪 50 年代中期, NMR 的基本原理已经比较清楚,在化学领域中的巨大应用价值也逐渐明朗。当时已经出现了商品化的 NMR 仪器。按现在的标准,当时的仪器相当原始和简陋,但其作用和意义却是不应该低估的。1956 年 ^1H NMR 谱的观测频率只有 40 MHz,是用晶体固定发射特定的频率。磁场的稳定是通过控制电流的大真空管和根据“超稳装置”设计的反馈线圈来完成,与射频系统无关。将细金属绕制而成的匀场线圈(shim coils)放入磁极之间,并将各配件固定,磁体可调节到最佳的均匀性,这就是匀场(shimming)过程。这一术语目前仍在应用,但所应用的技术手段已大相径庭,现在磁体均匀性(homogeneity)主要是通过调节与磁体相连接的室温匀场线圈中的电流获得,因此可把匀场理解为获得磁场的最佳均匀性。

对一般 ^1H 测定而言,在共振范围内完成扫场(field sweep)一般需要 5~10 min,通常不会出现严重的线形扭曲。扫描时间不能再延长,因为磁场的随机漂移将成为主要的影响因素。实际工作中,由于磁场漂移(drift),每一张谱都需要分别计算,而且常将几次扫描进行平均以提高精确度。对于仪器操作者而言,测定 NMR 谱是耗时的工作。

能获得一张好的谱图是再好不过的工作报酬。有机化学家很快发现 NMR 谱是阐明或证明中等大小分子化学结构的理想技术。几乎每一个化合物都有新的有特征意义的数据。Varian 公司每月都在美国化学会杂志(Journal of the American Chemical Society)上登载一系列称作“NMR at Work”的通告,说明 NMR 波谱的新应用。这些通告对有机化学家和新生的 NMR 研究人员是求之不得的有用信息。

1958 年 Shoolery 和 Rogers 报道了 NMR 在类固醇分子结构中的研究结果,表明即使在 40 MHz 条件下, ^1H 谱中角甲基的化学位移在结构判断方面也是有价值的。当时的其他研

究也表明从生物碱、糖、卟啉和其他化合物得到的 NMR 谱同样提供了丰富的信息。Karplus 证明了相邻的三键晶格耦合依赖于键角之后,对于构型尤其是糖类的构型研究变得广泛起来。1959 年 Jackman 分析总结了大量 NMR 谱与分子结构特点之间存在的相关性。Robert 为化学家简明扼要地叙述了 NMR 的基本原理。

在这一时期,对复杂图谱的解析取得巨大进展。通过对自旋相互作用进行量子化处理和对称性分析后,所期待的结果被清楚地展示出来。应该说,计算机的发展极大程度地促进了复杂图谱的解析。Pole、Schneider 和 Bernstein 等使图谱结果同化学理论有机结合起来。

在这 10 年中,磁体的设计和构造得到改进,从而使磁场强度有了提高, ^1H NMR 的观测频率从 40 MHz 到 60 MHz 再到 100 MHz。随着电子学技术的发展,磁场强度增加使检测灵敏度提高,谱图易于解析。较成熟的商品化仪器主要是 Varian A-60 谱仪。这种设备采用的手段简单而实用,即通过一个 NMR 信号来维持磁场和射频场之间的恒定关系,从而使随机磁场漂移得到补偿,每一张谱图都可在预定的扫描速度下采集,NMR 谱图记录纸可以统一印制。由于设计方案的改进,磁体、电源部分和冷却水部件的体积缩小,仪器设备可以放在普通的化学实验室中,价格也随之降低。A-60 谱仪确实促进了 NMR 的普及化。到 20 世纪 60 年代末,利用固态电子器件的仪器出现之前,这种设备已经售出 1 000 多台。

两项 NMR 新技术的应用在当时具有重要的意义。一项是双共振(double resonance)技术,对射频场同时施加两个不同的频率,一个用于观察信号,另一个用于干扰自旋系统。双共振技术的理论直到 20 世纪 60 年代才得到详细阐述,其中主要是哈佛的 Baldeschwieler 和瓦里安的 Freeman 和 Anderson。仪器配件的完善使商品化仪器能够用来进行双共振测定。应用范围相应得到扩展,包括自旋多重态的简单去偶、通过自旋反转详细研究能级、通过 NOE(nuclear overhauser effect)研究分子构型等等。NOE 在 1965 年首次被应用于有机立体化学研究。

另一项重要的技术进展是 ^{13}C NMR。 ^{13}C NMR 的检测灵敏度与 ^1H 和 ^{19}F 相比低得多。1957 年 Lauterbur 首次报道了一系列有机化合物的 ^{13}C NMR 结果,他证明 ^{13}C 核化学位移范围很宽,可提供有用的分子结构信息。 ^{13}C NMR 测定是在利用了双共振技术之后才成为现实,双共振技术消除了自旋核之间的偶合作用,与此同时产生 NOE 增强,从而使观测信号强度提高。Strothers、Roberts 和 Grant 等在 ^{13}C NMR 方法的发展及其在有机化合物结构研究中的广泛应用方面做了大量工作,他们拥有了适于研究这种“难以检测”核的特殊仪器。Wenkert 开拓了用于复杂分子结构研究的 ^{13}C NMR。

