

# 出國報告（出國類別：實習）

## 核磁共振光譜儀訓練課程

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：陳欣郁 技正、黃子凌 技士

派赴國家：日本

出國期間：108 年 10 月 27 日至 11 月 2 日

報告日期：109 年 1 月 14 日

## 目錄

摘要.....	3
壹、目的.....	4
貳、行程安排.....	5
參、訓練課程內容/過程 .....	6
肆、心得與建議.....	26
伍、附錄.....	28

## 摘要

核磁共振光譜儀(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)有高專一性、操作步驟簡單、不破壞樣品及資訊蒐集具即時性等優點，不但可應用於化學結構及未知物分析，還可以應用在定量及食品摻偽等領域，近年來成為國際上相當重視之食品及藥品檢驗新穎技術。本署亦於 108 年度購置 500 MHz 核磁共振光譜儀 1 台，已成功應用於同年度爆發的「咖啡豆產地摻偽事件」之定量檢驗工作，同時亦支援各項未知物分析及標準品純度確認等案件或研究。為強化同仁對 NMR 原理之認識、操作及應用，並使操作人員具備基本故障排除及儀器維護能力，本署於 108 年 10 月 28 日至 11 月 1 日派員前往日本電子株式會社(JEOL)位於東京都之工廠，參與「核磁共振光譜儀訓練課程」，內容包含 500 MHz NMR 之軟硬體操作與維護教學、一維及二維 NMR 試驗操作、定量核磁共振(quantification NMR, qNMR)原理及操作、CRAFT 和 DEPT 原理及操作、其他儀器介紹與展示等，訓練扎實且講師說明詳細，試驗均有親自參與操作之機會，可謂獲益良多。

## 壹、目的

核磁共振光譜儀(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)有高專一性、操作步驟簡單、不破壞樣品及資訊蒐集具即時性等優點，被應用於化學結構分析、未知物分析及定量等領域，近年來作為食品及藥品檢驗之新穎技術而受到國際重視。本署作為國家實驗室，於 108 年度購置 500 MHz 核磁共振光譜儀 1 台，已成功應用於同年度爆發的「咖啡豆產地摻偽事件」之檢驗工作，同時亦支援各項未知物分析及標準品純度確認等案件或研究。

因 NMR 為高階精密儀器，儀器維護及數據判讀皆具高度專業性，為強化同仁對 NMR 原理之認識、操作及應用，並使操作人員具備基本故障排除及儀器維護能力，職等奉派前往日本電子株式會社(JEOL)位於東京都之工廠，參與「核磁共振光譜儀訓練課程」，期間除提升自我專業技能，更瞭解國際間核磁共振技術應用實例，同時汲取各式新興檢驗技術知識，期能回饋於我國檢驗方法之開發與相關研究之執行。

## 貳、行程安排

JEOL 公司總部位於東京都昭島市，主力產品為電子顯微鏡，另有開發 NMR、質譜儀(mass spectrometer, MS)、X 光螢光光譜儀(X-ray fluorescence spectrometer, XRF)等分析儀器，並具研發生產各式分析儀器配件套組之能力。本次 NMR 訓練課程自 108 年 10 月 28 日至 11 月 1 日，為期 5 天，內容包含 500 MHz NMR 之軟硬體操作與維護教學、一維及二維 NMR 試驗操作、定量核磁共振(quantification NMR, qNMR)原理及操作、其他儀器介紹與展示等，講師群為大谷圭一(OTANI Keiichi)、Pavlos Stampou、染野豐(SOMENO Yutaka)及小松功典(KOMATSU Takanori)博士等人，訓練扎實且講師說明詳細，試驗均有親自參與操作之機會，可謂獲益良多。

時間	行程
108.10.27	去程(台北-日本東京)
108.10.28	核磁共振光譜儀訓練課程-NMR 定量概述
108.10.29	核磁共振光譜儀訓練課程-NMR 定量實作
108.10.30	核磁共振光譜儀訓練課程-CRAFT、秤重和 NMR <sup>13</sup> C 圖譜
108.10.31	核磁共振光譜儀訓練課程-DEPT 和 2D
108.11.1	核磁共振光譜儀訓練課程-結構解析、其他質譜課程-DART、MS
108.11.2	返程(日本東京-台北)

## 參、訓練課程內容/過程

### 一、核磁共振原理解說

原子序或質量數為奇數之原子核，具有核自旋(nuclear spin)及自旋角動量之特性，這類原子核就像一塊磁鐵而有核磁矩(nuclear magnetic moment)，當置於一外加靜磁場  $H_0$  中，原子核感受到之磁場強度為  $B_0$ ，核自旋量子數(spin quantum number,  $I$ )不為零，且核磁矩將沿著  $B_0$  呈現螺旋型的「拉莫進動(Lamor precession)」狀態；反之，若一原子之質量數為偶數，則核自旋量子數為零，亦不會有核磁矩與外加磁場作用。

$$B_0 = \mu_s H_0$$

( $\mu_s$ ：磁化係數)

NMR 即是針對具有核自旋與自旋角動量之原子核，在外加磁場中產生能階分裂，進行分光測定之方法，如上述說明，但並非所有原子核均能被 NMR 偵測，目前最普遍使用的是氫譜( $^1\text{H}$ )及碳譜( $^{13}\text{C}$ )測定。

原子序	質量數	核自旋量子數 ( $I$ )	範例
奇數或偶數	奇數	$\frac{1}{2}$ 、 $\frac{3}{2}$ 、 $\frac{5}{2}$ .....	$^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ ...
奇數	偶數	1、2、3 .....	$^2\text{H}$ ( $D$ ) ...
偶數	偶數	0	$^{12}\text{C}$ 、 $^{16}\text{O}$ ...

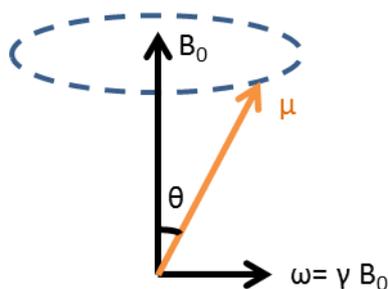
當  $I$  不為零之原子核處於外加靜磁場中，原子會有  $2I+1$  種排列狀態。以  $^1\text{H}$  為例， $I = 1/2$ ，則在外加靜磁場中會有 2 種排列，分別為與外加靜磁場方向相同、能態較低之  $1/2$  ( $\alpha$  spin)，及與外加靜磁場方向相反、能態較高之  $-1/2$  ( $\beta$  spin)，此能態之分裂稱為「塞曼效應(Zeeman effect)」，而能態分布比例會依循「波茲曼分布(Boltzmann distribution)」之原理，低能態之原子核分布較多，高能態之原子核

分布較少，且低能態原子核可透過吸收電磁波躍遷至高能態，該電磁波所需之頻率可透過以下公式計算：

$$\mu = \gamma I h$$

$$\Delta E = h \nu = \mu B_0 \cos\theta - (-\mu B_0 \cos\theta) = \gamma h B_0 / 2\pi$$

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi$$



其中， $\mu$  為磁矩(magnetic moment)、 $\gamma$  為核旋磁比(nuclear gyromagnetic ratio)、 $h$  為普朗克常數(Planck constant)、 $\omega$  為角速度(又稱為拉莫頻率 Lamor frequency)，而  $\nu$  為電磁波之頻率，由上述計算式可知電磁波所需頻率與磁場強度成正比，且當正確頻率之電磁波被低能態之原子核吸收，產生共振，原子核即躍遷至高能態。每特斯拉(tesla, T)之外加磁場中，可使  $^1\text{H}$  共振之頻率為 42.5771 MHz，而 NMR 儀器即是以  $^1\text{H}$  之共振頻率區分為 400 MHz、500 MHz 及 600 MHz 等型號。

