

NMR 用于膜的研究的原理与实验基础(下)

B. 弛豫时间

1. 弛豫时间的物理意义

核自旋体系吸收射频场的能量后处于热的非平衡态(激发态),当射频场不存在时,自旋体系回到热的平衡态。这是一种能量跃迁过程,叫做弛豫过程。弛豫过程有两种:一种是自旋—晶格弛豫,或叫纵向弛豫,此过程用 T_1 来描述。另一种是自旋—自旋弛豫,或叫横向弛豫,此过程用 T_2 来描述。 T_1 是描述自旋体系吸收能量后将其能量转移给它周围的介质而恢复到平衡态的特征时间。设 N 为在时间 t 的自旋数的差, N_∞ 为平衡态时的自旋数,应有下式:

$$N = N_\infty(1 - e^{-t/T_1}) \quad (1)$$

式中 T_1 为自旋—晶格弛豫时间,在固体中 T_1 可长达数小时,而在液体和气体中仅为 1 秒左右。

T_2 描述的是自旋—自旋之间的相互作用。能量交换只发生在自旋体系中各自旋核之间,而自旋体系中的总能量并不发生变化。通常总能量只影响激发态的寿命,即只影响线宽。

一般来讲, T_2 和 T_1 大致相同,但在固体中,特别是在低温固体中, T_2 是很短的。

就弛豫时间而论尚有第三种,即 $T_1\rho$,它是旋转座标中的纵向弛豫特征时间。

这三种弛豫时间在上应用上各有其特点。 T_1 对快速运动敏感, T_2 对慢速运动敏感,而 $T_1\rho$ 对非常慢的运动敏感。如能测量这三种弛豫时间,则可了解分子运动的分布情况。

T_1 和 T_2 是两个不同的特征时间,其区别就好像一根热的铜棒放入水中后,热量从铜棒转移到水中,这相当于 T_1 的过程。而铜棒内部温度高的部分把它的热量转移到温度低的部分,这相当于 T_2 的过程。

通常与自旋体系进行能量交换的晶格具有平动和转动等运动形式,当自旋体系由高能级 β 跃迁到低能级 α 时,晶格则同时由低能级跃迁到高能级,如下图所示:

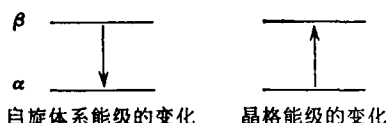


图 1

晶格作平动和转动时产生一个波动的磁场,该波

动磁场可以被 Fourier 展开:

$$\tilde{H}(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} g(\omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (2)$$

该波动场产生跃迁的条件是波动频率的分量要等于拉莫 (Larmor) 进动频率。只有在满足这一跃迁条件时,晶格才能和自旋体系进行能量交换。

由(2)式可推导出:

$$\frac{1}{T_1} \propto |g(\omega)|^2$$

式中 $\frac{1}{T_1}$ 叫做弛豫速率。 $g(\omega)$ 是频率分布函数。

温度和粘度皆影响 T_1 。

T_2 相应于磁化强度矢量在 xy 平面上衰减的情况。衰减速度和磁场的不均匀性及 T_2 的总和有关。在样品中磁场的不均匀性、化学位移,自旋—自旋偶极相互作用,电极矩相互作用均可造成拉莫进动的不同相。这些统称为磁场不均匀性造成的 T_2 。即使是一个理想的磁场不存在以上磁场的不均匀性,进动不同相的现象仍然会发生,即仍会有 T_2 。我们称这时的 T_2 为均匀磁场下的 T_2 (Homogeneous T_2)。

2. 弛豫时间的测量

在脉冲傅里叶变换的核磁仪器中,弛豫时间的测量皆用脉冲法。本文只介绍常用的几种。

(1) T_1 的测量

测量 T_1 的脉冲法计有:

① 反转恢复法 (I)

脉冲序列程序为: $(180^\circ - \tau - 90^\circ - AT - D)_n$

② 反转恢复法 (II)

脉冲序列程序为: $(180^\circ - \tau - 90^\circ - AT - D - 90^\circ - AT - D)_n$

③ 前进饱和法

脉冲序列程序为: $(90^\circ - \tau - AT)_n$

④ 饱和恢复法:

脉冲序列程序为: $(180^\circ - HS - \tau - 90^\circ - AT - HS)_n$

上列各式中:

