

(1054) 核磁共振光譜法之應用

1. 核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 光譜法之原理

核磁共振光譜法係利用特定原子核之磁性性質之分析技術。如其他光譜法，核磁共振光譜法吸收特定頻率之電磁能量以提供分析資訊。有別於其他光譜法，核磁共振光譜法須將原子核置於強度為 H_0 之磁場環境中，才能產生不連續能階間之躍遷。雖然外加磁場之初始磁場強度為 H_0 ，檢品插入磁鐵時，整個檢品之磁場強度變為 B_0 ，定義如下：

$$B_0 = \mu_s H_0 \quad (1)$$

其中 μ_s 為檢品之磁化係數。

原子核如同繞著一個核軸旋轉。原子核之角動量 ρ_0 可用自旋量子數 (spin quantum number, I) 描述。最大可觀察到之角動量向量 ρ 為：

$$\rho = I\hbar/2\pi = I\bar{h} \quad (2)$$

其中 h 為普朗克常數； $\bar{h}$ 為約化普朗克常數。

表1顯示自旋量子數 (I) 是原子質量數與原子序之函數。

表1

質量數	原子序	自旋量子數
-----	-----	-------

		(I)
奇數	奇或偶數	1/2、3/2、 5/2...
偶數	偶數	0
偶數	奇數	1、2、3、...

原子核之角動量 p 會產生與角動量平行且成正比之磁矩 μ (magnetic moment)：

$$\mu = \gamma p = \gamma I \hbar \quad (3)$$

其中 γ 為旋磁比 (magnetogyric ratio)，特定同位素之旋磁比為常數，與其在分子中之位置無關。

當自旋量子數 (I) 不為零之原子核置於外在穩定靜磁場中時，原子會沿著 $(2I+1)$ 種可能方向排列。舉例來說，原子核之 I 為 $1/2$ 時，包括大部分具有分析意義之同位素，其會有兩種方向，對應兩種能量狀態 (表2)。而這兩種狀態之能量為 $\pm\mu B_0$ ，能量差為：

$$E = \mu B_0 - (-\mu B_0) = 2\mu B_0 \quad (4)$$

在低能階 ($-\mu B_0$) 之原子核數量較高能階 ($+\mu B_0$) 為多。在不同能階之原子核數量依波茲曼分佈：

$$N_+/N_- = \exp(-E/kT) \quad (5)$$

N_+ 、 N_- 分別為高、低能階之原子核數量； k 為波茲曼常數； T 為絕對溫度 K。

核共振是指在兩個能階間躍遷，向上或向下皆有可能。在靜磁場下，原子核之磁軸會沿著磁軸(B_0)方向作旋進(拉莫旋進, Larmor precession)。旋進之角速度，一般稱為拉莫頻率(Larmor frequency, ω_0)，與 B_0 有關：

$$\begin{aligned} E &= h\nu = 2\mu B_0 \\ &= 2\gamma \hbar B_0 \\ &= \gamma \hbar B_0 \\ \nu &= \frac{\gamma B_0}{2\pi} \\ \omega_0 &= \gamma B_0 \quad (6) \end{aligned}$$

如果以一震盪射頻 (radio frequency, rf) 提供能量，當射頻頻率與旋進之角速度一致時，即產生共振。顯然原子核向上及向下躍遷之機率相同，但由於 N_- 大於 N_+ ，實際上向上躍遷較多。因此，整體來說會吸收能量。如表2所示，原子核共振頻率增加與磁場強度增加成正比。

表2 適合進行核磁共振光譜法研究之核種性質

				共振頻率 (MHz) 於		
原子核	自旋量子數 I	自然含量 (%)	靈敏度	1.4093 T ^a	7.0463 T	11.7440 T
^1H	1/2	99.98	1.00	60.000	300.000	500.000
^{13}C	1/2	1.108	0.0159	15.087	75.432	125.721
^{19}F	1/2	100	0.83	56.446	282.231	470.385
^{31}P	1/2	100	0.0663	24.289	121.442	202.404

^{11}B	(3/2)	80.42	0.17	19.250	96.251	160.419
^a T=tesla; 1.4903 T=14.093 kilogauss.						

核磁共振光譜法為具高專一性，但相對低靈敏性之技術。低靈敏性之基本原因在於高低能階之能量差相對其他光譜法來小（在磁場強度1.5~2.0 T下，僅差0.08焦耳），因此原子數量分佈之差異，僅在幾百萬分之一之譜。核磁共振光譜法另一個對靈敏性有重要負面影響現象之面向，是大部分原子核在激發狀態下具較長之存活時間。較長之存活時間影響核磁共振光譜法分析方法之設計，特別是在重複脈衝之實驗。相較於掃描全頻率之方法，能同時獲取完整共振頻率將可於單位時間內增加靈敏度。

訊號之所有特徵——包括化學位移、多重峰、線寬、耦合常數、相對強度及弛豫時間提供了分析資訊。核磁共振光譜法之分析應用由觀察特定原子核種，在不同之分子環境下產生之不同共振頻率。訊號間之差異，來自於特定原子核所處之有效磁場環境，是由儀器及鄰近循環電子產生外加磁場之總與所影響。後者所提之磁場通常與外加磁場方向相反，並減少原子核之整體磁場強度。這個現象稱為遮蔽效應（shielding）。因此被遮蔽越多之原子核會有較低之拉莫頻率。

與其他光譜法相比，在核磁共振光光譜法中要精確測量躍遷頻率之絕對值並不容易。然而精確測量兩個共振訊號之頻率差異則相

對容易。核磁共振光譜法中訊號之位置可透過與指定為標準值之共振訊號之分開程度來描述。訊號分開之位置稱作化學位移

(chemical shift)，以磁場或頻率之單位來表示，可利用公式(6)依共振條件進行轉換。此公式顯示當化學位移以頻率為單位時，其與磁場強度成正比。因此，以維度單位(dimensional unit, δ)來表達化學位移較方便，其與磁場強度無關：

$$\delta = (\nu_{SS} - \nu_{RS}) / \nu_0 \quad (7)$$

其中 ν_{SS} 為檢品之共振頻率，單位為Hz； ν_{RS} 為參考共振頻率，單位為Hz； ν_0 為儀器頻率，單位為MHz。當 ν_0 以MHz為單位，公式(7)則以百萬分之一(ppm)表示之。因此常以ppm來表示測試檢品之共振訊號與標準品間化學位移之差異。

由此公式，可以用已知檢品(例如：含 ^1H 之氘代溶劑)為化學位移參考值。這公式可適用於幾乎所有核種。

四甲基矽烷(tetramethylsilane, TMS)是最廣泛使用於氫譜、碳譜之化學位移參考物。TMS之化學惰性、只有一個單峰訊號(比大多數訊號遮蔽更多)，且具揮發性，使檢品方便回收。水溶性檢品則可選擇用2,2,3,3- d_4 -三甲基矽基丙酸鈉(TMSP)或2,2-二甲基-2-矽戊烷-5-磺酸鈉(DSS)作為參考物。TMSP或DSS之甲基共振頻率很接近TMS之訊號。當不適合用內在參考物，可以考慮外在

參考物，例如以另一根檢品管測量參考物。

傳統NMR光譜由左往右，遮蔽效應增加、化學位移減少，因為遮蔽較少之原子核會有較高之拉莫頻率。在光譜左側之訊號被稱作去遮蔽（deshielded，即擁有較低之電子密度）。在光譜右側之訊號被稱為遮蔽（shielded，即擁有較多之電子密度）。來自遮蔽與去遮蔽原子核之共振，常見不恰當之稱呼分別是高場區（high-field/upfield）、低場區（low-field/downfield）訊號，這是由於需逐漸改變外加磁場以獲取資訊之過時核磁共振光譜法技術。今日，絕大多數之光譜都是利用脈衝式傅立葉轉換（Fourier transform, FT）光譜方法，改變之不是外加磁場強度，也不是射頻頻率。因此，光譜左側之共振訊號稱之高頻率（high-frequency）或去遮蔽，右側共振訊號稱之低頻率（low-frequency）或遮蔽是比較適當的。

兩個原子核間之耦合，可以自旋-自旋耦合常數（ J ）描述，其中 J 為多重峰訊號之間之分裂（單位為Hz）。當兩個原子核彼此互相影響分裂情形，兩個多重峰測量到之耦合常數結果是相等的。此外，耦合常數（ J ）與磁場強度無關。

耦合自旋系統通常有強弱之分，此取決於耦合原子核之拉默頻率差異相較於其間之耦合常數。這兩值都很容易由光譜測得。例如

弱耦合系統中，兩訊號之化學位移差 ($\Delta\nu$ ，單位為Hz) 較 J (單位為Hz) 大。因此，兩者之比值無單位。一般來說，光譜學家認為 $\Delta\nu/J$ 比值大於10即為弱耦合。只有弱耦合自旋時，系統才會產生第一級光譜，在分析上會比較容易。各組訊號開裂之峰數、相對強度也都可以預測。訊號峰數之公式為 $2nI+1$ ， n 為造成開裂之相鄰基團上相同原子核之數量， I 為造成開裂之原子之自旋量子數。以氫為例，會有 $(n+1)$ 個峰。一般來講，多重峰裡每峰之相對強度，應符合二項展開式 $(a+b)^n$ 之係數。這些係數可利用巴斯卡三角形算出，得到多重峰之相對面積，分別為：雙峰，1:1；三重峰，1:2:1；四重峰，1:3:3:1；五重峰，1:4:6:4:1；六重峰，1:5:10:10:5:1；七重峰，1:6:15:20:15:6:1。圖1為兩個弱耦合之一級光譜之範例。

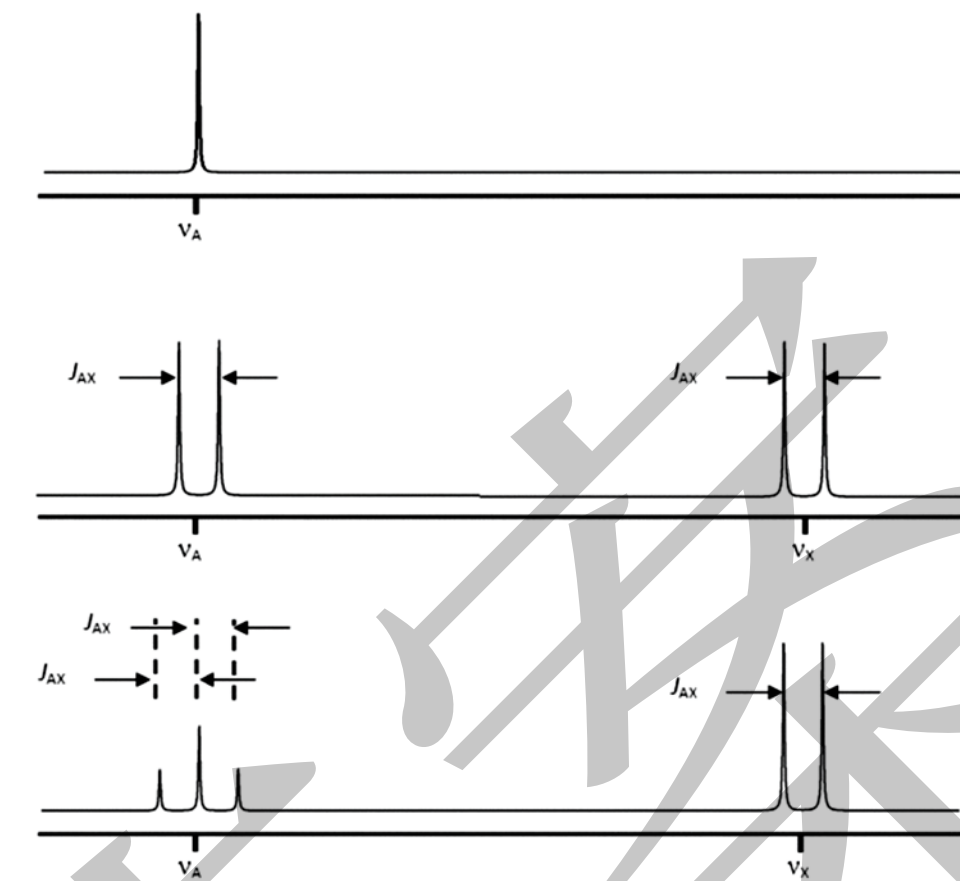


圖1 一般弱耦合系統之光譜範例

^1H 與其他原子可能發生耦合，例如： ^{19}F 、 ^{13}C 及 ^{31}P ，通常相隔1~5個鍵內可以觀察得到。具活磁性之原子核自轉量子數 $I \geq 1$ ，例如： ^{14}N ，具有核四極矩，會因相鄰原子而使訊號譜線寬化。