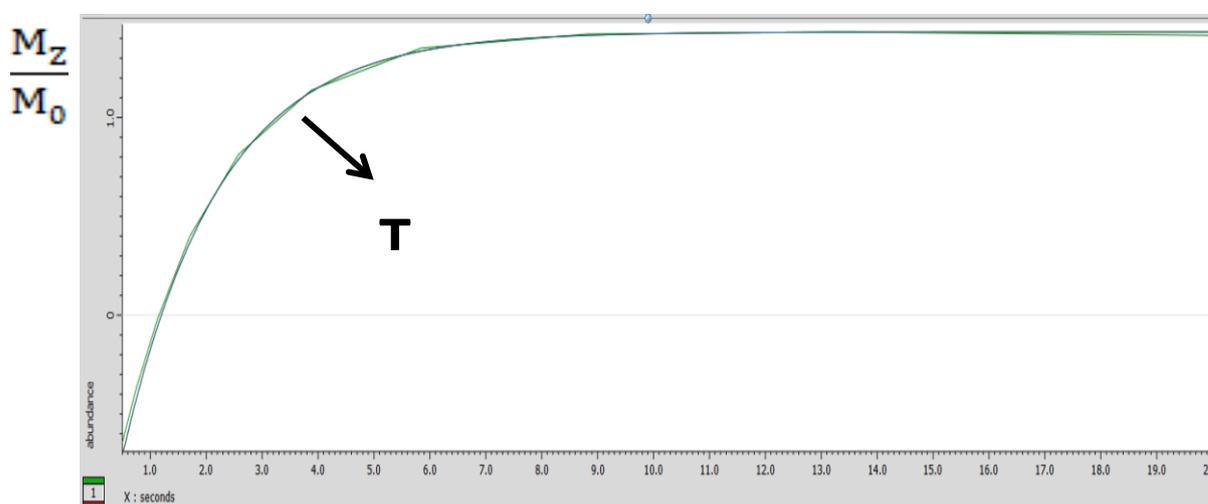
原子	磁場強度 (T)	共振頻率 (MHz)
$^1\text{H}$	9.39	400 MHz
	11.74	500 MHz
	14.09	600 MHz

被激發至高能態之原子核於電磁波停止後，將由激發態回到基態，此現象所需之時間由「弛豫(relaxation)」之作用速率所控制。所謂弛豫，可由能量傳遞之方向分為「自旋-晶格弛豫(spin-lattice relaxation)」(或稱「縱向弛豫(longitudinal relaxation)」)，以及「自旋-自旋弛豫(spin-spin relaxation)」(或稱「橫向弛豫

(transverse relaxation)」)，兩者之作用時間常數分別為  $T_1$  及  $T_2$ ，因此又分別稱為「 $T_1$  弛豫」及「 $T_2$  弛豫」。

### (一)自旋-晶格弛豫(縱向弛豫、 $T_1$ 弛豫)

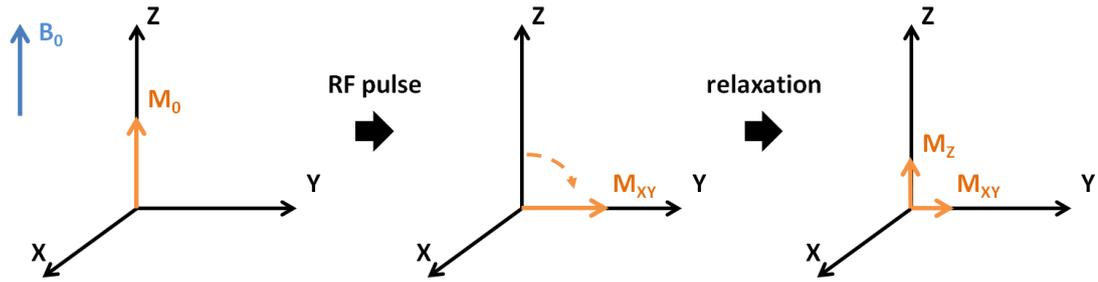
以磁場  $B_0$  方向為  $Z$  軸，若電磁波脈衝(radio frequency pulse, RF pulse)以垂直於磁場方向之  $X$  軸發射，原子核之淨磁矩  $M_0$  將倒向  $XY$  平面；當電磁波停止後，淨磁矩在  $Z$  軸方向之向量  $M_z$  將隨時間回復至熱平衡狀態  $M_0$ ，過程所需之時間常數為  $T_1$ 。圖一為本次訓練使用 NMR 測定  $^1\text{H}$  之  $T_1$  結果。



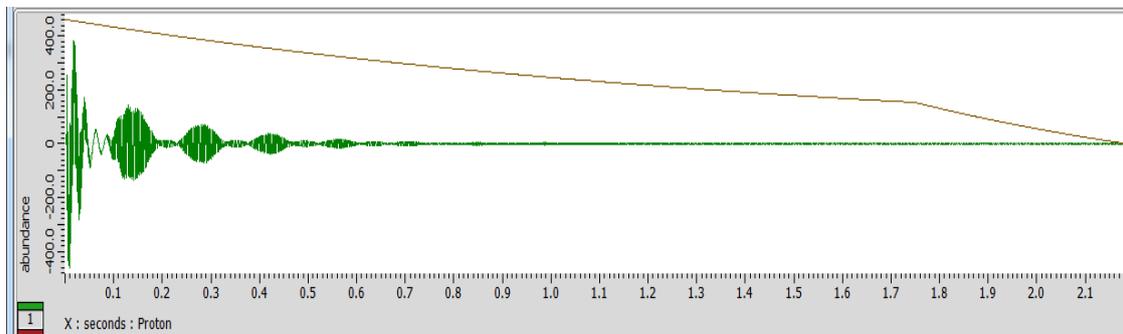
圖一、NMR 測定  $^1\text{H}$  之  $T_1$  結果

### (二)自旋-自旋弛豫(橫向弛豫、 $T_2$ 弛豫)

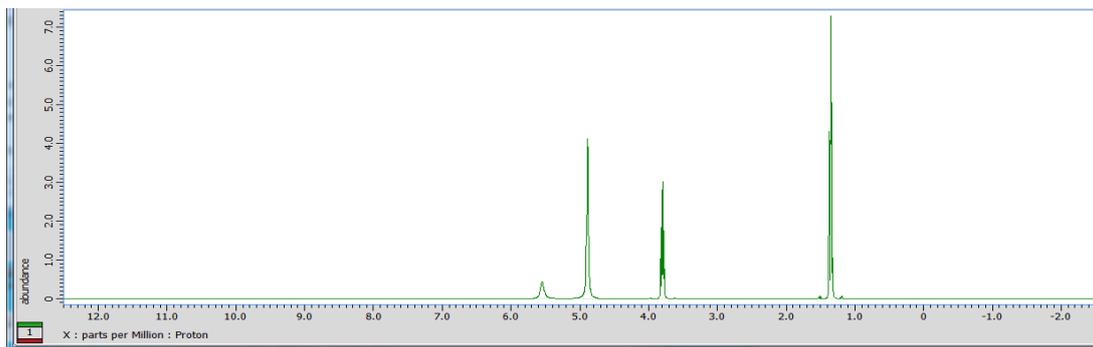
承(一)，淨磁矩  $M_0$  於  $XY$  平面之向量  $M_{xy}$  將隨時間衰退至零，時間常數為  $T_2$ 。