τ —脉冲间隔(可变)

n —在每一 τ 值中重复扫描次数

AT —采样时间

D —平衡恢复时间

HS —均匀度破坏脉冲

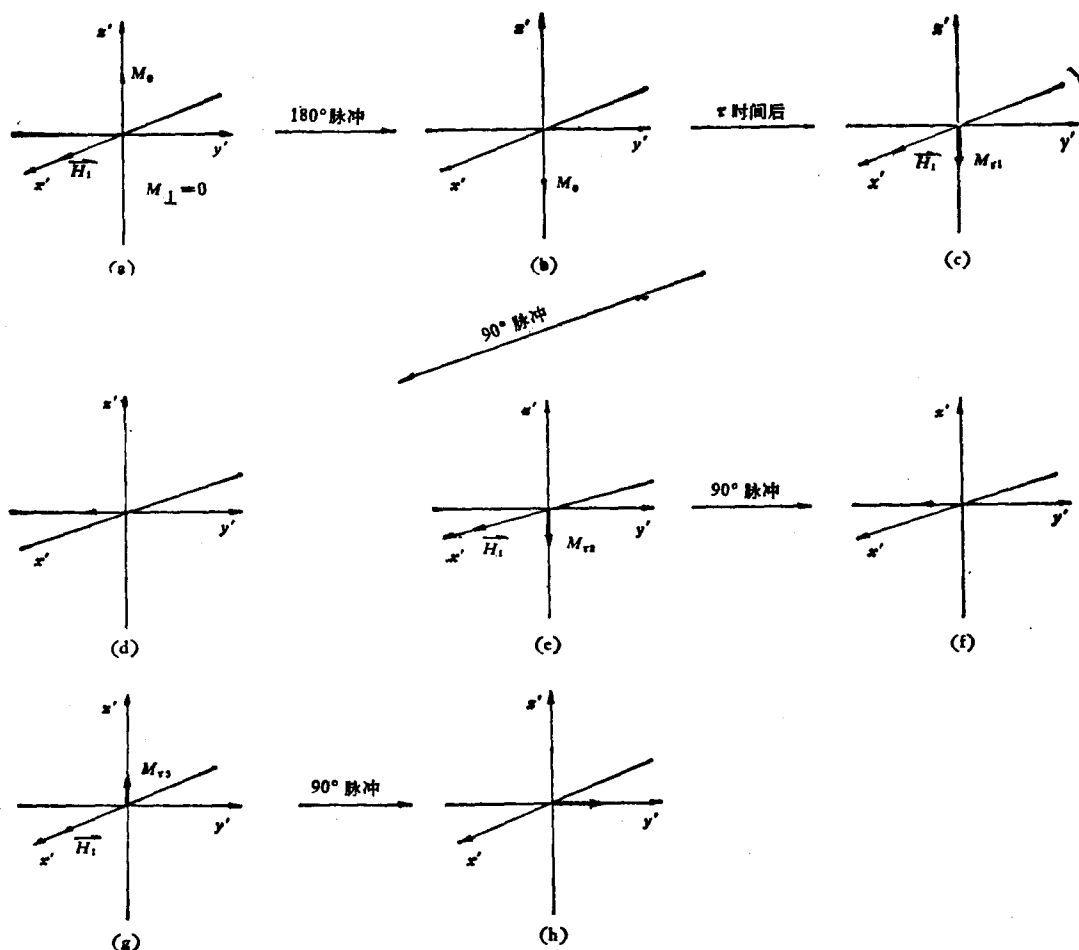


图 2 反转恢复法中在脉冲序列作用下的 M_z 的变化

下面仅以反转恢复法为例说明测量 T_1 的方法,基本过程是首先将 $180^\circ, \tau, 90^\circ$ 脉冲序列作用在样品上,并在 90° 脉冲之后观察 FID 信号。在一定的恢复时间 t 之后再加第二个 $180^\circ, \tau, 90^\circ$ 脉冲序列,但 τ 值不同,并得第二个 FID 信号。照此在样品上反复施加脉冲序列,并取得若干个 FID 信号,根据 FID 信号幅度与脉冲间隔之间的关系可计算出 T_1 。

