

第 55 回 NMR 討論会

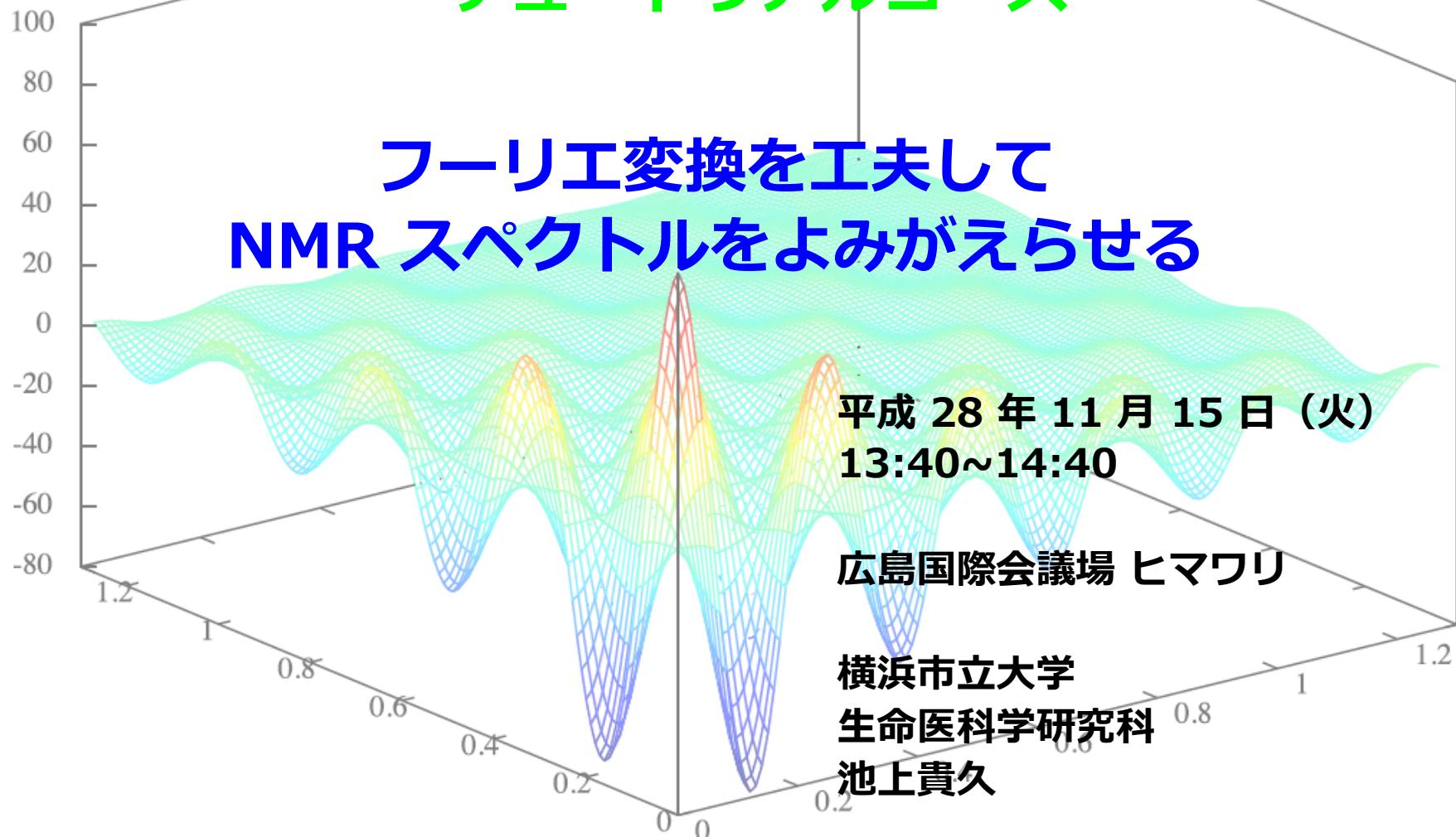
チュートリアルコース

フーリエ変換を工夫して
NMR スペクトルをよみがえらせる

平成 28 年 11 月 15 日 (火)
13:40~14:40

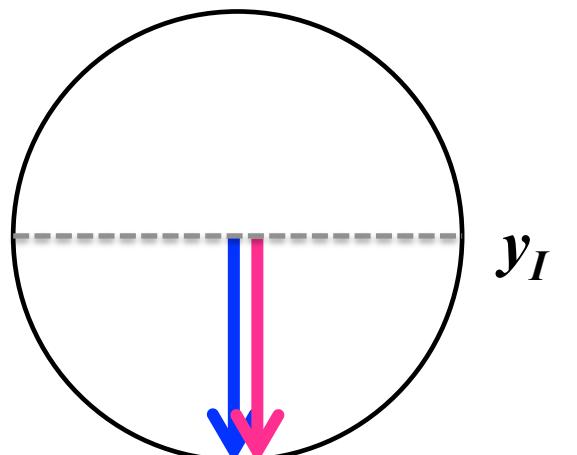
広島国際会議場 ヒマワリ

横浜市立大学
生命医科学研究科
池上貴久



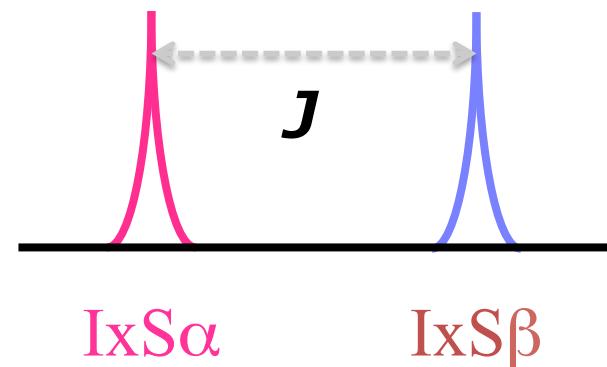
同じ測定データでも、どのようにフーリエ変換するかによって、スペクトルに大きな違いが生じることがあります。もちろん、プロセス法も考えておいたうえで測定パラメータを設定するのがよいのですが、もし間違えて測定してしまったとしても、フーリエ変換をなんとか工夫することによって、そのミスを少しでもカバーできればそれに越したことはありません。今回はプロセス用パラメータをブラックボックスとして使ってしまっている NMR 初心者を対象に、プロセス法における工夫や個々の基本的なパラメータの意味について、できるだけ詳しく紹介したいと思います。

コヒーレンス : x
検出位相 : x

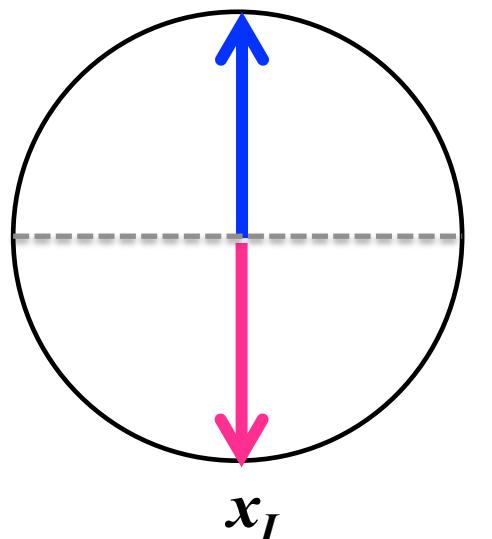


吸収波形

同位相 in-phase

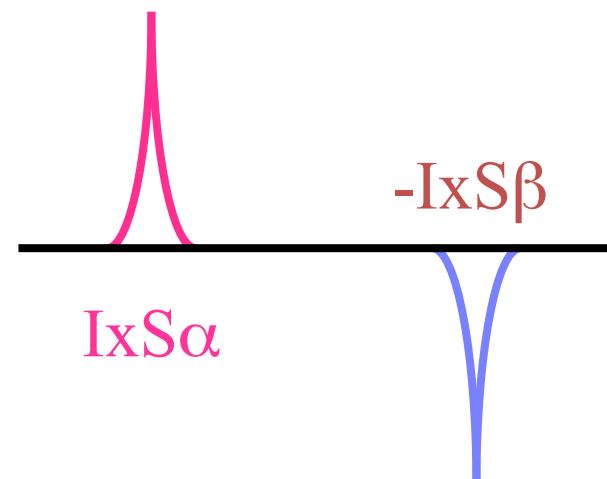


$$\mathbf{S}\alpha + \mathbf{S}\beta = 1$$



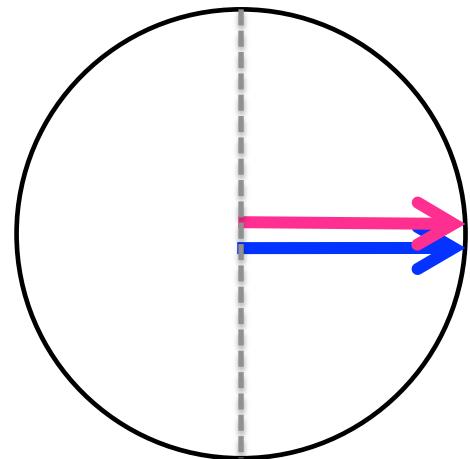
y_I

$$\mathbf{S}\alpha - \mathbf{S}\beta = 2\mathbf{S}z$$

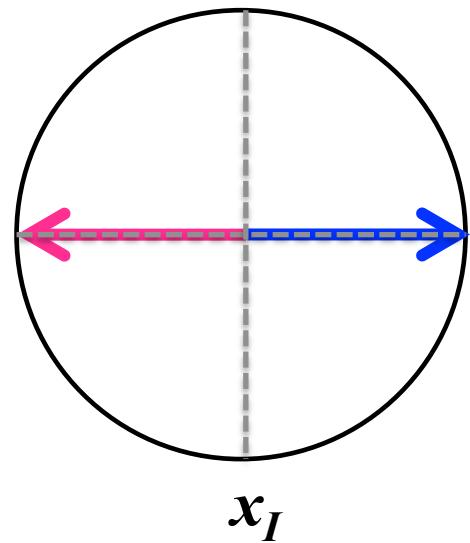
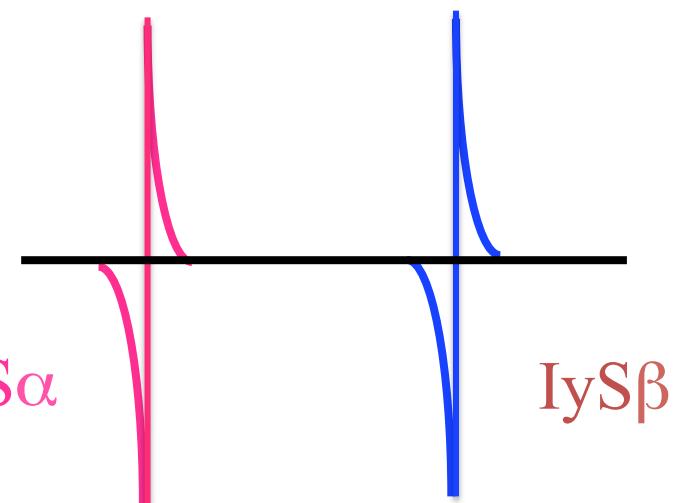


反位相 anti-phase

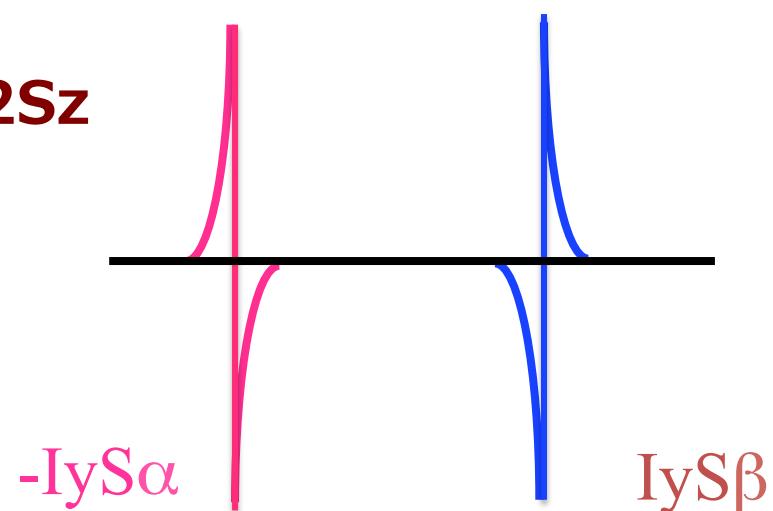
コヒーレンス : y
検出位相 : x



$$S\alpha + S\beta = 1$$

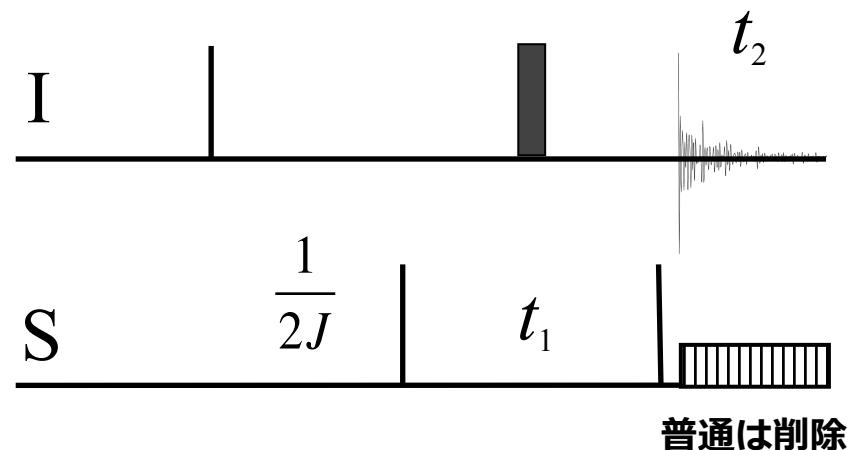


$$S\alpha - S\beta = 2Sz$$



分散波形

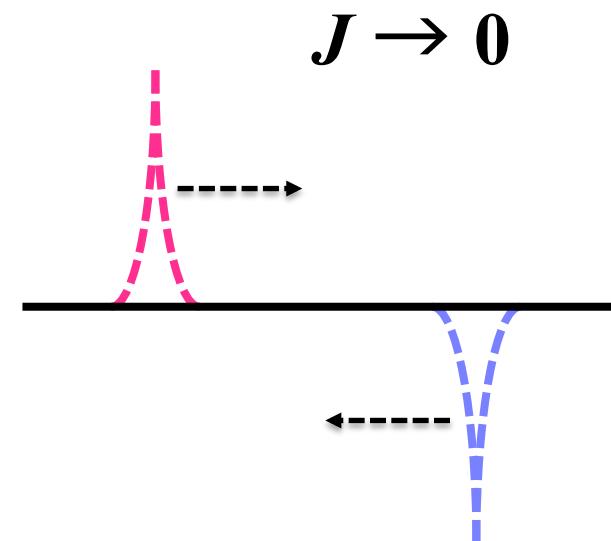
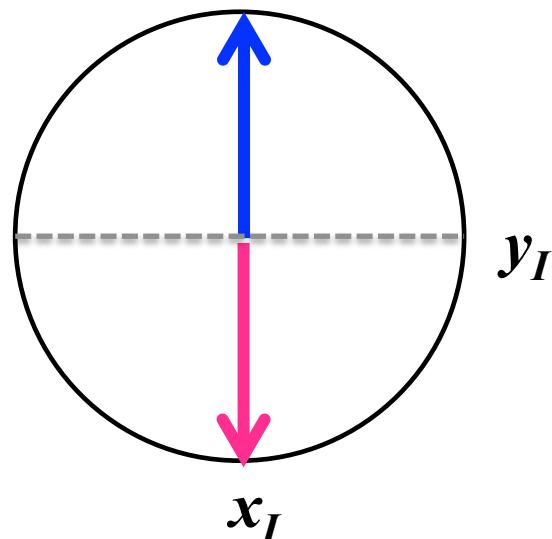
HMBC (+ decoupling ?)



反位相の状態で
デカップリング

↓
二重線が消える

(分散波形でも起きる)



フーリエ変換

$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} S(t) \exp(-i\omega t) dt$$

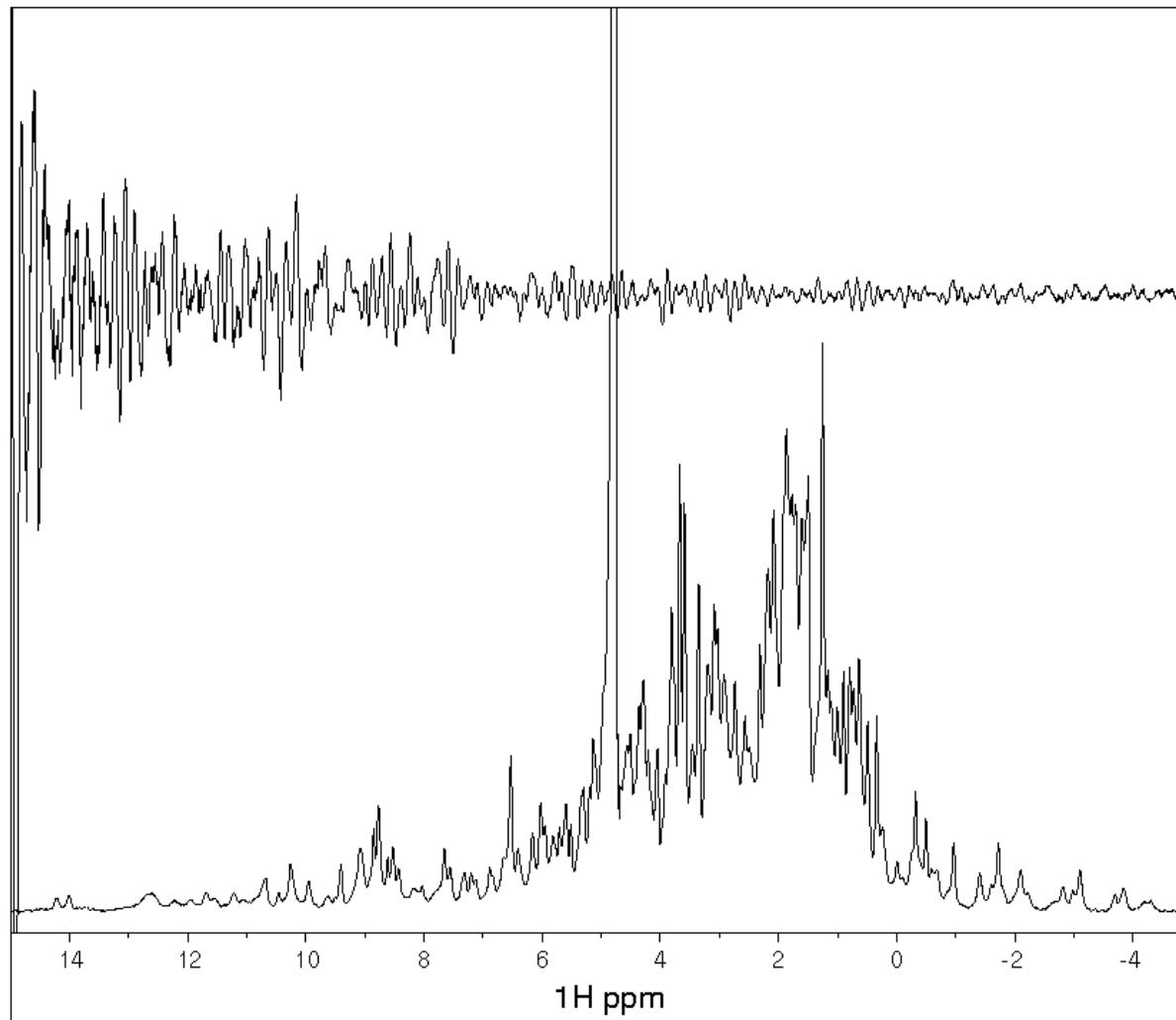


1768-1830 フランスの数学、物理学者

1789 フランス革命に遭遇

**ナポレオンに随行してエジプトに遠征
ロゼッタ・ストーンを発見**

FID をフーリエ変換すると NMR スペクトルになる

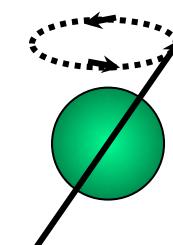


^1H スピンの回転速度を表す

FID
(時間軸データ)

