

核磁共振新發展與應用簡介

Introduction of Recent Advance in NMR Technology and Application

張七鳳、石峰鵠、吳英彥

Chi-Fon Chang, Fong-Ku Shi, Ying-Yann Wu

核磁共振是一個已經被廣泛應用的重要精密技術。過去數十年來核磁共振無論在硬體設計或技術應用方面的持續發展都是科學家們有目共睹的。本文將簡單介紹近幾年高磁場核磁共振的發展、磁場遮蔽技術的改進、探頭設計的突破以及在分析方法與生物巨分子方面的新應用。

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is a powerful and sophisticated technique with wide range of application. During the past few years, there are witnessed significant advances in NMR hardware development as well as methods and applications. This article briefly introduce recent advance in NMR technology and application including high field magnets, shielding techniques, probe heads, analytical applications and methods in biomolecular NMR.

一、前言

2005 年可以被稱為是核磁共振發展的六十大壽之年。物理學家 Dr. Felix Bloch 與 Dr. Edward Purcell 於 1945 年以共振法則測定核子自旋 (nuclear spin)，開啟核磁共振研究之門 (1952 年諾貝爾獎物理獎)，爾後核磁共振相關研究陸續展開，1991 年瑞士化學家 Dr. Richard Ernst 以其在核磁共振方法的貢獻榮獲諾貝爾化學獎，核磁共振的應用繼續蓬勃發展，2002 年瑞士化學家 Dr. Kurt Wüthrich 以核磁共振在生物巨分子的研究再度為核磁共振史增加一座諾貝爾獎。回顧這 60 年，核磁共振的發展史可以稱得上是近代科學發展的最佳典範之一。科儀新知在過去十多年來對於核磁共振的歷史、原理及

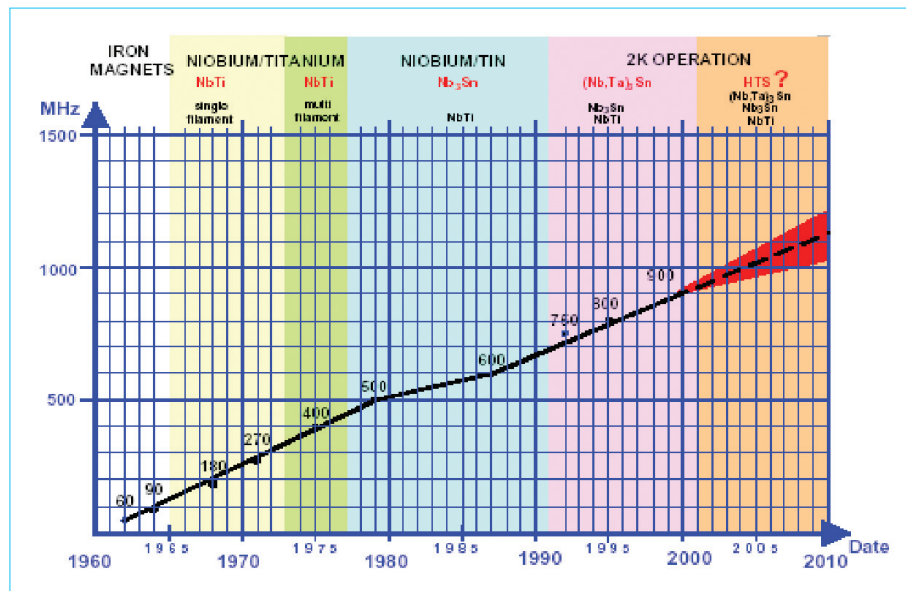
各階段的發展已有多篇文章報導，故筆者僅針對近幾年核磁共振硬體及應用的最新發展做簡單的介紹。

二、核磁共振硬體設備之發展

1. 高磁場核磁共振磁鐵

核磁共振的應用範圍與磁鐵技術的發展息息相關，因為原子核能階分裂 (nuclear Zeeman effect) 的能量差與外加磁場的強度成正比，因此磁場愈高核磁共振訊號的靈敏度及解析度就愈高。早期核磁共振儀的磁鐵大多為永久磁鐵與電磁鐵 (< 3 tesla)，然隨著超導技術的發展，高磁場強度與高穩定性磁鐵得以建造成功 (4.7–21.9 tesla)。