NMR訊號之另一個特色就是相對強度，有很廣泛之分析應用。在謹慎設計之實驗中，訊號之面積或強度跟氫之數量成正比。因此NMR可以用來定量（見此通則10.5. 定量分析章節與核磁共振光譜法（通則1026）中核磁共振之定性與定量分析）。NMR光譜可能會在訊號之兩側出現一些對稱之旋轉雜訊。這是由於在徑勻場（off-axis，X、Y方向）之勻場過程沒有調整到最好。現代超導磁

鐵之均質性，加上電腦勻場技術，已可減少檢品旋轉之必要與消除此些側峰了。

2. 核磁共振光譜儀

1952年，Varian HR-30是第一台商用、30 MHz之NMR儀器上市。

最初NMR之資料取得技術稱之為連續波(continuous wave, CW)，為基於改變磁場強度之方法。CW光譜法之缺點包含了低靈敏性與分析時間長。

現代光譜儀之操作頻率已經達到1 GHz，且使用脈衝式射頻激發檢品，產生自由感應衰減(free induction decay, FID)之時域訊號(time-domain signal)，再利用傅立葉轉換成頻域訊號(frequency-domain signal)。這個技術稱為傅立葉轉換光譜法。

目前核磁共振光譜儀主要由幾個要件組成：磁鐵、探頭、操縱台及電腦。儀器通常以大約 ^1H 之共振頻率描述，例如：600 MHz；或磁場強度，例如：14.1 T。

2.1. 磁鐵

1970年代初期之前，核磁共振光譜儀之磁鐵並非鐵磁核之電磁鐵，就是永久磁鐵，強度大概介於1.41~2.35 T，對應之 ^1H 之共振頻率為60、80、90、100 MHz。1960年代，超導磁鐵首次被引進使用於核磁共振光譜儀，使得磁場強度提高，可以達到目前之23.5

T (1 GHz) 。

超導磁鐵是核磁共振光譜儀裡最貴之零件，可以價值數百萬，裡面由數哩長之 Nb_3Sn 或 NbTi 線圈組成。當這些材料捲成螺線管，並泡入溫度為4.2 K之液氮中，即具有超導特性。亦即當外界提供能量誘導產生之電流，儘管外界能量移除後，也可長年存在於線圈內。這種恆定之電流可用來產生強而穩定之磁場，是鐵磁核磁鐵之數倍強。為了維持於高磁場，唯一需確保的就是超導線圈一直浸泡於液氮中。

圖2為典型配有超導磁鐵之核磁共振光譜儀示意圖。超導螺線管浸泡在裝有液氮，溫度為4.2 K之杜瓦瓶中。而此裝置又放置於另一個裝有液氮，溫度為77.4 K之杜瓦瓶內。每個杜瓦瓶外部為真空空腔、鍍有反射膜，以避免實驗室之熱能進入液氮杜瓦瓶中。中央核或室溫孔內空間，可作為室溫勻場線圈之通氣管。最後，探頭置於通氣管內。檢品從探頭進出則都是由過濾乾燥之空氣或氮氣所控制。

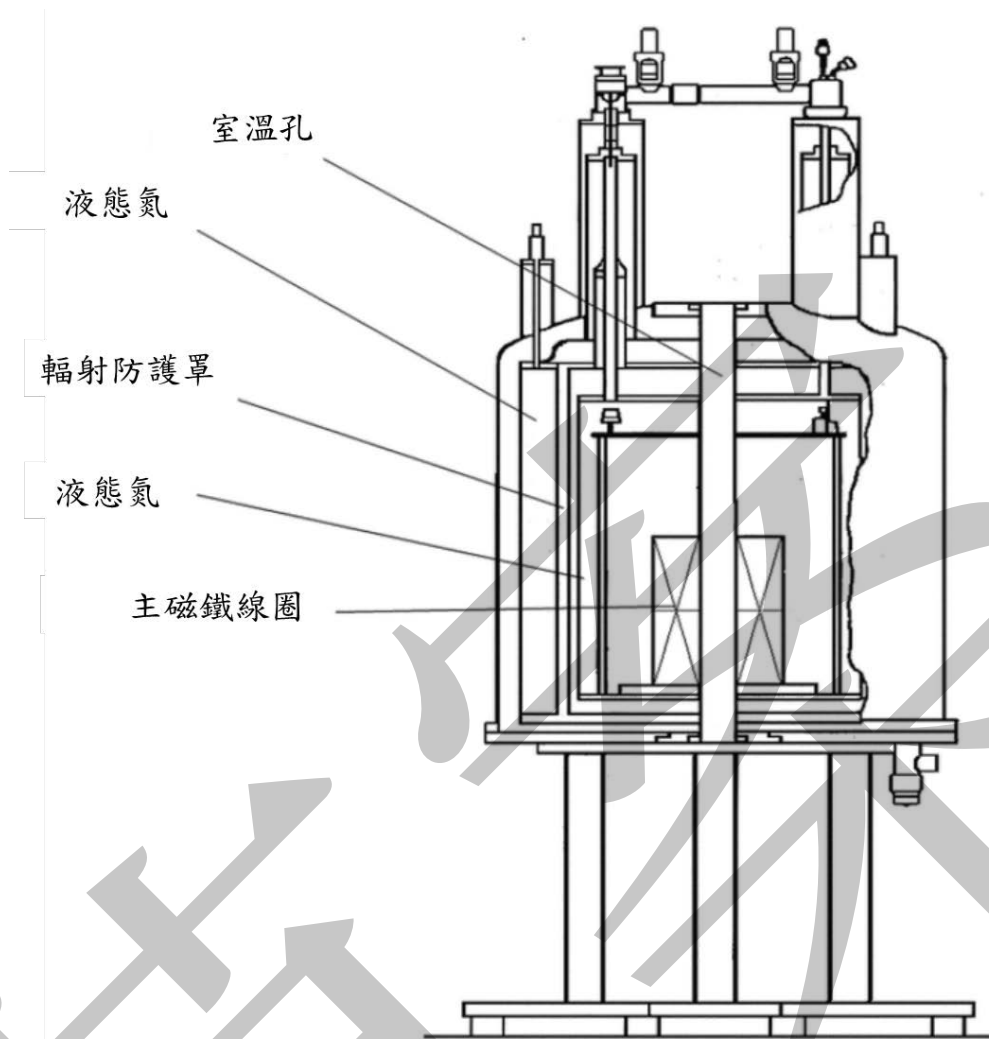


圖2 超導磁鐵之示意圖

近來，在磁鐵技術有重要進展。利用建立有邊緣場之遮蔽磁鐵，可將磁場向空間外延伸1或2 m，因此使得磁鐵之安置比使用無遮蔽磁鐵更加容易。

除了主要螺線管之外，液氮杜瓦瓶裡還有一些超導線圈，用於第一步將主要磁場均勻化之勻場階段。後續勻場是由插在磁鐵孔之室溫勻場堆內約20~30個勻場線圈完成。這些線圈在周圍溫度下運作，可以產生小磁場，來抵銷周遭、探頭或檢品本身等引起之

不均勻之磁場。電腦已完成大量繁瑣之磁鐵均勻化之勻場工作，這是獲得良好NMR數據之關鍵任務。光譜學家可藉由鎖定檢品訊號得到每個勻場線圈之場圖。電腦接著以此圖計算每個線圈所需之電流，將磁場調整到最均勻。一般來說，軸（ z_1 到 z_6 ）上之勻場線圈勻場過程可於一分鐘內完成。軸外（ x/y ）之不均勻情形可以類似方式補償，但因為線圈較多，需要較長之時間（15～20分鐘）。

2.2. 探頭

NMR探頭為儀器裡最重要之部分。探頭由1或2個射頻線圈組成。每個感應線圈（ L ）與幾個可調整之電容（ C ）組成迴路。這些可微調之組件，使探頭可發射與接收拉莫頻率（Larmor frequency, ν_0 ）。給定一個核種，探頭頻率為 $\nu = 1/(2\pi(LC)^{1/2})$ 。一個拉莫頻率之脈衝射頻產生一個磁場（ B_1 ）。 B_1 一定要與超導磁鐵之磁場垂直才可誘發過渡狀態。射頻線圈不只可發射激發脈衝，也可經由電子式調整以接收檢品之射頻訊號。

最常見之NMR檢品管是外徑5 mm之檢品管。然而，探頭被設計成許多樣式。有些可以容納10或20 mm檢品管以檢測例如石油、聚合物等大檢品量之檢品。至於限量珍貴檢品，可使用配合1 mm檢品管之探頭以檢測5 μ L液體之微量樣本。同樣地，也可使用流

動式探頭，直接自液相層析之流出液獲取資料。

探頭可容納大量線圈組態。最常見之探頭通常有寬頻觀察線圈，可調整寬頻範圍 ($^{31}\text{P} \sim ^{109}\text{Au}$) 與可鎖定場頻率之去耦合 (^1H) 線圈與氘 (^2H) 線圈。通常去耦合線圈可同時調整 ^1H 與 ^2H 。線圈組態可包含多達4個頻道用於生物巨分子之多維測量。

探頭可以使用非質子異核種 (X-nucleus, 例如: ^{13}C) 觀察線圈纏繞於去耦合 (^1H) 線圈外之型式。這種反式組態，在間接測量二維異核實驗中，也可提供最大 ^1H 訊噪比 (S/N ratio)，例如二維異核單量子關聯譜 (heteronuclear single-quantum coherence spectroscopy, HSQC)、二維異核多鍵結關聯譜 (heteronuclear multiple-bond correlation, HMBC) 等異核是間接以 ^1H 頻率偵測。

近來新探頭技術，已經可以將上述直接、反式偵測探頭之靈敏度合併於單一探頭。另一個探頭進步之設計為低溫冷卻探頭，將射頻線圈與前置放大器配置在液氦溫度 (20 K) 附近。因為射頻線圈在低溫下會產生較少雜訊，訊噪比最少增加4倍以上。因為圖譜訊噪比以 $n^{1/2}$ 計算， n 為掃描次數，訊噪比增加4倍，也就相當於節省16倍之時間或減少4倍之檢品量。