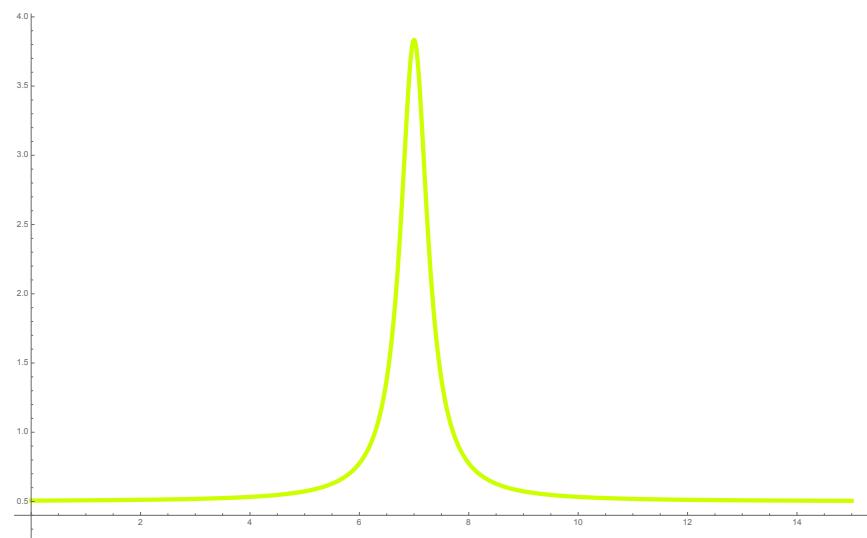
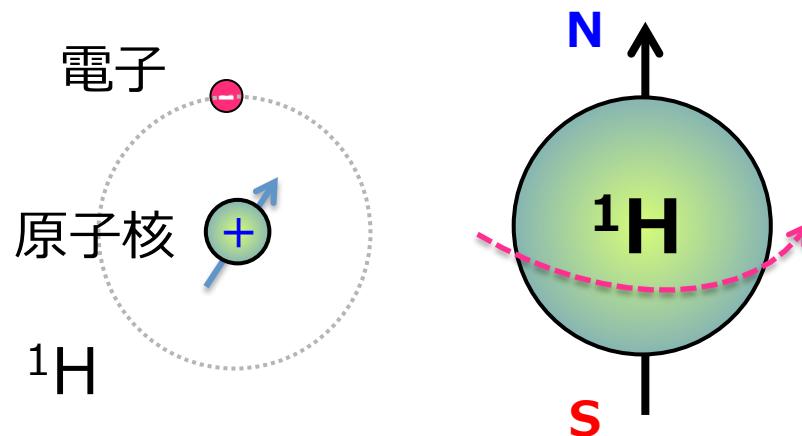
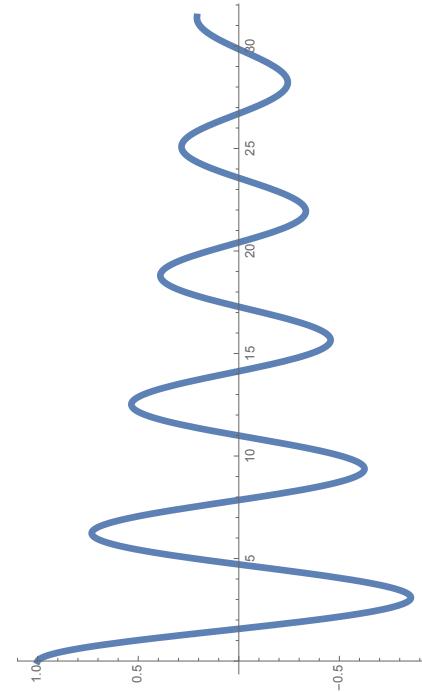
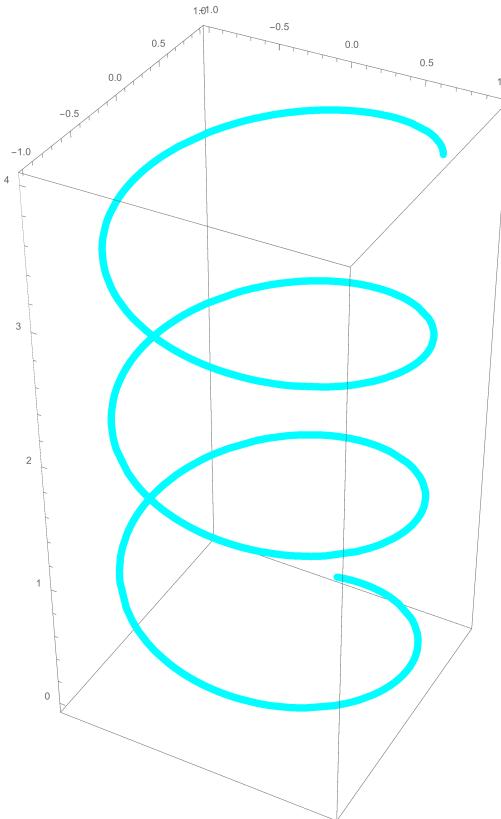
フーリエ変換後

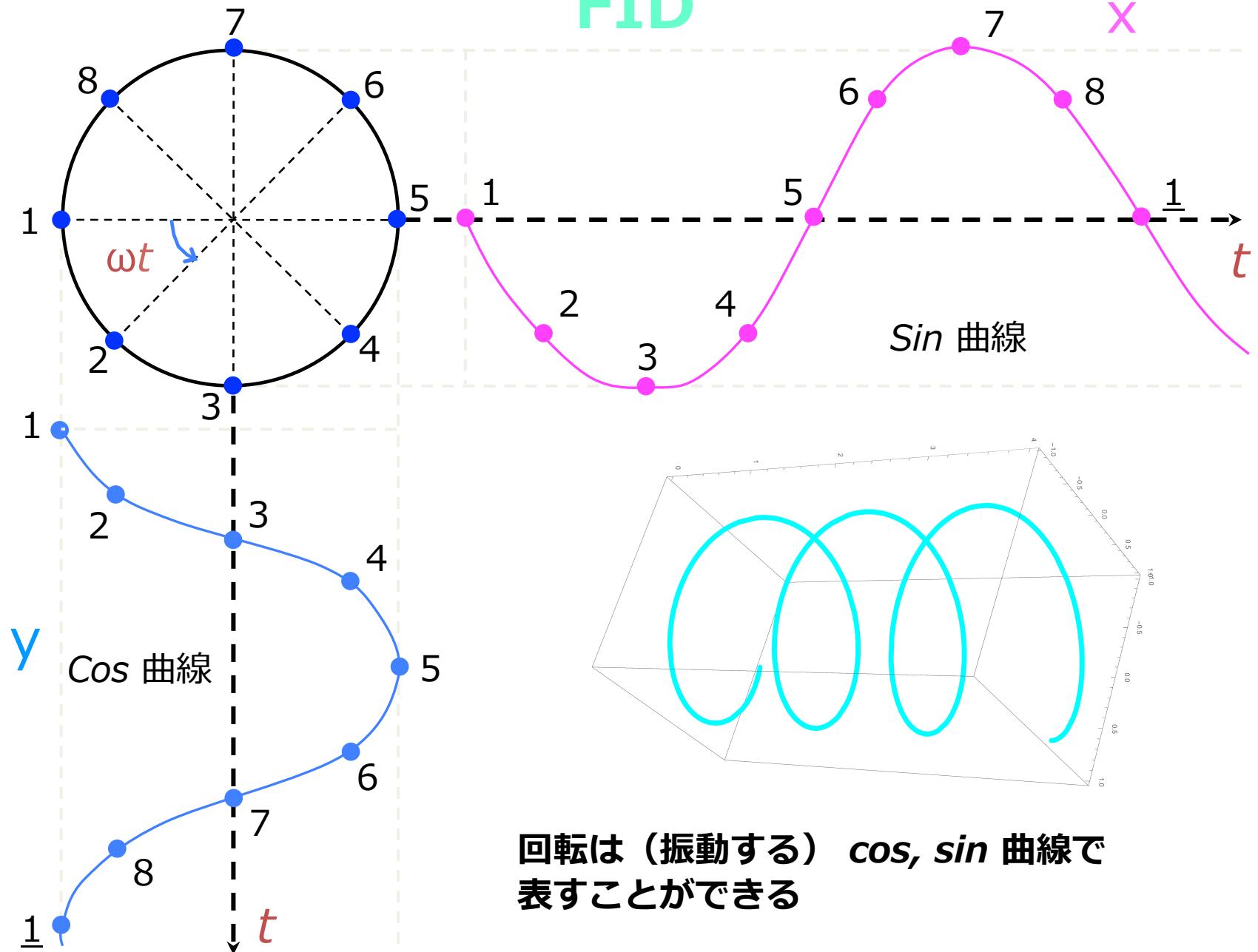
スペクトル
(周波数軸データ)



スピン

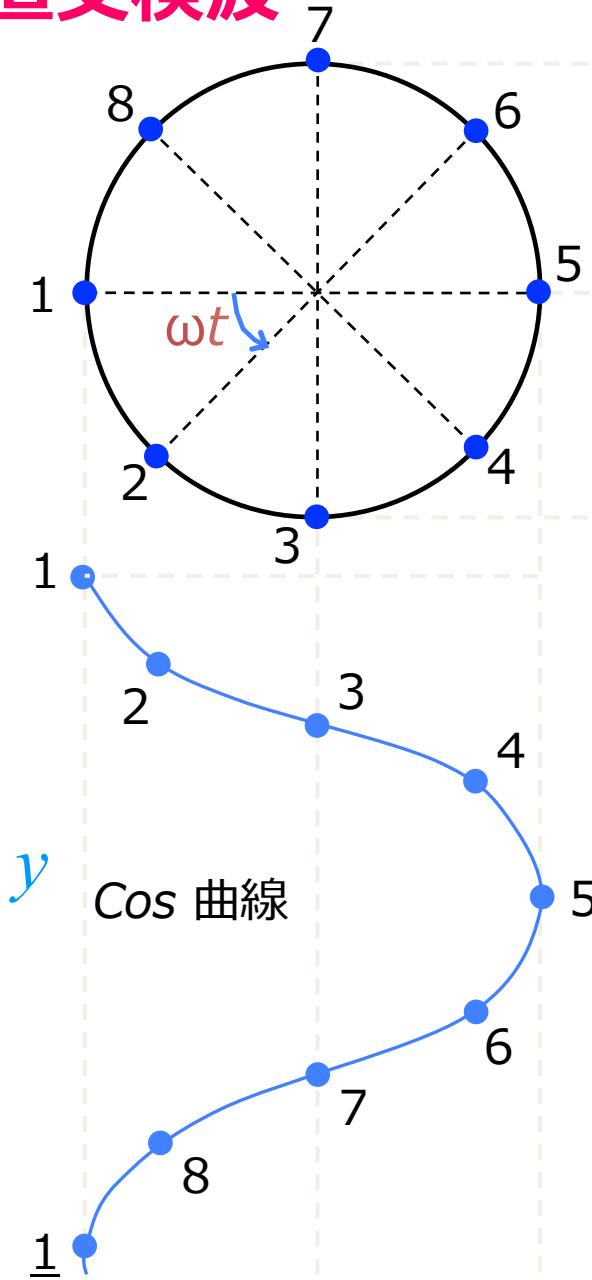
500MHz NMR
毎秒5億回転



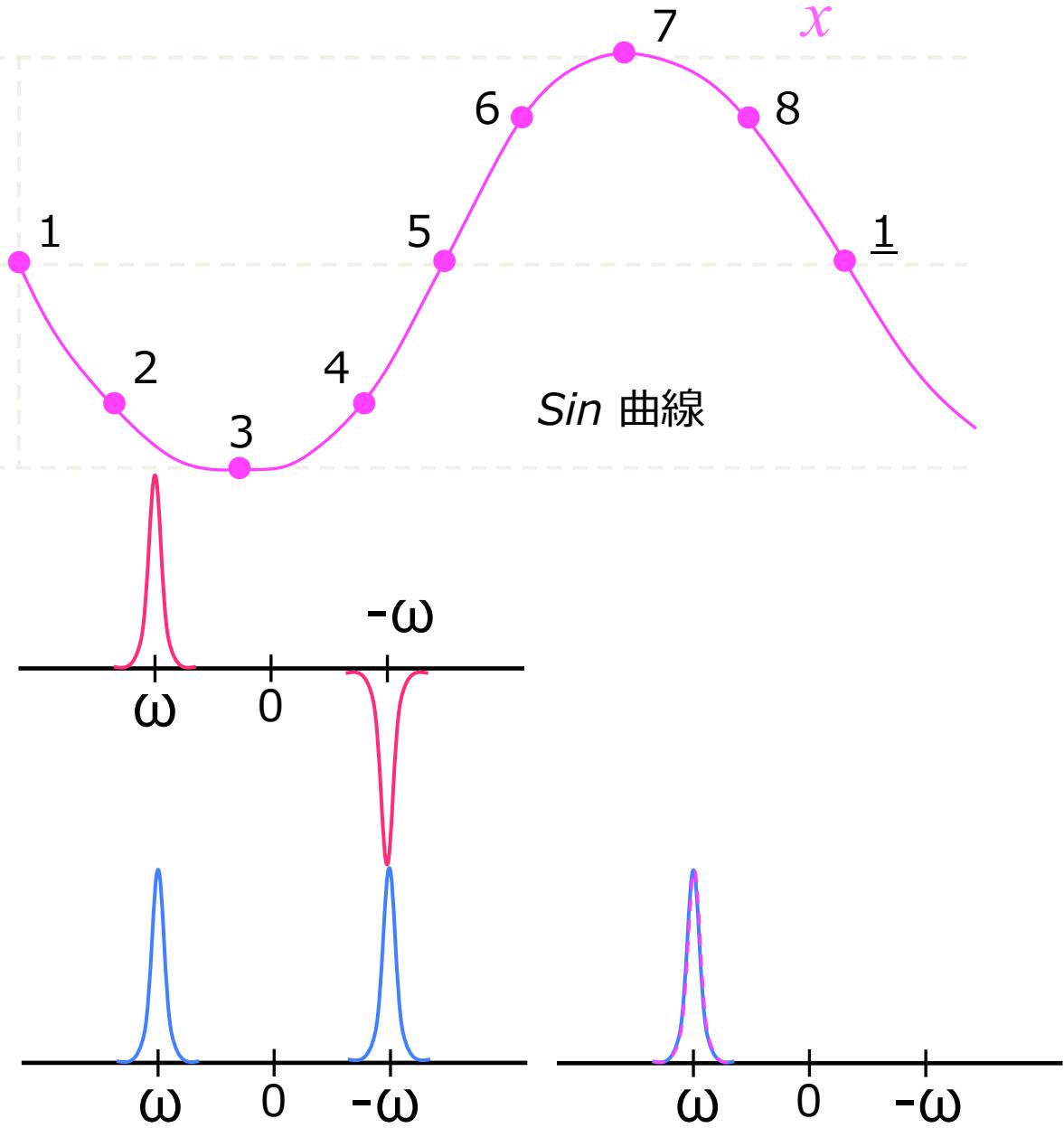


回転は（振動する） \cos, \sin 曲線で
表すことができる

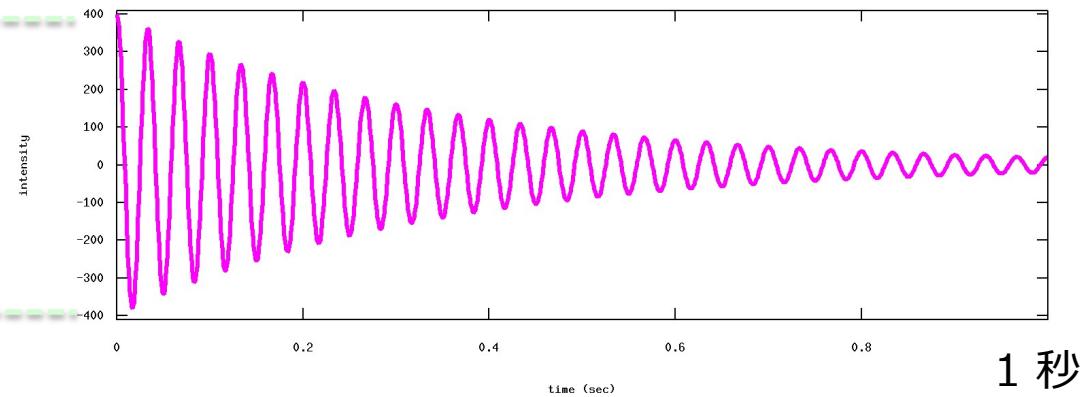
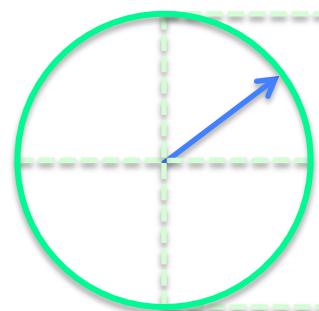
直交検波



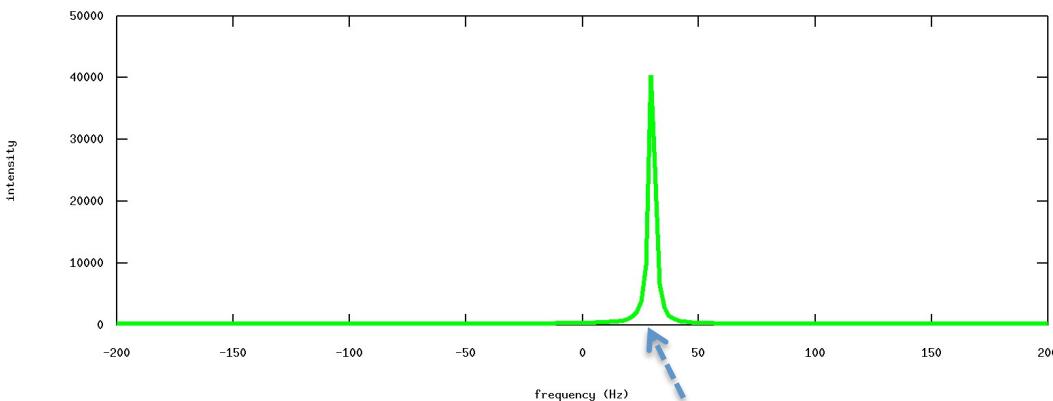
直接測定で検出される信号 FID



1秒間に 30 周回転したとすると



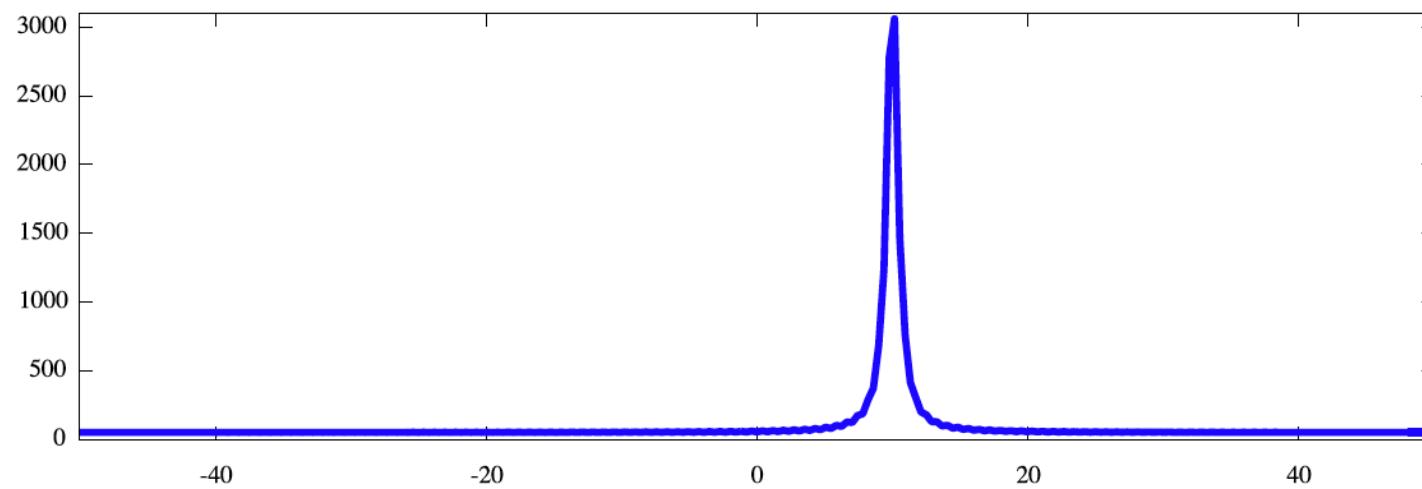
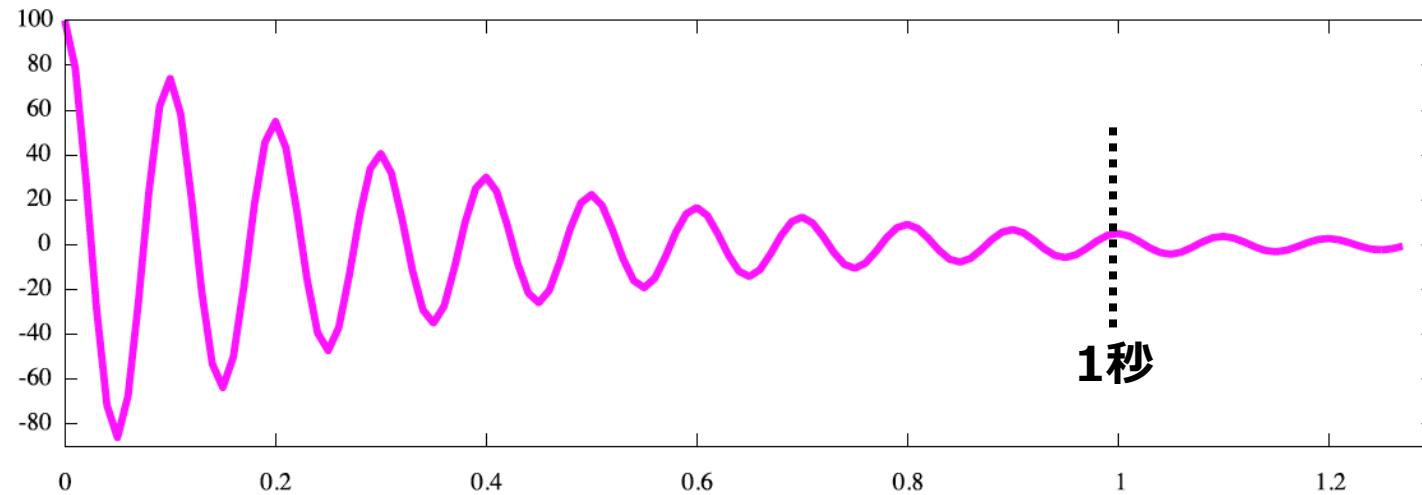
1秒