由图 2 可见,开始时磁化强度 M 处于平衡态,其纵向分量 $M_z = M_0$, 横向分量 $M_x = M_y = 0$, 如图 2a 所示,当在 x' 轴方向上加一个 180° 脉冲后,磁化强度 M 被翻转到了 $-z'$ 的方向上,即转了 180° 。此时的磁化强度的纵向分量为 $-M_0$, 如图 2b 所示,由于这是一种非平衡态,所以 M 要由 $-M_0$ 向 $+M_0$ 恢复,这就是纵向弛豫。而 M 的横向分量等于零,处于平衡态,不会发生任何变化。也就是说没有横向弛豫过程。在 180° 脉冲结束后,经过时间 τ_1 , M_z 恢复到了 M_{z1} , 如图 2c 所示。此后在 x' 的方向上加一个 90° 脉冲,并观察 FID 信号(图 2d)。当 M_z 恢复到 M_0 时,再加 $180^\circ, \tau, 90^\circ$ 脉冲序列,但要等到 τ 变为 $\tau_2 (\tau_2 > \tau_1)$ 时再加 90° 脉冲(图

2e, 图 2f)。依此类推在 $\tau_3 (\tau_3 > \tau_2)$ 时再加 90° 脉冲,由图 2g 和图 2h 可以看到 M_{z3} 变为正值, FID 亦为正值。这样下去便可得到磁化强度的幅度与时间 t 的关系曲线,如图 3 所示。这就是磁化强度在纵向的弛豫过程。而定量地描述这一过程的是 Bloch 方程:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (3)$$

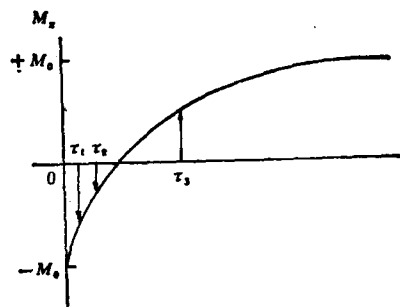


图 3 M 与 τ 的关系

由 180° 脉冲后之初始条件, $t = 0$ 时, $M_z = -M_0$, 则方程(3)的解为:

$$M_z = M_0(1 - 2e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (4)$$

根据方程(4)可求得 T_1 。上式也可变为:

$$\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln 2A_0 - \frac{t}{T_1} \quad (5)$$

式中: A_τ 是当 $t = \tau$ 时, 加 90° 脉冲后 FID 信号的幅度。 A_∞ 是当 $t = \infty$ (即 $\tau > 5T_1$) 时, 加 90° 脉冲后 FID 信号的幅度。

由式(5)可见, $\ln(A_\infty - A_\tau)$ 与 t 呈线性关系, 显然该直线的斜率为 $\frac{1}{T_1}$ 。 T_1 即可求得。

另外, 在式(5)中, 当 $A_\tau = 0$ 时, 90° 脉冲后 FID 的幅度亦为零, 此时式(5)变为:

$$\tau_0 = T_1 \ln 2 = 0.69T_1 \quad (6)$$

由式(6)可很快求出 T_1 , 但该算法的精度略差。

当 $T_1 \gg T_2$ 时, 可用第③、④二种方法, 第③种方法是用间隔为 τ 的一串 90° 脉冲, 可由下式得出 T_1 :

$$\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln A_0 - \frac{\tau}{T_1}$$

(2) T_2 的测量

测量 T_2 比 T_1 更为困难, 因为 T_2 对低频和零频磁场很敏感。任何磁场的不均匀性都会对 T_2 产生影响。为消除这种影响, 通常采用回波方法。常用的脉冲序列程序如下:

① $(90^\circ, \tau, 180^\circ, \tau, \text{回波}), n$

② $(90^\circ, \tau, 180^\circ, \tau, \text{回波}), \tau, 180^\circ, \tau, \text{回波} \dots\dots$

③ $90^\circ x', \tau, 180^\circ x', \tau, \text{回波}, \tau, 180^\circ - x', \tau, \text{回波}$

④ $90^\circ x', \tau, 180^\circ y', \tau, \text{回波}, \tau, 180^\circ y', \tau, \text{回波}$