探頭也可與梯度線圈安裝在一起，可以只在 z 軸或 x 、 y 、 z 方向上加上磁場梯度。磁場梯度可用來研究擴散，或更常見的是脈衝程

序之整體，因其提供在二維實驗中有效選擇特定頻寬之方法。

除電路線圈外，探頭通常會配有一個加熱線圈，可使工作溫度介

於 $-100\sim+150^{\circ}$ 。探頭也有氣體管線，可使檢品進出儀器與旋轉。

對於固態檢品，可有蓋充滿檢品之圓筒狀轉子，與磁場方向成

54.74° （魔角），並以頻率70 kHz快速旋轉。在這角度下快速旋

轉可以消除異向化學位移、偶極耦合。所以可大幅減少在固態之

寬共振訊號。

2.3. 控制台與電腦

NMR控制台之主要功能是為特定實驗產生所需不同之拉莫頻率，

將這些頻率放大、發射至探頭及接收由探頭髮射之結果訊號，才

可以此產生NMR圖譜。除此之外，控制台還有許多其他可以用

電腦控制之操作選項。圖3描繪了現在主流光譜儀操縱台之許多

組件。

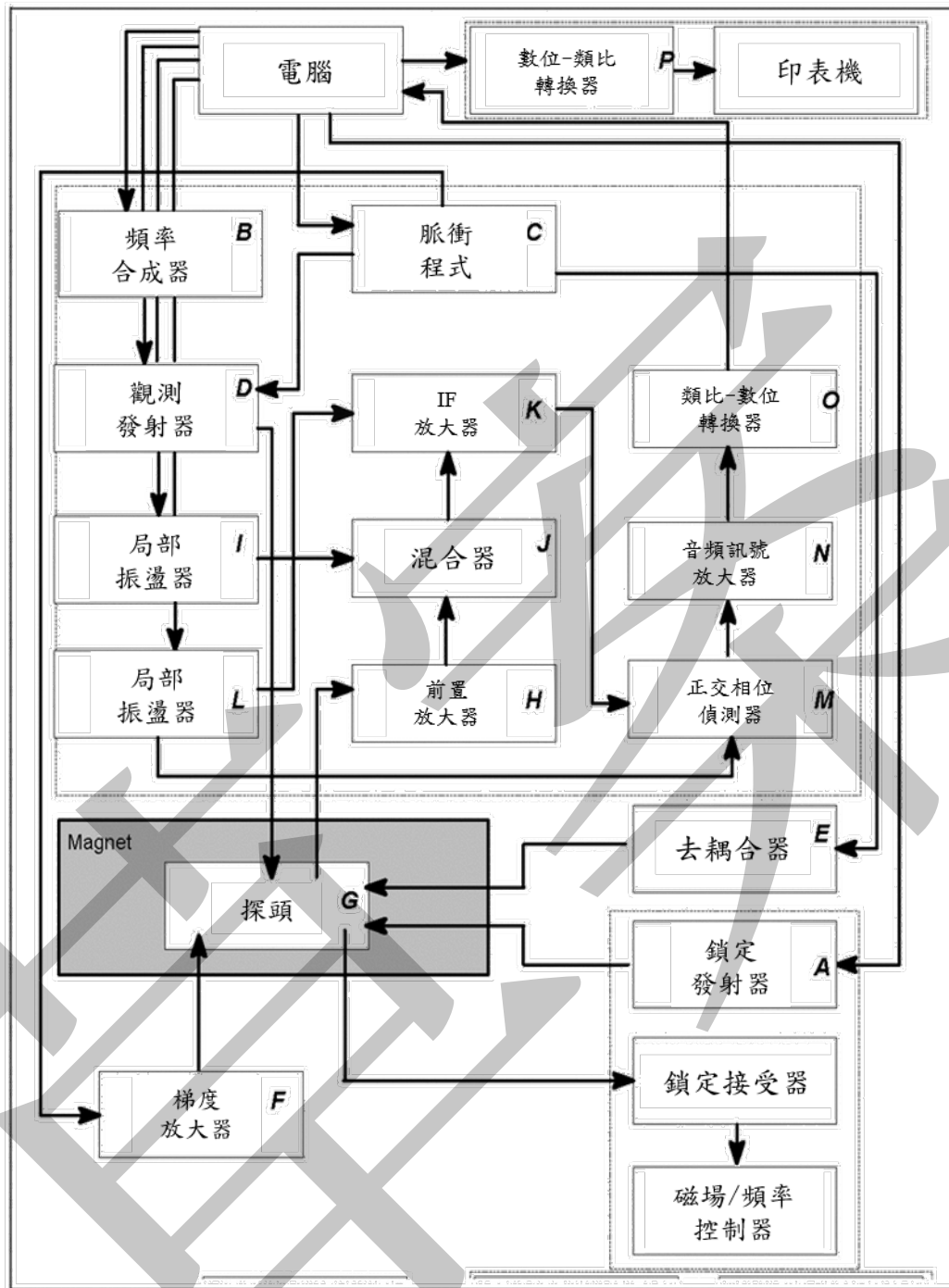


圖3 NMR光譜儀之圖示

電腦會持續控制至鎖定發射器 (A) 之訊號，鎖定接受器中鎖定物質共振之偵測可維持磁場/頻率之控制。產生各種頻率接近觀察或被干擾原子核之拉莫頻率之頻率合成器 (B) 也會由電腦控

制。在特定實驗裡，電腦先啟動脈衝程式（**C**），將時間訊號（脈衝寬、相位、形狀）發送到實驗所需單元，例如：觀測發射器（**D**）、去耦合器（**E**）及梯度放大器（**F**）。當在探頭（**G**）裡之待觀測原子核被觀測發射器之脈衝激發，產生之射頻訊號會被前置放大器（**H**）放大。接著訊號在混合器（**J**）與局部振盪器（**I**）混合，產生較低之射頻頻率，稱為中頻(intermediate frequency, IF)，然後再被放大器（**K**）放大。第二次混合階段，是與一個不同之局部振盪器（**L**）混合，產生一個音頻訊號，於放大（**N**）前先傳到正交相位偵測器（**M**），然後由類比-數位轉換器（**O**）轉換訊號並儲存在電腦裡。當要將訊號轉成圖譜時，數位訊號可以由數位-類比轉換器（**P**）轉換並列印。

相位敏感檢波器（**M**）之輸出是自由感應衰減（FID），是一種時域訊號 $f(t)$ 。

當使用兩個偵測器（**M**）之參考頻率彼此相差 90° ，相對於參考頻率可區分為正頻率與負頻率。此系統稱為正交相位敏感偵測（quadrature phase-sensitive detection, QPD）。每個偵測器都會產生一個FID，只是相位差永遠 90° 。其中一個FID稱為真實FID，另一個稱為假想FID。在這裡之傅立葉轉換，是複雜傅立葉轉換。真實與假想FID之合併，可得到頻率光譜 $F(\omega)$ 。

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \exp^{-i\omega t} dt \quad (8)$$

除了傅立葉轉換過程，電腦也用於資料收集後之處理。複雜傅立葉轉換得到之頻域光譜可以被定相、校正基線(移除扭曲部份)、積分訊號面積及標定訊號。電腦還可計算訊號之化學位移、耦合常數、曲線擬合共振及反摺積複雜重疊峰。最後，數位資料會被數位-類比轉換器 (digital to analog converter, DAC) (O) 轉換成類比格式並列印。

3. 弛豫

NMR包含兩種弛豫：自旋-自旋弛豫 (Spin-Spin Relaxation)，有時也稱為橫向弛豫 (Transverse Relaxation)、 T_2 弛豫；自旋-晶格弛豫 (Spin-Lattice Relaxation)，有時也稱為縱向弛豫 (Longitudinal Relaxation)、 T_1 弛豫。至少有兩種機轉造成了橫向弛豫：因為 B_0 不均一性、或磁場非常均一仍發生之自然弛豫現象，導致訊號消失。綜合這兩種機轉，產生一個新弛豫時間常數，也就是 T_2^* 。

3.1. 自旋-自旋弛豫 (橫向弛豫)

在脈衝射頻之後，磁矩 M_0 在 (x,y) 平面上向量 (M_{xy}) 會逐漸衰退至零。就像其他一級過程，這裡瞬時衰變率 M_{xy} 與相較於平衡之位置成正比。更進一步， M_{xy} 取代0，衰退越快，當接近0，則衰退變慢。因此，如公式(9)所示：

$$dM_{xy}/dt \propto (-M_{xy}) \quad (9)$$

這個過程類似放射性元素衰變。然而光譜學家不會將FID之衰變速度稱作半衰期，而是稱為1/e-life，也就是FID衰變到時間為0之初始數值1/e。公式（9）經過標準運算後得到：

$$M_{xy}=M_0 \exp(-t/ T_2^*) \quad (10)$$

M_0 為公式（9）之平衡分布， T_2^* 為衰變之速率常數。 T_2^* 為測量訊號衰變多快，而不是衰變了多久。在給予脈衝同時衰變速率是最快的，因為離平衡位置0最遠。如果速率是常數，維持在初始速率，訊號在一個 T_2^* 後就會完全衰變。

表3數據由公式（10）得到，在90°脈衝後，在不同時間點（ T_2^* s為單位），時間與剩餘 M_{xy} 百分比之函數關係。

表3 剩餘百分比 M_{xy} 與時間 T_2^* 之函數關係

時間 / T_2^*	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0	5.0
%剩餘	100.0	60.7	36.8	22.3	13.5	5.0	1.8	0.7

M_{xy} 會趨近於零，要花無限久時間才會完全衰變，但一般來說，3~5個 T_2^* 就可以視為完全衰退。因此，這個時間點被當作是擷取時間。如果擷取時間比3個 T_2^* 時間短，FID就會被截斷，而後續傅立葉轉換，基線會產生可被察覺之雜訊。

FID之衰變產生最後光譜中之峰寬。衰變越快，波峰就越寬。數

學關係式如下：

$$\Delta\nu_{1/2}=1/(\pi T_2^*) \quad (11)$$

$\Delta\nu_{1/2}$ 為波峰之半高寬。

3.2. 自旋-晶格弛豫（縱向弛豫）

在脈衝射頻後，原子核從低能階激發到高能階。最終原子核會回復到波茲曼分布（見公式（5）），而這個過程稱為自旋-晶格弛豫。回復過程是一級。就像其他一級過程， M_z 瞬時成長率與平衡時取代的量成正比。 M_z 從 M_0 取代之越遠， M_z 就越快回復，而且當接近 M_0 ，其成長率會越來越慢。因此公式（12）：

$$dM_z/dt \propto (M_0 - M_z) \quad (12)$$

標準數學運算後得到：

$$M_z = M_0(1 - \exp(-t/T_1)) \quad (13)$$

T_1 是測量 M_z 多快回到 M_0 ，而不是需要多久回復。表4由公式（13）計算得到，在 90° 脈衝後，在不同 T_1 單位時間下， M_z 之回復百分比。

表4 回復百分比 M_z 與時間 T_1 之函數

時間/ T_1	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0	5.0
%回復	0.0	39.3	63.2	77.7	86.5	95	98.2	99.3