30 Hz

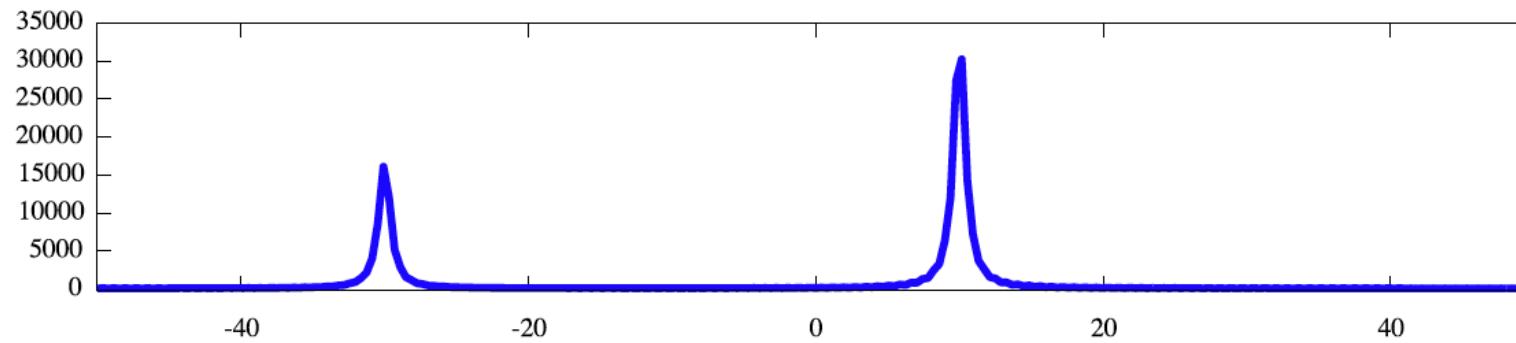
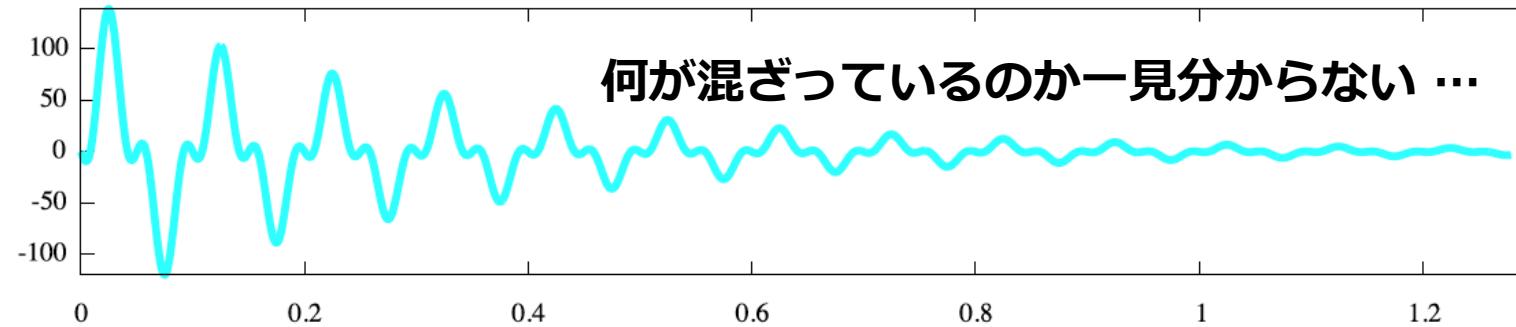
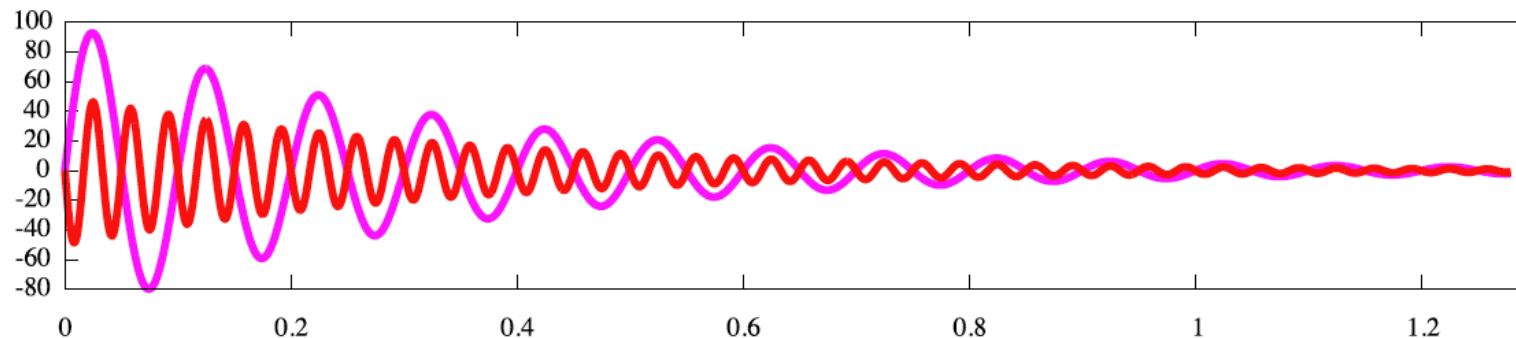
フーリエ変換

1秒間に 10 回転していたら ….



10 Hz の位置にピークが出た。

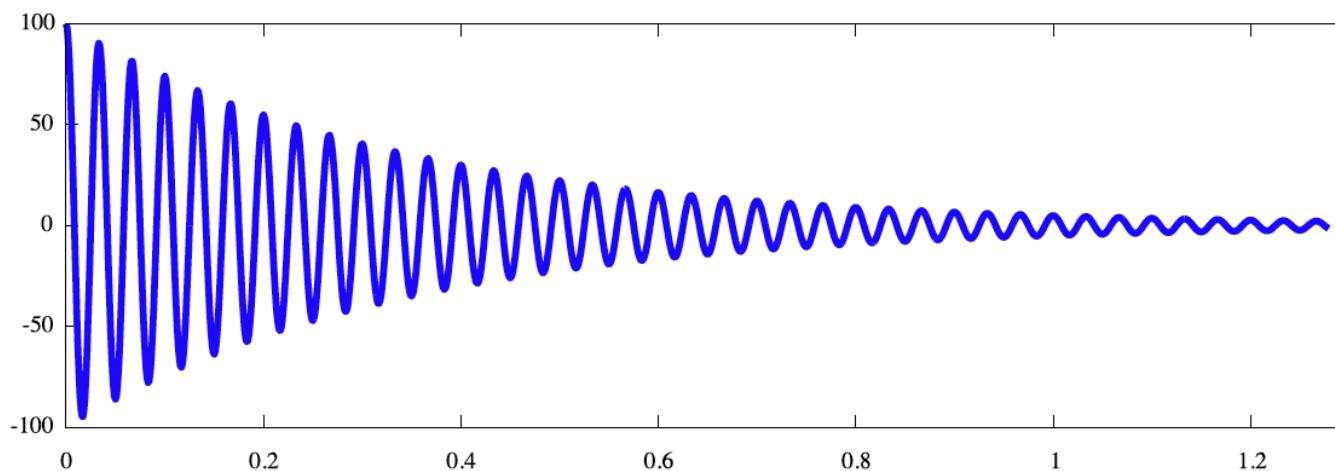
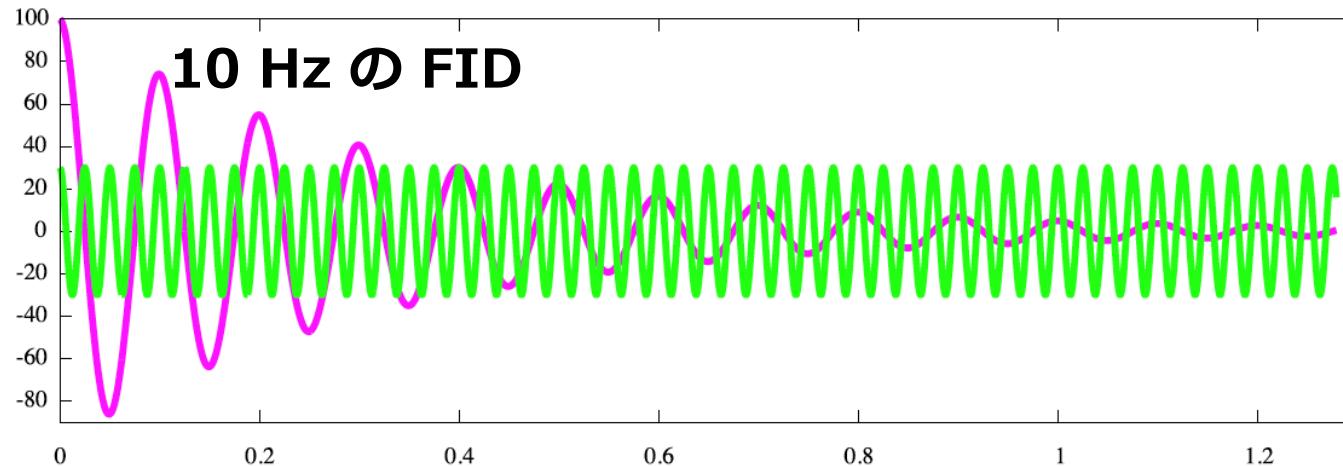
もう一つ、1秒間に30回、しかも、逆向きに回転していたら



10 Hz と -30Hz の位置にピークが出た。
周波数だけでなく、大きさまで、きっちりと分けられた！

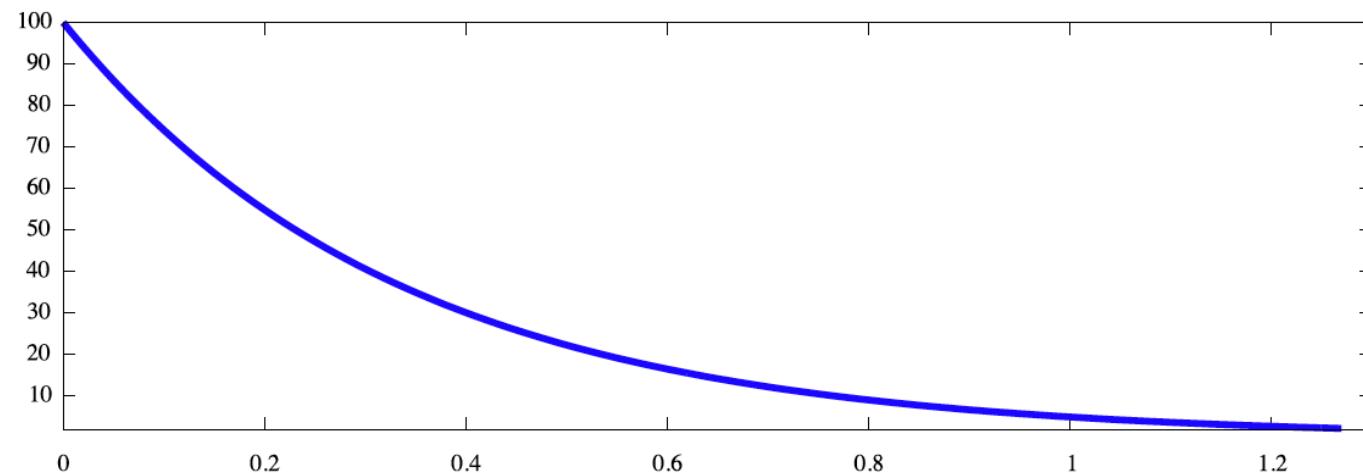
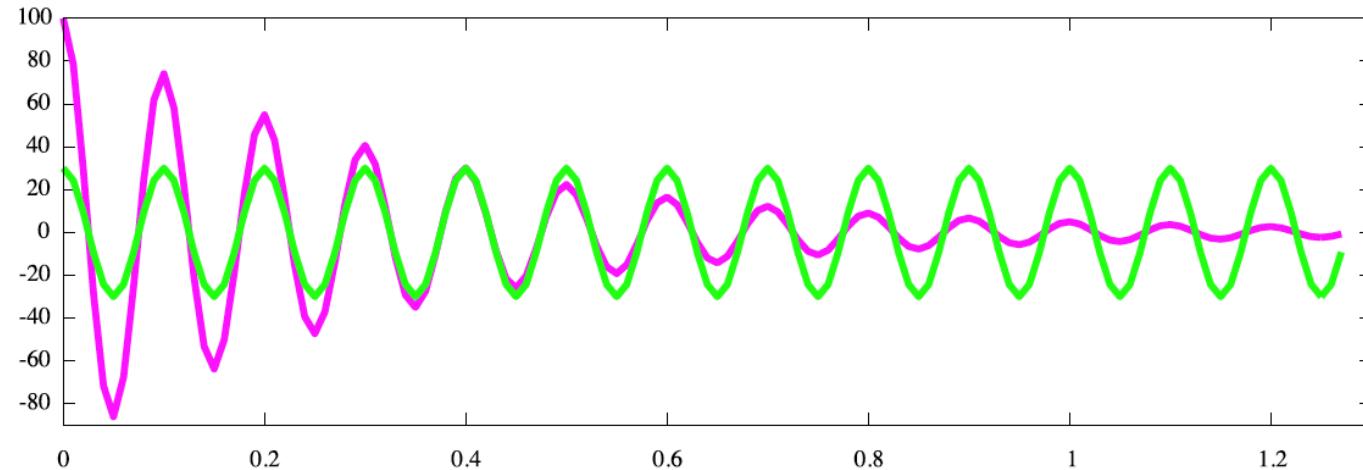
$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} S(t) \exp(-i\omega t) dt = \int_{-\infty}^{\infty} S(t) \{ \cos(\omega t) - i \sin(\omega t) \} dt$$

では、試しに $\cos(40 * t)$ を掛けてみよう。



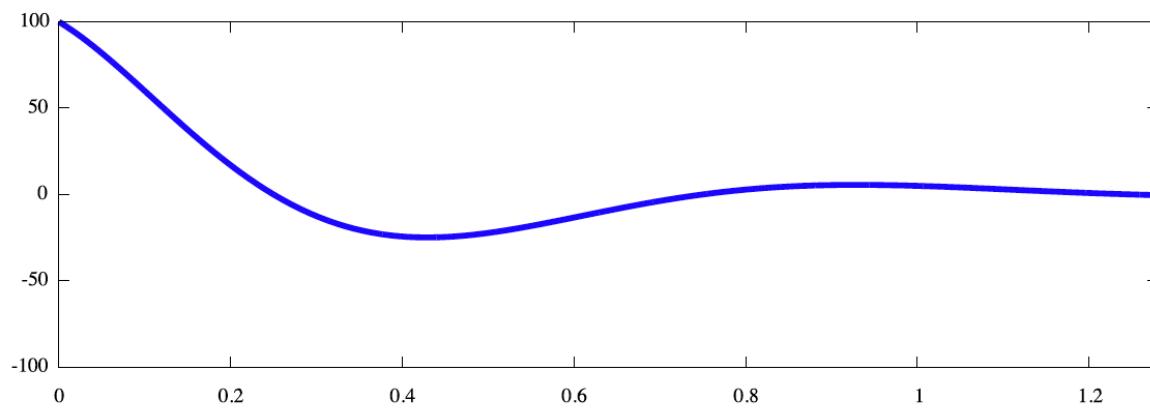
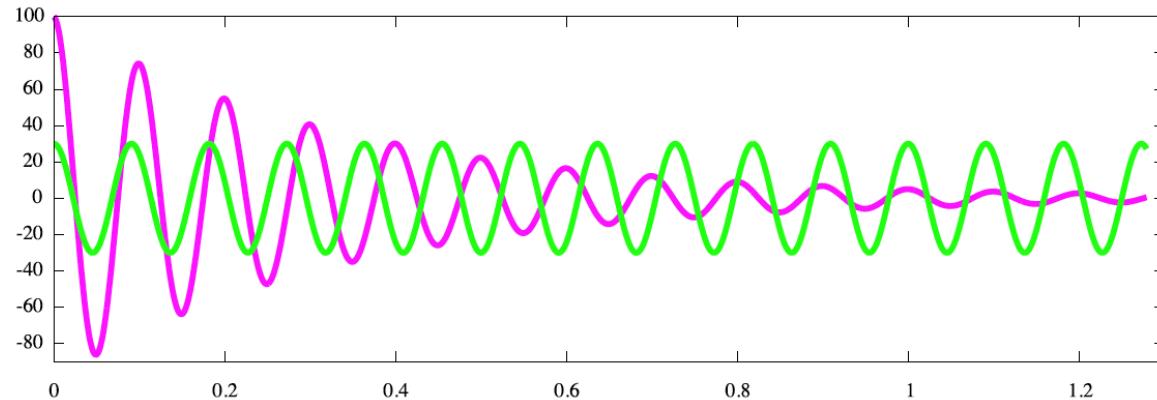
端から端まで足し合わせると 0 になるから、40 Hz は間違いのようだ。

今度は、もう少し実際の振動に近そうな $\cos(10 * t)$ を掛けてみよう。



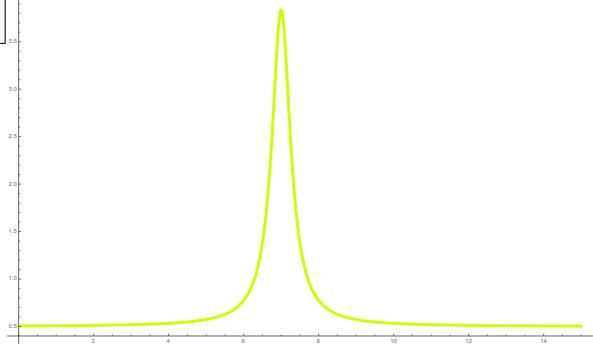
端から端まで足し合わせると 0 にはならないから
どうも 10 Hz が正しい周波数のようだ。

