固態核磁共振光譜學簡介

Introduction to Solid-State NMR Spectroscopy

陳振中 Jerry Chun Chung Chan

> 核磁共振是一門用途極為廣泛的光譜學,到目前為止,因核磁共振而得諾貝爾獎的學者已達 六位之多。核磁共振目前有三大分支,分別為液態核磁共振、固態核磁共振及磁共振成像。 本文將集中討論固態核磁共振的一些原理及應用,內容包括多肽二級結構之測量,玻璃系統 的結構鑑定,及生物礦化的研究。

> Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has a large variety of applications. To date, six scholars have been granted the Nobel prizes because of their NMR based research. There are three sub-disciplines in NMR spectroscopy, *viz*. the solution-state NMR, solid-state NMR and magnetic resonance imaging. In this short review article, we will briefly discuss some of the common techniques of solid-state NMR and their related applications, including the determination of backbone torsion angle of polypeptides, the structural elucidation of glass systems, and the study of biomineralization.

一、導言

核磁共振是一門用途極為廣泛的光譜學,到目 前為止,因核磁共振而得諾貝爾獎的學者已達六位 之多。核磁共振目前有三大分支,分別為液態核磁 共振、固態核磁共振及磁共振成像。本文將集中討 論固態核磁共振的一些原理及應用。相較於液態核 磁共振,固態核磁共振光譜學在技術及理論背景顯 得遠為複雜,原因主要是在固態粉末樣品中,與核 磁共振相關的相互作用,其各向異性都會影響圖譜 的解析度。而且不同樣品中的相互作用差異一般都 甚大,因此根本不可能發展出一套可以適用於所有 樣品的固態核磁共振方法。以同核雙量子技術為 例,幾乎每一精研固態核磁共振的研究小組都有其 特地發展出來的脈衝序列。從儀器的角度考量,固 態核磁共振中所要求的高功率脈衝、魔角旋轉、快 速脈衝相位改變,都非一般液態核磁共振儀所能提 供。固態核磁共振所需之探頭,其直徑達 89 mm,使相關的超導磁場造價極高,所以在相同磁 場下,固態核磁共振儀都比液態儀昂貴許多。為使 固態核磁共振更為普及,許多儀器公司都設計出可 用於液態儀的固態核磁共振探頭,但用途僅限於常 規實驗。目前商業公司提供的固態核磁共振儀,磁 場強度最高可達 850 MHz,造價約為新台幣三億 元。

為何歐美國家願意投入巨額經費於高場固態核

磁共振儀的建置?理由很簡單,對非晶態系統或結 構具某程度不規則性的系統而言,固態核磁共振可 以在分子尺度上提供最豐富的結構信息。所以有關 玻璃、黏土、陶瓷、沸石、聚合物、生物礦化物、 膜蛋白以至纖維蛋白質的研究都會用上固態核磁共 振技術。以下筆者將簡單介紹固態核磁共振中數種 常用技術,以及它們在不同領域研究上的應用。

二、觀念及技術

顧名思義,固態核磁共振是用來測量固態樣品的技術,樣品可以為單顆晶體、多晶體粉末或非晶態粉末,但在此文中將集中討論粉末樣品的固態核磁共振技術。核磁共振是指自旋 $\geq 1/2$ 的核置於外加磁場後與特定頻率 (Larmor 頻率)的電磁波所發生的共振現象,其中 Larmor 頻率 (ω_L)與磁場強度 (B_0)的關係為:

$$\omega_L = -\gamma_N B_0 \tag{1}$$

γ_N 為磁旋比常數。由於電子的軌道角動量會產生 磁場,因此分子中的原子核依其所在位置的磁場便 會受到鄰近電子的分布情況所影響,這就是化學位 移 (chemical shift) 的由來。另一方面,自旋 ≥ 1/2 的核本身便具有磁矩,因此這些核也會影響彼此位 置上的磁場大小,其影響與距離的立方成反比,稱 為磁偶極相互作用。根據公式 (1),由於核的共振 頻率正比於其位置上的磁場大小,因此化學位移與 偶極相互作用的大小便會影響光譜上峰線的位置。 公式 (2)列出了化學位移的 Hamiltonian:

$$\hat{H}_{cs} = \omega_L [\delta_{33} \cos^2 \theta + \delta_{11} \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + \delta_{22} \sin^2 \theta \sin^2 \varphi] \hat{I}_z$$
(2)