率								
---	--	--	--	--	--	--	--	--

當 M_z 趨近於 M_0 ，要經無限長時間才完全回復。但一般來說，回復到99%就可以視為完全回復。因此通常以脈衝後5個 T_1 時間作為弛豫延遲時間。在脈衝瞬間之回復速率最快，因為 M_0 離平衡位置最遠。如果速率維持在初始速率，訊號在一個 T_1 後就會完全回復。

4. 頂錐角

在脈衝射頻中，會對檢品施加一個磁場（magnetic field, B_1 ）。磁化向量（ M ）會對 B_1 產生旋進：

$$\omega_1 = \gamma B_1 \quad (14)$$

ω_1 為旋進頻率， B_1 為施加到樣品之磁場強度。在脈衝施加期間， M 以旋進速率與脈衝寬度（ PW ）之乘積所造成之角度 α 旋進，得公式如下：

$$PW \times \omega_1 = \alpha = PW \times \gamma B_1 \quad (15)$$

一般頂錐角以角度或弧度作單位。例如一個 90° 脈衝有時也可以表示成一個 $\pi/2$ 脈衝。

4.1. 最優化之頂錐角或恩斯特角

增加訊噪比之平均時間，一定會伴隨著重複之停頓-脈衝-收訊程序。假設在第一次脈衝結束前， M_0 對 B_1 以 30° 旋進，這個時間點

M_z 大小是 $M_0 \cos 30^\circ$ 。脈衝結束後， M_z 開始回復到平衡時之 M_0 值。一般來說，第二個脈衝會在 M_z 回到 M_0 之前施加，使得 M_z 離 M_0 更遠。因為離平衡值更遠， M_z 回復速率也越快。在6~10個脈衝後， M_z 會回復至由每一接續脈衝造成增加之取代量，進而達到一新平衡或穩定狀態。每個接續之脈衝會在 M_z 新穩定值加上 30° 之產生每一脈衝之強度。

穩定狀態之平衡位置由三個因素決定： T_1 、頂錐角及脈衝之間隔時間。假設已給定 T_1 、脈衝之間隔時間，如頂錐角太大， M_z 之穩定狀態會接近原始值，只能產生一個小訊號。然而，如果頂錐角太小（例如： 5° ），穩定狀態數值就會很大，但 $M_z \sin 5^\circ$ 數值也會很小，最後也只能產生一個小訊號。最佳之角度稱做恩斯特角（Ernst angle）：

$$\cos \alpha_{opt} = \exp(-PR / T_1) \quad (16)$$

$$\alpha_{opt} = \arccos[\exp(-PR / T_1)] \quad (17)$$

其中， PR 為脈衝之間隔時間。這時間是獲取FID之時間與弛豫延遲時間之總和。恩斯特角提供一個夠大之穩定狀態值與角度，將在單位時間產生最佳之訊噪比。公式（17）之 T_1 應該帶入分子中弛豫時間最長之核種。

5. 弛豫延遲時間

令人驚訝的是，理想單位時間之訊噪比，是當在一個已知之 T_1 條件下且弛豫時間為零時獲得的，此時 PR 等於訊號擷取時間

（acquisition time, AT）。然而，大部分分子之原子核都不會有相同之 T_1 值，也就沒有相對強度關係。

典型定量實驗中，弛豫延遲時間應該是分子內任何原子最長 T_1 值之5倍，脈衝寬度應該設定 90° 。進一步細節在10.5. 定量分析章節。

6. 解析度

在NMR光譜中，解析度定義為區分兩個接近之共振訊號之能力。

測量解析度之工業標準是單一訊號之半高寬，單位為Hz。

測不準原理（uncertainty principle）可決定NMR能達到最好之解析度。一個光譜最大解析度，或者分開兩個可觀察到訊號之最小頻率差 $\Delta\nu$ ，與FID之訊號擷取時間（AT）成倒數。

$$\Delta\nu = 1/\Delta t = 1/AT \quad (18)$$

操作人員在設定時間不宜超過所需之訊號擷取時間，因為訊號衰變到零之後，只會收集到雜訊。收集雜訊不會增加解析度。

7. 收訊後資料處理

在傅立葉轉換前，通常可於FID應用一些數學運算，改善光譜最後呈現情形。兩個常見之步驟是：將FID乘上一個數學運算式，稱為視窗函數（window function）；或是在FID結尾換上零值，稱為零

填滿 (zero filling)。

7.1. 視窗函數

一般常用兩種形式：一是增加解析度，或是增加訊噪比。

7.1.1. 增加解析度

在光譜，訊號之衰變會造成峰寬，如沒有衰變，共振峰只會有一個點，像是一個極窄的峰。訊號之衰變可以由 $\exp(-t/T_2^*)$ 表示。因此訊號衰變之公式可寫成：

$$A(t) = A_0 \exp(-t/T_2^*) \cos(\omega t + \theta) \quad (19)$$

如果FID乘上一個遞增函數，可剛好抵銷衰變，那峰寬就會移除。FID可以乘上 $\exp(t/T_2^*)$ 然後公式 (19) 就變成：

$$A(t) = A_0 \exp(0) \cos(\omega t + \theta) = A_0 \cos(\omega t + \theta) \quad (20)$$

然而，利用上述運算仍會在FID尾端不成正比之增加雜訊。最終光譜之訊噪比會相當糟糕，因此此函數不能在未修改之情況下使用。一般來說，在FID開頭之訊噪比較好，解析度會增加，但FID尾端訊噪比差，雜訊會增加。高斯函數 (Gaussian function)、FID反加轉換 (reversed-added FIDs, TRAF) 函數為兩種常用增加解析度之函數。儀器製造商有時又稱後者TRAFR。二種函數增加解析度之能力相同，但TRAFR比較不會破壞整體之訊噪比。還有許多其他視窗函數被提出，但沒有被廣泛使用。另外，必

須注意的是，由於此方法可能會改變光譜訊號之積分值，在定量上要特別小心。

7.1.2. 增加訊噪比

在FID開頭資料點加權較尾端多，可增進光譜整體之訊噪比，因為開頭之訊噪比最高，尾端最低。加權是將FID原始資料乘上隨時間增加而遞減之函數。匹配濾波器（matched filter）是最有名之函數，可增加最多訊噪比。每個FID資料點加權量正比於原本之訊噪比。一個函數要達到這個目標，一定要與衰變相符。因此FID要乘上 $\exp(-t/T_2^*)$ 。

使用匹配濾波器之缺點是犧牲解析度，使峰寬變成2倍。當原始衰變乘上匹配濾波器，新衰變函數寫成：

$$\exp(-t/T_2^*) \times \exp(-t/T_2^*) = \exp(-2t/T_2^*) = \exp(-t/0.5T_2^*) \quad (21)$$

FID就會呈現隨 T_2^* 衰變，相當於原本之一半，且由公式(11)、(18)可知峰寬會變成2倍。嘗試將加權開頭資料點乘上陡峭衰變，只會增加訊噪比，且得到更寬之峰寬。

另一個增加訊噪比，但不會改變解析度的是針對靈敏度之TRAF函數，有時候製造商又稱為TRAFS。

7.2. 零填滿

在傅立葉轉換前，光譜學家可於FID後加上一些零之資料點，可

改善整體光譜結果。這個步驟使光譜中每個共振峰有更多之點。

最常見之方法是附加上與FID資料點數相同數量之零。加入更多零資料點，只會有非常些微改善。

雖然經過零填滿，全部之波峰會更明確，但解析度不會跟著增加。

例如，假設兩條分開之線之間，比波峰寬度還窄時，僅會呈現單一寬線。零填滿不會增加這些峰之解析度，它只會在寬線上面加上更多點。只有增加訊號擷取時間，或利用視窗函數才可增加解析度。

零填滿在定量上面有好處。數位光譜之積分是將特定點之強度加上其他連續之點。如果資料數不足以描繪精確出波峰之形狀，無法精準決定波峰之積分。因此，零填滿使每個峰都至少有7~10個資料點，能更準確積分。要有可靠之峰形與訊號積分之定量，波峰一半之高度至少要有4~5個資料點。

8. 結構鑑定之一般步驟

因為對特定核種如 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{31}P 及 ^{19}F 鑑定之專一性，NMR光譜是在結構鑑定上一強大之技術。對於簡單分子，可於短時間內以 ^1H NMR進行一般常規之鑑定測試。基本鑑定是比較測試檢品與合格之對照標準品比較訊號。當檢品之化學位移、多重峰及耦合常數皆符合對照標準品或藥典個論中數值，即確認其鑑定結果。

假如檢品製備過程不正確，或是光譜儀參數設定不佳導致低解析度、低靈敏度或光譜不正確之情形，使得分析資料無法使用。儀器操作人員應熟悉NMR基本原理與操作儀器，也應時常檢查儀器性能。

這裡提到之實驗步驟大致針對 ^1H 與 ^{13}C NMR，但修改後也可套用到其他核種。這裡討論之NMR光譜，是以合適溶劑配成之檢品溶液測得。

8.1. 溶劑選擇

NMR分析一般以氘代溶劑配製檢品溶液，因為易取得且大幅降低光譜中溶劑之 ^1H 訊號，並提供鎖定之訊號。應選定殘留之 ^1H 訊號不會干擾分析物訊號之氘代溶劑。如殘留 ^1H 訊號可能干擾檢品訊號，卻沒有其他溶劑選擇，那麼氘同位素(^2H)之純度就應儘可能的高。有些溶劑（例如： D_2O 、 CD_3OD ）之不穩定氫基，會與分析物中不穩定氫基進行快速置換反應。這可能消除 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 及 $-\text{NH}_2$ 官能基之共振訊號。最常見的 ^1H 、 ^{13}C NMR溶劑如表5所示，表中包括殘留 ^1H 與 ^{13}C 之化學位移訊號，及與氘耦合共振之多重峰等資訊。

表5 常用於 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 之溶劑化學位移

溶劑	殘留 ^1H 、 ^{13}C 化學位移 ($\delta^{a,b}$) 及
----	---

	多重峰訊號	
	¹ H	¹³ C
CDCl ₃	7.27	77.23 (3)
CD ₃ OD	3.35、4.78	49.15 (7)
(CD ₃) ₂ CO	2.05	206.68 (1)
		29.92 (7)
D ₂ O	4.7 ^c	—
(CD ₃) ₂ SO	2.50	39.51 (7)
C ₆ D ₆	7.20	128.39 (3)
Dioxane- <i>d</i> ₈	3.55	66.66 (5)
CD ₃ CO ₂ D	2.05、11.65 ^c	178.99 (1)
		20.0 (7)
(CD ₃) ₂ NCDO	2.77、2.93、8.05	163.15 (3)
		34.89 (7)
		29.76 (7)
^a 化學位移於 295 K 下測量。		
^b 化學位移（單位 ppm）是相對於 TMS（0 ppm）。		
^c 不穩定氫。		

8.2. 檢品製備

藥典中檢品製備通常按照藥品個論中之方法。溶質濃度依實驗之

目的而定。一般NMR檢品溶液濃度由數個mg/mL~50 mg/mL。

微量雜質檢測則需要更高之濃度。某些情況例如聚合物，也可能用到更高之濃度。檢品溶液先個別在小瓶裡製備，再轉移到NMR檢品管中。檢品管裡之液面高度要足夠，當檢品管插入儀器探頭需高於線圈。