圖 1. 超導線圈材料與磁場強度之演進 (取自 Bruker 公司文件, 已獲同意引用)。



超導現象是 1911 年由荷蘭的科學家歐尼斯 (H. K. Onnes) 提出。當時研究人員將水銀放置在 4.2 K (液態氦) 下時, 發現水銀的電阻降為零, 便將這種特殊電性的狀態稱之為超導 (superconducting)。超導材料在應用上有三個操作限制: 溫度、磁場及電流, 其臨界值分別稱為臨界溫度 (T_c)、臨界磁場 (H_c) 及臨界電流 (J_c), 而各種超導材料皆有其臨界條件。圖 1 為核磁共振磁鐵用的超導線圈材料與磁場強度之演進, 如圖 1 所示, 超導線圈必須要維持在 2 K 的溫度下才能使磁場強度高於 17.6 tesla (750 MHz) 並維持其磁場及電流之穩定。1990 年代初期科學家利用「焦耳-湯姆生效應」(Joule-Thomson effect) 將液態氦的溫度由 4 K 降至 2 K 就成為發展超高磁場的重要關鍵。所謂「焦耳-湯姆生效應」就是當氣體體積突然膨脹 (由高壓變成低壓) 時, 所產生溫度變化的效應。以氦氣而言, 將氦氣利用壓縮機壓縮成液態氦, 再來回膨脹壓縮, 就可以將液態氦的溫度由 4 K 降溫至 2 K (圖 2)。以目前的超導材料及加工技術, 商業化磁鐵最高磁場強度為 21.2 tesla (900 MHz), 而國內現在則有二部 18.8 tesla (800 MHz) 之核磁共振儀分別安裝於國立中興大學及中央研究院。

2. 磁場遮蔽技術

磁場強度愈高的磁鐵由於其磁力線的延伸較

遠, 故具有愈大的磁性影響範圍以磁場強度 14.09 tesla (600 MHz) 的磁鐵為例, 若沒有磁場遮蔽 (shielding) 的設計, 其水平之 5 高斯 (gauss) 半徑範圍約為 4.1 m。通常在 5 高斯磁場範圍內之磁性足以影響其他設備之正常運作, 反之其他設備也會干擾核磁共振實驗之進行。故 5 高斯磁場範圍內之空