では、 $\cos(11 * t)$ を掛けたら、どうなるのだろう？



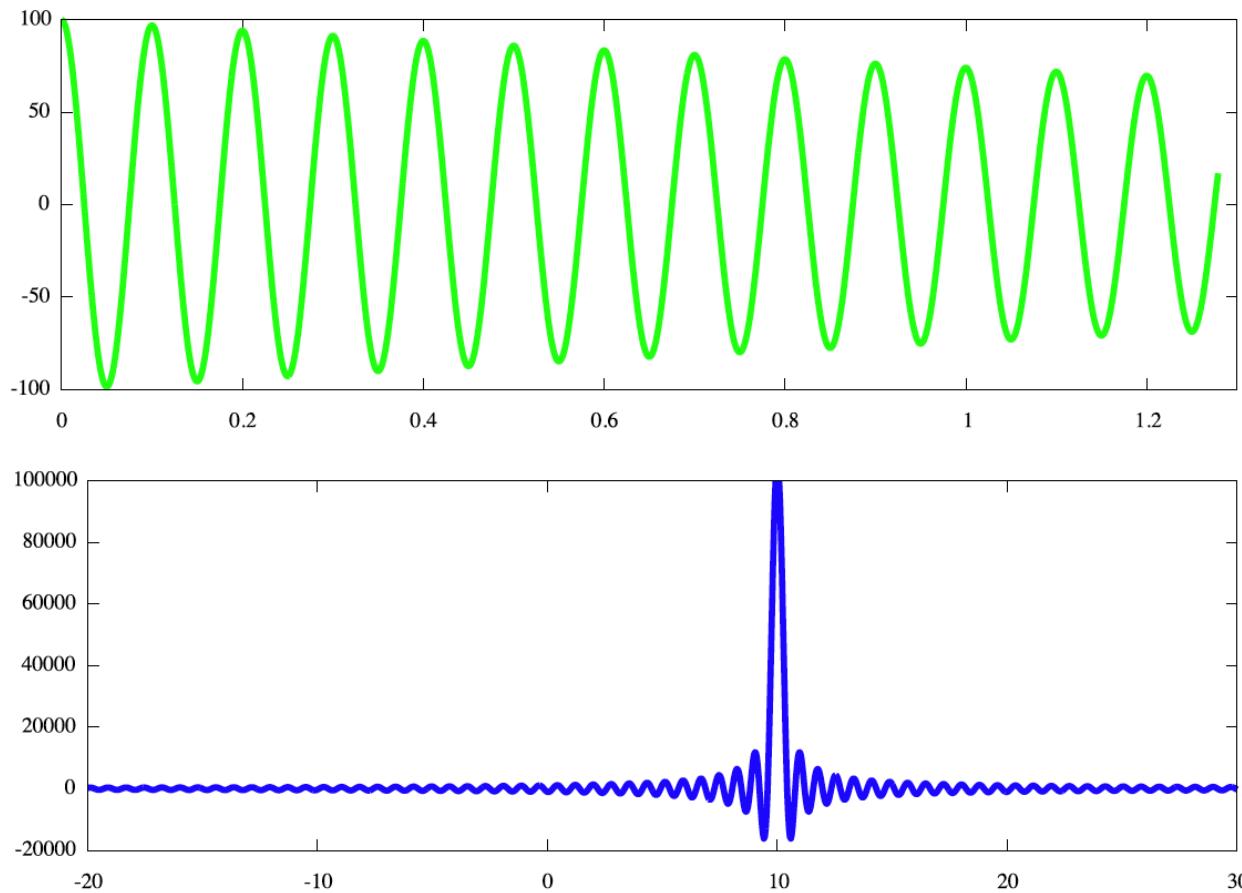
$$\text{半値幅} = 1 / (\pi T_2^*)$$

微妙 … 完全には 0 にならない。
FID がもう少し長ければ 0 になるのに …



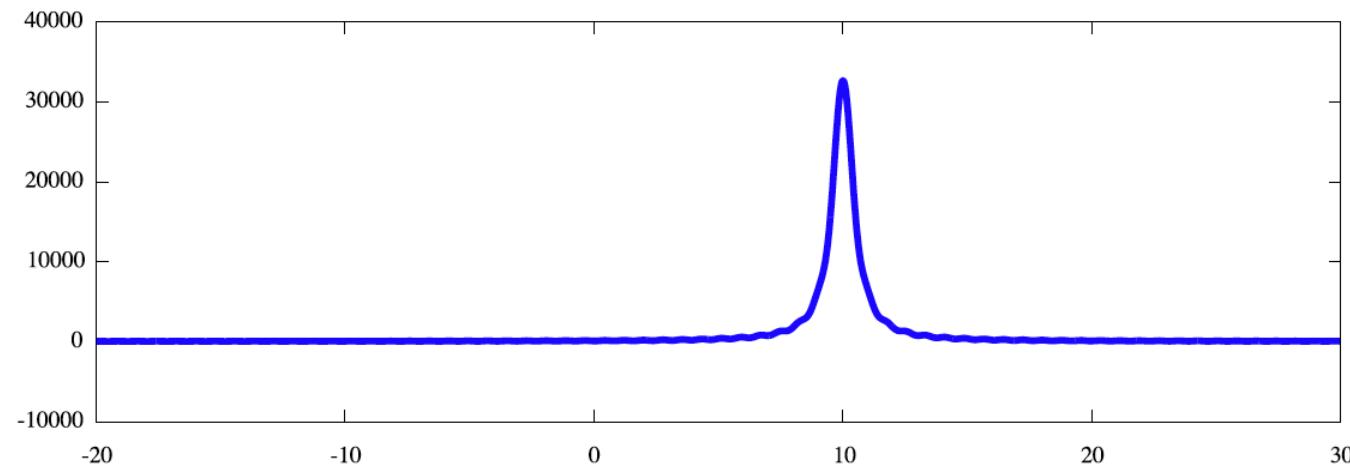
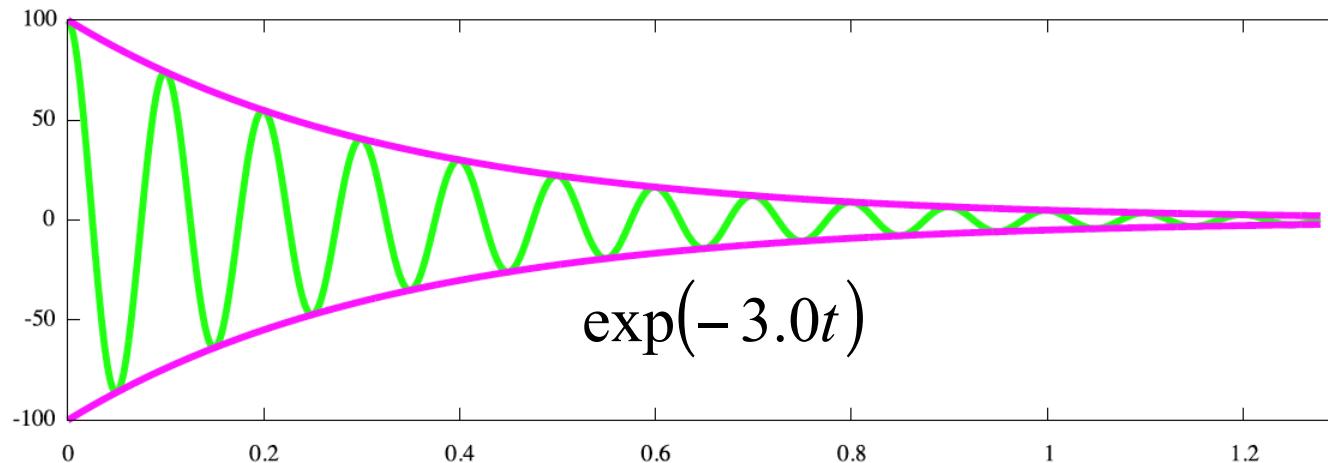
Window 窓関数の適用

FID の右端に値が残っていると …



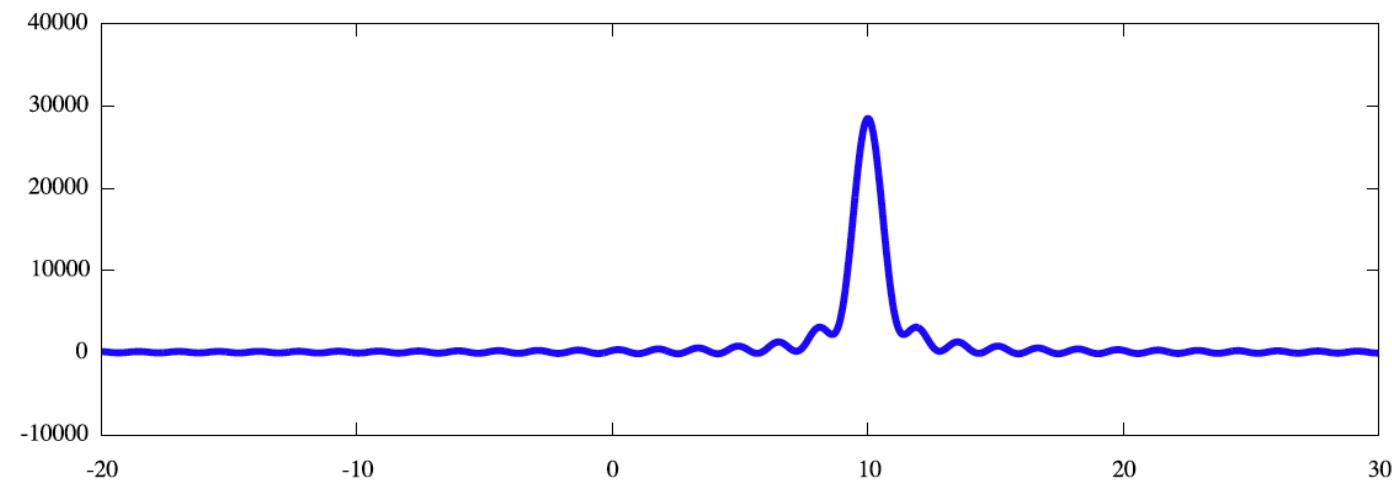
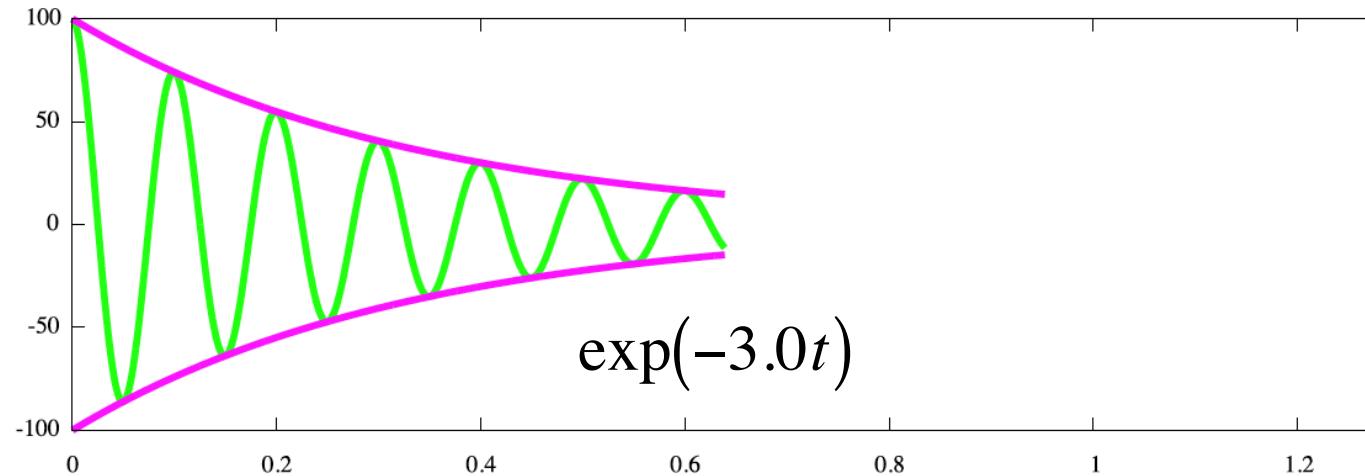
フーリエ変換後に wiggle (波) が出てしまう。

FID の右端が 0 になるように整形すると …



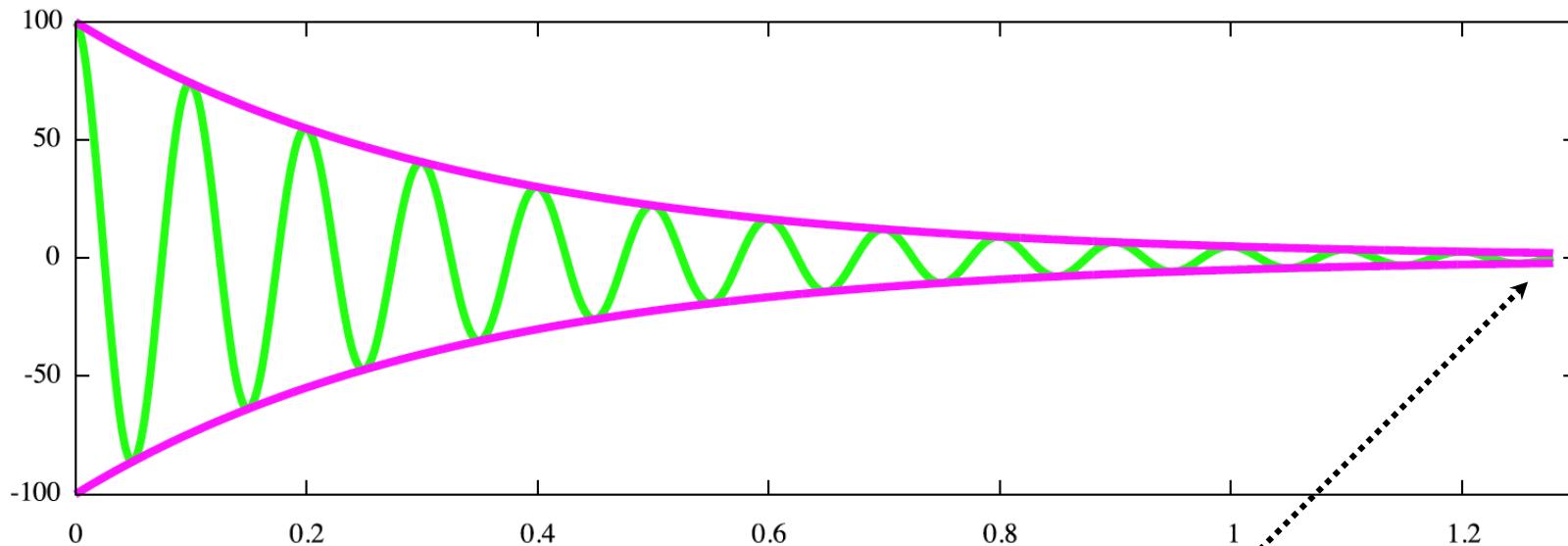
フーリエ変換後に wiggle (波) は消える。

FID の長さを半分にして、同じ window をかけると …



再び wiggle (波) が出来てしまう。

exp 窓関数で本当に大丈夫？



FID サンプリングの最後の値が 0 に近くなるように
この変数を調整しなければならない。

$$\exp(-3.0t)$$

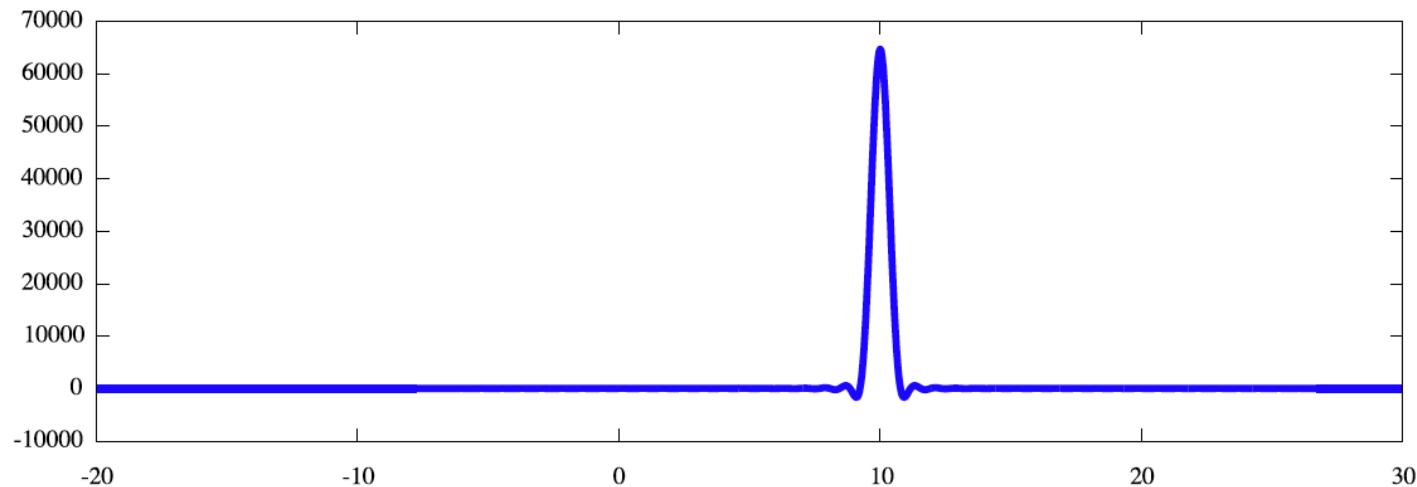
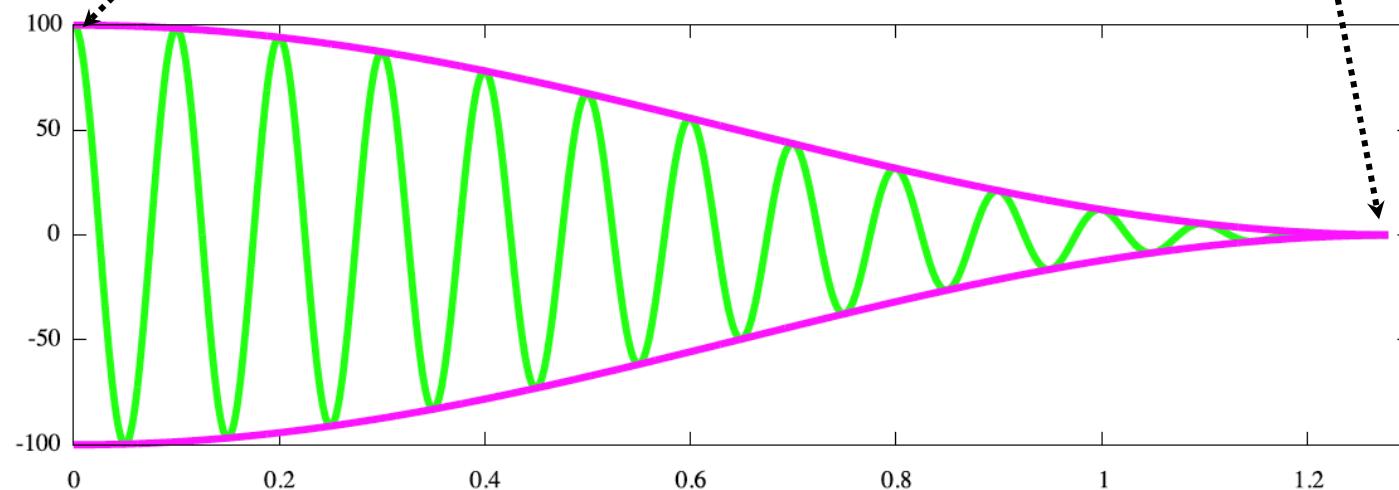
$$\sin^2(0.99\pi) = \frac{1}{1000}$$

程度であればきっと安全

$\sin^2(\cos^2)$ 窓関数はなかなか便利

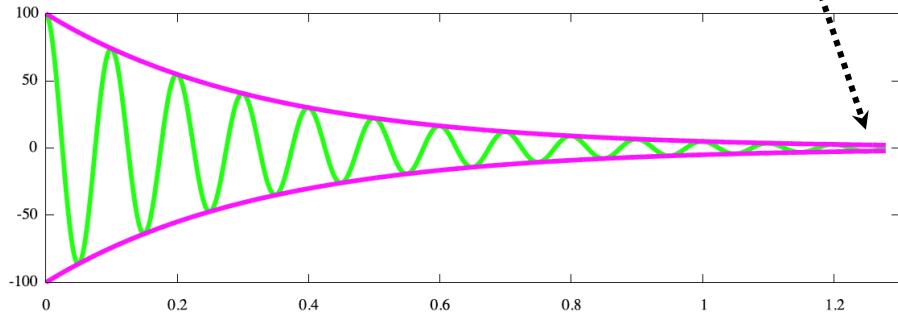
$$\sin^2(0.5\pi) = 1$$

$$\sin^2(0.99\pi) = \frac{1}{1000}$$

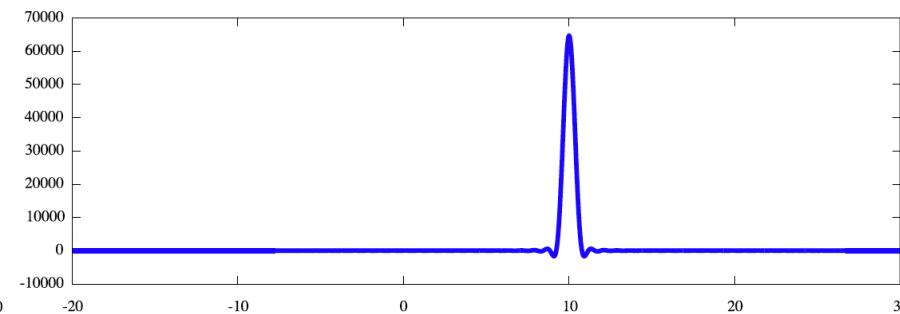
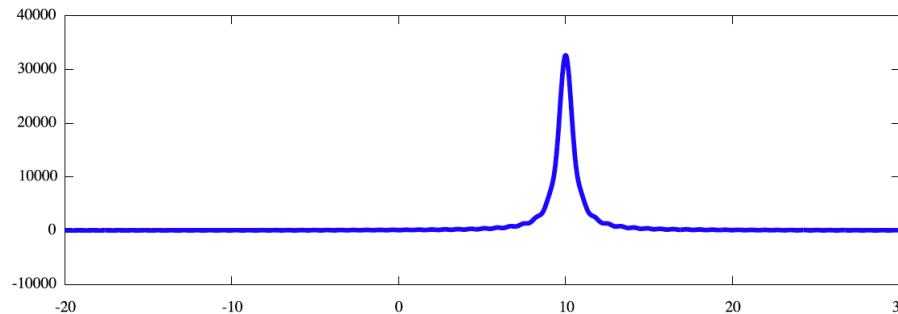
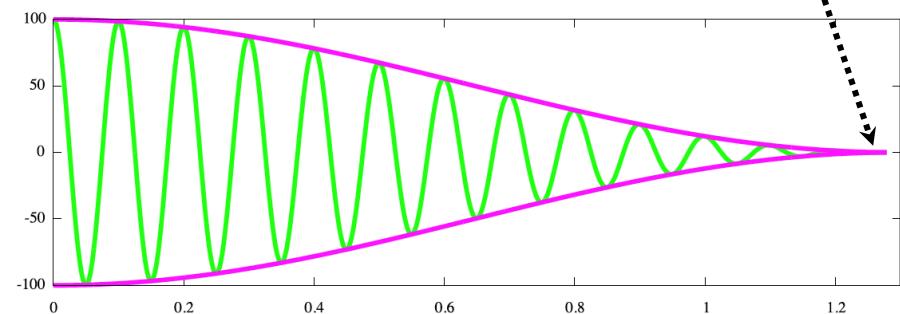