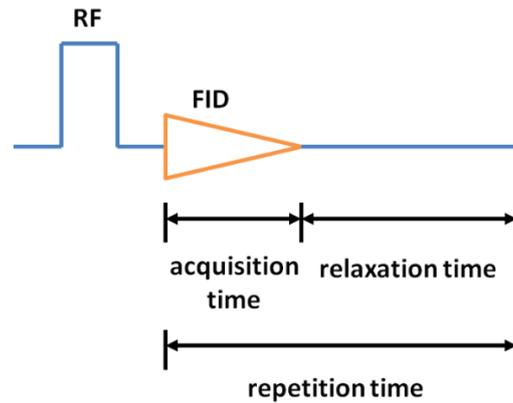
當原子核吸收脈衝能量共振時會產生電訊號，而原子核由激發態至弛緩回到基態之過程，訊號衰變之現象稱為「自由感應衰減 (free induction decay, FID)」，亦是 NMR 分析時儀器測定之訊號原始表現模樣：



當 FID 訊號透過「傅立葉轉換(Fourier transform)」為頻率訊號後，即可得到 NMR 圖譜如下圖：

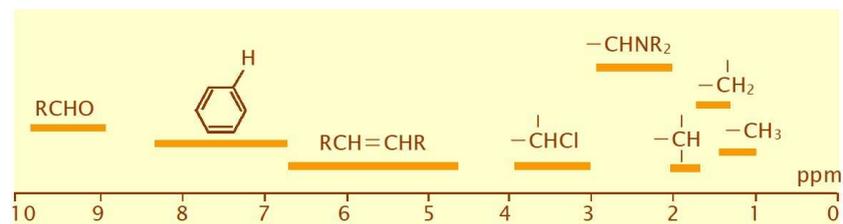


綜上所述，NMR 作用流程可簡化如下圖：



須注意若要  $M_z$  完全回復為  $M_0$  需要相當長的時間，一般將回復至 99% 的狀態視為完全回復，則 NMR 收集訊號時，45 度脈衝之弛豫延遲時間需設置為 3 個  $T_1$  時間，90 度脈衝之弛豫延遲時間則為 5 個  $T_1$  時間，且在儀器參數設定時須注意弛豫延遲時間是否超過 repetition time，以避免訊號蒐集之不完整及雜訊之出現。

執行 NMR 分析時，檢體並不只包含單一個原子核，分子中的各個基團會因鍵結、分子構型及電負度等因素造成之電子屏蔽效應，而出現不同程度的「化學位移(chemical shift,  $\delta$ )」現象。電子濃度分布越高的地方，將產生越強的屏蔽 (shielding)，阻擋外加磁場對原子核之共振作用。一般 NMR 試驗中定義無化學位移之四甲基矽烷(tetramethylsilane, TMS)為參考，於氫譜中各基團之化學位移分布如圖二所示。



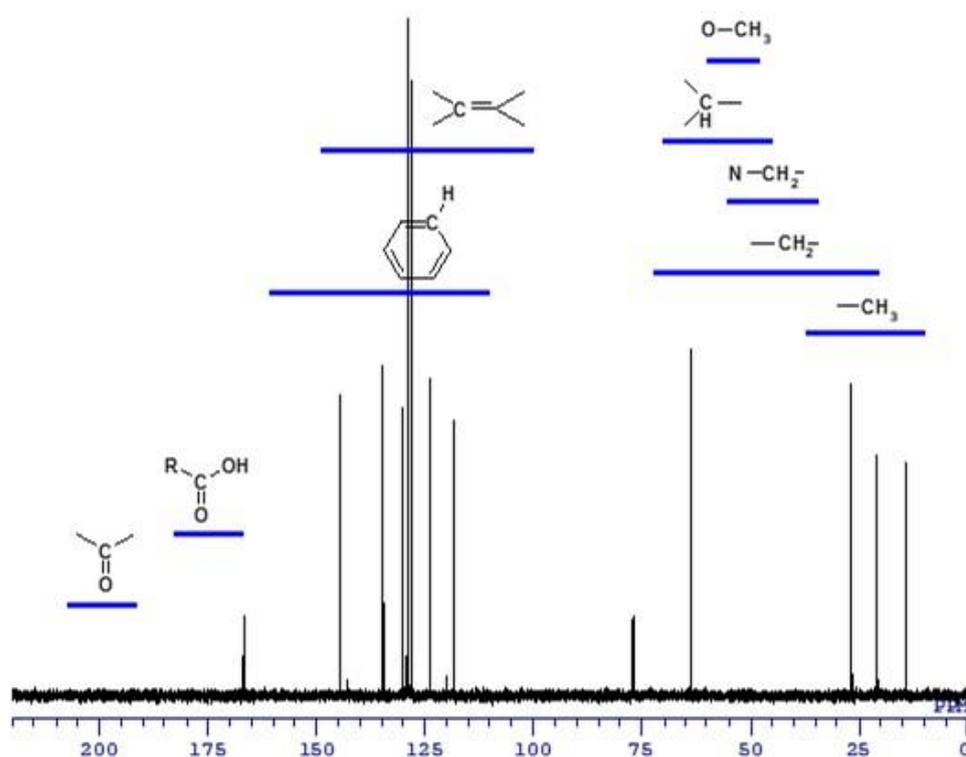
圖二、 $^1\text{H}$  之化學位移

當屏蔽作用越多，原子核受到外加磁場共振少，NMR 訊號位置會處在低頻率(低 ppm)之 up field 位置；反之，若屏蔽作用弱，NMR 訊號位置會處在高頻率(高 ppm)之 down field 位置，此一現象是解讀 NMR 圖譜之基礎。

### (三)核磁共振碳譜( $^{13}\text{C}$ NMR)

$^{13}\text{C}$  NMR 圖譜為解析有機化合物結構的重要工具，經常用來與  $^1\text{H}$  NMR 圖譜結合鑑定有機化合物結構。

核子(nucleus)磁自旋量子數(magnetic spin quantum number ; I)為 0 者，無法產生 NMR 訊號，而  $^{12}\text{C}$  核子  $I = 0$ ，故 NMR 不能測定  $^{12}\text{C}$  訊號，而碳同位素  $^{13}\text{C}$  核子  $I = 1/2$ ，可被 NMR 測得訊號；然而，自然界之  $^{13}\text{C}$  的同位素含量只有 1.1%，且碳的旋磁比僅約為氫的 1/4，因此， $^{13}\text{C}$  的 NMR 訊號靈敏度比  $^1\text{H}$  低很多。於碳譜中各基團之化學位移分布如圖三所示。



圖三、 $^{13}\text{C}$  之化學位移

## 二、NMR 儀器構造認識

NMR 儀器主要由操縱台(console)、前置放大器(pre-amplifier)、超導磁鐵(superconductive magnet)及探頭(probe)組成，如照片 1 所示。



照片 1：本次研習使用之 JEOL 500 MHz NMR

其中，超導磁鐵需充填液態氮(LN<sub>2</sub>)及液態氦(LHe)，兩者均須定期補充，LN<sub>2</sub> 雖用於保護並延緩 LHe 流失，但若疏於維護而使 LHe 含量降低至超過儀器警告界線，將造成磁鐵內含之磁線圈電力流失，若重新充填液態氣體並充電，恐需花費新台幣約 100 萬元之成本。