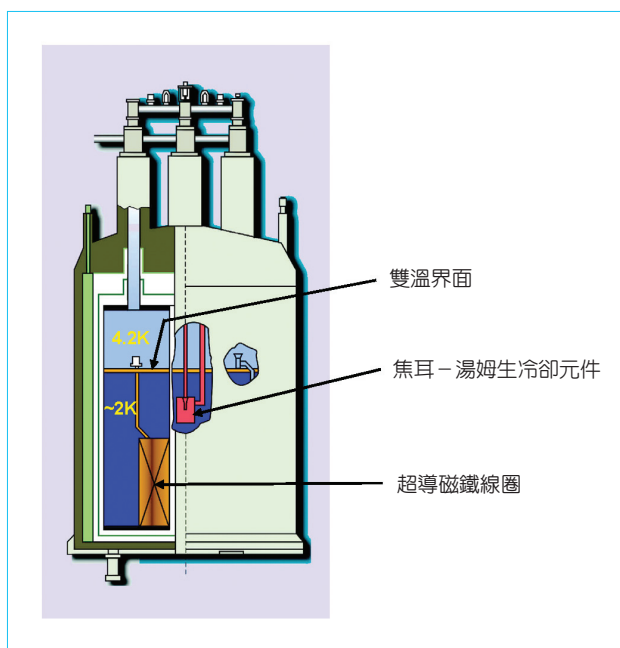


圖 2. 18.8 tesla (800 MHz) 超導磁鐵的內部構造 (原圖取自 Bruker 公司文件, 已獲同意引用)。

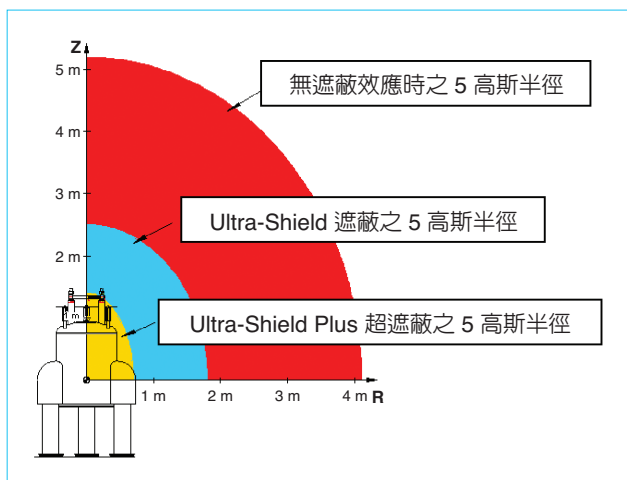


圖 3. Bruker 14.09 tesla (600 MHz) 超導磁鐵遮蔽效應對其 5 高斯半徑的影響 (原圖取自 Bruker 公司文件，已獲同意引用)。

間必須淨空，亦即在此範圍內無法放置其他設備，因此磁鐵之磁性影響範圍往往成為如何有效運用空間的一大難題。磁場遮蔽的概念就是在磁鐵原有的超導線圈外再加一些反向的線圈，此反向線圈的作用在抵消其向外擴散之磁力，進而降低其磁性影響範圍，如此一來可大幅增加核磁共振儀周邊空間的利用性。近年來磁場遮蔽技術已有顯著地進步，以 Bruker 的 600 MHz UltraShield™ 及 UltraShield™ PLUS 磁鐵為例，其 5 高斯的半徑範圍已分別縮小到 1.8 m 及 0.7 m (圖 3)，對研究單位有限的空間運用有極大的助益。

3. 核磁共振探頭

增加核磁共振訊號靈敏度的方法除了朝高磁場發展外，另一方向則是探頭 (probe head) 的改良。超低溫探頭 (cryoprobe 或 cold probe) 的研發是近年來液態核磁共振探頭設計的最大突破。超低溫探頭的設計是利用低溫氮氣將探頭之無線電波線圈 (RF coil) 及前置放大器 (preamplifier) 冷卻至 25 K，但是樣品的溫度仍可以保持在實驗所需的溫度。因為處於低溫，所以可將線圈因熱所產生之熱噪信號 (thermal noise) 大幅降低，接收效率則相對提升，再加上前置放大器之熱噪信號也因低溫而減少，故利用超低溫探頭取得的核磁共振訊噪比 (signal to

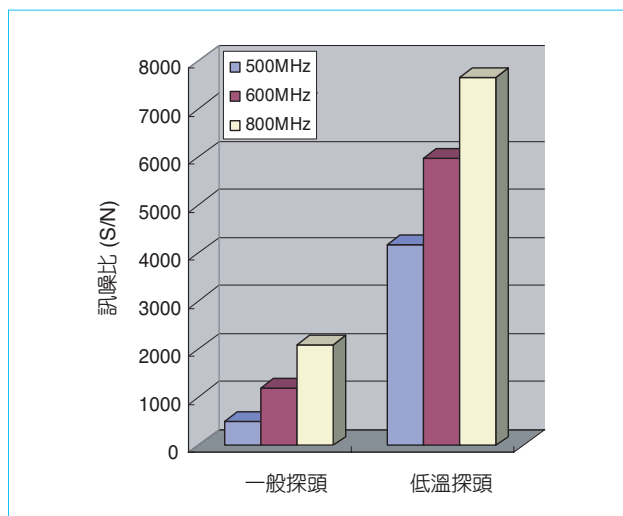


圖 4. 低溫探頭與一般探頭訊噪比 (0.1% EB in CDCl₃) 之比較 (數據由高磁場核磁共振核心提供)。

noise ratio) 相較於一般探頭可提高許多 (圖 4)。對於溶於有機溶劑的樣品而言，其靈敏度約可增加約四倍，水溶液的樣品訊號則平均約可增加二至三倍，因此超低溫探頭可以更迅速完成實驗並提高偵測微量樣品的可能性。目前國內共有 5 組超低溫探頭，分別裝置於中央研究院 500 MHz、600 MHz (圖 5，2 組)、800 MHz 及中興大學 600 MHz 之核磁共振儀。