NMR檢品管之直徑、管壁厚度、同心率及弧度之規格應符合嚴格之容許範圍。最廣泛使用之檢品管外徑（OD）是5或10 mm，長度介於15~20 cm。但外徑為1 mm~3 mm之檢品管越來越常見，也有使用外徑達20 mm之檢品管。

8.3. 步驟

NMR檢品管會置於磁場裡探頭中。雖然傳統上檢品會旋轉以平均非徑向磁場梯度（nonradial field gradients）之方向旋轉，現在因為勻場線圈，旋轉已經不再是必要了，而且許多2D實驗檢品則是不應該旋轉。磁場均一度經由勻場至最佳化。探頭調整到測量之頻率，並調整使匹配儀器系統之阻抗。

電腦控制著儀器所有操作—從執行脈衝程式到資料儲存運算。實驗設置包含許多變數之數值選擇，包含光譜涵蓋寬度、激發脈衝之長度（pulse width, *PW*）、資料擷取時間間隔（acquired time, *AT*）、掃描次數之累積及擷取之延遲時間（弛豫時間）。掃描次數之擷

取時間是以秒為單位。與掃描次數相關，包含檢品濃度、核種及實驗目的，次數從大多數 ^1H 實驗之數次，到 ^{13}C 之數千次都有可能。實驗結束後，訊號（FID）以數位化格式儲存在電腦，以螢幕顯示結果。訊號可經由數學運算加強解析度，或靈敏度，用傅立葉轉換成頻域光譜（frequency-domain spectrum），再進一步分析訊號位置（化學位移）與強度。

8.4. NMR結構鑑定

最簡單的NMR結構鑑定例子，是將未知結構之光譜與資料庫之對照標準品比對。就算在缺乏高品質標準品或光譜可對照時，NMR光譜所含之資訊也足夠推導出有機分子之結構。從一維（1-D） ^1H 、 ^{13}C 光譜之化學位移、耦合模式、強度可鑑定出相對簡單之結構。至於更複雜之結構，光譜學家可以從二維（2D）光譜中，確認同/異原子之連結。

二維光譜之特色是擁有兩個頻率軸。在數學上，強度是另一個維度，但在二維NMR不算一個維度，因為它不是從化學位移衍生出來之軸。所有現代二維實驗至少由兩個脈衝組成，以時間週期區分成：演化期（evolution period, t_1 ）與收集訊號之測量期（detection period, t_2 ）。關聯性磁振光譜（COrrrelation SpectroscopY, COSY）序列是所有二維最簡單的，如圖4所示。

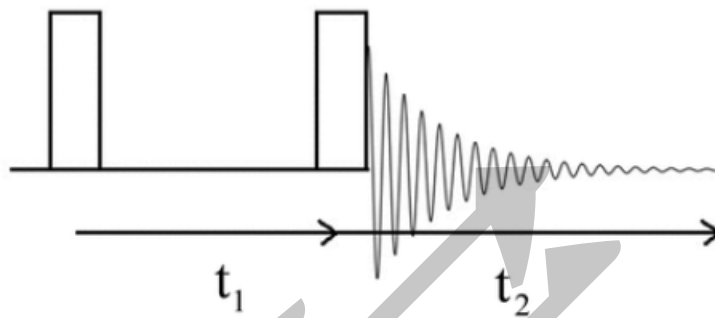


圖4 一個COSY實驗脈衝序列

在演化期，會有一連串不斷疊加脈衝序列。每段測量期， t_2 ，傅立葉轉換都會疊加一起，然後再以 t_1 為新軸，進行第二次傅立葉轉換，最後得到一個有兩頻率軸， F_2 及 F_1 ，之振幅圖。

除了COSY外，最簡單的是多了一個脈衝。核奧佛豪瑟譜(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, NOESY)為一個例子，如圖5所示。

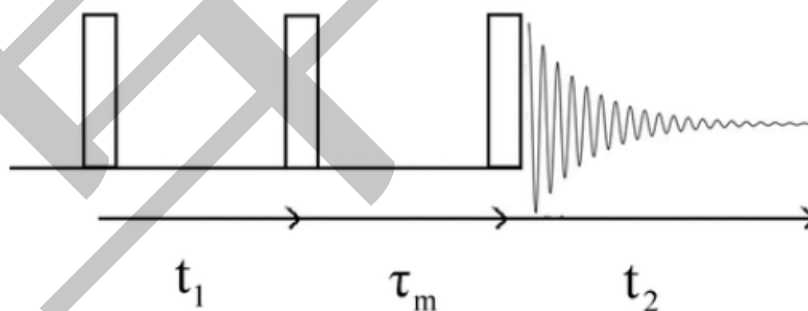


圖5 一個NOESY實驗脈衝序列

演化期是前兩次脈衝間隔之時間，在COSY間隔時間會逐漸增加。

第二與第三次脈衝之間隔時間是固定、不增加的。這演化期時間

則標記為 τ_m ，稱作混合時間（mixing time）。在這個期間會發生交叉極化（cross-polarization）。

上述COSY、NOESY是最簡單之二維實驗。許多其他實驗也被開發出來，包含一系列複雜之脈衝：不同脈衝寬度、延遲時間、閘控去耦合（gated decoupling）與脈衝磁場梯度。以下為一些實驗之介紹。

8.5. 同核種連接關係建立之策略

結構鑑定第一步，是根據化學位移、多重峰、耦合常數來標定訊號。如果能夠建立起同核種之連接關係，就能簡化結構鑑定。可以利用鍵之相關性（量化耦合，又稱 J 耦合），或空間交互作用（偶極耦合）來達到。本段落介紹一些用來研究同核種連接關係之NMR技術。此類別下常見的有COSY、總相關性光譜學（total correlated spectroscopy, TOCSY）、NOESY及旋轉座標系奧佛豪瑟增強譜（rotating frame Overhauser effect spectroscopy, ROESY）。

8.5.1. COSY

COSY可以快速提供氫-氫原子在自旋系統裡，間隔2或3個鍵之關聯性，已經成為常規的2-D ^1H NMR實驗。一般來說，COSY光譜呈現對角線或非對角線之交叉訊號（cross peaks）。2-D光譜對角線訊號對應到之是1-D ^1H NMR 光譜同一個原子核之化

學位移。2-D光譜非對角線交叉訊號表示兩個不同化學位移之原子核有耦合關係。COSY光譜可鑑別孿位 (geminal) 與鄰位 (vicinal) 之量化耦合。一般來說，在解析COSY圖譜時，從1-D ^1H NMR已經鑑定過的開始著手。接著是與此共振有非對角線訊號，或任何有耦合之鄰近氫原子。這樣方法找出之鄰近氫原子，可當成下一個出發點，找出其他氫原子，直到整個耦合系統都鑑定完畢。

因此，COSY實驗可提供分子片段裡氫原子與氫原子關聯之資訊。片段間如無耦合情形，可能使這些片段之關係難以建立。例如，兩個片段中間由四級碳或異原子連接時，兩片段之間之氫相隔四鍵結時之耦合常數很小，一般很難由COSY實驗測得。

基本COSY實驗通常用強度模式 (magnitude mode) 操作，使得訊號底部寬大。對角線訊號會太寬，以至於遮蓋到非對角線訊號，進而使鄰近化學位移觀察困難。圖6為一個COSY (更精確是梯度，或稱gCOSY) 例子。

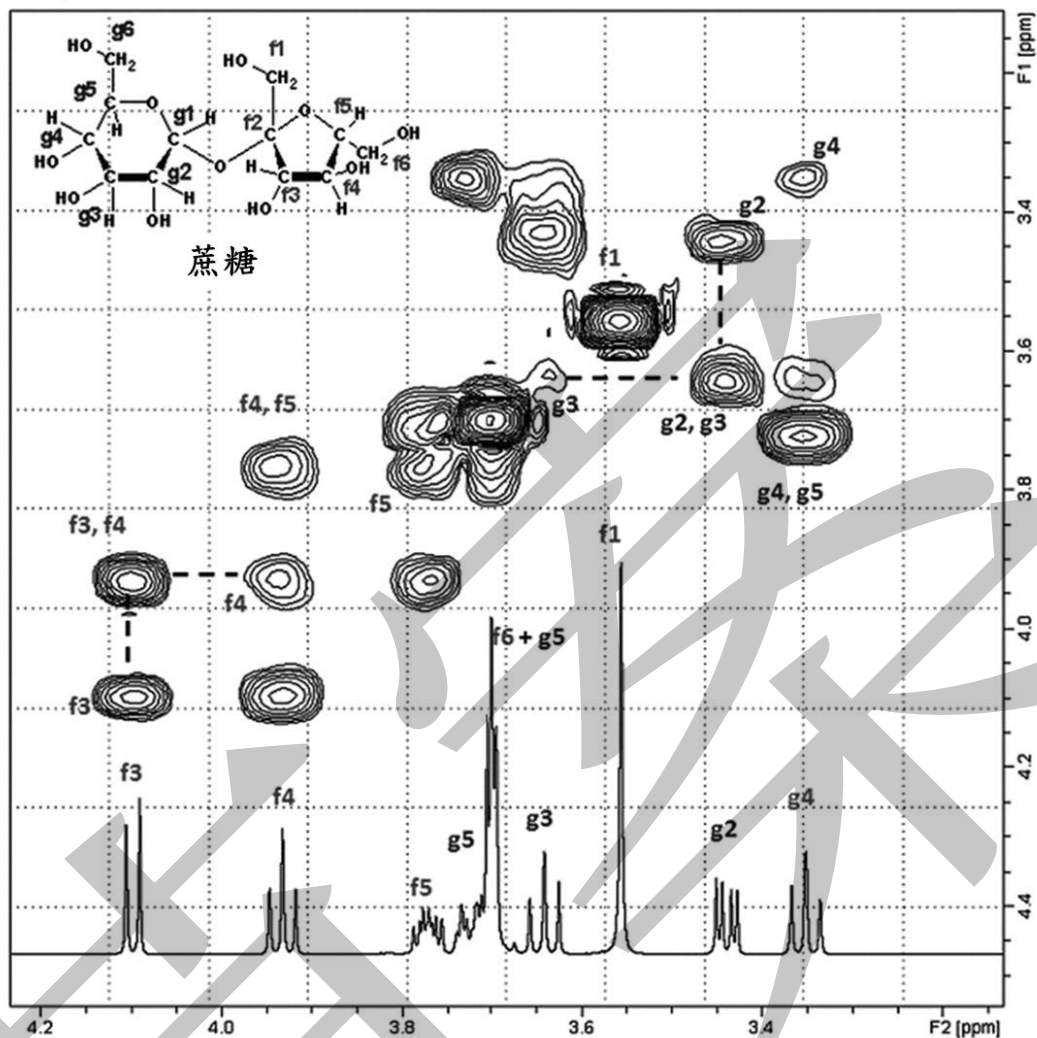


圖6 蔗糖之部分COSY光譜。虛線標示如何由兩組非對角線(f3、f4與g2、g3)等高線訊號確定兩個原子彼此耦合。

許多實驗則由原始COSY實驗改進而成。或許最重要之改變是以梯度表示之gCOSY光譜。典型之COSY用 90° 脈衝產生橫向磁化 (transverse magnetization)，並依靠elaborate phase cycling 消除不要之訊號，所以實驗時間變長。在gCOSY，配有脈衝磁場梯度 (pulsed field gradient, PFG) 之探頭，可以將xy平面上任何相關之磁化去相化。如果第二個適當強度梯度脈衝從反向施