其中 θ 與 φ 為外界磁場在分子系統中的極坐標, δ_{ii} (*i* = 1, 2, 3) 為化學位移張量的三個主要分量(圖 1)。 從上式中可見,當分子與外界磁場(B_0)的相對方向 位置改變時,化學位移的大小會隨之改變,此性質 稱為各向異性(anisotropy)。公式(3)列出異核磁偶 極相互作用的 Hamiltonian:

$$\hat{H}_{IS} = -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_I \gamma_S}{r_{IS}^3} \hbar (3\cos^2\theta - 1) I_z S_z \tag{3}$$



圖1.外加磁場在化學位移張量坐標中之示意圖。

若以向量表示兩核之間的距離,θ便為此向量與外 界磁場之間的夾角,因此磁偶極相互作用也是各向 異性的。當然,若分子是在溶液中,其快速的旋轉 運動通常都會有效地消除各向異性的影響,令圖譜 出現單一的共振頻率。但對粉末樣品而言,由於分 子有不同的空間座向,而且座向不隨時間改變,因 此其共振頻率便會呈現分布狀態。圖2是在磁偶極 相互作用影響下粉末樣品的核磁共振圖譜,整個圖 譜是由不同座向分子中的核所產生的訊號疊加而 成。可見在各向異性的相互作用影響下,粉末樣品 在靜態條件時的固態核磁共振圖譜,其解析度一般 都是非常差的。

1. 魔角旋轉

若將粉末樣品所置的轉子作高速旋轉,其中的 分子與外加磁場的相對位置便會隨時間改變,因而 各向異性的 Hamiltonian 隨時間改變大小,以化學 位移為例:

$$\hat{H}_{CS} = \omega_L \left[\delta_{33} \cos^2 \theta_t + \delta_{11} \sin^2 \theta_t \cos^2 \varphi_t + \delta_{22} \sin^2 \theta_t \sin^2 \varphi_t \right] \hat{I}_z$$
(4)

把公式4的角度變量按圖3可寫為轉子的旋轉角度 (*θ*,)與其他相關角度的函數,並取其時間平均值:

$$\overline{H}_{CS} = \omega_{L} \left[\frac{1}{2} (\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33}) \sin^{2} \theta_{r} + \frac{1}{2} (3 \cos^{2} \theta_{r} - 1) \sum_{i=1,2,3} \delta_{ii} \cos^{2} \chi_{ii} \right] \hat{I}_{z}$$
(5)

科儀新知第二十八卷第三期 95.12 **43**



圖 2. 不同座向的分子,其訊號疊加後形成靜態粉 末圖譜。

若把 θ, 定為 54.7°, 函數 (3cos²θ, -1)等於零,從而 令化學位移的 Hamiltonian 成為各向同性,此魔法 似的旋轉角度因而被稱為魔角^(1,2)。圖 4 顯示魔角 旋轉 (magic angle spinning, MAS) 可消除化學位移 的各向異性,大大提高粉末圖譜的解析度。類似 地,魔角旋轉也可以消除磁偶極相互作用的各向異 性。與化學位移不同,由於磁偶極相互作用並沒有 各向同性的部分,因此魔角旋轉可令磁偶極相互作 用對圖譜峰線的影響完全消失。