另外還有許多為了不同需求所設計的新穎核磁

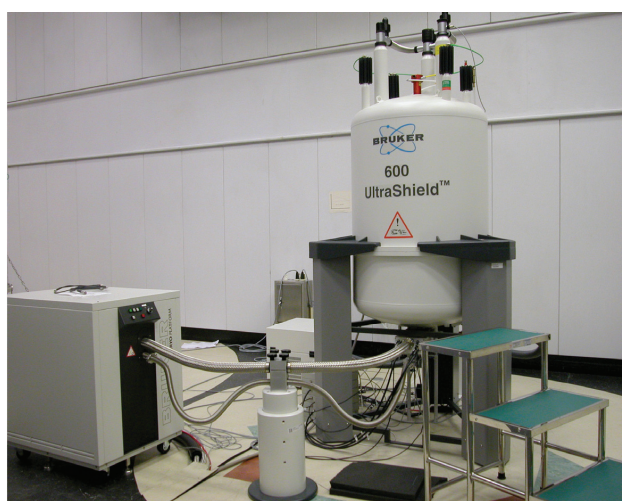


圖 5. 低溫探頭之配置 (高磁場核磁共振核心 600 MHz 核磁共振儀)。

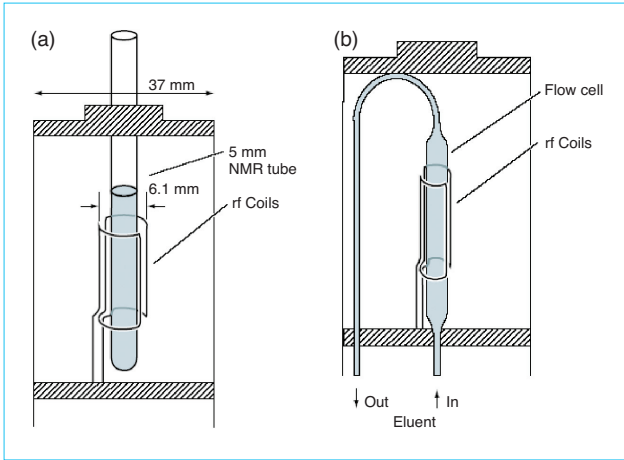


圖 6. (a) 一般 5 mm 探頭與 (b) 流動樣品探頭之比較 (取自 Bruker 公司文件, 已獲同意引用)。

共振探頭, 例如 (1) 配合稀有樣品的微量探頭 (1 mm micro probe): 此類探頭之無線電波線圈直接圍繞在樣品槽的外圍, 因此充填因子 (filling factor) 增加, 靈敏度也就相對有效地提高; (2) 配合液相層析 (LC) 的流動樣品探頭 (flow probe): 此類探頭樣品槽 (flow cell) 之有效承載的樣品體積 (active volume) 為 30–240 μL , 同樣利用近距離線圈圍繞的方法來提高充填因子以增加靈敏度 (圖 6); (3) 結合液態及固態核磁共振探頭優點, 配合磁場梯度 (field gradient) 及魔角高速旋轉 (54.736° , magic angle spinning), 適合膠態樣品的魔角探頭 (HR-MAS probe 或 nano probes, Bio-MAS) 等。總之, 近年來由於各類高效能探頭的改良與發展, 大幅增加核磁共振技術的應用範圍與便利性, 使核磁共振儀的功能更加多元化。