加，會使任何已經去相化之雙量子之磁化重新聚焦。

因此只有這些訊號會被接收。梯度之強度可以用來選擇單、雙或三量子之相關性。

gCOSY之梯度脈衝可避免傳統COSY實驗造成不正確訊號之重新磁化聚焦（refocusing of magnetizations）。因此每次脈衝增加，gCOSY只需要一次擷取，而不用至少8個周期才擷取。如果檢品濃度足夠，一次擷取就產生可接受之訊噪比，且能大幅縮短實驗時間。

相位相關之COSY已經發展到可克服覆蓋鄰近化學位移之問題。

此類型COSY比傳統強度模式，有更單純且更窄之吸收訊號。

更窄之訊號使得接近對角線之訊號解析度提升。

雙量子濾波COSY（double-quantum filtered COSY, DQF-COSY）

解決了如甲基等大訊號造成之問題。這些基團之單峰訊號不會提供有用之關聯訊息，但他們之強度太強，限制了實驗之動態範圍，使得較弱之訊號難以觀察。DQF-COSY之脈衝序列只偵測有雙量子過渡情形之自旋系統。個別之單峰則不被選取，因此最後2-D光譜裡被過濾掉。此外，也會達到對角線訊號強度降低，非對角線強度增加。

8.5.2. TOCSY（或homonuclear Hartmann-Hahn, HOHAHA）

^1H - ^1H TOCSY實驗與COSY高度相關，但不同在於可以得到耦合系統中每個自旋關係。多重峰重疊在一起或有特別強之耦合時，特別有幫助。例如 $-\text{CHa}-\text{CHb}-\text{CHc}-\text{CHd}-\text{Che}-$ 裡每個H都與隔3個鍵之H耦合。在COSY光譜會顯示出每組相鄰氫原子之關聯。一方面，Hb之共振顯示其與Ha及Hc直接聯結而不與Hd直接聯結。每個H都有部分關聯。另一方面，TOCSY光譜會顯示出此結構每一自旋之所有非對角線等高線。也就是每個耦合關係可以從非對角線訊號對應到CHa、CHb、CHc、CHd及Che。如圖7所示，一個TOCSY實驗可鑑定在同一耦合系統裡之所有原子。此類模式很好辨認，尤其是當與其他耦合系統在大規模之重疊時。然而被異原子、四級碳分開之系統，或碳上有可取代氫，TOCSY無法建立起關聯。在研究有許多分開耦合系統之大分子，例如：多肽、蛋白質、寡醣及多醣時，TOCSY是很有用之工具。

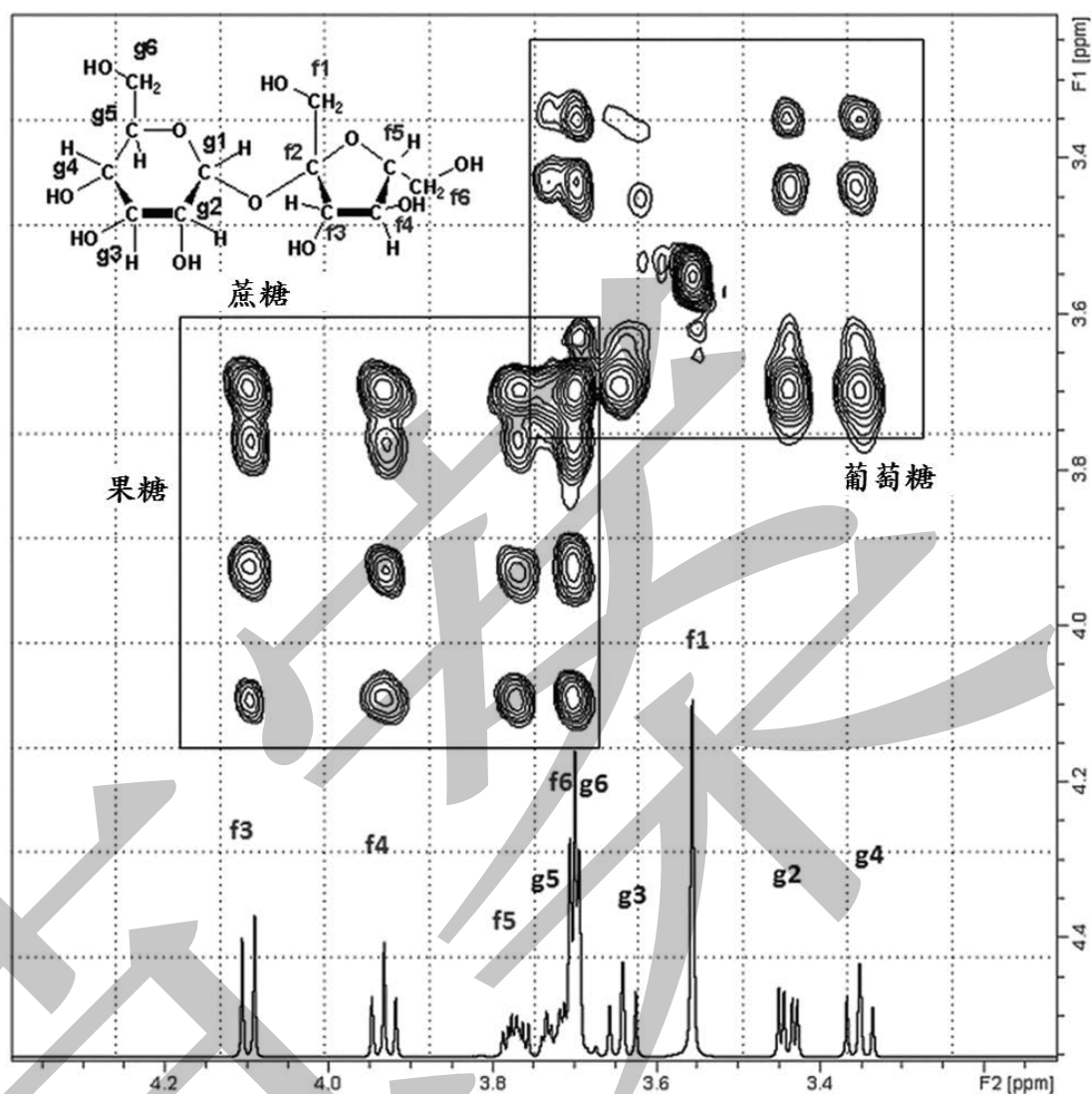


圖7 蔗糖之部分TOCSY光譜，可看到葡萄糖與果糖片段所有耦合之等高線。蔗糖之f1共振訊號落於葡萄糖自旋系統中，但沒有與其他原子耦合。

8.5.3. NOESY

NOESY可提供空間中相近之氫原子之關聯即使之間沒有由化學鍵相連。這空間關聯是透過自旋-晶格弛豫（。空間中氫原子間之偶極作用力產生核奧佛豪瑟效應（NOE）轉移，然後會沿著z軸（ B_0 ）磁化，產生COSY光譜一般無法觀察到使用之交叉

訊號強度正向或負相之變化。NOESY訊號峰之「正負值」依照研究分子之大小及可動性而定。NOESY與其他技術使用，可建立一些特定自旋之空間關係，並可提供環狀結構及構型等關鍵資訊。

8.5.4. ^1H - ^1H ROESY

ROESY與NOESY類似，同樣是研究空間中相近之氫原子之關聯即使之間沒有由化學鍵相連。ROESY是透過在座標系旋轉之自旋-弛豫現象產生光譜。ROESY實驗以spin-lock序列作混合時間，這期間NOE轉換時，所有原子自旋都被鎖定在xy平面上。與NOESY實驗中，NOE轉換發生在沿著z軸(B_0)之磁化作用，進而增加或減少強度不同，ROESY實驗是取決於在 B_1 磁場影響下之旋轉座標軸發生之NOE轉換。不管分子大小或運動快慢，得到之訊號永遠是正值。因此，當NOESY則因為分子之可動性，無法偵測到時，ROESY常常用來研究「穿透」空間之關聯。

8.5.5. 稀核雙量子轉移實驗

稀核雙量子轉移實驗 (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment, INADEQUATE) 用雙量子相關性提供 ^{13}C 與另一 ^{13}C 直接之耦合資訊。因此INADEQUATE可以提供像是COSY可用來分析 ^1H 耦合一樣類型之 ^{13}C 資訊。但因為兩個 ^{13}C 相連之機率太低（只有0.01%），所以通常是最後才用之

一類方法。現代儀器前所未有之超高低溫冷卻探頭之靈敏度，在某些情況下，可以使此實驗具有實用性。

8.6. 異核連接建立之策略

雖然同原子 ^1H - ^1H 之關聯在有機分子結構鑑定上為重要之面向，儘管大多數異原子之自然含量更低，異核連結之建立也是同樣重要，雖然困難度更高。當用 ^1H 或 ^{13}C 光譜只能解出部分結構，異核之關聯可更完整地解析這兩種光譜。異核2-D光譜不像同核有對角線之訊號。圖譜交叉訊號是出現在 ^1H 與 ^{13}C 化學位移相交處，如圖8所示。

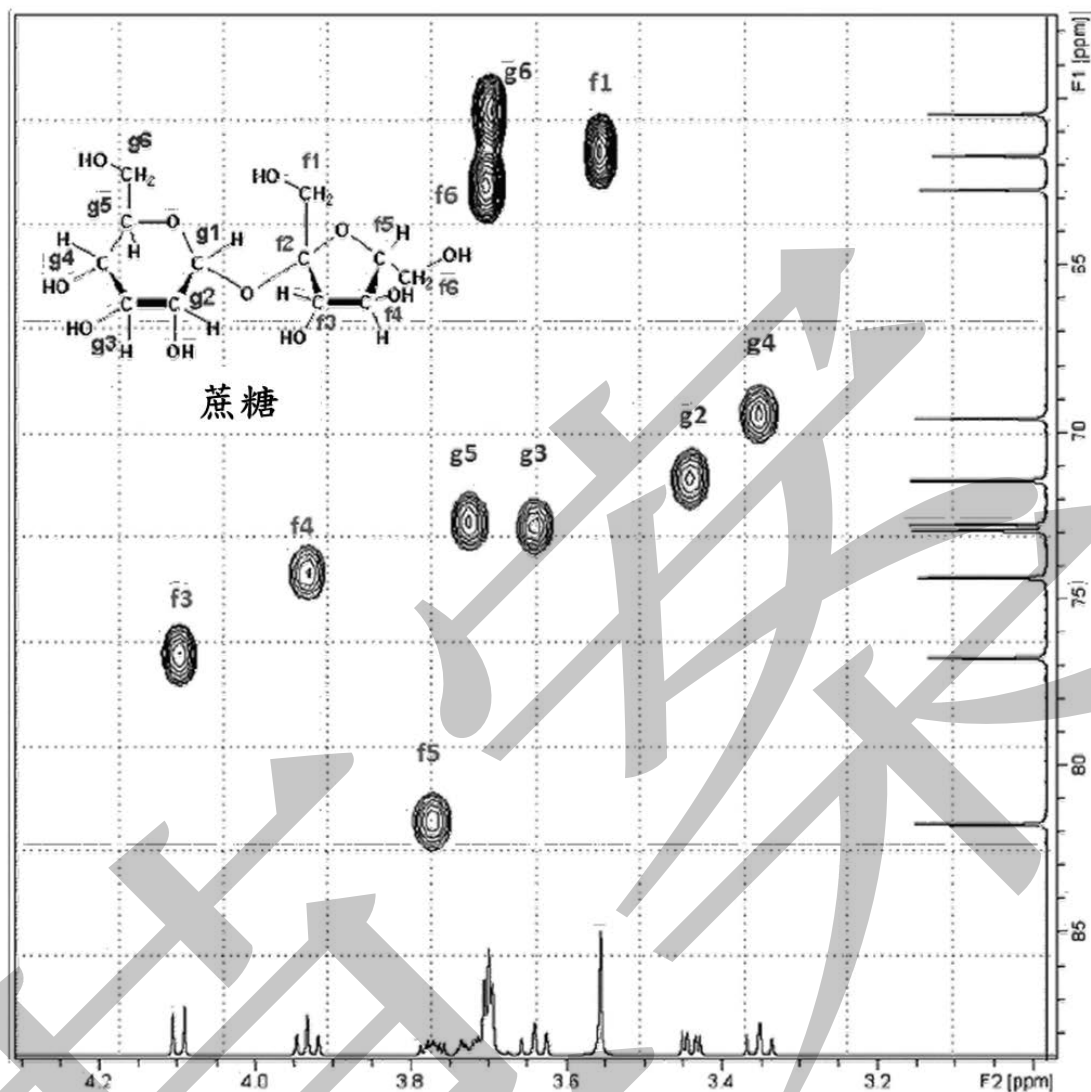


圖8 蔗糖之部分 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC光譜，等高線為某個氫原子與其附著之碳之間之單鍵連結。