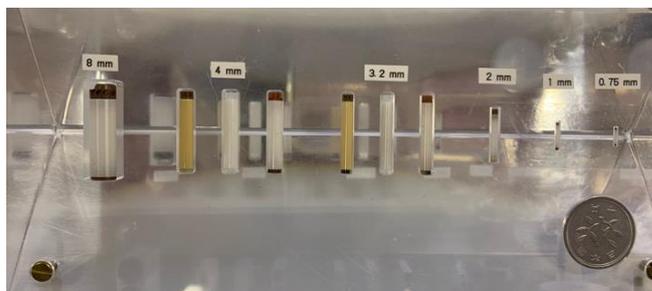


照片 2：陳欣郁技正(右)與黃子凌技士(左)與超導磁鐵模型合影

另一方面，NMR 試驗依照檢體形態及含量之不同可選擇不同探頭，而一般液態探頭售價約數百萬台幣，拆卸及組裝時須小心留意。



照片 3 (左)：探頭髮射及接收拉莫頻率訊號之通道



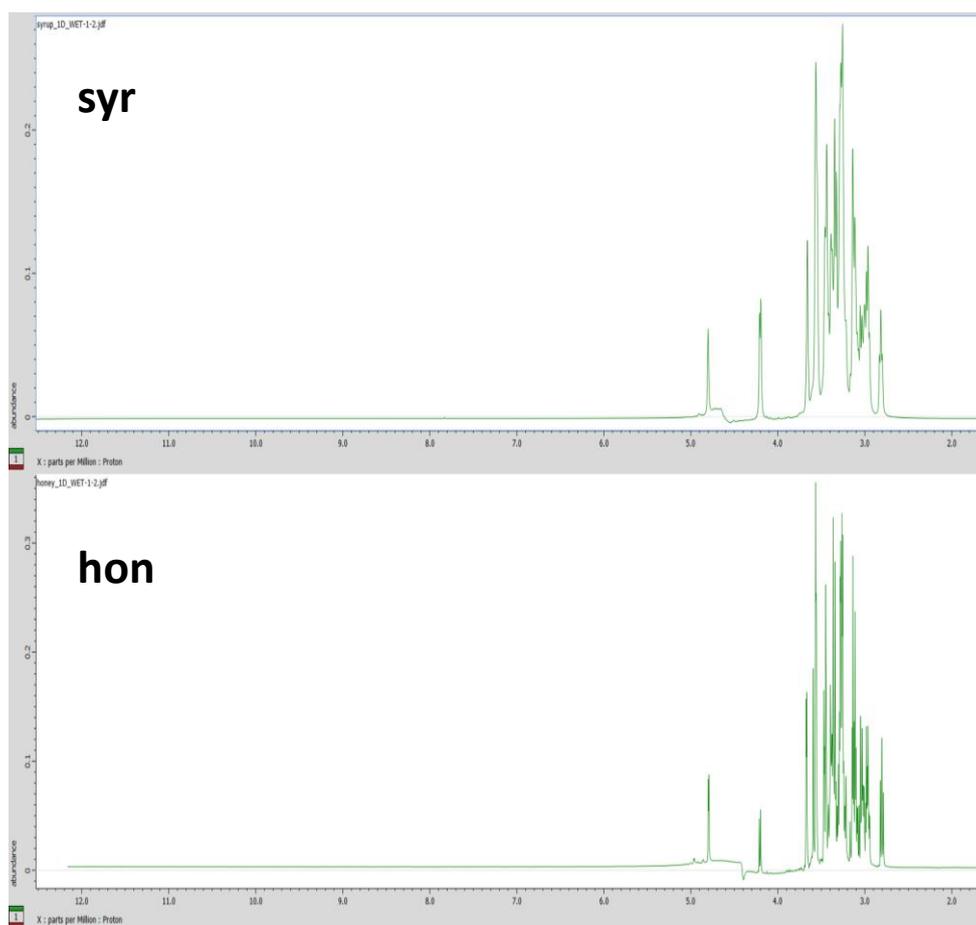
照片 4 (右)：依照不同檢體容積可選擇不同適用探頭

### 三、NMR 實機操作

#### (一)一維(1D)氫譜及無氘代溶劑試驗(no D test)

一般操作 NMR 試驗均須使用氘代溶劑(deuterated solvent)，降低溶劑中  $^1\text{H}$  之干擾幅度至最小程度；而本次試驗之檢體為蜂蜜及糖漿，不額外再以氘代溶劑溶解，直接將檢體置於樣品管中上機分析，期能瞭解蜂蜜及糖漿中成分差異之情形，並測試稠狀檢體以液態檢體專用探頭分析之效能，結果如圖四所示。

由結果可知，蜂蜜中成分組成與糖漿相似，而圖譜解析度不佳的原因，推測是因為使用液態檢體專用之探頭，使發射及接受脈衝頻率之效能低落，建議濃稠狀之檢體可挑選半固態(semi-solid phase)專用之探頭分析。



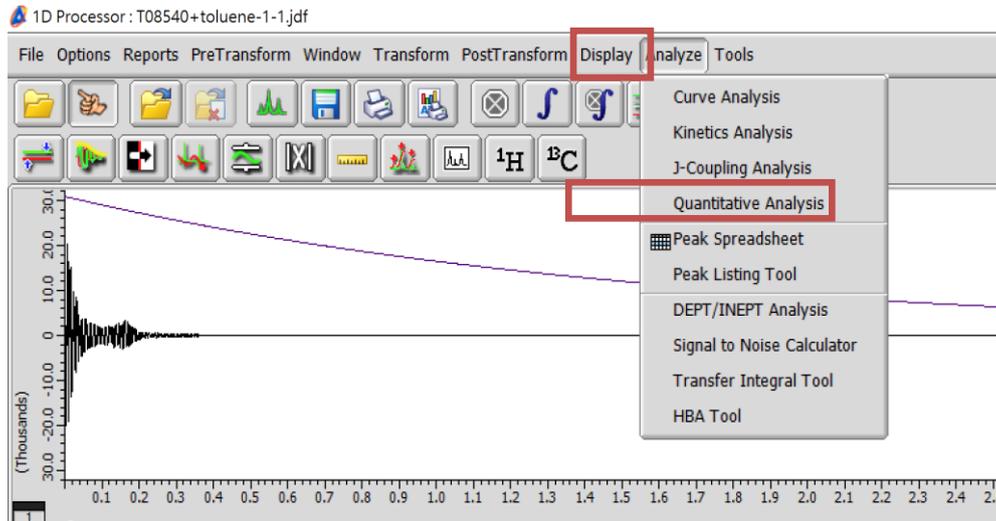
圖四、蜂蜜(無氘代溶劑)之 NMR 檢測結果

## (二) qNMR 試驗

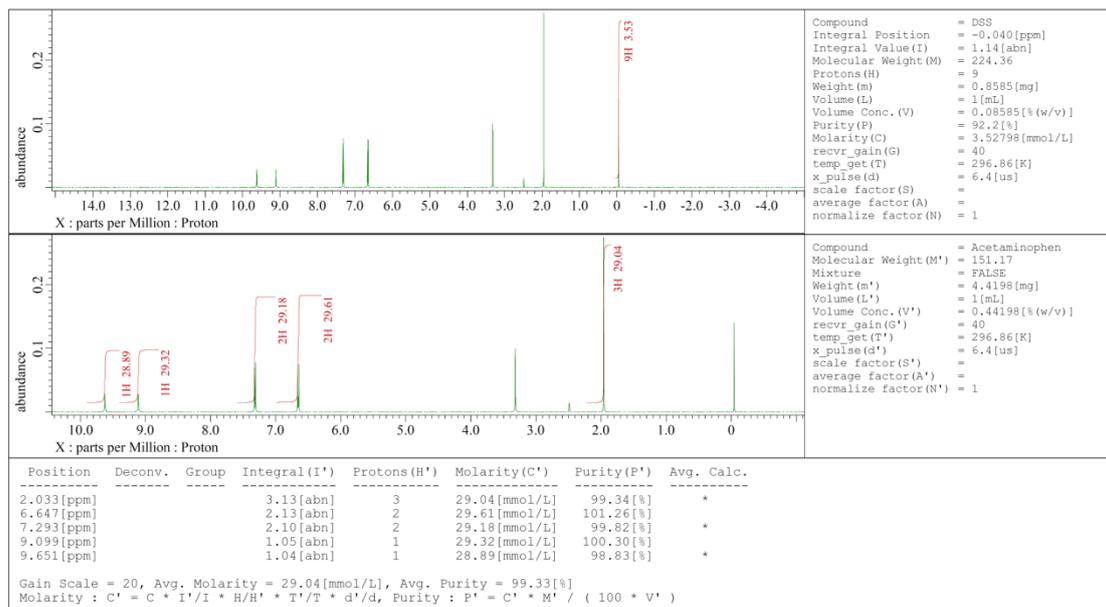
一般化學分析定量方法相當依賴與待測物成分相同之標準品，經由檢測器蒐集訊號波峰後依波峰面積計算檢體成分濃度，但許多有機成分沒有標準品，或是標準品過於昂貴等問題。透過定量 NMR (quantitative NMR)試驗，標準品之選擇不再需要與待測物成分一致，僅需選擇 NMR 訊號不與待測物干擾之成分作為內部標準品，即可檢測待測物成分濃度或純度，此一優點使得 qNMR 近年來於成分定量分析之使用愈趨普遍。