三、核磁共振應用新方法

1. 核磁共振儀與高效能液相層析儀 (HPLC) 及質譜儀 (MS) 串連之發展

核磁共振圖譜是鑑定分子結構最重要的方法之一, 尤其在分子結構分析和立體化學研究方面是其他測試技術無法取代的。通常我們要進行分子結構分析前會先利用各種方式將待測樣品一一純化出來後再量測其核磁共振圖譜, 並配合質譜儀來鑑定分子結構。若將液相層析儀、核磁共振儀及質譜儀串

聯起來 (圖 7), 對鑑定混合物中微量樣品的研究來說無疑提供了最佳的解決方案。高效液相層析與核磁共振的串聯已發展多年, 但近年來在設計及技術上的突破使其應用更加普及。高效液相層析儀將樣品分離後可以下列幾種方式分析: (1) 流動模式 (on flow): 在流動模式操作過程中, 層析管柱的出口直接連結至核磁共振探頭的流動樣品槽中, 分離後的樣品不斷地通過樣品槽, 而核磁共振儀也同時不停地蒐集圖譜。每一個由層析管流出的沖堤峰 (elution peak) 都會對應到一個核磁共振圖譜, 但因為每個樣品被沖堤到流動樣品槽內留置的時間大約只有 10–30 秒, 所以可進行的實驗方法受到限制 (一般只能取得一維氫譜)。此外, 因樣品在流動的狀態下會造成磁場不均勻, 故光譜的解析度較差。(2) 停流模式 (stop flow): 停流模式與流動模式最大的不同就是多了另一個偵測器來選擇要導入核磁共振探頭的沖堤峰。使用者由 UV-VIS 或質譜儀訊號來設定要導入核磁共振儀偵測的沖堤峰條件後, 當出現符合條件的沖堤峰時, 液相層析幫浦會立即停止, 核磁共振儀亦會同時自動進行偵測。此時只有經過篩選的樣品會留置在樣品槽內, 所以樣品是處於靜止狀態, 磁場的均勻度優於流動狀態, 光譜的解析度及靈敏度都會因此提高, 甚至可以進行二