\sin^2 (\cos^2) 窓関数は線幅もそれほど広げない。

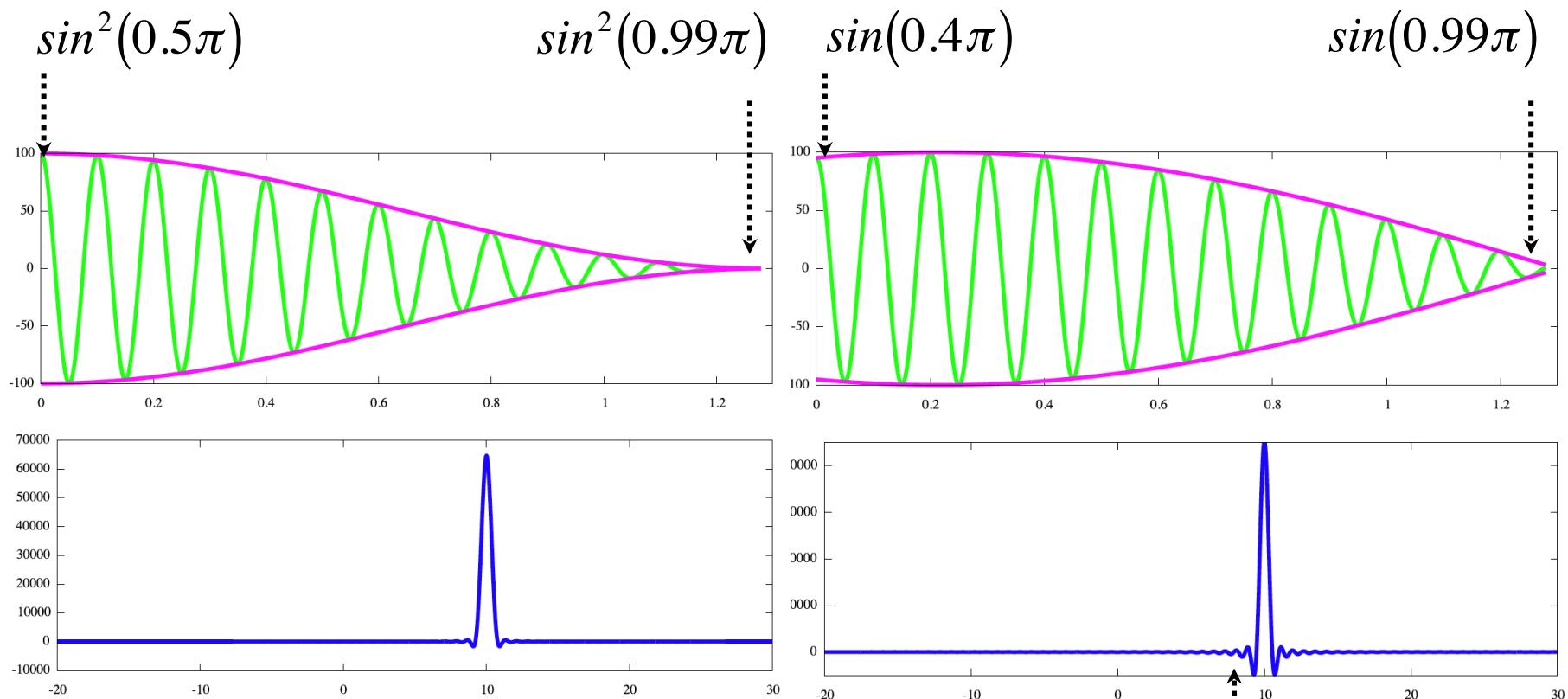
$$\exp(-3a_q) = 0.02$$



$$\sin^2(0.99\pi) = \frac{1}{1000}$$



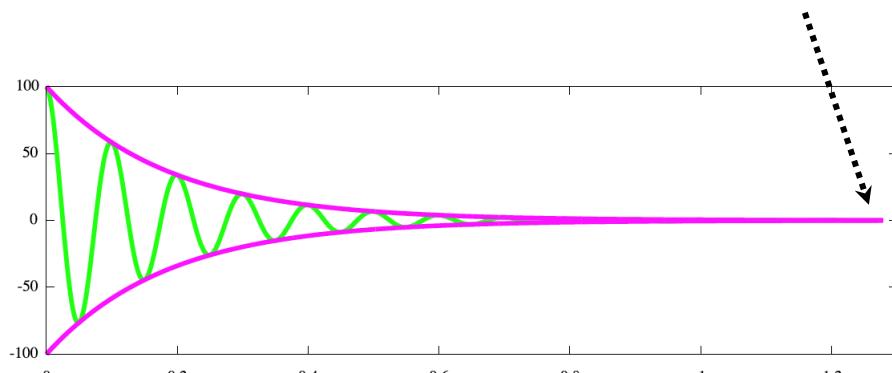
ポイント数の少ない間接測定軸には、
 \sin (\cos) 窓関数を使えば、
分解能をそれほど落とさずに済む。



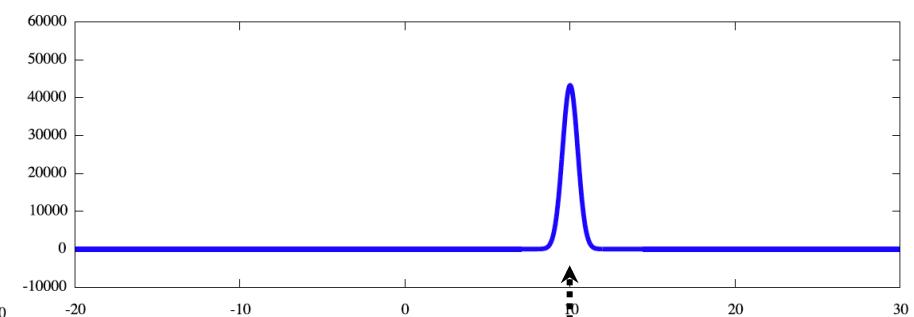
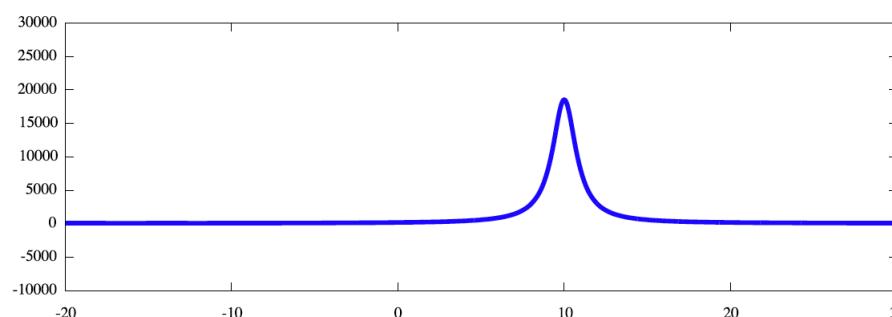
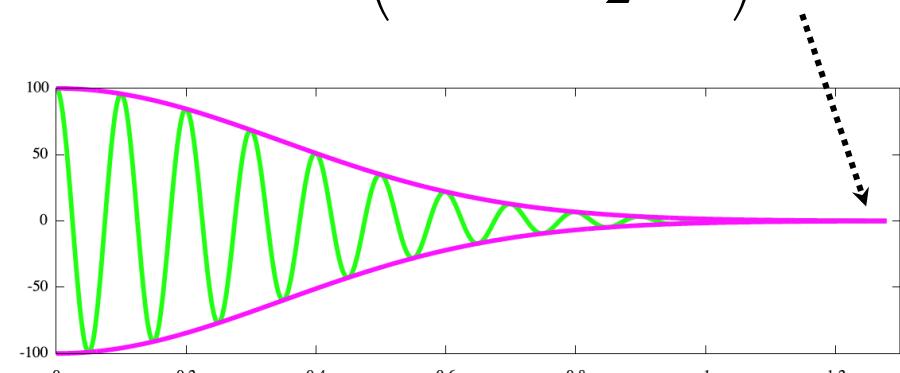
しかし、着地が急激な分、少し wiggle が ...

Lorentz-to-gauss 窓関数を使えば、 裾野が長く尾を引かない。

$$\exp(-5.4a_q) = 0.001$$

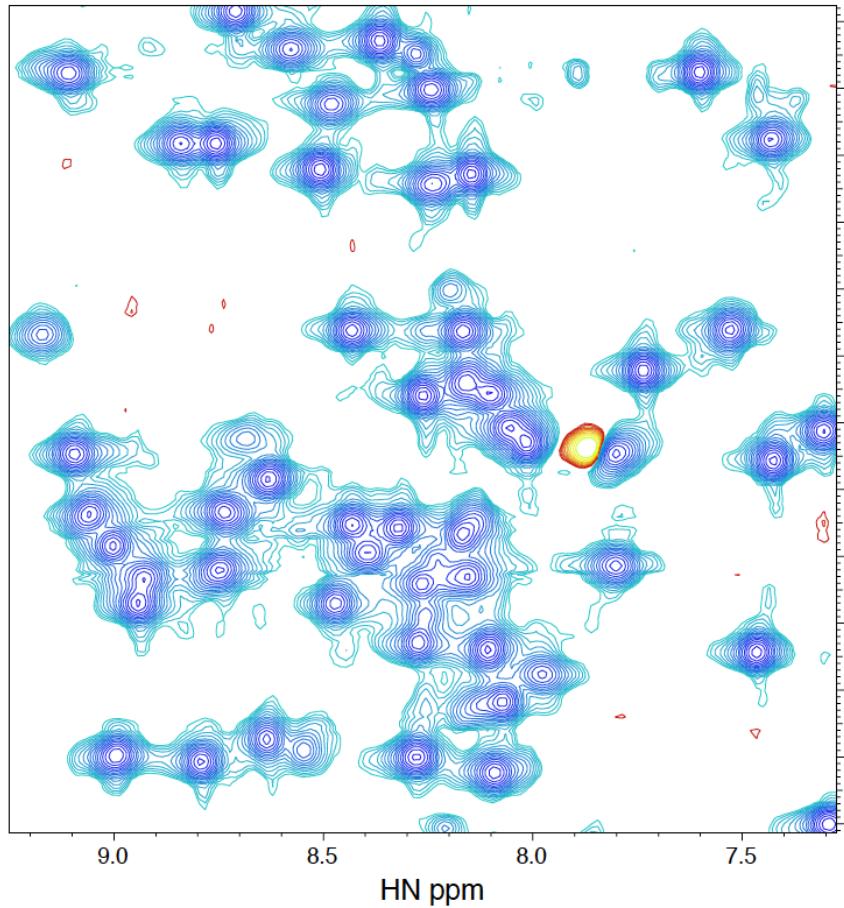


$$\exp\left(+R_2a_q - \frac{\sigma^2}{2}a_q^2\right) = 0.001$$

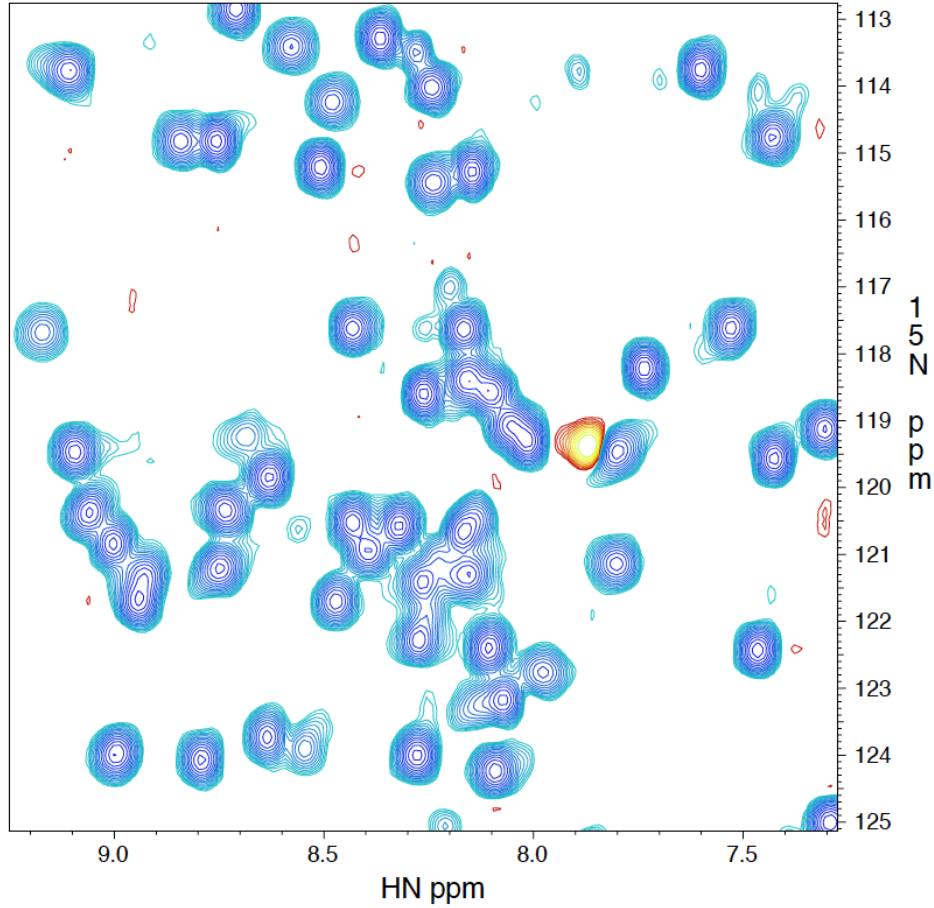


分解能が向上した交換条件として、少し感度を失う。

感度が許せば、lorentz-to-gauss 窓関数は
 \cos^2 窓関数よりもよいかも。



$^{1}\text{H}/^{15}\text{N}$ 次元ともに \cos^2



$^{1}\text{H}/^{15}\text{N}$ 次元ともに lorentz-to-gauss

なぜ 1 次元ずつフーリエ変換するのか？

$$\exp(-i \omega_I t_2) * \exp(-i \omega_S t_1)$$

$$\{\cos(\omega_I t_2) + i \sin(\omega_I t_2)\} * \{\cos(\omega_S t_1) + i \sin(\omega_S t_1)\}$$

実数部分 : $\cos(\omega_I t_2) \cos(\omega_S t_1) - \sin(\omega_I t_2) \sin(\omega_S t_1)$

虚数部分 : $\cos(\omega_I t_2) \sin(\omega_S t_1) + \sin(\omega_I t_2) \cos(\omega_S t_1)$

なぜ 1 次元ずつフーリエ変換するのか？

$$\exp(-i \omega_I t_2) * \exp(-i \omega_S t_1)$$
$$\{\cos(\omega_I t_2) + i \sin(\omega_I t_2)\} * \{\cos(\omega_S t_1) + i \sin(\omega_S t_1)\}$$

$$\{R(\omega_I) + I(\omega_I)\} * \{\cos(\omega_S t_1) + i \sin(\omega_S t_1)\}$$

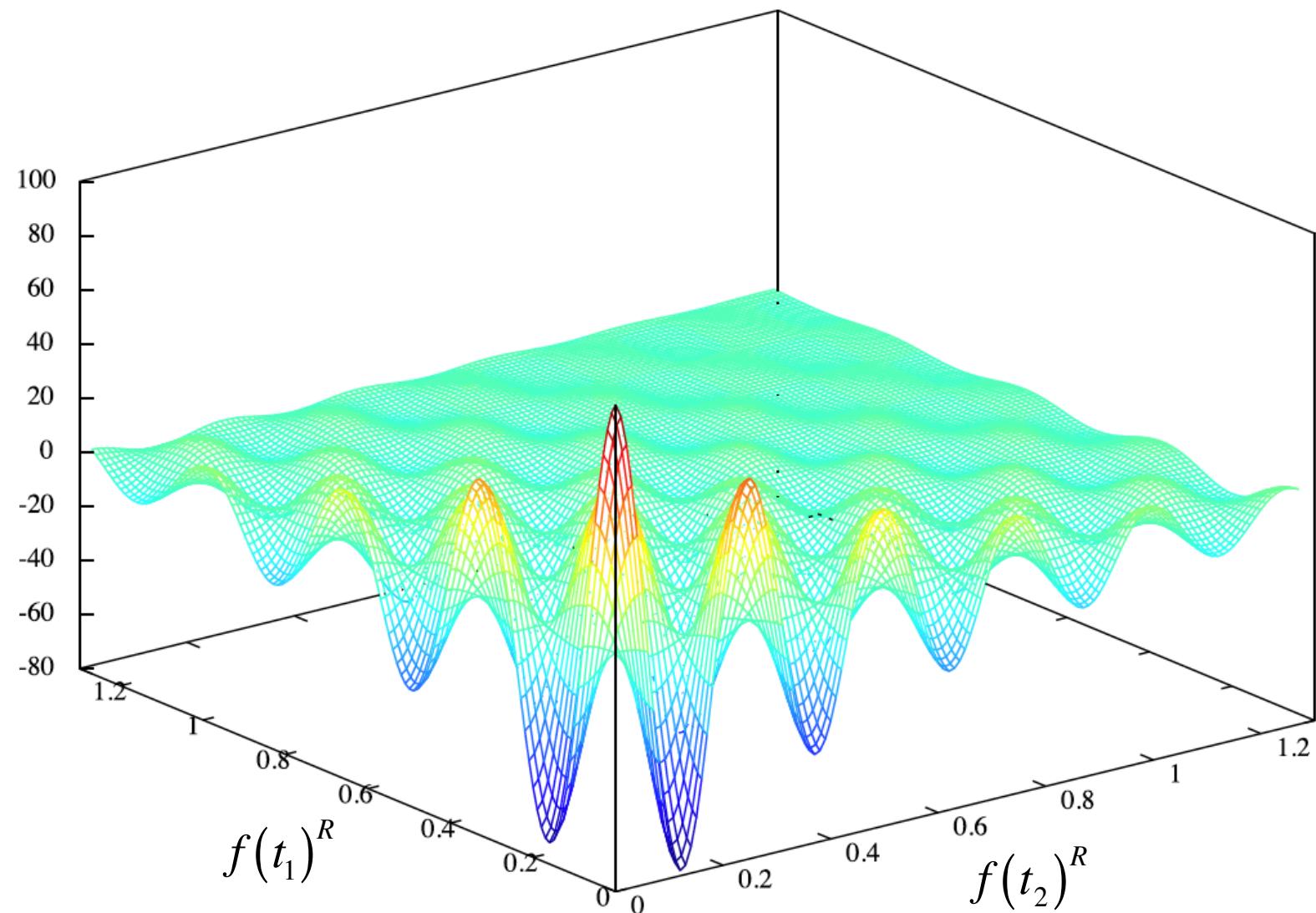
↓ 位相補正

$$R(\omega_I) * \{\cos(\omega_S t_1) + i \sin(\omega_S t_1)\}$$

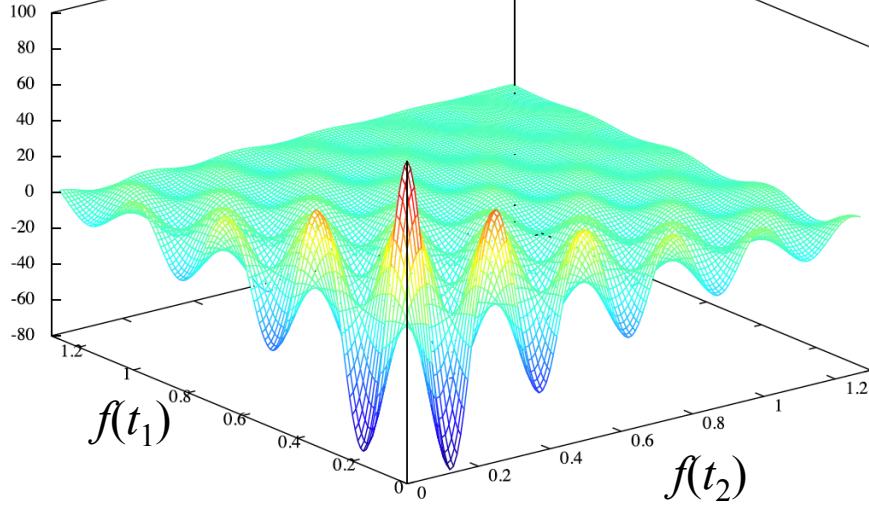
$$R(\omega_I) * \{R(\omega_S) + I(\omega_S)\}$$