本次實作試驗選用 DSS-d<sub>6</sub> [3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid-d<sub>6</sub> sodium salt]作為 qNMR 內部標準品，乙醯胺酚(acetaminophen)為檢體，分別精確

秤定後，定容至 5 mL DMSO-d<sub>6</sub>，再取適當體積之檢液至於 NMR 樣品管中進行 qNMR 測定。實驗參數之設定除選定分析方法，尚須輸入秤重重量、分子量及成分名稱等資訊，於結果圖譜蒐集完成後，將該圖譜做基本設定調整，並對標準品及檢體訊號做積分，進一步開啟定量軟體計算檢體純度(如下圖)。



因標準品之 <sup>1</sup>H 個數及純度為已知，對檢體之各個波峰做積分，並勾選檢體是否為混合物、選填檢體成分之分子量及重量資訊後，軟體便會自動運算得到檢體成分之平均純度，以本實驗為例，acetaminophen 之平均純度計算結果為 99.33% (如圖五所示)。

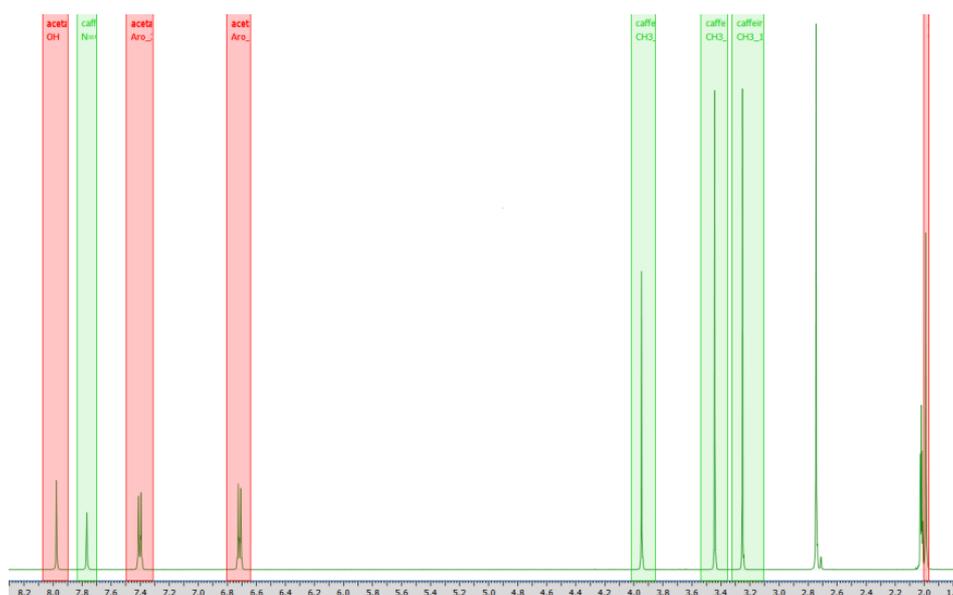


圖五、acetaminophen 純度測定結果

### (三)完全降低幅頻表(complete reduction to amplitude-frequency table, CRAFT)

CRAFT 可自動且有效的從 NMR 數據中選取出最佳的振幅(amplitudes)和頻率(frequencies)，其數據擷取方式是直接將 NMR 原始數據 FID 檔，轉換成每個訊號的頻率和幅度表，再轉換成目視圖譜，這種直接藉由時域(time domain)圖譜的貝葉斯分析(bayesian analysis)方式，可減少傅立葉轉換可能造成的問題(傅立葉轉換已將時域數據轉換成易於觀看和理解的二維圖譜，轉換過程可能會產生許多變數，不適合直接以 CRAFT 分析)，亦可減少基線和相位的問題，所以很適合用在重疊圖譜的面積積分解析，也可降低基質干擾情形。

此次訓練，利用咖啡因(caffeine)和乙醯胺酚(acetaminophen)進行 CRAFT 實作，利用完全降低幅頻表分別篩選出咖啡因和乙醯胺酚之訊號波峰，並將化合物片段資訊套用至圖譜中(如圖六所示)，最後再產出 CRAFT 分離之化合物圖譜。



圖六、套用 CARFT 產生化合物片段資訊之圖譜

### (四)最小重量(minimum weight)

在 NMR 定量中，內部標準品、分析樣品及溶劑取樣可能都需要用到秤重，而在 NMR 定量上，秤重的精密性可說是最基本且重要的一個基本條件；影響秤重的因素，包括：天平性能、操作者的技巧及設置環境。為了精確秤定數毫克的

分析物和標準物質，必須要嚴格注意準確及精密秤重的規則，講師亦建議以 NMR 進行定量實驗時，建議使用微量天平(micro balances)(最小位數 1 µg)或超微量天平(ultra micro balances)(最小位數 0.1 µg)。

所以，此次訓練內容亦包含最小重量(minimum weight)之觀念及實作，考慮到天平的不確定度，必須要測定最小樣品重量之秤重準確度。而美國藥典 GC 41 和 GC1251 亦提及秤重的重要性，"In order to satisfy the required weighing tolerance, when samples are weighed the amount of sample mass (i.e., the net weight) must be equal to or larger than the minimum weight. The minimum weight applies to the sample weight, not to the tare or gross weight."，指出樣品秤重量至少要大於最小重量。

最小重量測定方式：

- 1.進行重複性試驗：用同一個測試樣品於天平秤重 10 次以上
- 2.滿意的重複性試驗結果：秤重的標準差(standard deviation, SD)乘上 2，再除以標稱值(nominal value)，結果小於 0.10%，極為滿意結果。

$$SD*2 / \text{秤樣重} \leq 0.10\%$$

此公式可轉成 -> 最小重量 (Wmin) = 2\* SD\*1000

#### (五)核磁共振應用於化合物結構解析

本署在未知物之分析實務上，經常會遇到以質譜分析出可疑成分後，但卻無標準品可供比對確認，此時，NMR 就是協助未知物結構解析之一大利器。

將未知物成分以 NMR 分析其  $^1\text{H}$  圖譜及  $^{13}\text{C}$  圖譜後，可藉由其化學位移及 J 角動量偶合(J-coupling)，判斷化合物之官能基組成，再拼圖出其完整結構。

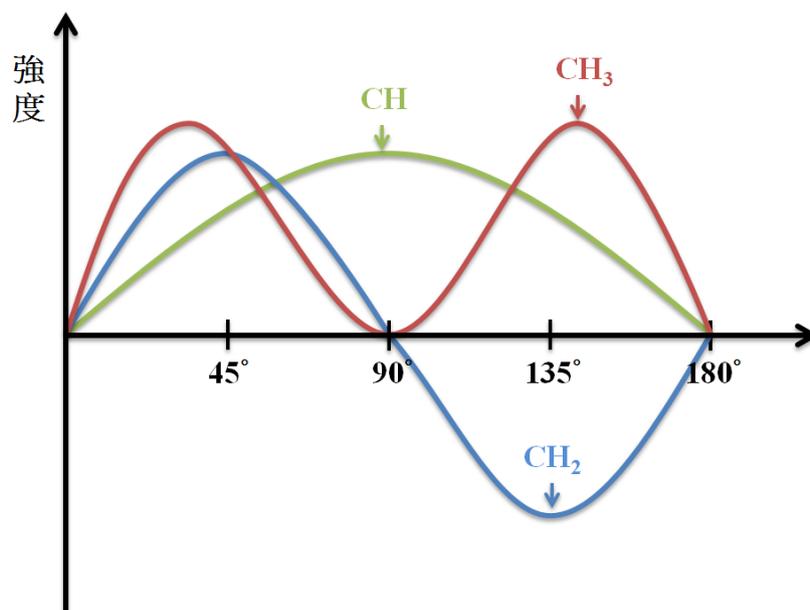
本次訓練課程，講師也講解如何應用及搭配 NMR 所測得之氫譜、碳譜和二維圖譜解析化學物質結構，以下分別說明其基本概念及相關應用：