下面以自旋回波法(方法①)为例简述一下 T_2 的测量原理。

自旋回波法采用 $90^\circ, \tau, 180^\circ$ 脉冲序列作用在样品上。开始时 M 处于平衡态(图 4a), 由于 90° 脉冲的作用, M 被翻转到 y' 轴上(图 4b), 由于非均匀磁场的作用 M_x 会发生分散(图 4d)。此后在时间 τ 的时刻, 在 x' 轴上加一个 180° 脉冲, 使分散开的 M_x 绕 x' 轴旋转 180° (图 4d), 经过一段时间后, 分散开的磁矩在 y' 上集中起来, 在 2τ 的时刻就得到了一个回波(图 4e)。自旋回波信号与磁化强度在 y' 轴上的分量 My' 成正比, 其定量关系可用下式描述:

$$My'(t) = M_0 e^{-\frac{t}{T_1}} e^{-[\frac{(t-2\tau)^2}{2T_2^2}]} \quad (7)$$

式中 T_2' 是非均匀磁场引起的弛豫时间。当 $t = 2\tau$ 时:

$$My'(t) = M_0 e^{-\frac{2\tau}{T_1}} \quad (8)$$

这就是自旋回波的幅度, 它随 τ 而变化, 并呈指数衰减, 时间常数为 T_2' 。若将 $90^\circ, \tau, 180^\circ$ 脉冲序列重复多次, 每次 τ 取不同的值, 可得到许多自旋回波, 回波的包络线反映的正是原子核系统自然弛豫时间 T_2' 决定的指数衰减曲线。

把式(8)写成对数形式, 得:

$$\ln At = \ln A_0 - \frac{t}{T_2'} \quad (9)$$

式中 At 是自旋回波的幅度, 可由实验得到, A_0 是

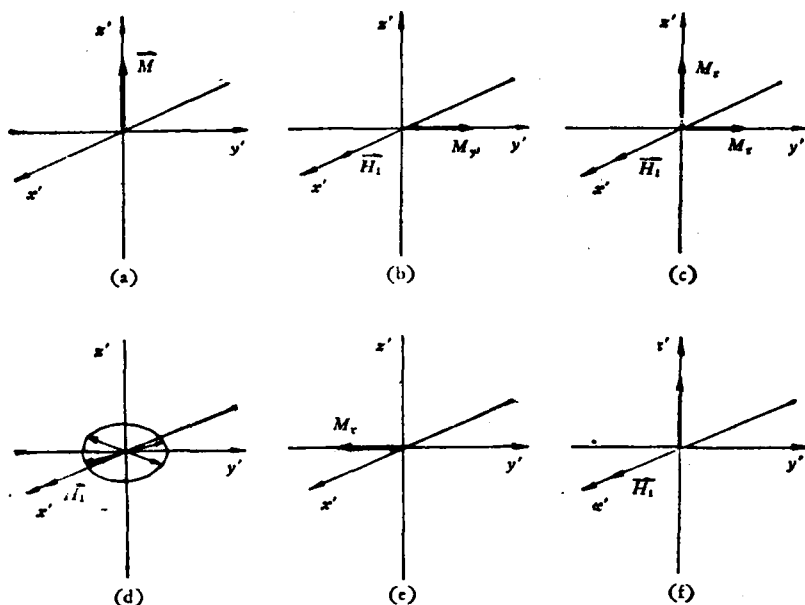


图 4 自旋回波法中脉冲序列对 M 的作用过程

90° 脉冲结束时的 FID 信号幅度。

根据式(9)和 At 作对数图,可得一条直线,该直线的斜率就是自然横向弛豫时间 T_2' 。用这种方法求 T_2' ,可把非均匀磁场引起的 T_2' 用 180° 脉冲平均掉,因此避免了非均匀磁场的影响。

用上述方法求 T_2' 有测量时间长和测量结果受样品中分子扩散运动的影响的缺点。因而发展了其他方法,即方法②,③,④。由于篇幅有限在本文中不再详述。

(3) $T_{1\rho}$ 的测量

目前对 $T_{1\rho}$ 的研究还很少,但对慢运动来讲,它是非常重要的。

$T_{1\rho}$ 是旋转坐标 (x' , y' , z') 的纵向弛豫时间。沿 x' 轴的 90° 脉冲使 M 翻转到 y' 轴上,若将射频场 H_1 的相位改变 90°, 使其沿 y' 轴的方向,这时 M 平行于 H_1 ,也就是无力矩作用。这意味着 M 被 H_1 锁在 y' 轴的方向上,故称自旋锁定 (Spinlock), 此时 H_1 的作用和 H_0 相同。 M 沿 H_1 方向上的弛豫和 T_1 类似, 所以叫 $T_{1\rho}$ 。 $T_{1\rho}$ 反应了分子重新取向的信息,因而有助于了解分子运动情况。