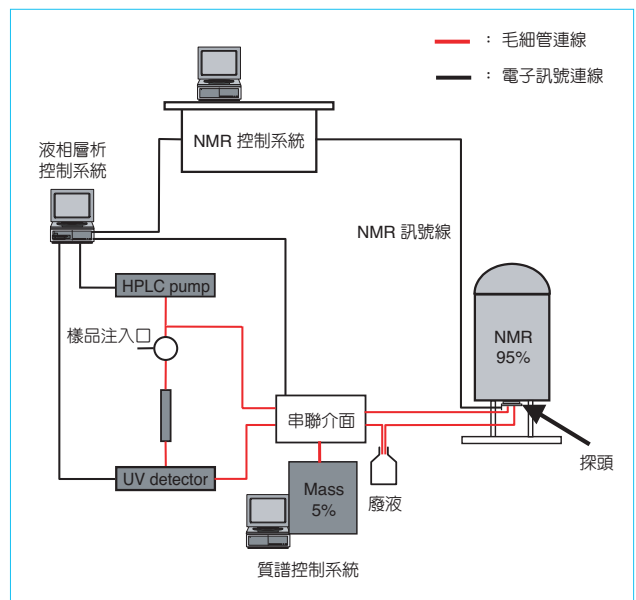


圖 7. 高效液相層析儀、核磁共振儀及質譜儀串聯示意圖。

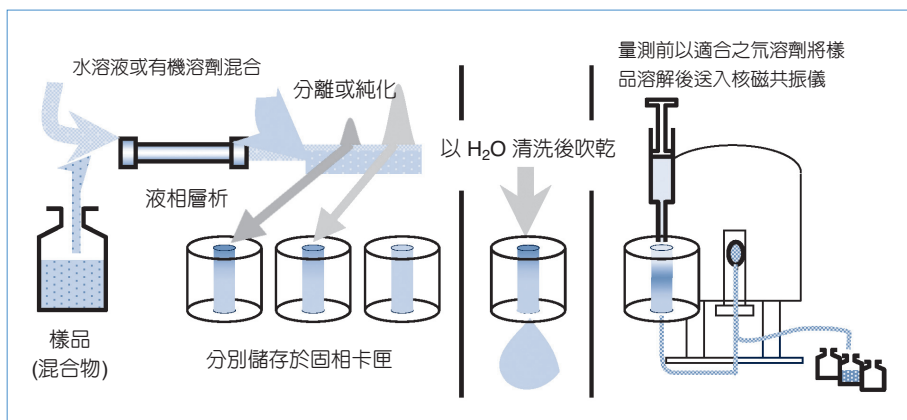


圖 8. 固相萃取模式運作示意圖 (原圖取自 Bruker 公司文件, 已獲同意引用)。

維光譜的偵測。但系統處於停流模式時，留在層析管柱內的樣品會有擴散 (diffusion) 的現象，可能造成沖堤峰變寬而影響分離效果。(3) 樣品暫存／轉運模式 (loop storage/transfer)：此模式將分離後需要收集的沖堤峰先儲存於不同的儲存環中，待所有沖堤峰分離／儲存完成後，再一一任意地轉運送入核磁共振儀偵測。因為沖堤峰已被分別儲存於儲存環，所以不會有停流模式的擴散問題，便可依一般樣品管的操作方式進行長時間實驗。(4) 固相萃取模式 (solid phase extraction)：最新發展的固相萃取模式是利用固相萃取的方法將液相層析分離出的不同物種儲存於不同的固相卡匣 (cartridge) 中，經過清洗乾燥後再以氣溶劑溶解送入核磁共振探頭中進行偵測 (圖 8)。這種模式的優點包括可使用普通的溶劑進行液相層析，節省操作成本 (前述三種模式在液相層析時必須使用氬取代溶劑，如 D₂O，樣品流入核磁共振探頭時才能進行氬鎖定)、可使用多次萃取達到預濃縮的效果以提高核磁共振訊號的靈敏度、可使用各種不同的純氣溶劑如 DMSO/C₆D₆/CDCl₃ 等來導入核磁共振探頭，可以較長時間保存樣品或擇期再進行核磁共振實驗等。至於與質譜儀的串聯則較單純，由液相層析分離後，95% 的液體流入核磁共振探頭進行偵測，另外 5% 則進入質譜儀儀器中獲取質譜之訊息。

目前台灣有兩台可串聯高效液相層析儀之核磁共振儀，分別為台灣大學醫學院藥學系的 400 MHz 及中央研究院基因體研究中心的 600 MHz (圖 9)，對於天然物分析或藥物篩選方面研究提供高效率的實驗方法。

2. 生物巨分子方面之應用

核磁共振是非常重要的且已被廣泛應用的生物物理實驗技術，近年來除了核磁共振硬體之發展大幅提高此技術之靈敏度及解析度外，核磁共振實驗方法之突破也使核磁共振成為結構基因體研究及藥物設計方面不可或缺的重要技術。應用於生物分子的核磁共振實驗方法包括：(1) 利用 TROSY⁽¹⁾ (transverse relaxation-optimized spectroscopy) 或 CRINEPT⁽²⁾ (cross relaxation-enhanced polarization transfer) 的實驗方法：分子量愈大之分子 (> 25 kDa) 其橫向弛緩 T₂ (transverse relaxation) 時間較短，常導致譜線變寬及訊號靈敏度降低之困擾。TROSY 技術的發展即用來克服橫向弛緩 T₂ 的問題，而 CRINEPT 技術則可增加 polarization transfer 的效率，二者對於譜線寬化及靈敏度降低的問題有極大的助益。這兩種實驗的應用在近年來有更進一步的發展，已成功地決定巨大蛋白質 (~100 kDa) 之骨架 (backbone) 及支鍊 (side-chain)⁽³⁾ 化學位移。(2) 殘餘偶極耦合 (residue dipolar coupling) 技術的應用：兩個原子核之間的自旋偶極耦合 (spin dipolar coupling) 含有充分的結構資訊，測量偶極耦合之數值可以推導出這兩個核的偶極 (dipole) 與磁場方向之夾角，進而得知其分子結構。以蛋白質為例，如果可以得知每個胺基酸上 NH dipole 與磁場方向的夾角，這個蛋白質的三維結構就可以大致被決定出來。然而偶極耦合現象會因分子在溶液中朝任意方向自由運動而平均為零，因此一般液態核磁共振方法無法直接利用偶極耦合的資訊來決定其結構。然而，如果能夠使生物分子有方向性地排列