## 1.無畸變增強極化轉移技術(distortionless enhancement by polarization transfer, DEPT)

首先介紹 DEPT 之前身-極化轉移非靈敏性核強化(insensitive nuclei-enhanced polarization transfer, INEPT)，INEPT 為一種透過極化轉移方式，藉由較高靈敏度之氫，將能量傳遞至低靈敏度之碳上，使  $^{13}\text{C}$  核的靈敏度增加 4 倍以上，並可加速碳譜之測定。

後來再進一步發展出，無畸變增強極化轉移技術(distortionless enhancement by polarization transfer, DEPT)及質子連接試驗(attached proton test, APT)等方法，其中 DEPT 脈衝序列比 INEPT 短，且不會像 INEPT 法一樣容易造成相位及強度改變，因此，目前 DEPT 法為  $^{13}\text{C}$  NMR 中測定碳種類最常用之技術，可大幅提升  $^{13}\text{C}$  的觀測靈敏度。

DEPT 之應用為分辨碳種類，因為一級碳( $\text{CH}_3$ ，伯碳)、二級碳( $\text{CH}_2$ ，仲碳)、三級碳( $\text{CH}$ ，叔碳)和四級碳( $\text{C}$ ，季碳)在不同脈衝角度下，如  $\theta=135^\circ$ 、 $90^\circ$  和  $45^\circ$  之脈衝角度，會有不同的強度(如圖七)，DEPT 利用此原理對質子的脈衝角度改變以產出能夠區分碳原子的類型之資訊。實務上通常只需測定  $\theta=135^\circ$  及  $\theta=90^\circ$  之圖譜，因為  $\theta=135^\circ$  及  $\theta=90^\circ$  所提供之資訊即包含  $\theta=45^\circ$  可見之訊號。

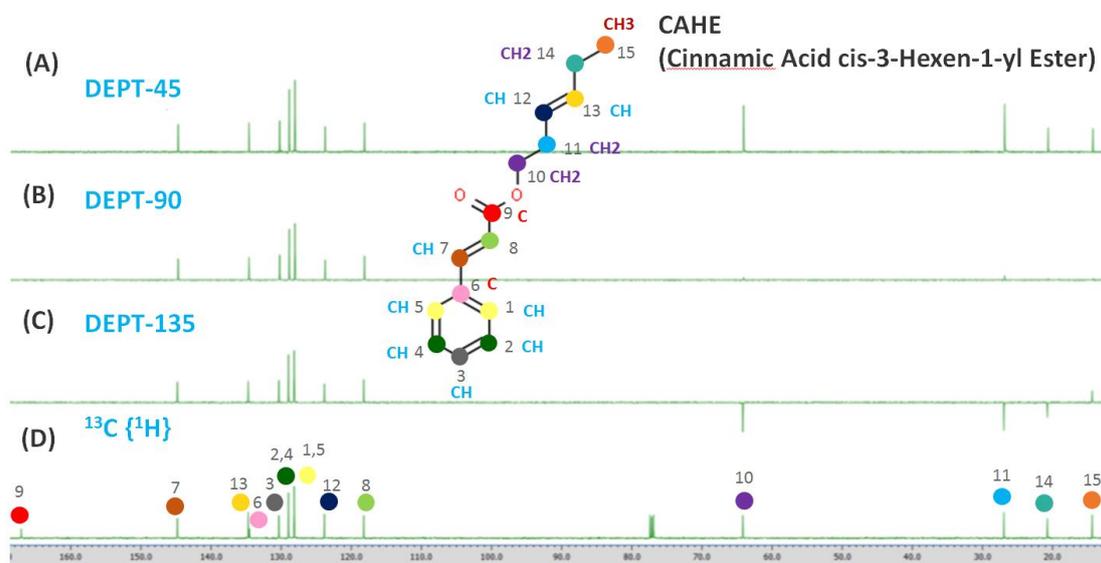


圖七、一級碳、二級碳及三級碳在不同脈衝角度下之強度

不同角度所提供之碳種類資訊：

角度	資訊
$\theta=135^\circ$	CH 及 CH <sub>3</sub> 波峰朝上(正訊號)，CH <sub>2</sub> 波峰朝下(負訊號)，四極碳訊號消失。
$\theta=90^\circ$	CH 波峰朝上，其它訊號消失。
$\theta=45^\circ$	CH <sub>3</sub> 、CH <sub>2</sub> 及 CH 波峰朝上，只有四極碳訊號消失。

此次課程測定化合物(cinnamic acid cis-3-hexen-1-yl ester, CAHE)之 DEPT 圖譜及一般去氫耦合 <sup>13</sup>C 譜(全部碳訊號)，如圖八所示，利用  $\theta=135^\circ$ 和  $\theta=90^\circ$ 所測得之 <sup>13</sup>C 譜與全 <sup>13</sup>C 譜訊號圖譜進行比較。先將全 <sup>13</sup>C 譜訊號與其他圖譜比較，訊號消失者，即代表該位置為四級碳(位置標示 9 及 6)，且四極碳訊號強度亦比其他碳低； $\theta=135^\circ$ 中訊號朝下者(位置標示 10、11 及 14)，即為 CH<sub>2</sub>； $\theta=135^\circ$ 中訊號朝上，但  $\theta=90^\circ$ 未測得訊號者(位置標示 15)，即為 CH<sub>3</sub>；其餘皆為 CH 之訊號，但單由 DEPT 之結果無法區分其位置，須搭配其他 NMR 二維圖譜結果判定。



圖八、化合物 CAHE 之 DEPT 圖譜， $\theta=45^\circ$ 之 <sup>13</sup>C 譜(A)、 $\theta=90^\circ$ 之 <sup>13</sup>C 譜(B)、 $\theta=135^\circ$ 之 <sup>13</sup>C 譜(C)及一般 <sup>13</sup>C 譜(D)。

## 2. NMR 二維圖譜(2D-NMR)

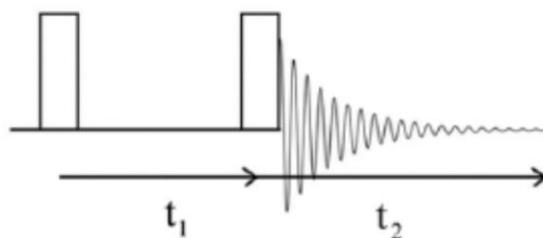
一維核磁共振圖譜(1D-NMR)提供以同一種核的頻率當作橫坐標，吸收強度當作縱坐標之資訊，可用來與標準品比對進行定性定量分析，但無法提供足夠的資訊鑑別化學物結構。

二維圖譜則是利用兩個頻率軸，將其化學位移和耦合常數等參數展開在二維平面上，減少一維圖譜的重疊情形並提高圖譜解析度，且提供自旋核之間的相關訊息。因此，當進行化學結構鑑定時，通常須借助二維核磁共振圖譜所提供的資訊，例如分析未知成分時，若沒有標準品或圖譜可供比對確認結構，通常須將一維氫譜和碳譜資訊再搭配數種二維核磁共振圖譜，才能夠進行未知物結構解析與確認。