2. 磁偶極回耦

在魔角旋轉的條件下,異核磁偶極相互作用的 Hamiltonian 可寫作:

$$H_{IS}(t) = \sqrt{\frac{2}{3}} \sum_{m=\pm 1,\pm 2} \omega_m \exp(im\omega_R t) I_z S_z$$
$$\omega_{\pm 1} = \frac{d_{12}\sqrt{3}}{2} \sin(2\beta_{PR}) \exp(\pm i\gamma_{PR})$$
$$\omega_{\pm 2} = \frac{d_{12}\sqrt{3}}{\sqrt{8}} \sin^2(\beta_{PR}) \exp(\pm i2\gamma_{PR})$$
$$d_{12} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_s}{r_0^3} \hbar$$

 ω_R 為旋轉速率, $(\alpha_{PR}, \beta_{PR}, \gamma_{PR})$ 為分子座向的歐拉角。如前所述,此各向異性的 Hamiltonian 時間平均值為零,因而使圖譜的解析度得以提高。但另一



圖 3.

在魔角旋轉下,外加磁場之極坐標 是以下角度之函數:旋轉軸與磁場 之夾角(θ_r),旋轉軸在張量坐標中之 方向餘弦(χ₁₁, χ₂₂, χ₃₃)。



圖 4. 魔角旋轉可提高 圖譜解析度。

方面,磁偶極相互作用的大小可用來測量核的空間 分布,如何在魔角旋轉的條件下回復磁偶極相互作 用對圖譜的影響便成為極重要的課題。文獻上把這 類回復技巧稱之為回耦 (recoupling)^(3,4)。驟看之 下,回耦技術好像會把魔角旋轉所提供的高解析度 犧牲掉,但實際上回耦技術只會使得線峰在圖譜的 第二維訊號增寬,結果是不會影響圖譜在第一維的 解析度。目前幾乎所有各向異性的相互作用都有與 之對應的回耦技術,但成效則視乎樣品的核磁共振 性質為何。

3. 交叉極化

交叉極化 (cross polarization, CP) 在固態核磁共 振學中是非常重要的技術,其應用之廣泛業已令交 叉極化被歸類為常規實驗技巧之一(5)。交叉極化是 指兩組不同的核種在能量守恆的情況下發生極化轉 移 (polarization transfer)。在外界磁場影響下,自旋 核的相鄰 Zeeman 能階差就是系統的共振頻率,也 就是上文提及的 Larmor 頻率。能階的居量遵守波 茲曼分布,波茲曼分布中的溫度就是系統溫度,相 鄰 Zeeman 能階的居量差就是極化。若以共振頻率 相符的射頻場作用於系統,在射頻場的相互作用座 標 (interaction frame) 中,系統的能階差便會由射頻 場的強度決定。在相互作用座標中的能階居量同樣 遵守波茲曼分布,但其對應的「溫度」是利用能階 的居量及波茲曼分布方程反推而來,稱為自旋溫 度。現考慮兩種核 (I-S) 組成的異核系統, I 與 S 的 Zeeman 能階差並不相同。由於能量守恆定律的 關係,因此I與S之間的極化轉移不會自行發生。

另一方面,若我們同時對該兩種核施以相關共振頻 率的射頻場,兩者射頻場的強度則分別調校,使得 I與S在相互作用坐標中的能階差相同,於是I與 S便可進行極化轉移。至於極化轉移的方向,端視 乎I與S相應的自旋溫度為何。隨著系統演化,I 與S在相互作用座標中的自旋溫度將趨向相同。

4. 同核多量子技術

利用適當的脈衝序列,同核磁偶極相互作用會 造成樣品產生多量子訊號,其訊號強度與核距和空 間分布有關。固態核磁共振的多量子技術早在八十 年代已經透過 Pines 小組的努力得到長足的發展 ⁽⁰⁾,但他們的工作集中於靜態樣品。由於儀器條件 限制,在魔角旋轉條件下的多量子技術在近年才有 相當的發展。Spiess 小組的工作顯示氫核系統在魔 角旋轉下的多量子訊號基本上可以沿用 Pines 小組 的脈衝序列,只需要把脈衝時間作適當的旋轉同步 便可以⁽⁷⁾。其他核的多量子激發就困難得多了,需 要相當複雜的脈衝序列,較常用的有 Levitt 小組的 C 組與 R 組脈衝序列⁽⁸⁾。在高速魔角旋轉條件下則 有 Tycko 小組發展出來的 HSMAS-MO 序列⁹⁹,此 序列在³¹P 的多核系統中有上佳表現,圖 5 是在 10 kHz 魔角旋轉時以 HSMAS-MQ 測得的 octacalcium phosphate (OCP) 雙量子相關圖⁽¹⁰⁾。