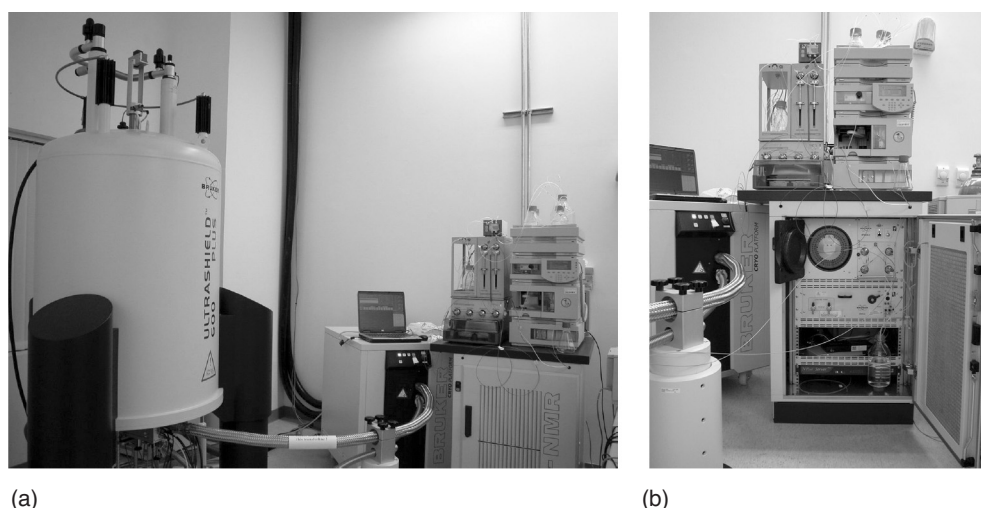
起來 (weak alignment), 分子不會如在溶液中般的任意轉動或擴散, 偶極耦合無法完全抵消, 如此一來殘餘之偶極耦合訊息便能提供重要的結構訊息。近幾年陸續發展出各種樣品配製新方法, 使生物分子處於具方向性的排列狀態, 例如可利用各種液晶態的介質 (liquid crystalline media) 或凝膠擠壓的方法 (compressed acrylamide gel matrix) 等, 量測其殘餘偶極耦合後, 均能成功地提供生物巨分子更準確有效的結構相關訊息⁽⁴⁾。(3) 高解析固態核磁共振: 固態核磁共振的方法並不需要樣品處於水溶液或結晶狀態, 而其所提供的訊息亦不同於液態核磁共振或 X-ray 的方法, 因此有其絕對的重要性及特殊性。例如在固態核磁共振方法中, 偶極耦合的訊息全部得以保留, 理論上可以提供非常有用的結構資訊, 但過去大分子的固態核磁共振光譜解析度不夠, 無法確實被利用來決定生物巨分子三維結構。近幾年來, 固態核磁共振無論是在硬體 (HR-MAS 或 Bio-MAS)、樣品配置或脈衝程式 (pulse program) 方面都有重大的突破, 利用固態核磁共振方法取得高解析訊號並決定生物巨分子之結構的目標已經可以達成⁽⁵⁾。尤其對於膜蛋白 (membrane protein) 及有纖維化現象的分子 (如 amyloid fibrils) 等無法利用液態核磁共振方法研究的樣品而言是非常重要的新技術。(4) 以碳譜為主之偵測法 (^{13}C direct detection): 如前所述分子量愈大之分子其橫向弛緩時間愈短, 而以偵測氫訊號 (^1H) 為主的實驗方法所造成之譜線寬化的問題尤甚。近年來由於