1.1.4 技术发展(1966~1975)

1. 超导磁体出现

因为铁芯电磁体的最大磁场强度约为 2.35 T(相当于 100 MHz),当设备的磁场强度升高到 100 MHz 后,这种铁芯电磁体技术基本发展到了极限。如果需要获得更高磁场强度的磁体,只能通过使用低温超导线圈。尽管当时对超导材料技术已有了认识,但要制造一个高磁场强度的磁体,而且要求这种磁体能够满足连续操作时很少或没有漂移,有高度均一性,有容纳样品管的磁体腔,能够安置在装有液氮和液氮杜瓦瓶中的诸多条件,是有很难度的。有几个实验室尝试组装了这样的磁体,但第一个成功商品化的磁体是 1966 年瓦里安的 HR-200 系统。

此后,磁体技术顺利发展,牛津大学的 Richards 与牛津设备和布鲁克设备公司联合将 ^1H NMR 频率升高到 270 MHz、360 MHz 和 400 MHz。大约在 1978 年推出了 500 MHz 设备。1978 年卡尼格米龙(Carnegie Mellon)大学制造了利用非恒定磁体的 600 MHz 设备。1987 年利用恒定磁体的商品化 600 MHz 设备问世。最近 800 MHz 仪器已经商品化,我国的北京大学已引进这种设备,以推动我国生物大分子结构分析技术的发展。1 000 MHz 磁体正在加快商品化进程。

超导磁体磁场强度的大幅度提高后,低场条件下测定得到的谱图中的重叠峰可被分散开来,从而使复杂的有机分子解析变得容易。化学位移分散,检测灵敏度提高,为研究肽类、寡核苷酸和其他生物来源的分子提供了物质条件。应该说自从出现了 NMR 技术之后,研究人员就在不断尝试利用 NMR 技术解决生物分子结构的问题。早在 20 世纪 50 年代斯坦福大学的 Jardetzky、宾夕法尼亚大学的 Cohen 等就已经研究了氨基酸和核苷酸的分子结构。1957 年 Saunders、Wishnia 和 Kirkwood 报道了首张蛋白质的 NMR 图谱。尽管变性的蛋白质图谱峰形较窄,但所提供的有用信息不多。因而对生物体系的早期研究主要是为了得到氨基酸、小分子肽、单核苷酸和小分子糖的必需的 NMR 数据。

1967 年 McDonald 和 Phillips 利用超导磁体首次测定了蛋白质图谱,他们证实了利用高磁场强度可改善分辨率,即意味着可获得更多、更详细的信息。实验研究发现化学位移的改变与蛋白质的构型和 pH 改变时质子的离子化程度有关。然而大多数研究主要集中在观察蛋白质分子组氨酸的共振峰,因为它们高度去屏蔽,在谱图中重叠程度较低,易于识别。生物 NMR 的发展得益于后来发明的两项技术。

2. FT-NMR 谱

能否有足够的检测灵敏度始终是困扰 NMR 测定的一个关键问题。当所研究的样品浓度低或样品量少时(尤其是对于生物来源的样品),或者在研究低灵敏度核(^{13}C 、 ^{15}N)时,信噪比经常成为测定时的限制性因素。20 世纪 60 年代早期应用连续的时间平均(time averaged)进行 NMR 谱测定。 N 次连续的扫描用数字记录,连续相加产生的信号是一次扫描的 N 倍,而随机性的噪音只有 $N^{1/2}$,通过增加扫描次数可以改善信噪比。

连续波测定方法需要进行连续的频率扫描。为了避免谱线变形,扫描速度不能过快,因而效率较低,一次只能研究很窄的谱范围。尤其是磁场强度提高后,扫描的频率范围加宽,另外 NMR 方法扩展到有较大化学位移范围的 ^{13}C ,要进行一次扫描需要数分钟。一次扫描所需的时间还可以接受,但要重复进行 10 000 次这样的扫描而使信噪比提高 100 倍就不可能了。

显然需要一种可同时激发整个谱范围内各种频率的技术。在光学和红外光谱中,利用干涉仪和时间响应 Fourier 变换(FT)产生了多重(Felgett's)激发效应。对于 NMR 波谱,用一个短射频脉冲可产生类似的激发。

1957 年 Lowe 和 Norberg 认为射频脉冲产生的自由感应衰减(FID)信号在原则上能够转换成频率谱,但直到 1966 年 Ernst 和 Anderson 才将其变为现实。他们最初的研究包括冗长的数据处理,FID 连续加和,然后用纸带、磁带和打孔卡片转换成能用数字计算机进行处理的形式。FT-NMR 谱的实现应归功于计算机硬件和软件的发展。FT-NMR 方法学的发展使 NMR 应用领域有了革命性进步。不仅时间平均灵敏度增加,而且还可以利用脉冲 FT 方法的速度来研究一些瞬间过程如化学反应和时间依赖性 NMR 现象(如弛豫)。对不灵敏