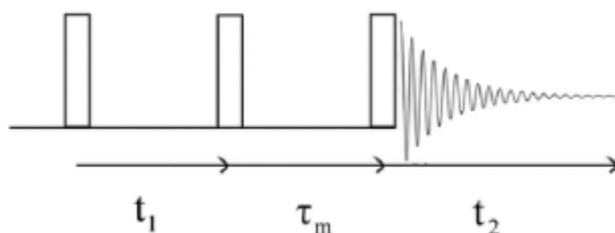
二維圖譜至少需要兩個脈衝構成，以時間週期可區分成準備期、演化期(evolution period,  $t_1$ )、混合期(mixing time)及收集訊號之測定期(detection period,  $t_2$ )。

(1)準備期：通常較長，主要使自旋系統達到熱平衡。

(2)演化期和測定期：演化期在每次實驗中，會有一連串不斷疊加脈衝序列，其  $t_1$  以固定  $\Delta t$  增加，由  $t_1 = 0$  開始，先測定一次以  $t_2$  為函數的 FID，之後再每增加一個  $\Delta t$ ，再測定一次以  $t_2$  為函數的 FID，直到蒐集足夠  $t_2$  訊號為止，最後可得到有兩頻率軸 F2 及 F1 之振幅圖，如關聯性磁振光譜(correlation spectroscopy, COSY)模式(見下圖)。在二維模式下，演化期增加的次數可達 100 次以上，因此測定二維圖譜所需的時間，也是一維圖譜的數倍。



(3)混合期:可視實驗需求選擇此條件,如核奧佛豪瑟光譜(nuclear overhauser effect spectroscopy, NOESY)模式即含有混合期,見下圖,主要差別為增加一個脈衝,這段混合的演化期間標記為  $\tau_m$ ,此期間會發生交叉極化(cross-polarization)。



二維核磁共振圖譜之種類大略可分為化學位移相關圖譜(shift correlation)及化學位移偶合常數二維圖譜(J-resolved)兩大類,亦可分為同核及異核二維圖譜。現在常用的二維圖譜,包括上述提到的 COSY 和 NOESY,還有異核單量子關聯圖譜(heteronuclear single quantum coherence, HSQC)及異核多鍵結關聯圖譜(heteronuclear multiple bond coherence, HMBC),其相關說明如下:

- **COSY**

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  同核相關圖譜,為最基礎的 NMR 二維圖譜,可以快速提供氫-氫原子在自旋系統裡間隔 2 或 3 個氫鍵之關聯性。其圖譜呈現對角線或非對角線之交叉訊號,由右上角到左下角的對角線為交叉峰,可直接反映出質子間的 J 耦合關係,即提供化學分子片段中氫與氫的關聯性。

- **NOESY**

NOESY 法與 COSY 皆為測定  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  同核圖譜,不同之處為 NOESY 是用來測定氫與氫之間立體結構關係,因此可提供空間中相近氫原子之關聯性,即便沒有化學鍵相連者亦能測定。主要原理為透過自旋-晶格弛豫時,空間中氫原子間

之偶極作用力產生核奧佛豪瑟效應(nuclear overhauser effect, NOE)轉移，產生交叉訊號強度正向或負相之變化；NOE 效應就是指在分子中若有二個  $^1\text{H}$  距離在  $5\text{\AA}$  內，會產生雙偶極作用(dipolar coupling)，可利用無線電波照射其中一個  $^1\text{H}$  共振位置，產生飽合現象，另一個  $^1\text{H}$  圖譜強度就會增強或減弱，NOE 即為其強度改變之百分比，若 NOE 越大，則表示二個  $^1\text{H}$  之間距離越短。

NOESY 所測得圖譜之交叉峰對應訊號，為空間上相互接近的質子，因此，NOESY 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。

## ● HSQC

先介紹 HSQC 之前身-異核多量子關聯圖譜(heteronuclear multiple quantum coherence, HMQC)，HMQC 主要透過量化異核之耦合提供氫原子與附著之異原子之關聯性訊息，主要使用之脈衝序列為多量子關聯(DEPT 模式)。

而 HSQC 模式與 HMQC 類似，兩者呈現之圖譜類型相差不大，皆經由反方向化學位移之關聯性，鑑定  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  之直接鍵結，可觀察近程碳氫相關資訊；不同之處為 HSQC 改藉由 INEPT 模式以單量子進行連續轉移，主要優點是 F1 象限沒有任何  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  耦合訊息，可使解析度提高，因此，HSQC 為目前常用來取代 HMQC 之技術。

## ● HMBC

HMBC 是從 HSQC 延伸的模式，適合測定 2J (隔 2 個鍵)、3J (隔 3 個鍵)的圖譜，因此可用來鑑定  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  遠程耦合關係，提供遠程碳氫相關資訊。

#### 四、其他儀器實習

##### (一)質譜儀(mass spectrometer, MS)及 msFineAnalysis 軟體

JEOL 公司研發生產之質譜儀裝備之離子源除具備一般硬游離(hard ionization)之電子游離(electronic ionization, EI)功能，亦可執行化學游離(chemical ionization, CI)、光游離(photo ionization, PI)及電場游離(field ionization, FI)等軟離子化(soft ionization)模式，可配合不同檢體選擇適合之模式，所得碎片圖譜再於 msFineAnalysis 軟體中與質譜資料庫比對分析，得到最佳化之分析結果。

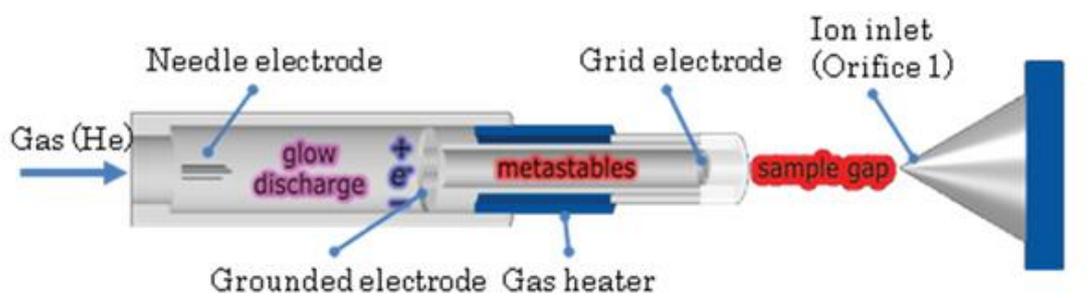
##### (二)即時直接分析(DART)

即時直接分析(direct analysis in real time, DART)為一種質譜的進樣系統，其最大特點是檢體不須經過任何前處理，即可直接進樣到質譜中。DART 離子化(ionization)是藉由激發態原子或分子與大氣氣體和(或)分析物之間的相互作用，將待測物離子化，

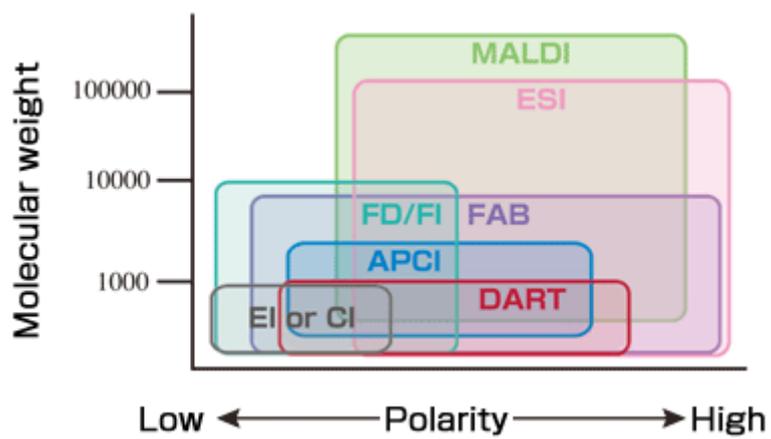
其原理(如圖九)是藉由氦氣等氣流經過針狀電擊(needle electrode)產生輝光放電(glow discharge)，並進一步產生等離子體/電漿(plasma)，包括離子、電子和激發態(metastable)原子或分子，其中大部分帶電粒子會被接地線電極(grounded electrode)消除，激發態中性物質則會被排到大氣中，氣流可以由氣體加熱器(gas heater)加熱，以幫助分析物從基質表面產生蒸發或脫附，最後進入離子入口，即可測得訊號。