三、多肽二級結構之研究

生物界中許多蛋白質的水溶性與結晶度都甚 差,以致難以利用液態核磁共振或繞射方法研究其



圖 5. Octacalcium phosphate 的³¹P 雙量子相關圖譜。

結構,目前較受注意的例子為類澱粉質纖維 (amyloid fibrils),此類非晶態蛋白質纖維與多種腦 內病變引起的神經系統病症有莫大關連,庫賈氏 病、狂牛症等都是廣為人知的例子。由於固態核磁 共振技術可測量晶態或非晶態的樣品,因此相關技 術在類澱粉質纖維的研究上深受重視。以Ure2p_{10.39} 多肽所形成的纖維分子為例,它是與普里昂疾病有 關的類澱粉質纖維,研究的主要目的是為這些纖維 蛋白建立高解析度的分子結構模型,最終的目標是 要從結構的角度探討普里昂病變蛋白的形成機制, 從而讓醫學界可儘快發展相應的治療方法。由於這 些較短的多肽可利用常規的固態合成方法製備,因 此可以任意對其中數種胺基酸進行同位素標籤,以 便對之作一系列的固態核磁共振實驗,測量其分子 構相。研究的步驟可細分如下:(1)製備並檢測含 ¹³C與¹⁵N同位素的普里昂纖維;(2)測量並鑑定纖 維中的¹³C與¹⁵N化學位移;(3)測量纖維中 β 褶板 構相的位置與分布;(4)測量殘基的脊柱扭轉角度 及側鏈之間的相互作用;(5)整合實驗所得的數 據,並利用分子動力學計算,建立普里昂纖維的模 型。圖 6 是利用以上方法所建立的 Ure2p₁₀₋₃₉ 類澱 粉質纖維的分子結構模型⁽¹¹⁾。此外,隨著¹³C及 ¹⁵N同位素標籤技術及固態核磁共振硬體的發展, 新的脈衝序列亦不斷湧現^(3,4,12,13)。例如 ROCSA⁽¹⁴⁾ 及 ROCSA-LG⁽¹⁵⁾便可於均匀同位素標籤的單個殘 基上測量脊柱扭轉角度 ψ 。這些新穎的技術均有待 進一步應用在其他重要的生醫課題。

四、玻璃系統之固態核磁共振研究

玻璃系統的定義相當廣泛,較狹義的來說,可 指結構上不具長程有序之無機系統。玻璃系統的結 構測量一直是頗受重視的研究題目,尤其是一些具 高度應用價值的玻璃系統,其結構之探討更是文獻 上經常出現的課題。由於繞射方法並不適用於玻璃 的結構研究,目前較常規的測量方法是傅利葉轉換 一紅外線或拉曼光譜分析。其優點是靈敏度高,但 困難處是無法選擇性地測量系統的個別元素,導致 圖譜往往過於複雜。核磁共振與上述光譜的優劣在 許多方面具互補關係,但核磁共振有一特點是其他 光譜技術所沒有的,就是我們可利用雙共振或多量