低溫探頭的發展可大幅提昇碳核訊號靈敏度, 故利用碳譜偵測的各種實驗方法便陸續發展出來, 對於研究弛緩時間較短的生物巨分子有極大的助益⁽⁶⁻⁸⁾。(5) 高效率核磁共振圖譜蒐集: 如何更迅速地蒐集有用圖譜的概念早已被提出, 但配合各種脈衝程式技術及分析方法並應用於生物巨分子圖譜蒐集, 則是近年來的發展方向並已有所突破⁽⁹⁻¹¹⁾。例如利用維度分享的概念減少多維度圖譜必須增加的訊號蒐集時間而建立的 G-矩陣傅立葉轉核磁共振 (GFT-NMR)、配合磁場梯度的單次掃描多維圖譜 (single-scan multidimensional spectroscopy)、高解析反覆頻率識別法 (high-resolution iterative frequency identification, HIFI-NMR) 及非均勻取樣法 (non-uniform sampling) 等, 除了可以節省蒐集圖譜所需的儀器時間外, 對於穩定性較差的樣品而言更是不可或缺的新技術。

四、結語

核磁共振是一個應用範圍極廣的技術, 小至簡單的水分子, 大至複雜的生物巨分子, 都可以利用核磁共振的方法來研究其分子結構與動性, 在物理、化學、材料及生命科學等領域都是極其重要的分析工具。而核磁共振技術的發展更是日新月異, 本文僅擇項簡介最近幾年的發展, 相信核磁共振領域未來無論在硬體設備或應用方法方面都將持續不斷地突破與精進。

圖 9.
與高效液相層析串聯之
核磁共振儀 (中研院基
因體中心 600 MHz)。



參考文獻

1. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wüthrich, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, **94**, 12366 (1997).
 2. R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, and K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4918 (1999).
 3. V. Tugarinov, P. M. Hwang, and L. E. Kay, *Annu. Rev. Biochem*, **73**, 107 (2004).
 4. A. Grishaev and A. Bax, *Cur. Opinion Struct. Biol.*, **15**, 563 (2005).
 5. R. Tycko, *Annual Review of Physical Chemistry*, **52**, 575 (2001).
 6. W. Bermel, I. Bertini, I. C. Felli, R. Kummerle, and R. Pierattelli, *JACS*, **125**, 16423 (2003).
 7. I. Bertini, I. C. Felli, R. Kümmerle, D. Moskau, and R. Pierattelli, *JACS*, **126**, 464 (2004).
 8. N. Shimba, H. Kovacs, A. S. Stern, A. M. Nomura, I. Shimada, J. C. Hoch, C. S. Craik, and V. Dötsch, *J. Biomolecular NMR*, **30**, 175 (2004).
 9. R. Freeman and E. Kupče, *J. Biomolecular NMR*, **27**, 101 (2003).
 10. D. Rovnyak, D. P. Frueh, M. Sastry, Z. J. Sun, A. S. Stern, J. C. Hoch, and G. Wagner, *J. Magnetic Resonance*, **170**, 15 (2004).
 11. H. R. Eghbalnia, A. Bahrami, M. Tonelli, K. Hallenga, and J. L. Markley, *JACS*, **127**, 12528 (2005).
-
- 張七鳳小姐為美國俄亥俄州立大學生物物理博士，現任中央研究院基因體中心副研究技師及高磁場核磁共振核心經理。
 - 石峰鵠先生為國立臺灣大學化學碩士，現任磊葳公司經理。
 - 吳英彥先生為中原大學化學博士，現任磊葳公司應用化學師。
 - Chi-Fon Chang received her Ph.D. in biophysics from Ohio State University, USA. She is currently an associate research specialist in Genomics Research Center, Academia Sinica, and the facility manager of High-Field Nuclear Magnetic Resonance Center, NRPGM.
 - Fong-Ku Shi received his M.S. in chemistry from National Taiwan University. He is currently the manager in Rezwave Technology Inc.
 - Ying-Yann Wu received his Ph.D. in chemistry from Chung Yuan Christian University. He is currently an application chemist in Rezwave Technology Inc.