DART 離子源主要優點是快速、無損，而且不需要以溶劑處理樣品，不但可減少因溶劑影響離子化之問題，還具有綠色環保價值，但其缺點是不適合用在大分子檢體之檢測(如圖十)。

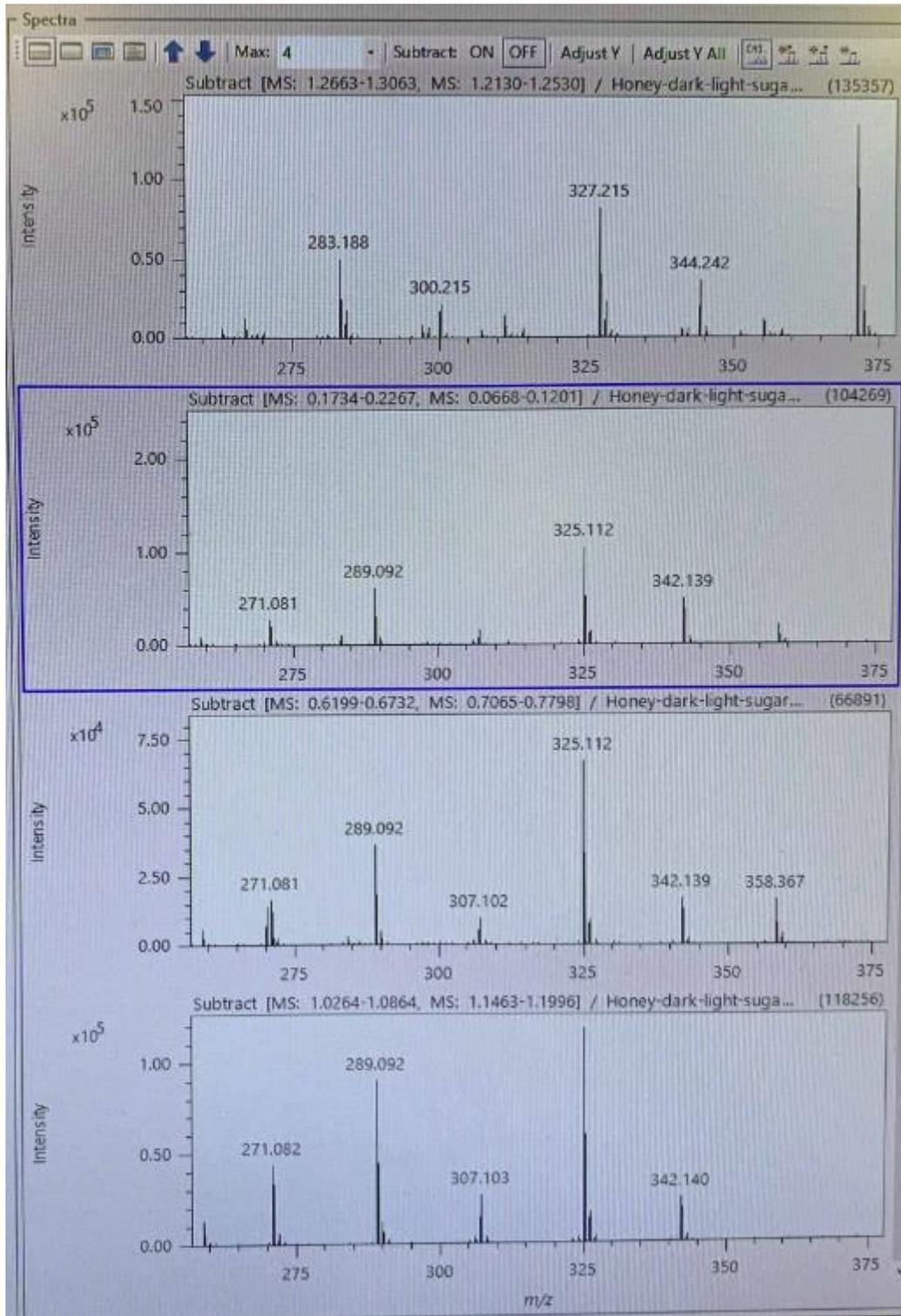
此次訓練以蜂蜜進行 DART 實作，直接以玻璃管沾取蜂蜜檢體，再放置到圖九中樣品放置處(sample gap)，幾秒鐘內就能觀察到樣品所提供之成分及碎片 m/z 訊號(圖十一)。



圖九、DRAT 離子源



圖十、常見離子源適用之極性及分子量範圍



圖十一、蜂蜜以 DART 進樣之檢測結果

## 肆、心得與建議

### 一、心得

#### (一)利用 NMR 解析化合物需綜整多種圖譜資訊

本次訓練課程有許多 NMR 實際操作，包含氫譜、碳譜和二維圖譜等，也學習到解析化學物質結構相關技巧。在 DEPT 實作，可由 DEPT 提供之圖譜判斷化合物部分結構之位置，但還是有許多位置無法確定，所以必須搭配其他 NMR 二維圖譜結果一同進行判定。

#### (二)秤重準確度為 NMR 定量重要影響因素

進 NMR 定量實驗時，內部標準品、分析樣品及溶劑取樣和秤重的精確度都相當重要，因此，一定要有足夠精確可秤重至微量的天平，以及良好的秤量環境和操作人員，實務上可透過最小重量之測定，確定天平確實可達到之最小秤重重量，才不會因秤樣量不準確，影響定量結果。

#### (三)可應用 CRAFT 模式於重疊波峰之分離

進行氫譜實驗時，經常會有不同化合物之波峰在同一個化學位移點上，產生重疊的情形，進而大幅影響定量準確度。可利用 CRAFT 模式，直接從 NMR 原始訊號檔(FID 檔)，進行不同化合物之波峰分離，即可減少重疊波峰造成定量不準確的情況。

## 二、建議

### (一)持續培養訓練 NMR 專業人才

NMR 試驗操作人員須具備相關專業知識及能力，試驗條件之設定及圖譜解析更需要經年累月之經驗，有鑑於 NMR 技術在食藥分析及定量領域之應用潛力龐大且發展快速，為強化我國檢驗實力並與國際接軌，持續培養 NMR 專業人才實屬必要。

### (二)開發 NMR 及 qNMR 研究主題及檢驗方法

執行研究主題與開發檢驗方法除可增加我國檢驗量能，亦可使同仁累積使用儀器之經驗。本署將持續執行 NMR 相關研究主題，現有 NMR 儀器亦可隨時支援各項檢驗案件及方法開發之需求，未來研究成果或檢驗方法公開後，將提供民間實驗室及各地衛生局參考，期可拓展我國檢驗技術之廣度與深度。

### (三)關注國際間 NMR 檢驗方法之應用及發展

NMR 技術發展快速，應藉由持續參訪他國專業檢驗單位或機構及參與相關研討會，了解各國 NMR 發展現況與認識各項新穎應用，並與專業人士交流、建立人脈，有助於經驗及成果之共享與推展我國外交。

## 伍、附錄



與講師 Pavlos Stampou (左一)合影



與講師染野豊(左一)及大谷圭一(左二)合影



與講師小松功典博士(中)合影