↓ 位相補正

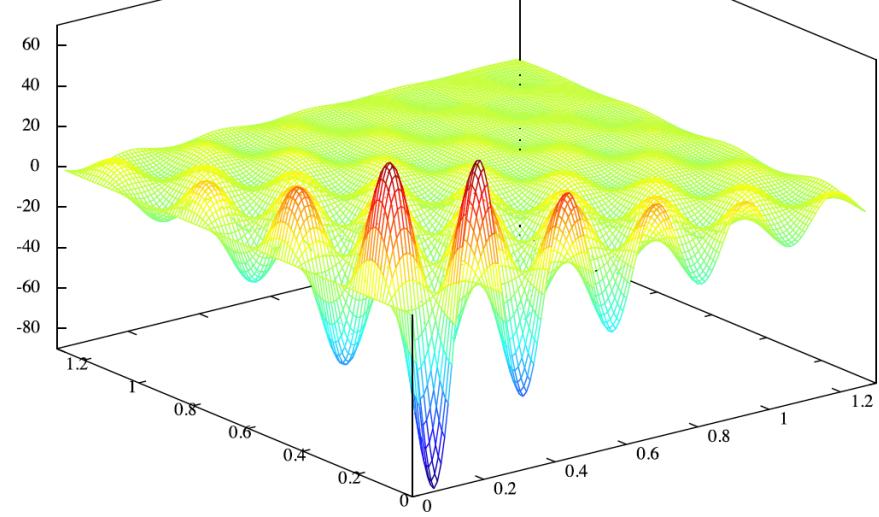
$$R(\omega_I) * R(\omega_S)$$



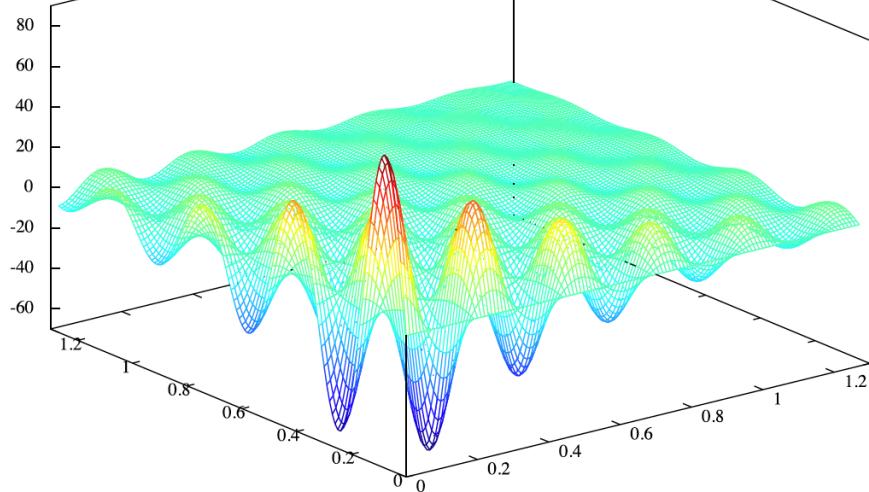
$$f(t_2)^R f(t_1)^R$$



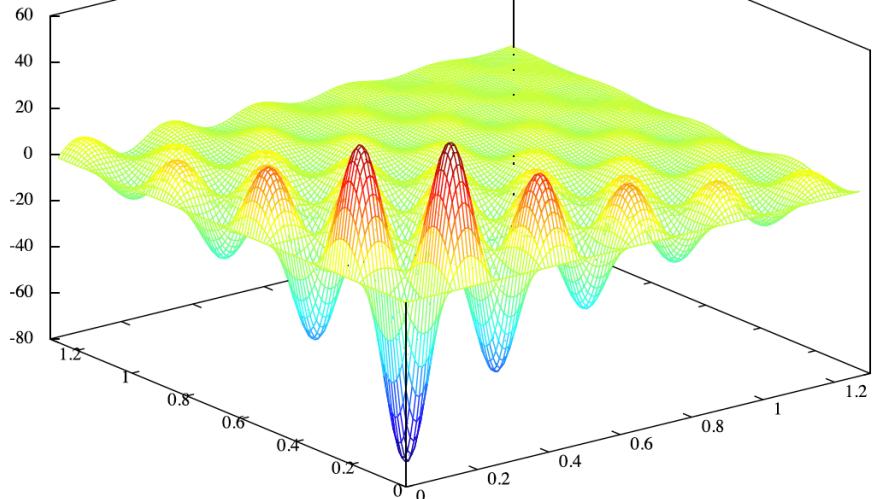
$$f(t_2)^I f(t_1)^R$$



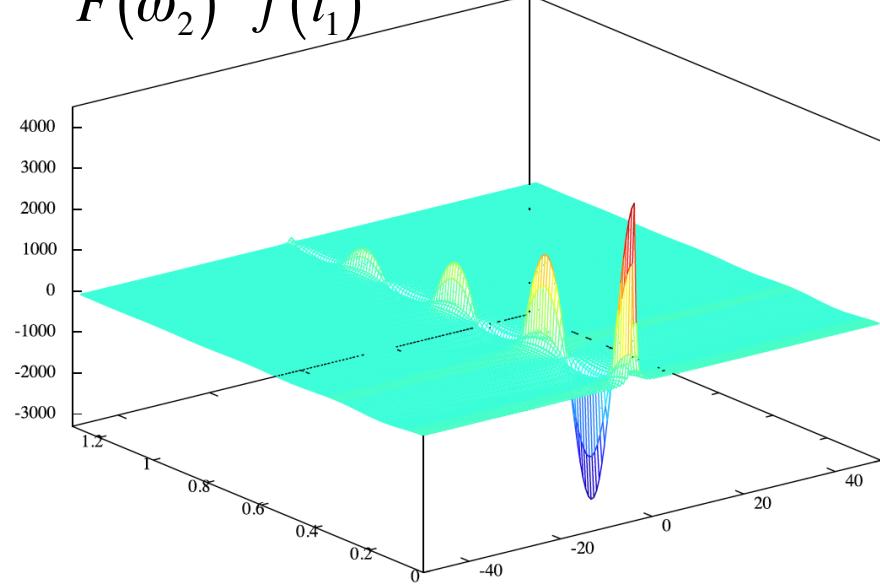
$$f(t_2)^R f(t_1)^I$$



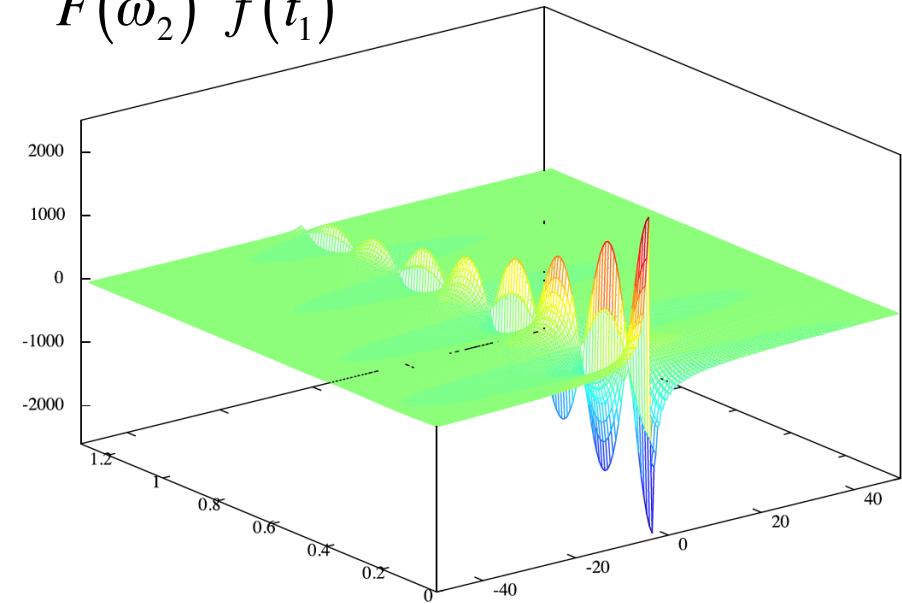
$$f(t_2)^I f(t_1)^I$$



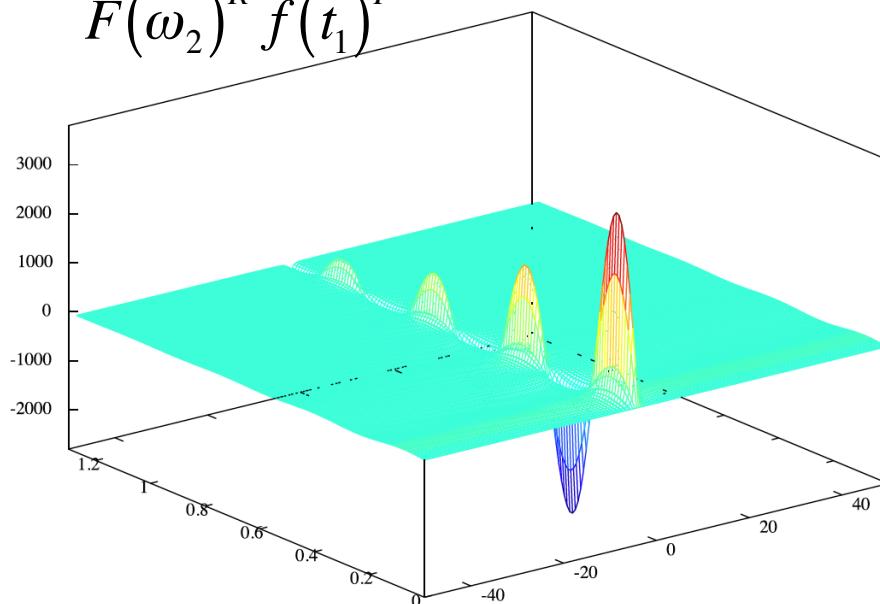
$$F(\omega_2)^R f(t_1)^R$$



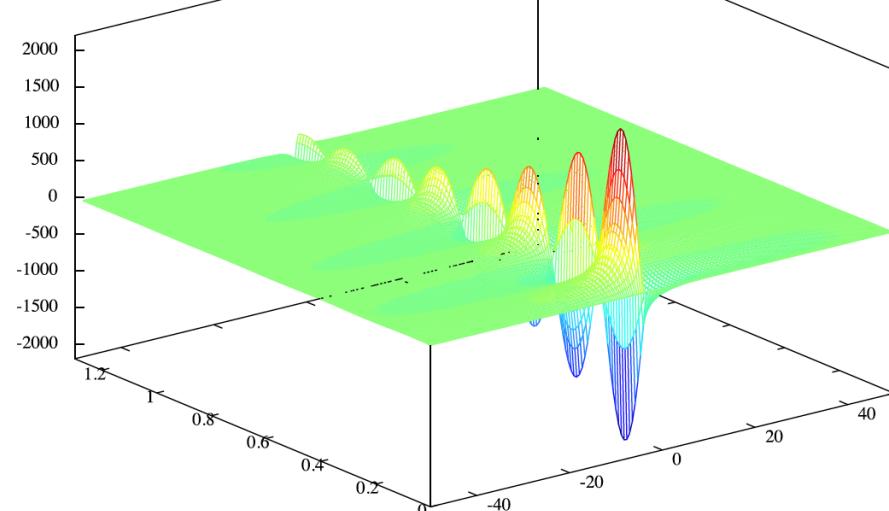
$$F(\omega_2)^I f(t_1)^R$$



$$F(\omega_2)^R f(t_1)^I$$



$$F(\omega_2)^I f(t_1)^I$$

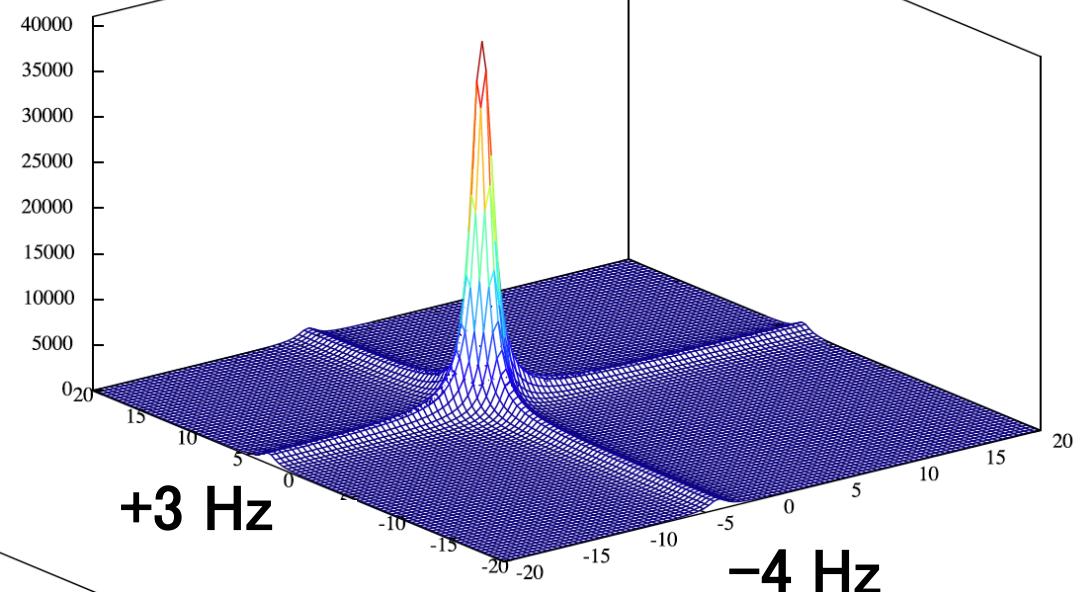
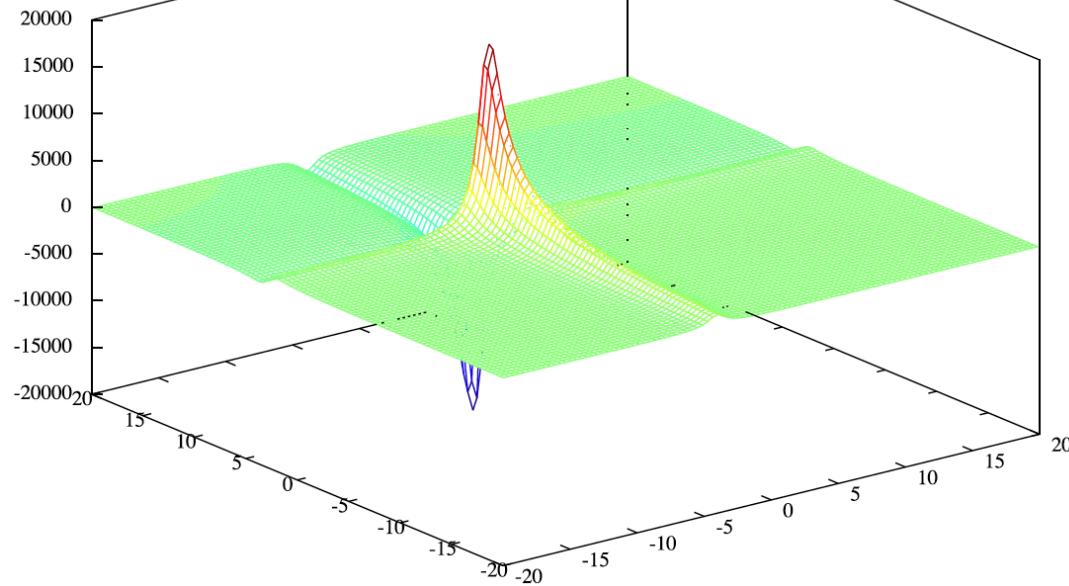


$$F(\omega_2)^R F(\omega_1)^I$$

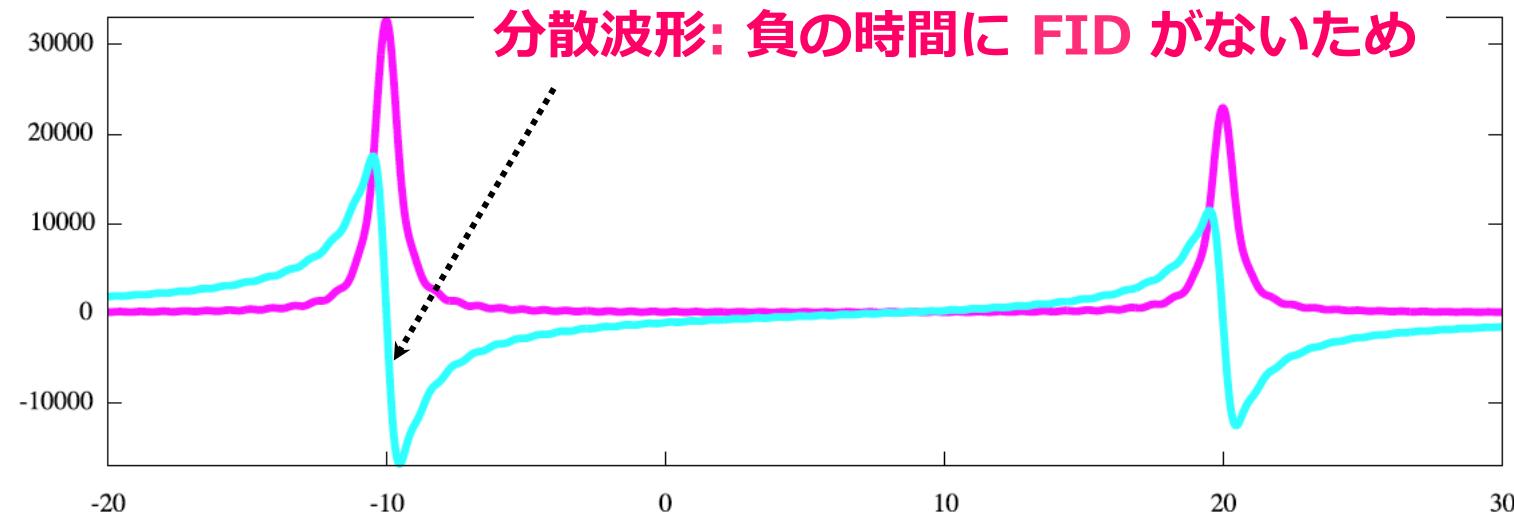
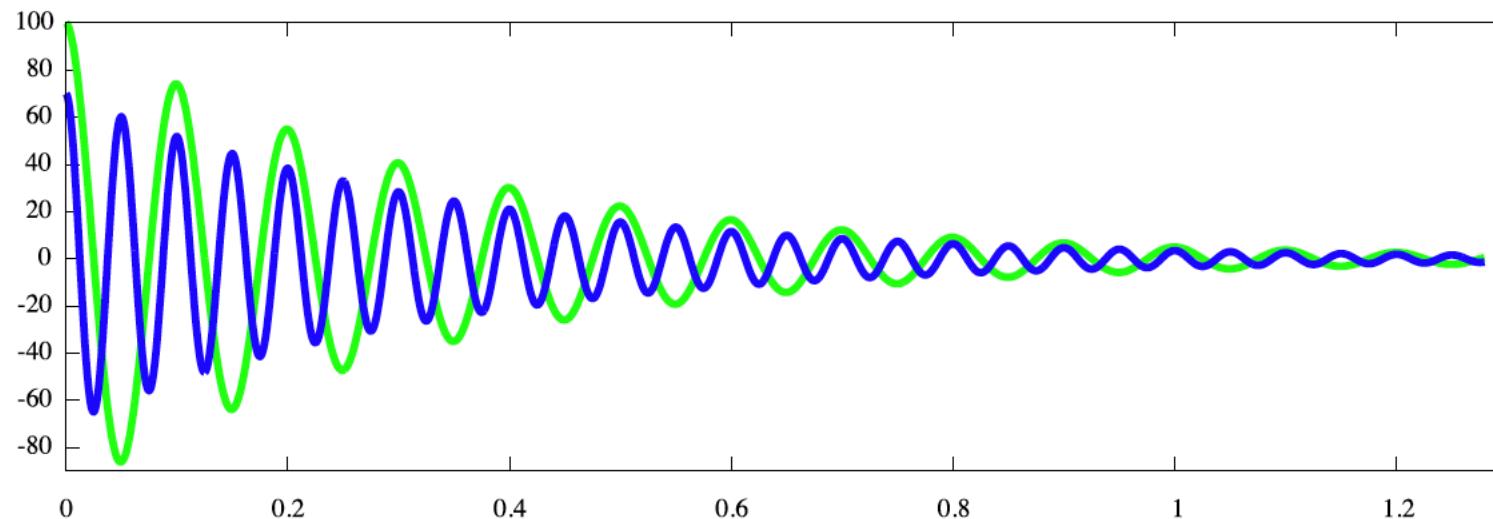
+3 Hz