圖 6. 以固態核磁共振及分子動力學計算所建立的 Ure2p10.39 纖維的結構模型



圖 7. 硼鋁氧化物玻璃之²⁷Al 及¹¹B 魔角旋轉譜, 以不同離子作網路修飾劑時,玻璃的結構單 元有明顯變化。

子技術測量系統中結構單元之距離或空間分布關係。

以硼鋁氧化物玻璃為例,圖7是 27 Al及 11 B 魔 角旋轉圖譜,其中可清楚分辨不同配位數的硼及鋁 (16)。隨著玻璃成分的改變,可以利用魔角旋轉譜追 蹤玻璃中各種結構單元在量方面的變化。圖 7 顯 示,當我們以鎂離子作為硼鋁氧化物玻璃的網路修 飾劑時,五配位的鋁在量方面有極顯著之增加。圖 8 是²⁷Al-¹¹B 的雙共振相關圖,結果顯示在硼鋁氧 化物玻璃中,三配位硼比四配位硼更容易與四配位 鋁形成鍵結⁽¹⁶⁾。另一方面,固態核磁共振也可用以 追踪羥基磷灰石在生物活性玻璃表面的結晶過程 ⁽¹⁷⁾。利用¹H-³¹P 雙共振技術,我們可輕易地分辨 不同環境下的磷,透過峰寬的大小瞭解系統的結晶 性⁽¹⁷⁾。除此以外,也可利用 ${}^{31}P - {}^{31}P$ 雙量子激發, 測量磷與磷在空間上的分布,從而斷定磷酸鈣先於 玻璃表面沉澱為非晶相物質,再轉化為具結晶性的 羥基磷灰石(17)。

五、生物礦化之機理

生物礦化是指在生物體內礦物質的形成過程 ⁽¹⁸⁾。通過體內的有機巨分子,生物體可在奈米的尺 度上精確地控制著體內無機礦物的結晶行為。在生



物體中形成的礦物質與一般的天然礦物無論在大 小、晶癖、化學成分以至同位素含量等都有極大差 異。目前為止,我們知道有多達六十多種的礦物 **質**,在生物界中被廣泛地用於外殼、牙齒和骨骼等 硬組織的構成。以骨骼為例,其最基本的結構單 元,就是磷灰石 (HAp)。我們對生物磷灰石在分子 尺度上的形成過程所知甚少,目前僅知道它很可能 是從八磷酸鈣 (OCP) 經相轉變而成。由於 OCP 及 HAp的³¹PNMR圖譜並不相同,因此可利用³¹P固 態核磁共振來追蹤相轉變的過程⁽¹⁹⁾。首先利用適當 的合成條件,讓 OCP 慢慢發生相轉變,並於不同 的反應時間收取產物。圖9是不同反應時間之產物 的³¹P NMR 圖譜,當中可清楚看到系統在 12 小時 內從 OCP 相轉變為 HAp。利用 ³¹P-¹H 交叉極化實 驗,我們發現當系統的 pH 值增加時,水分子會進 入 OCP 晶格內, 使系統發生相變。³¹P-³¹P 雙量子 實驗則提供證據,顯示在相變的過程中,OCP 及 HAp 晶格的 c 軸是處於相反方向。利用這結果, 我們進一步推斷,在生物礦化中的所謂「中心黑 線」,其實可利用 OCP 與 HAp 晶格錯配解釋之。 如圖 10 所示,當 OCP 發生相變時,不同的外延點

如圖10 所示,當OCP 發生相變時,不同的外延結 所衍生的 HAp 區塊往往會發生晶格錯配,因而產 生「中心黑線」⁽¹⁹⁾。

我們也可利用固態核磁共振研究 statherin 蛋白如何抑制磷酸鈣在唾液中結晶⁽²⁰⁾。方法是在

科儀新知第二十八卷第三期 95.12 47



圖 9.當 OCP 發生相變時,不同反應時間之產物的 ³¹P NMR 圖譜。

statherin 特定的胺基酸進行¹³C 與¹⁵N 同位素標 籤,將 statherin 蛋白附在磷灰石後,便以固態核磁 共振技術測量 statherin 的結構。由結果顯示 statherin 的 N-端從第二至第十二個胺基 (pSpSEEKFLRRIG) 在磷灰石表面都具有螺旋狀的 二級結構。值得注意的是,樣品經冷凍乾燥處理 後,在 statherin N-端的六個胺基便失去原有的螺旋 狀結構,顯示水份子在體系的穩定性中擔當著重要 角色。此外,核磁弛豫的數據表明是 N-端的兩個 磷絲胺酸把 statherin 錨定在磷灰石表面。剛才提及 的螺旋結構則具有相當的動性,其作用是使 statherin 更有效地阻止在溶液中的磷酸根接近其錨 定的磷灰石,從而令晶體無法進一步增長,圖 11 所示的模型就是實驗的總結。