異核二維光譜之設計是測量氫原子，並使用反式探頭偵測，因為 ^1H 線圈會比寬頻線圈更靠近檢品，因此會有較好之填充因子（filling factor），及 ^1H 線圈更好之靈敏度。更新型之線圈組態不用反式線圈，卻具有同樣靈敏度。典型異核二維實驗包含二維異核單量子關聯譜（Heteronuclear Single Quantum Coherence,

HSQC)、二維異核多量子關聯譜(Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HMQC)及二維異核多鍵結關聯譜(Heteronuclear Multiple Bond Correlation, HMBC)實驗。

8.6.1. HMQC

二維HMQC實驗可透過量化異核之耦合提供氫原子與附著之異原子間之關聯資訊。此程序選擇雙重量子介於非向量耦合關聯性轉移以量化 ^{13}C - ^1H 間之自旋情形。

8.6.2. HSQC

HSQC光譜與自HMQC所得到之資訊一樣，也是經由「反方向」化學位移關聯，鑑定 ^{13}C - ^1H 間之直接鍵結。與異核間之關聯是極度轉移非靈敏性核強化(insensitive nuclear enhancement by polarization transfer, INEPT)之程序選擇單量子連續轉移。用此程序取代HMQC之主要優點是 F_1 象限沒有任何H-H耦合。因此，解析度提高。

此程序之一個有趣之修飾是編輯過之HSQC實驗。這是一個對相位敏感之實驗，不只可觀察到H-C之單鍵相連，亦可觀察到甲基與次甲基之關聯之波峰，因為其與亞甲基共振相位差 180° 。

8.6.3. HMBC

HMBC光譜是從HSQC之一個修改本版，適合鑑定長範圍(>1鍵)之 ^1H - ^{13}C 連結。長範圍異核關聯光譜可得到相隔2~4個鍵

之原子核訊號。此實驗結合其他前述2-D實驗，可供詳盡之解析分子結構。

9. 定量應用

NMR為化學定量分析中最好用之工具之一。如配合適當實驗條件，共振之相對強度，會與產生這些共振之原子核之數量成比例。NMR可被設計在相對或絕對定量上，不論加或不加內標準品。

9.1. NMR定量實驗設計

定量實驗設計包含消除或精確測量基於自旋-晶格弛豫、NOE之強度差異。所有原子共振之自旋-晶格弛豫時間 (T_1) 可利用反轉回復脈衝 (inversion recovery pulse) 測量。如使用 90° 脈衝激發，在一個週期時期 (T_r ，弛豫時間、擷取時間之總和，5倍 T_1) 大約可定量至99.3%之程度。使用更長之週期時間、較短之脈衝，可以達到更高之水平。定量率 (degree of quantitation, Q) 之一般公式可用脈衝角度、 α 、 T_r 、 T_1 表達成：

$$Q = \frac{1 - e^{-T_r/T_1}}{1 - (e^{-T_r/T_1} \cdot \cos(\alpha))} \quad (22)$$

如使用 45° 激發脈衝，其中 T_r 為 $5T_1$ ， Q 為 0.998。然而，最終頻譜之定量準確性，不只依賴共振 Q 值，也與積分方法準確性及頻譜訊噪比有關。因此，必須要保證 Q 值比 1 還小，並使用其他角度與週期時間。

系統定量偏差之最小化應足以滿足該程序之預期用途。或者，可使用對於部份或所有共振條件不一致之 Q 值來開發定量程序，前提是 Q 值是精確測量並經過校正。

在使用異原子定量方法時，差異性NOEs之可能性應該使用 T_r （至少要最長 T_1 之5倍）及反式閘控去耦合（只在擷取時間閘控去耦合）去避免。比較好的方式是使用 90° 脈衝。在定量方法中，弛豫劑通常用來縮短異原子之 T_1 值。

一個NMR方法之再現性決定於許多擷取及程序之參數，全部上述過程都應在步驟中描述。包含脈衝角度、擷取時間、弛豫延遲、圖譜寬度、FID之點數、擷取次數、零填滿之資料數量（若有）、線寬、基線校正、積分斷裂及溫度。為求最佳之再現性， ^1H NMR積分斷裂需要精確到0.01 ppm， ^{13}C NMR則要精確到0.1 ppm。

現代儀器使定量分析有顯著進步，包含微量雜質偵測。近年來，強磁場與先進探頭技術增進了NMR之靈敏度。

10. 固態NMR

同樣原子核因為在不同之固態環境中會展現不同之共振頻率，使得以固態NMR分析固體材料上很具實用性。此一技術可以應用於藥物分析之領域從固態（同質異晶物、溶劑合物）之鑑定、散裝藥物物質之量到劑型物化性質。技術特點在於可以長時間探測特

定原子核於固態電子環境，而不需要取得單晶物質或均質檢品。

接下來討論固態NMR最常見 ^{13}C 之方法步驟。同樣觀念也可套用到其他自旋量子數為 $1/2$ 之原子核，例如自然含量低之 ^{15}N ，或含量高之 ^{31}P 。

10.1. 交叉極化魔角旋轉NMR技術

液態、固態NMR之基礎理論一樣，但傳統液相1-D NMR資料擷取技術，應用於固態檢品時卻因為低靈敏性、廣泛性之訊號寬化嚴重，不能產生可偵測之光譜。由於 ^{13}C 之自然含量僅1.1%、自旋-晶格弛豫時間(T_1)長，因此，固態實驗之靈敏度很低。

訊號寬化會因為偶極-偶極作用力與化學位移各向異性

(chemical shift anisotropy, CSA)而增加。固態因為分子被固定在一起，使CSA平均後不為0，在液態時，檢品則因為分子在液體裡快速擾動，使CSA平均後為0。如不平均，會同時觀察到分子因外加磁場所有不同方向之結果。CSA光譜現象可能涵蓋全液態光譜之寬度。標準溶液三種修飾之方法—交叉極化

(cross-polarization, CP)、魔角旋轉(magic angle spinning, MAS)

及高能量 ^1H 去耦合之組合為常規使用之高解析固態NMR光譜法。

10.1.1. 交叉極化

CP針對靈敏度低，例如自旋量子數為-1/2之稀少核種，例如 ^{13}C 。

CP是雙共振程序，會施加兩個自旋-鎖定之射頻磁場（ B_{1H} 與 B_{1C} ），同時共振含量豐核種 ^1H 與稀少核種 ^{13}C ，具磁場強度可滿足Hartmann-Hahn之匹配條件，

$$\gamma_H B_{1H} = \gamma_C B_{1C} \quad (23)$$

在接觸期間，極化轉移使豐核 ^1H 自旋之磁化及延遲情形轉移到稀核 ^{13}C 自旋上，使靈敏度提升(因為 ^1H 、 ^{13}C 旋磁比相差近4倍)，並減少脈衝重複時間。減少脈衝重複時間可以大幅增加單位時間累積之擷取次數，訊噪比也會更佳。例如，因 ^1H - ^{13}C 耦合太弱或旋轉座標（ T_{1rH} ）下自旋-晶格弛豫時間太短，而難以或無法紀錄CP光譜，直接極化(direct polarization，亦稱為Bloch decay)可能是唯一紀錄固態NMR光譜之方法

10.1.2. 魔角旋轉

用MAS與高能量 ^1H 去耦合可消除或平均固態NMR之線寬。

MAS涉及機械式，以相對靜磁場方向 54.7° 之角度（魔角）旋轉檢品，以模擬分子在溶液中擾動之情形。固態檢品以魔角旋轉（Hz）必須轉得比CSA之寬還快才能降低線寬。現在之MAS探頭技術可以用在高速旋轉，但加上CP就會變得複雜，可能需要如ramped-amplitude CP（RAMP-CP）與variable-amplitude CP

(VACP) 等技術來增進¹H磁化轉移之效率。此外，如果不控制MAS，檢品溫度會明顯升高、轉子周圍壓力比常壓大數千倍。高壓可能使檢品產生相變化、損失溶劑與其他影響。

10.1.3. 側峰抑制

如圖9所示，低轉速可避免固態樣品被平均化，但當CSA平均不完全，自旋側峰 (spinning sidebands) 就會出現在固態NMR光譜內。這些雜訊會從中央峰，由積分多重峰之自轉速度 (Hz) 分離出來，而且可於不同轉速下之光譜分辨出這些位移。自旋側峰有很多有用資訊，但會干擾有興趣之訊號，特別是儀器在更高磁場下，可能會產生問題。側峰全抑制 (total suppression of spinning sidebands, TOSS) 實驗是常用來消除固態NMR光譜之旋轉側峰。