$T_{1\rho}$ 测量的脉冲序列为:

$[90^\circ\tau(\text{加 } \Delta\phi = 90^\circ \text{ 的 } H_1), \text{ 取样}]_n$

由图可见,自旋绕 H_1 进动,而 rH_1 非常小,所以它

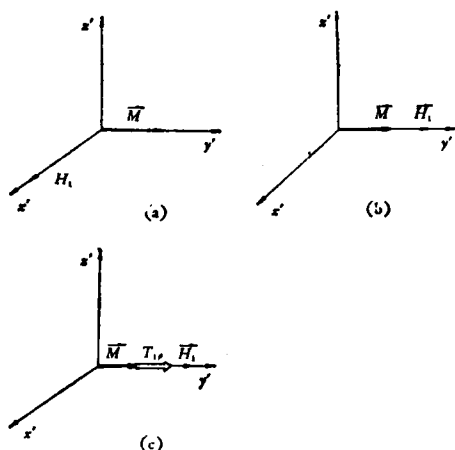


图 5 $T_{1\rho}$ 测量中脉冲序列对 M 的作用

(上接第 80 页)

表 3 酸不溶物同位素计数降低与 DNase-I 量的关系

组别	$^3\text{H-DNA}$	DNase-I	DNase-I (相应酶单位)	酸不溶物计 数(%)
1	10 μl			100
2	10 μl	20 μg	0.02	95.4
3	10 μl	200 μg	0.2	86.6
4	10 μl	1 ng	1.0	80.1

对应于非常慢的运动。实验中 $T_{1\rho}$ 可根据

$$Mt = M_0 e^{-\frac{t}{T_{1\rho}}},$$

以及 FID 信号幅度与 H_1 的持续时间的关系曲线计算而得到。

有人曾测量了含蛋白质的双层脂的 $T_{1\rho}$, 在有蛋白质的双层脂中的 T_1 的变化并不大, 而 $T_{1\rho}$ 的变化却很大, 所以 $T_{1\rho}$ 反应的是低频运动的变化。

美国加州理工学院陈长谦教授通过测定弛豫时间取得了许多重要成果, 揭示了膜中分子运动的某些规律。如多层膜 T_1 和频率的关系的研究。对小分子来讲, T_1 与磁场无关, 而在膜中 T_1 和频率有关。十年前陈教授就提出了膜中有二种运动的独特见解: 一种是异构化, 这是一种快运动, 另一种是慢运动。对小分子来讲, T_1 与频率无关, 但高频时, 中等大小(分子量 = 1000)的分子, T_1 与频率有关, 这些分子的 τ_c 大约为 10^{-10} — 10^{-11} 秒。

陈教授曾作双层脂中 ^1H 的研究, 也作 ^2D 和 ^{13}C 的研究, 研究 T_1 和频率的关系, 发现双层脂中有快运动、慢运动, 甚至还有很慢的运动。

陈教授 15 年前从测量脂质体小泡的波谱中得到各个基团的 T_1 值, T_1 约为 1 秒, T_2 约为 10 毫秒。这个结果表明运动是各向异性的。 T_1 和 T_2 的研究揭示了膜中有不止一种运动。

陈教授今后打算对光谱密度函数和频率的关系进行深入研究, 进一步揭示双层脂的动力学规律。

参 考 文 献

- [1] Chan, S. I.: Lecture on "NMR and ESR", in Institute of Biophysics, Academia Sinica, 1981.
- [2] Chan, S. I. et al.: Membrane Spectroscopy, 1981.
- [3] Kroon, P. A. et al.: Biochim. Biophys. Acta, 433, 282—293, 1976.
- [4] Lee, A. G.: Methods Membr. Biol., 2, 1, 1974.
- [5] Carr, H. T.: Phys. Rev., 94, 630—638, 1954.
- [6] Martin, M. L. et al.: Practical NMR Spectroscopy, 1980.

[丰玉璧编写]

参 考 文 献

- [1] Kurnick, N. B.: Methods in Biochem. Anal., 9, 1962.
- [2] Zimmerman, S. B. et al.: J. Biochem. Biophys., 246, 309, 1971.
- [3] Greth, M. L. et al.: Biochem. Biophys. Acta, 390, 168, 1975.

[本文于 1983 年 5 月 20 日收到]