六、結論

本文簡單介紹了固態核磁共振一些技術及其相 關應用,由於筆者識見所限,應用例子僅涉及多肽 及生物礦化的領域,其實固態核磁共振於孔洞材料 及其他生醫課題上亦有極重要的應用,讀者可參閱 化學九十四年第六十三卷第二期的一系列文章。雖 然固態核磁共振儀的購置所費不菲,但由於此技術 原則上可以應用於任何固態樣品,並在分子尺度上 提供極豐富的結構及動態上的訊息,因此固態核磁 共振的普及程度與日俱增,現已成為地區及國家研 究水平的指標性儀器之一。





圖 11. Statherin 蛋白與磷灰石相互作用示意圖⁽²⁰⁾。

參考文獻

- E. R. Andrew, A. Bradbury, and R. G. Eades, *Nature (London)*, 182, 1659 (1958).
- 2. I. J. Lowe, Phys. Rev. Lett., 2, 285 (1959).
- 3. M. Baldus, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 41, 1 (2002).
- I. Schnell, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 45, 145 (2004).
- A. Pines, M. G. Gibby, and J. S. Waugh, J. Chem. Phys., 59, 569 (1973).
- 6. M. Munowitz, Coherence and NMR, New York: Wiley (1988).
- M. Feike, D. E. Demco, R. Graf, J. Gottwald, S. Hafner, and H. W. Spiess, *J. Magn. Reson. A*, **122**, 214 (1996).
- 8. A. Brinkmann and M. H. Levitt, J. Chem. Phys., 115, 357 (2001).
- 9. N. A. Oyler and R. Tycko, J. Phys. Chem. B, 106, 8382 (2002).
- 10. Y. H. Tseng, Y. Mou, C. Y. Mou, and J. C. C. Chan, Solid State

Nucl. Magn. Reson., 27, 266 (2005).

- J. C. C. Chan, N. Oyler, W. M. Yau, and R. Tycko, *Biochemistry*, 44, 10669 (2005).
- 12. Y. Mou and J. C. C. Chan, Chem. Phys. Lett., 419, 144 (2006).
- Y. Mou, J. C. H. Chao, and J. C. C. Chan, *Solid State Nucl.* Magn. Reson., 29, 278 (2006).
- 14. J. C. C. Chan and R. Tycko, J. Chem. Phys., 118, 8378 (2003).
- J. C. C. Chan and R. Tycko, J. Am. Chem. Soc., 125, 11828 (2003).
- J. C. C. Chan, M. Bertmer, and H. Eckert, J. Am. Chem. Soc., 121, 5238 (1999).
- K. S. K. Lin, Y. H. Tseng, Y. Mou, Y. C. Hsu, C. M. Yang, and J. C. C. Chan, *Chem. Mater.*, **17**, 4493 (2005).
- S. Mann, Biomineralization-Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry, New York: Oxford University Press (2001).
- Y.-H. Tseng, C.-Y. Mou, and J. C. C. Chan, J. Am. Chem. Soc., 128, 6909 (2006).
- G. P. Drobny, J. R. Long, T. Karlsson, W. Shaw, J. Popham, N. Oyler, P. Bower, J. Stringer, D. Gregory, M. Mehta, and P. S. Stayton, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **54**, 531 (2003).
- 陳振中先生為香港中文大學化學博士,現任國立台灣 大學化學系助理教授。
- Jerry Chun Chung Chan received his Ph.D. in chemistry from the Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong. He is currently an assistant professor in the Department of Chemistry at National Taiwan University.