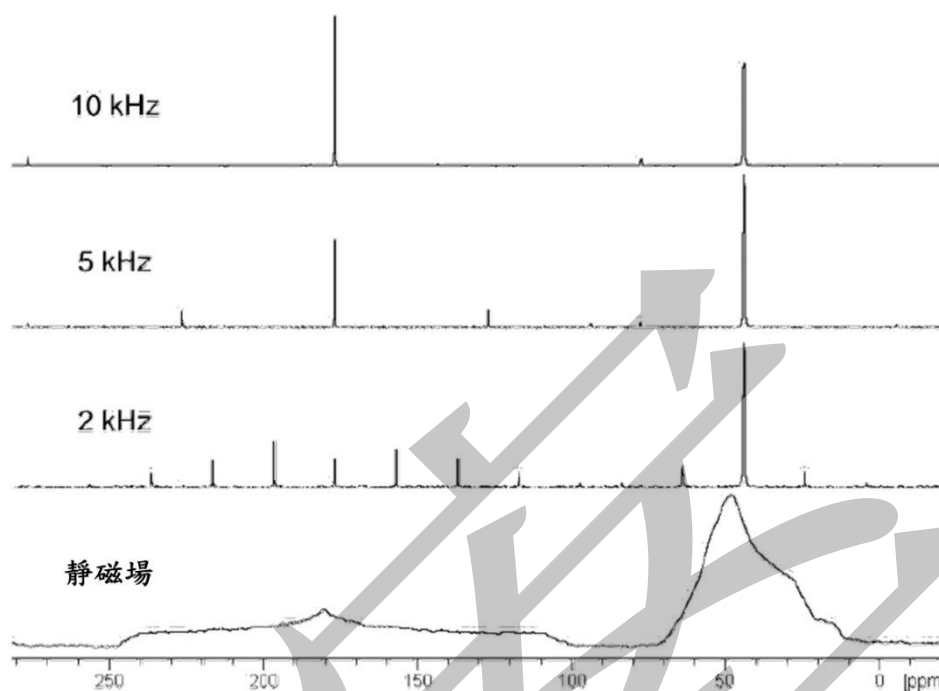


圖9 在MAS不同轉速下所得 α -甘胺酸多晶體之 ^{13}C CPMAS NMR光譜。當旋轉頻率低於CSA模式之寬，旋轉側峰就出現在固態NMR光譜裡。

10.1.4. 高能量 ^1H 去耦合

高能量 ^1H 去耦合可進一步將固態 ^1H 自旋偶極耦合之線寬降低。

固態 ^1H 去耦合需要特殊硬體設備傳送射頻，比液態移除量化耦合之強度還要大上2個數量級。連續波去耦合常用在固態NMR，雖然雙脈衝相調整，及小相位遞增交變（SPINAL-64）去耦合越來越常用來增加稀檢品之靈敏度及解析度。

一般來說，當需要有機物之固態 ^{13}C NMR光譜時， ^1H - ^{13}C 異核偶極作用力才重要。同原子 ^{13}C - ^{13}C 偶極偶極與量化耦合作用是可以忽略的。因為它們自然含量低，兩個 ^{13}C 原子核相鄰之機率

非常低。然而被 ^{13}C 標定之物質就需要考慮到同原子 ^{13}C - ^{13}C 偶極耦合。

10.1.5. 實驗裝置

CPMAS實驗之基本裝置必須包含魔角設定、勻場、脈衝校正、Hartmann-Hahn匹配條件及光譜參考，所述每一項一般都會以標準品進行。固態NMR實驗需要精確測量脈衝長度與相關之射頻強度值。探頭設定與性能評估包含魔角設定、CPMAS探頭勻場，還有於不同微調範圍測量其靈敏度。MAS固態NMR探頭勻場比液態檢品之探頭還複雜，因為勻場梯度是設計給垂直方向之溶液NMR檢品管。固態NMR探頭沒有 ^2H 鎖定頻道，也就必須手動勻場。由於本質上訊號較寬，固態NMR勻場不需要像液態NMR一樣那麼嚴苛。

用來設定交叉極化之魔角、最佳化脈衝長度、相關射頻強度之標準化合物列在表6。溴化鉀 (KBr) 常用於魔角校正，藉由 ^{79}Br 共振，調整檢品旋轉角度到最大化FID之旋轉回波之長度（到10 ms或更長）。液態檢品可用來勻場固態NMR探頭，儘管這通常會以固態金剛烷 (adamantane) 來完成。金剛烷、甘胺酸 (glycine)、六甲苯 (hexamethylbenzene, HMB) 常用來測試Hartmann-Hahn之匹配條件及靈敏度。一般來說，測試靈敏度

之參考品是長期密封裝在轉子內，確保檢品之數量相同。

表6 常見CPMAS實驗之校正標準品

步驟	核種	標準品
設定魔角	^{79}Br	溴化鉀
勻場	^{13}C	金剛烷
脈衝校正	^1H 、 ^{13}C	金剛烷、六甲苯
Hartmann–Hahn 匹配條件	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	金剛烷、六甲苯
靈敏度	^{13}C	六甲苯、金剛烷、 α - 甘胺酸

一般固態NMR沒有場/頻率鎖定，所以化學位移精確度沒有用來測液體檢品來得高。一級或二級標準品可用來校正化學位移。

光譜參考通常用檢品取代（外部參考）。表7為常見用在光譜參考之固態NMR標準品。注意甘胺酸為多型態的，所以用來當參考光譜之前要確認晶型。

表7 常見固態NMR之標準品

原子核	一級標準品	二級標準品	一級標準品 之化學位移 (ppm)

^{13}C	四甲基矽烷	六甲苯、金剛烷、 α -甘胺酸	17.35 (CH_3) 38.48 (CH_2) 176.45 (carboxyl)
^{15}N	硝基甲烷	$\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ α -glycine- ^{15}N	-5.1 (NO_3) -338.1 -349.5
^{31}P	85% H_3PO_4	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (鈣磷石)	1.4
^{29}Si	四甲基矽烷	四 (三甲基矽甲烷)	-1.4
^{19}F	CF_3Cl	六氟苯	-166.4

10.2. 一般測試步驟

儀器首先應以參考檢品測試性能，如在前述交叉極化魔角自旋 NMR 技術實驗裝置實驗設定章節中所述。以與檢品無關之參考化合物建立交叉極化之魔角、脈衝長度、相關射頻強度。為了獲得檢品之 CP 光譜，只需選擇循環延遲時間，接著是接觸時間。當不需要定量訊號強度，理想循環延遲時間，亦即獲得最佳之訊噪比，是 $1.2 T_{1H}$ ，則接觸時間一般為可提供最佳訊噪比或可顯示大部分關注之特徵。定量 CP 時，循環延遲時間至少要異質混合物最長 T_{1H} 之 5 倍，才能確保有完整之弛豫時間，且須完全分析 CP 訊號以作為接觸時間函數。見下述定量分析次項。

10.2.1. 檢品製備

處理固態NMR檢品之步驟，在本質上跟液體NMR不一樣。固態檢品是放置在陶瓷轉子中，蓋上為MAS特製有凹槽蓋子。通常細粉檢品直接填塞進MAS轉子裡，雖然完整錠劑等固體可切成正好符合轉子內部之大小，直接置入。壓碎或磨碎也可使檢品變細粉，但要小心不致造成相轉變。依轉子體積與粉末壓縮性，一般需要40~400 mg之材料以填充至檢品轉子。

10.3. 物理特性

異質系統之特定組成物，可用獨特之核種或不同NMR弛豫特性進行搜尋。鑑定晶體或非晶型材料可用比較檢品與標準品之固態NMR光譜來達成。化學位移與訊號之相對強度可用來比較。非晶型材料通常有好的MAS光譜，訊號比晶體材料寬。高度晶體檢品 ^{13}C 線寬邊界約在數十個Hz之等級。訊號形狀通常介於Lorentzian與Gaussian之間，為應用於鑑別重疊波峰解析鑑別之因子。

10.4. 弛豫

在固態NMR中令人感興趣之弛豫參數包含：自旋-晶格弛豫(T_1)、旋轉座標之自旋-晶格弛豫($T_{1\rho}$)、自旋-自旋弛豫(T_2)及交叉弛豫(T_{CP})。有機固體 ^1H 自旋擴散通常很有效率，所以純化合物具單一之弛豫時間(T_1 與 $T_{1\rho}$)。交叉極化實驗之 T_{1H}

可用來計算擷取間之循環延遲時間。 T_{1H} 弛豫時間可利用交叉極化脈衝序列之延遲發展飽和或反式恢復脈衝序列經由 ^{13}C 訊號進行測量。CP實驗之 T_{CP} 、 $T_{1\rho H}$ 以建立磁化及衰減為其特色。 $T_{1\rho H}$ 是使用了在變動之延遲時間接觸CP脈衝序列，透過 ^{13}C 訊號測量，該脈衝序列再CP接觸前具有可變動之延遲時間。

10.5. 定量分析

為了在CP條件下定量固態NMR，額外測量是必須要的。另外為了確保檢品旋轉軸在魔角（ 54.7° ）以減少CSA寬化，溫度與轉速都必須小心控制，MAS探頭也要適當調撥。建議循環延遲時間（5倍 T_{1H} ）分配於接下來的一個脈衝之間，確保磁化已經回復到完全平衡之數值。 T_{CP} 、 $T_{1\rho H}$ 弛豫一定要納入所選擇之接觸時間之說明。一般來講，選擇之CP接觸時間可為有興趣之訊號提供最大靈敏度。定量分析可用內部或外部參考方法。內部標準品可補償檢品體積與 B_1 在檢品內不均一性之問題。適當地設定資料擷取參數（週期時間、脈衝寬度、接觸時間、Hartmann-Hahn匹配條件及每個化學系統之去耦合強度），產生訊號之原子核會與訊號強度成比例。在定量分析時，應使用積分訊號強度而不是訊號高度，因為固態光譜線寬之變異通常很大。當自旋側鋒無法用MAS消去，那麼自旋轉側峰之強度則要

計算到中央帶之強度中。

10.6. 光譜編輯

分析任何NMR光譜之關鍵步驟是指定個別共振到特定之區隔中，或在一些例子是指定分子內特定之原子。目前有特殊脈衝序列可幫助簡化CPMAS光譜及訊號鑑定訊號。偶極去相位（dipolar dephasing），或稱非四級碳抑峰、中斷式去耦合，可以得到只有四級碳與甲基訊號之光譜。由正常或短接觸時間CP光譜，經過光譜刪減法得到偶極去相位光譜後，可以得到只有亞甲基與次甲基之子光譜。極化反轉（polarization-inversion）技術可用來辨認亞甲基與次甲基之碳原子。

11. 低磁場NMR

低磁場NMR (low field NMR, LF-NMR) 實驗，有時也稱時域NMR (time domain NMR, TD-NMR)，可以測量弛豫、弛豫譜學 (relaxometry) 或擴散。這些應用儀器學是基於操作頻率在2~25 MHz範圍之間之低磁場永久磁鐵技術。市面上可買到平價固定在實驗桌上但可移動之TD-NMR光譜儀。一般容納孔之孔徑大小是直徑10~50 mm。近期在儀器之發展是使用移動式老鼠探頭，取代固定磁鐵。此項設計可以分析之檢品大小不受限制。

大多數時域NMR (TD-NMR) 應用是基於簡單之脈衝序列，包括

FID、Hahn-echo、Carr-Purcell-Meiboom-Gill及solid-echo擷取。

脈衝序列之選擇取決於檢品之物化性質，及欲從實驗中獲得之資訊為何。這些系統可用來測量縱向弛豫（自旋-晶格， T_1 ）與橫向弛豫（自旋-自旋， T_2 ）。化合物之擴散性質可以利用脈衝梯度場（pulsed field gradient, PFGNMR）實驗。

弛豫譜學傳統之應用是以水、脂肪及蛋白質之縱向與橫向弛豫之時間差來確認食物產品之組成。

11.1. 弛豫率

一種物質增強一個原子核弛豫速率之能力強度，稱為弛豫率，單位表示為 $\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 。此類物質常用於NMR之一個例子是順磁乙醯丙酮鉻（III）（paramagnetic chromium acetylacetonate）。順磁系列化合物在醫療工業用途中為磁共振造影之造影劑。物質之弛豫率由測量待測物之自旋-晶格弛豫（ T_1 ），再將 $1/T_1$ 對濃度（單位為mM，mmol/L）作圖而決定。曲線斜率即為弛豫率數值。