-4 Hz

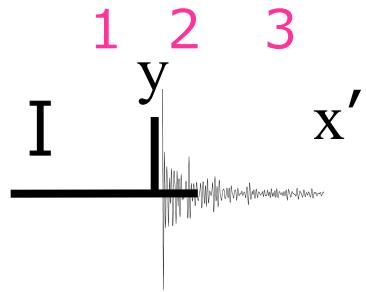
$$F(\omega_2)^R F(\omega_1)^R$$



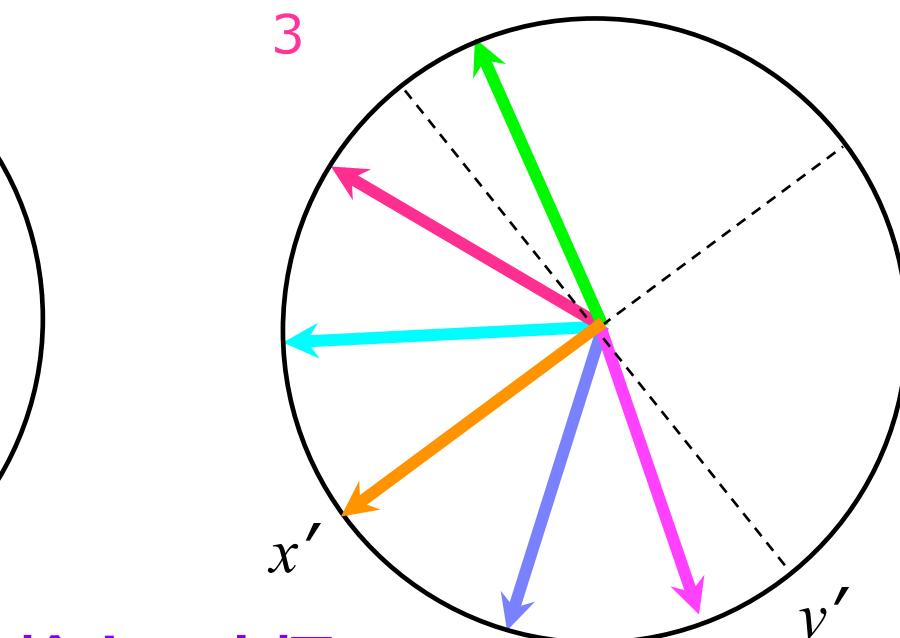
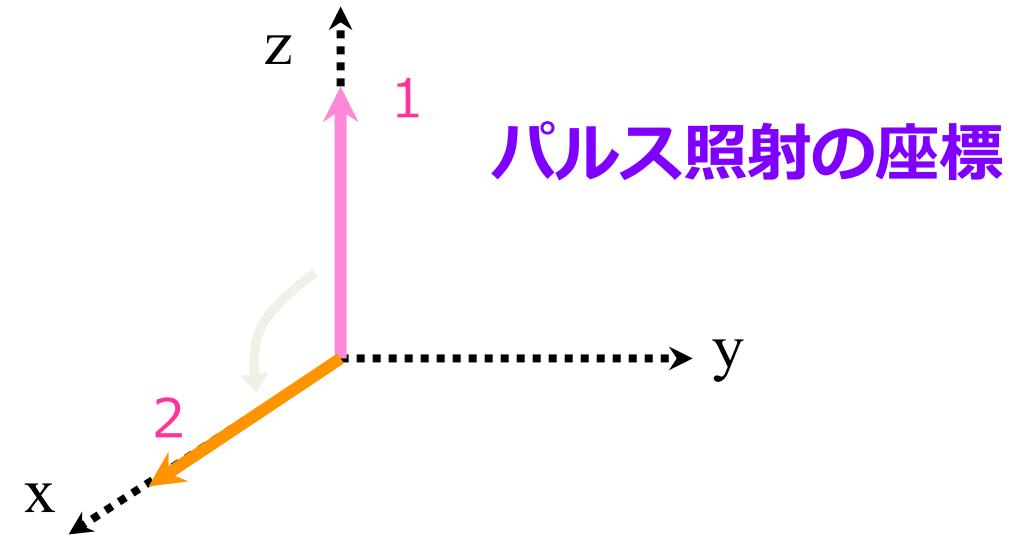
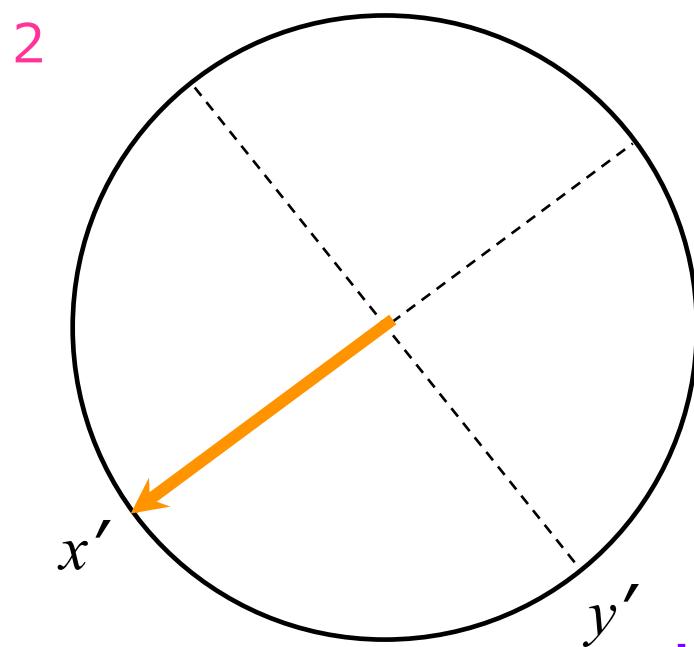
位相の調整



吸収波形と分散波形に分かれる。



照射の座標の x
 \neq
検出の座標の x'



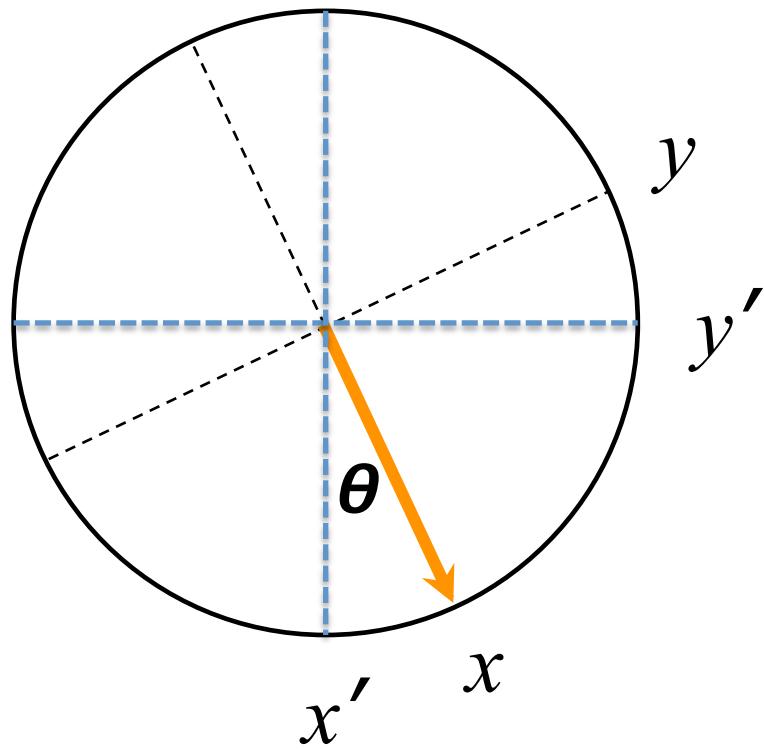
検出の座標

パルス照射の座標

照射の座標の x
≠
検出の座標の x'

$$\begin{aligned} I(x) &= 1 \\ I(y) &= 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} I(x') &= \cos(\theta) \\ I(y') &= \sin(\theta) \end{aligned}$$

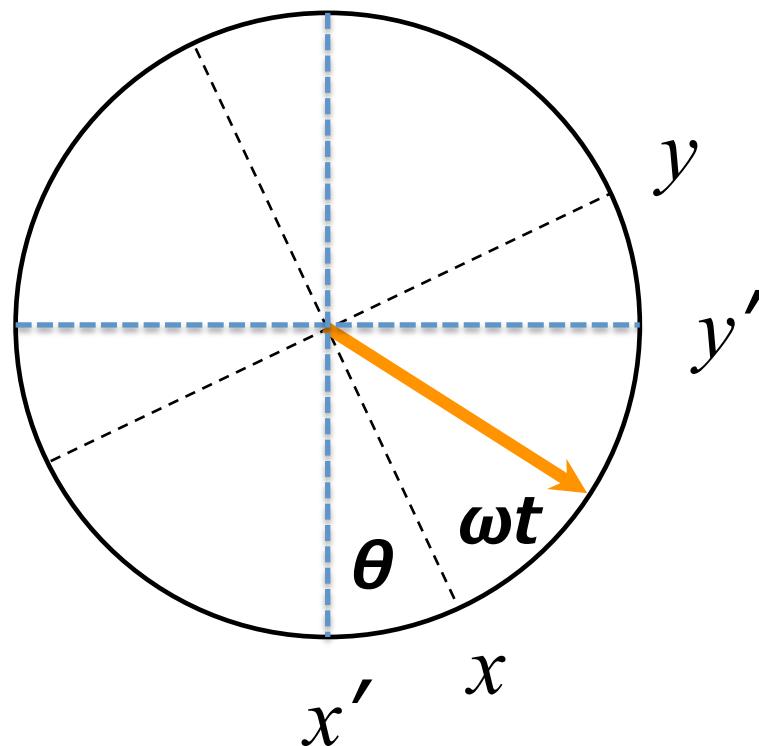


$$I(x) = \cos(\omega t)$$

$$I(y) = \sin(\omega t)$$

$$I(x') = \cos(\omega t + \theta) = I(x) \cos(\theta) - I(y) \sin(\theta)$$

$$I(y') = \sin(\omega t + \theta) = I(x) \sin(\theta) + I(y) \cos(\theta)$$

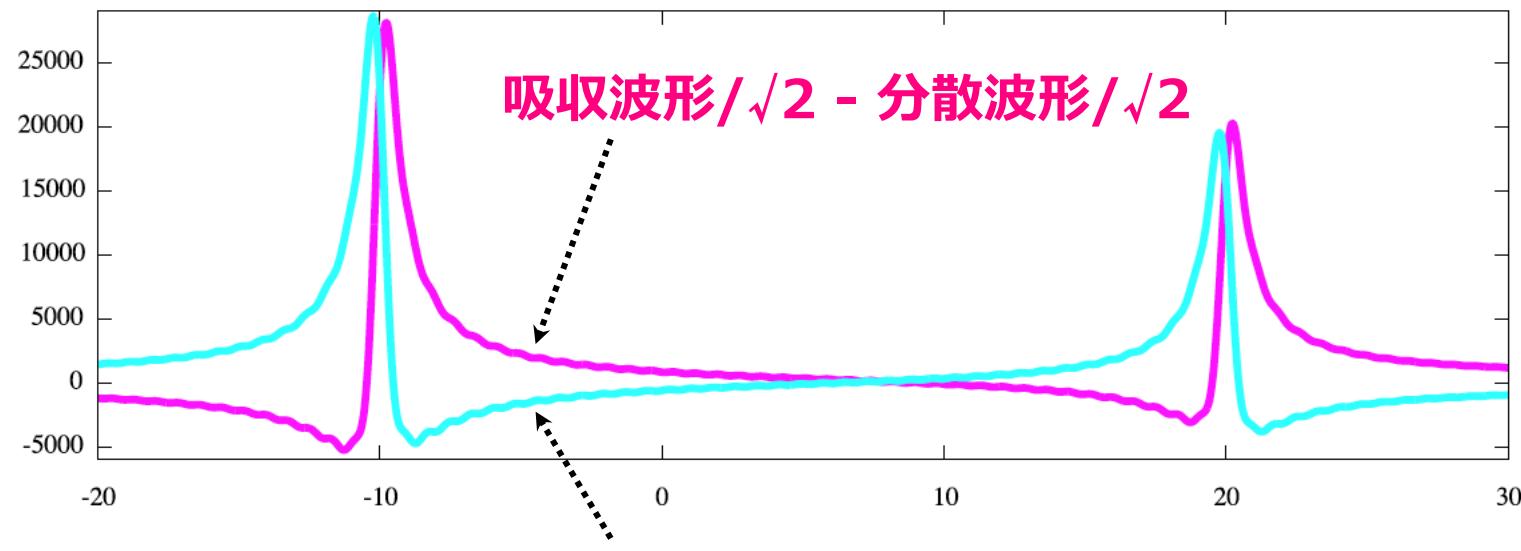
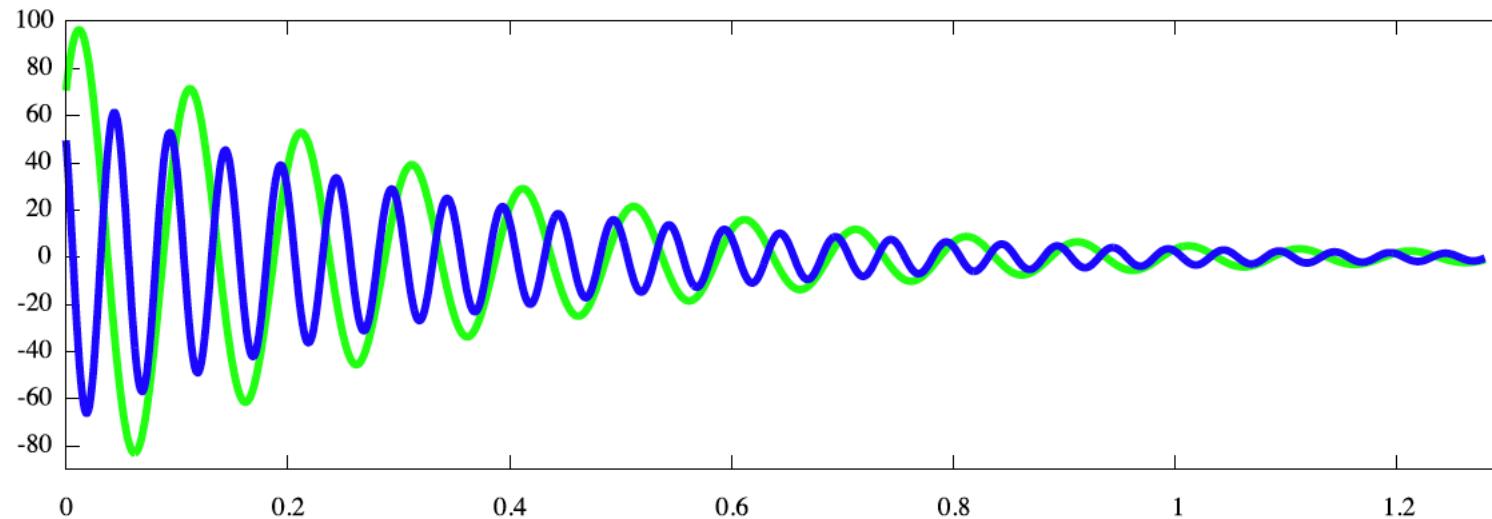


検出座標 (x', y') で検出
された信号

↓
θだけ反時計回りに回転

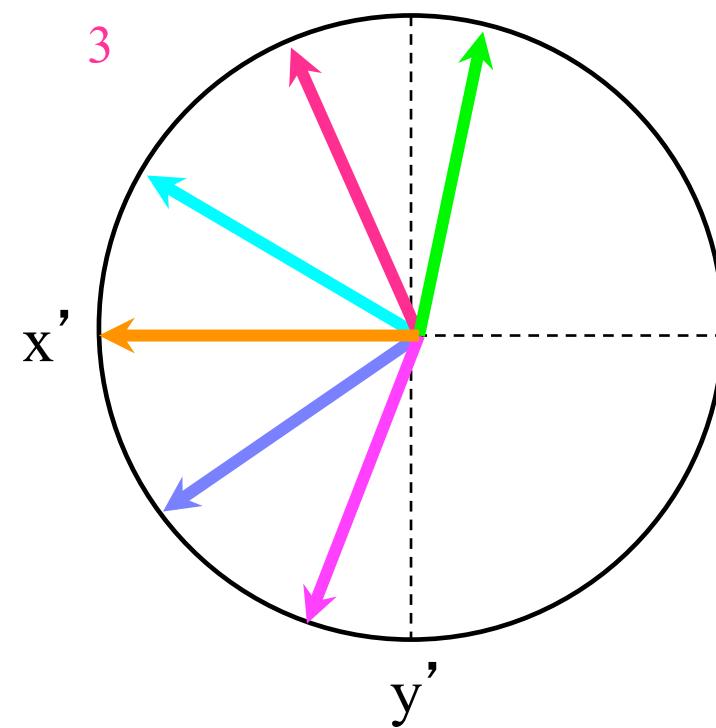
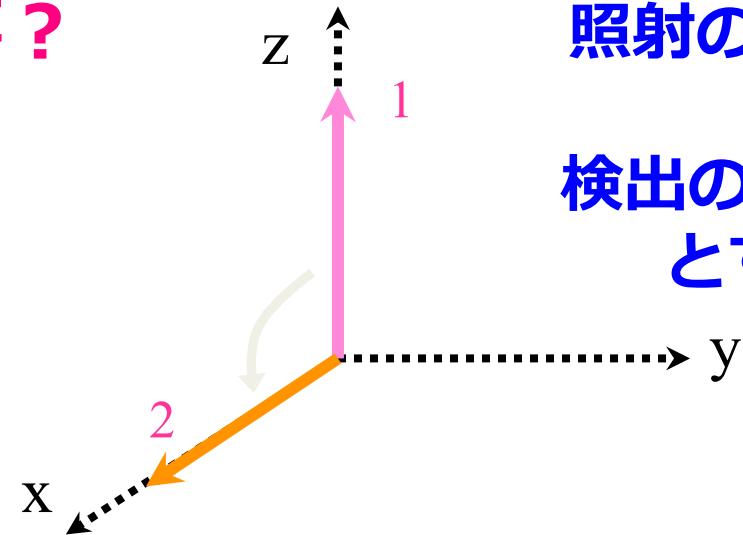
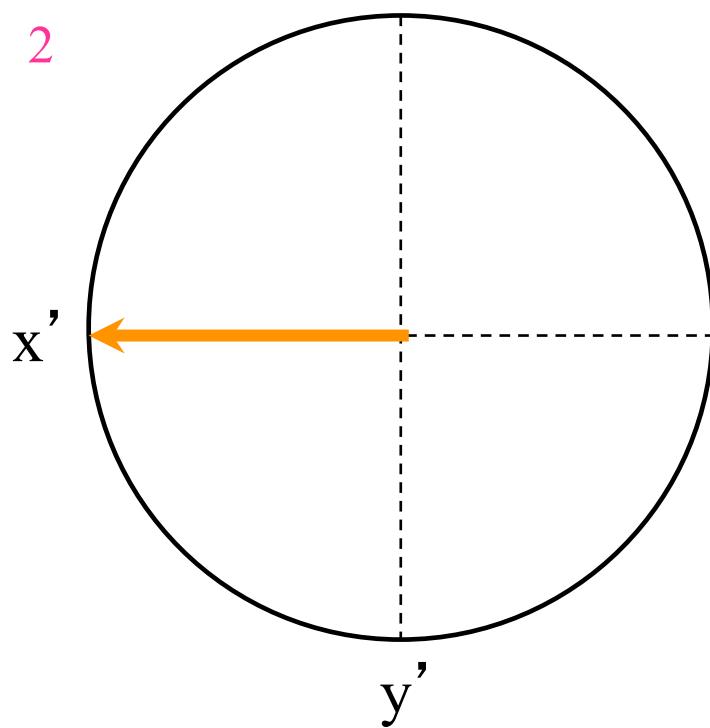
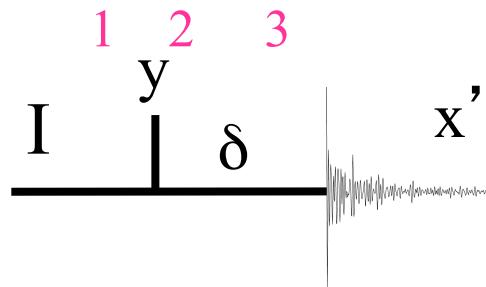
↓
照射座標 (x, y) に移す

照射座標と検出座標が 45° ずれないと …

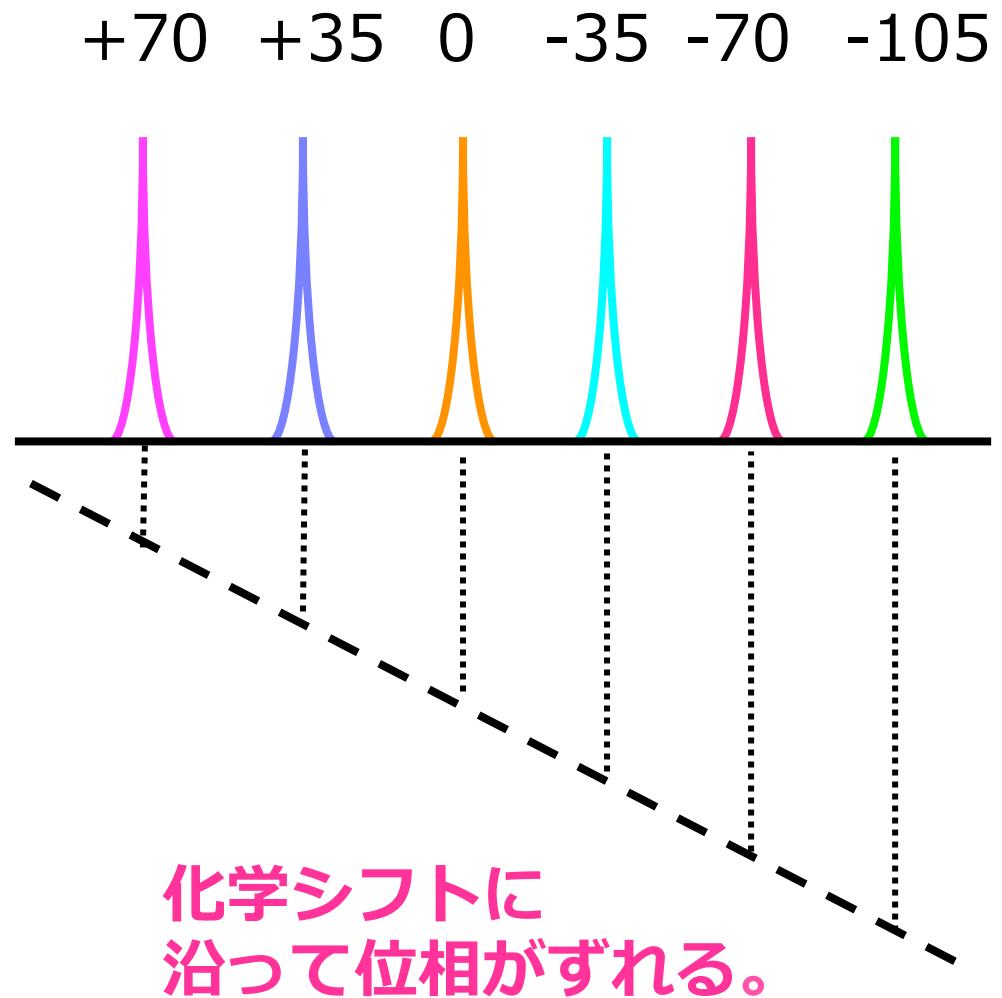
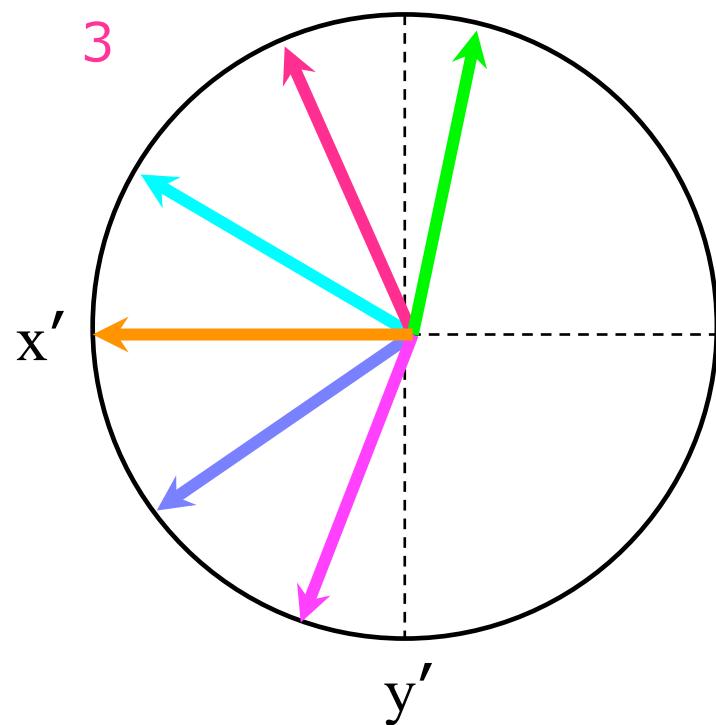
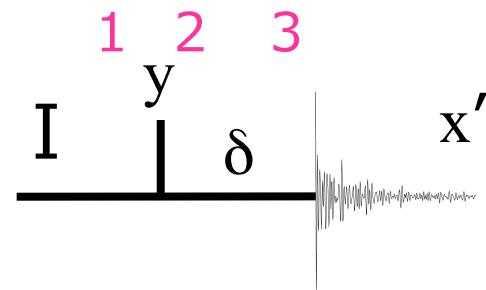


吸收波形/ $\sqrt{2}$ + 分散波形/ $\sqrt{2}$

一次補正はなぜ必要？

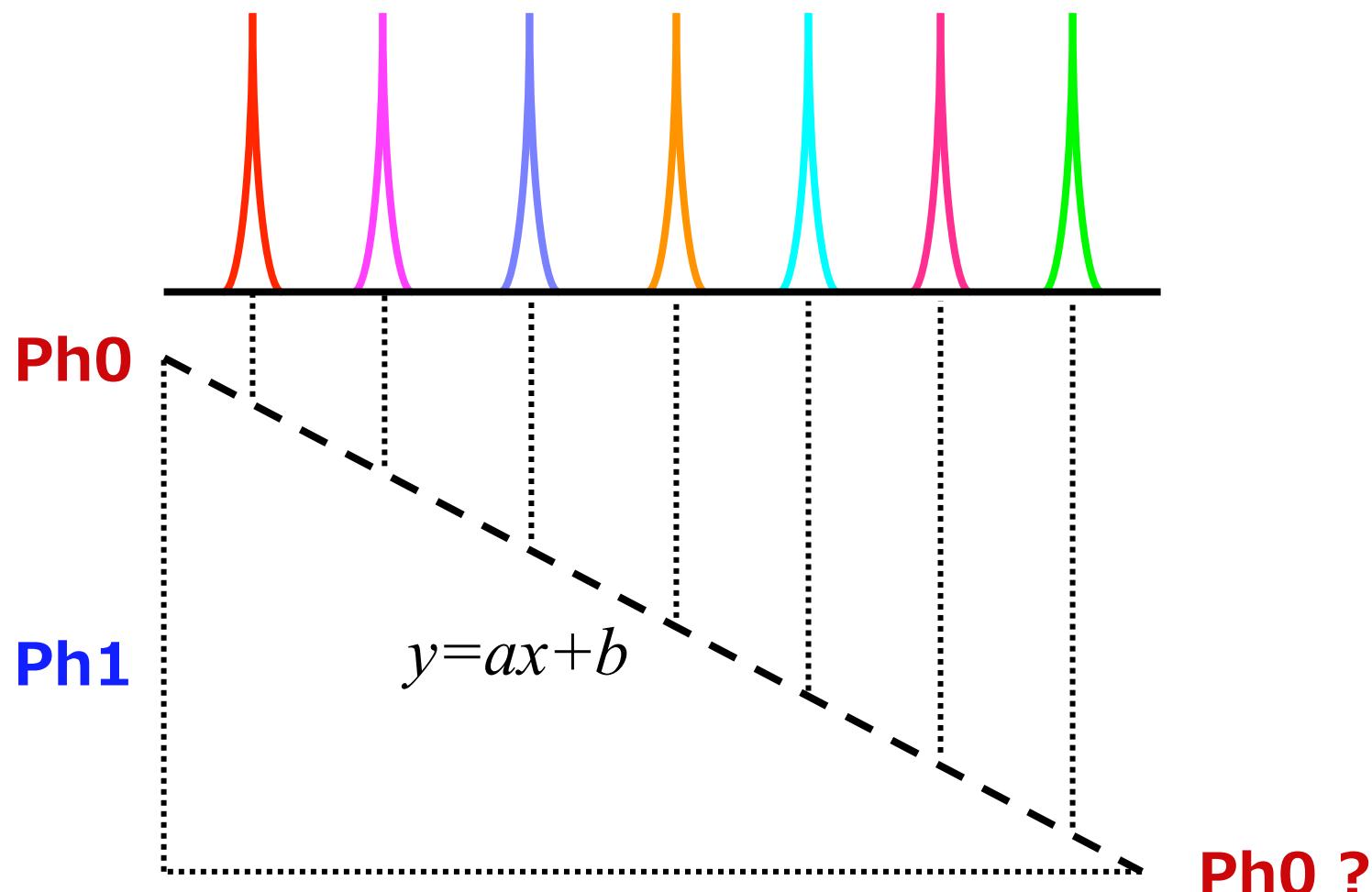


照射の座標の x
=
検出の座標の x'
とする。



これが FID の開始時点

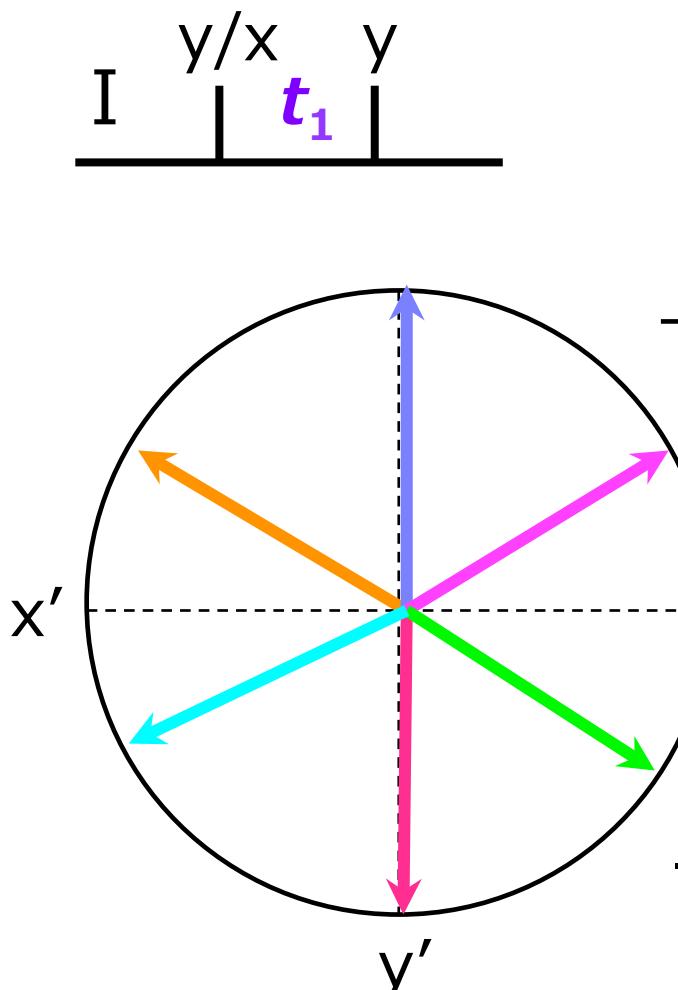
+105 +70 +35 0 -35 -70 -105



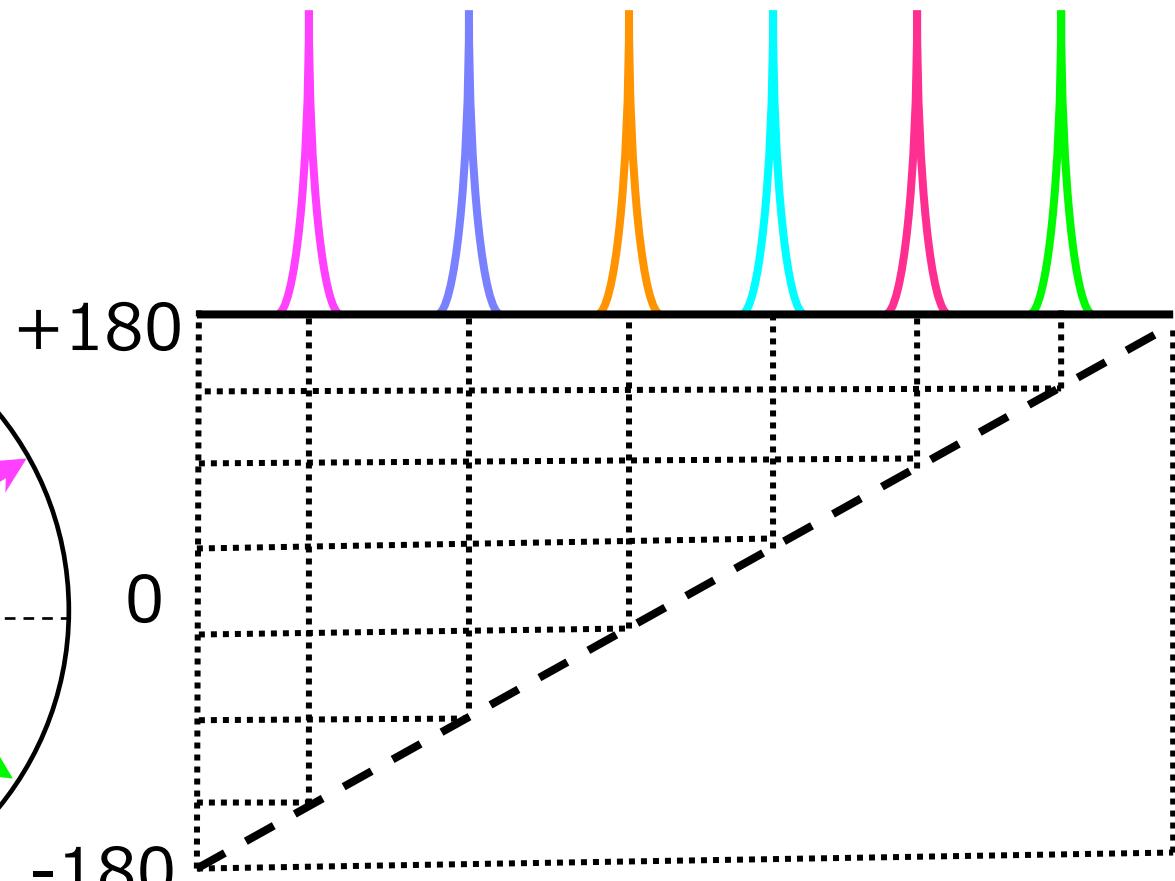
スペクトル幅を切らずに Ph1 を合わせる。

NmrPipe と Topspin とでは Ph0, Ph1 両方ともに \pm 逆転

t_1 の開始が Δt_1 分だけ遅れると …



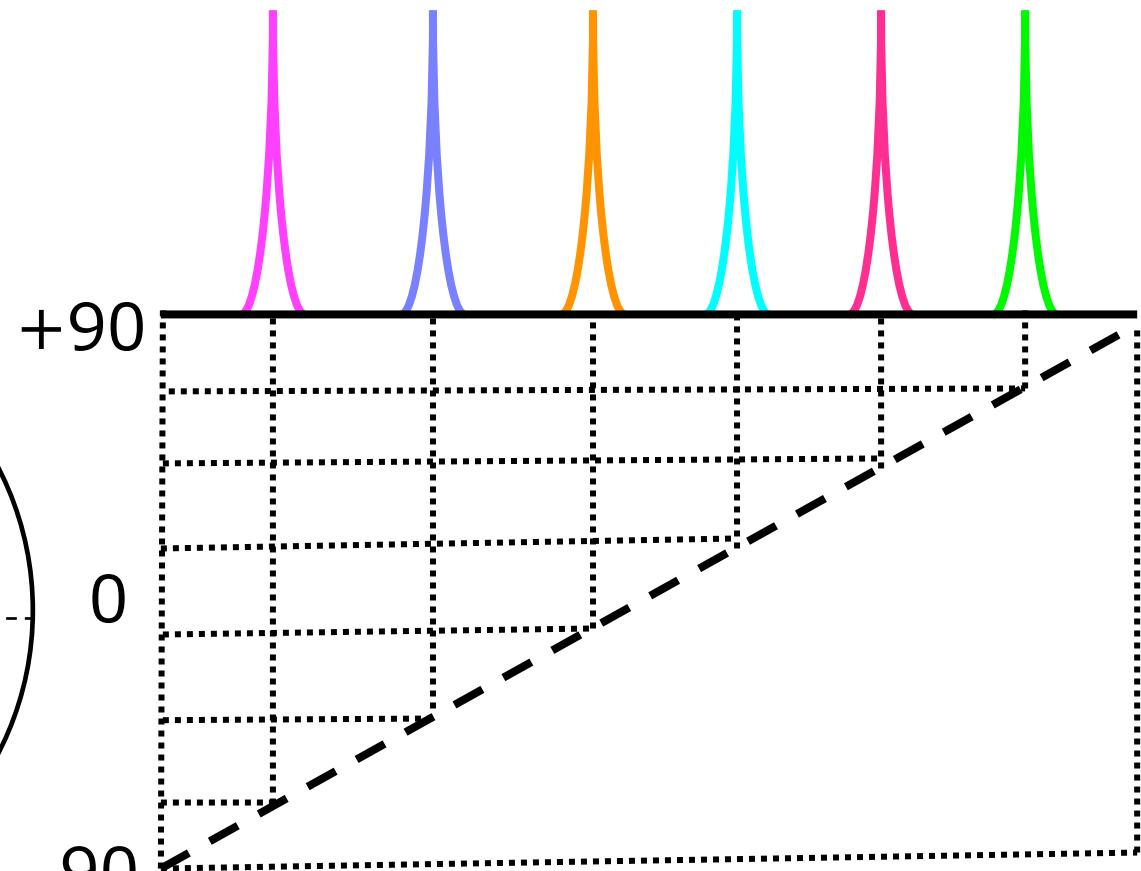
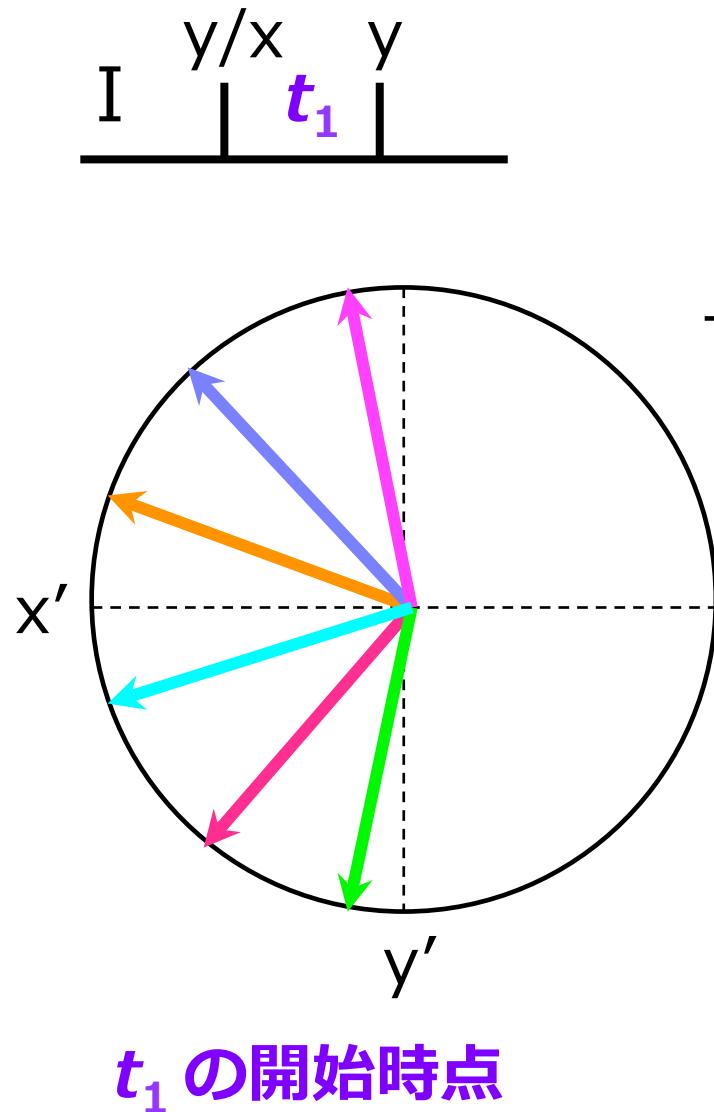
t_1 の開始時点



0 次の位相補正: -180°

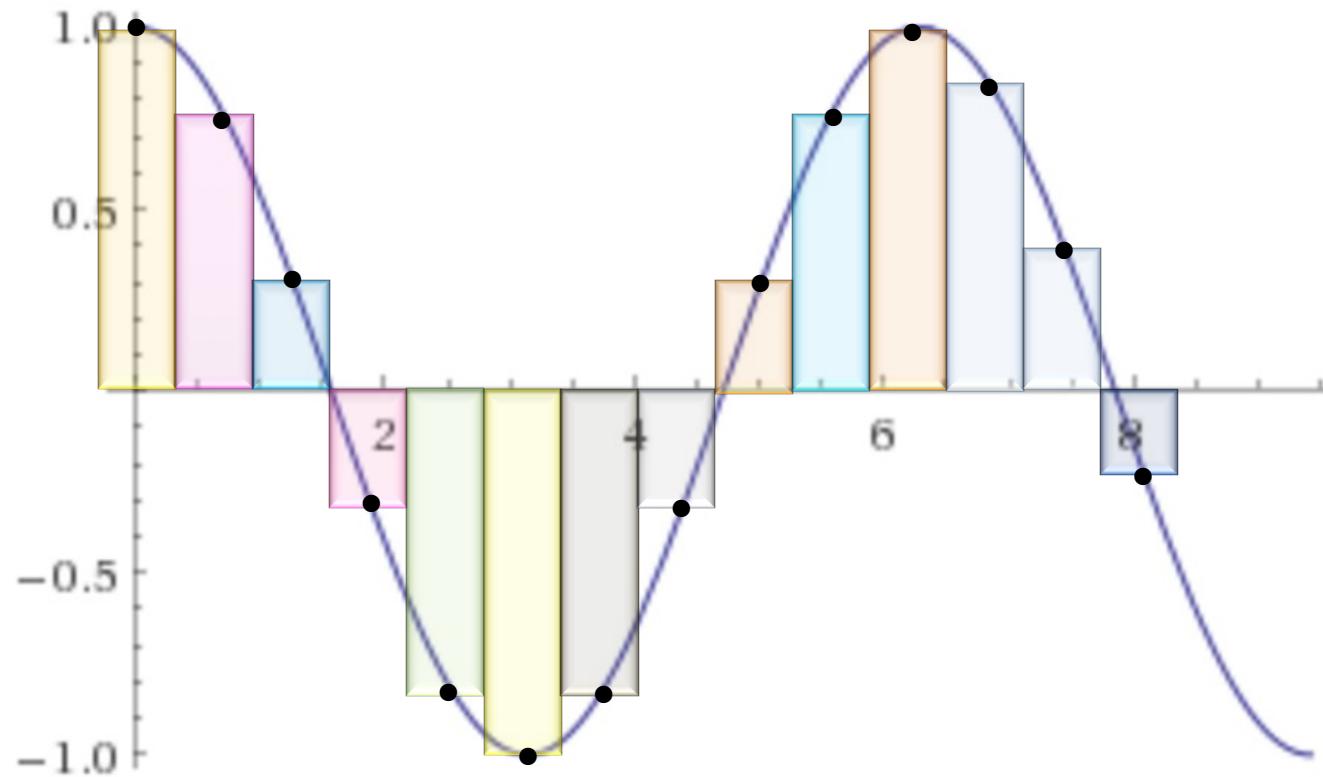
1 次の位相補正: 360°

t_1 の開始が $0.5\Delta t_1$ 分だけ遅れると …



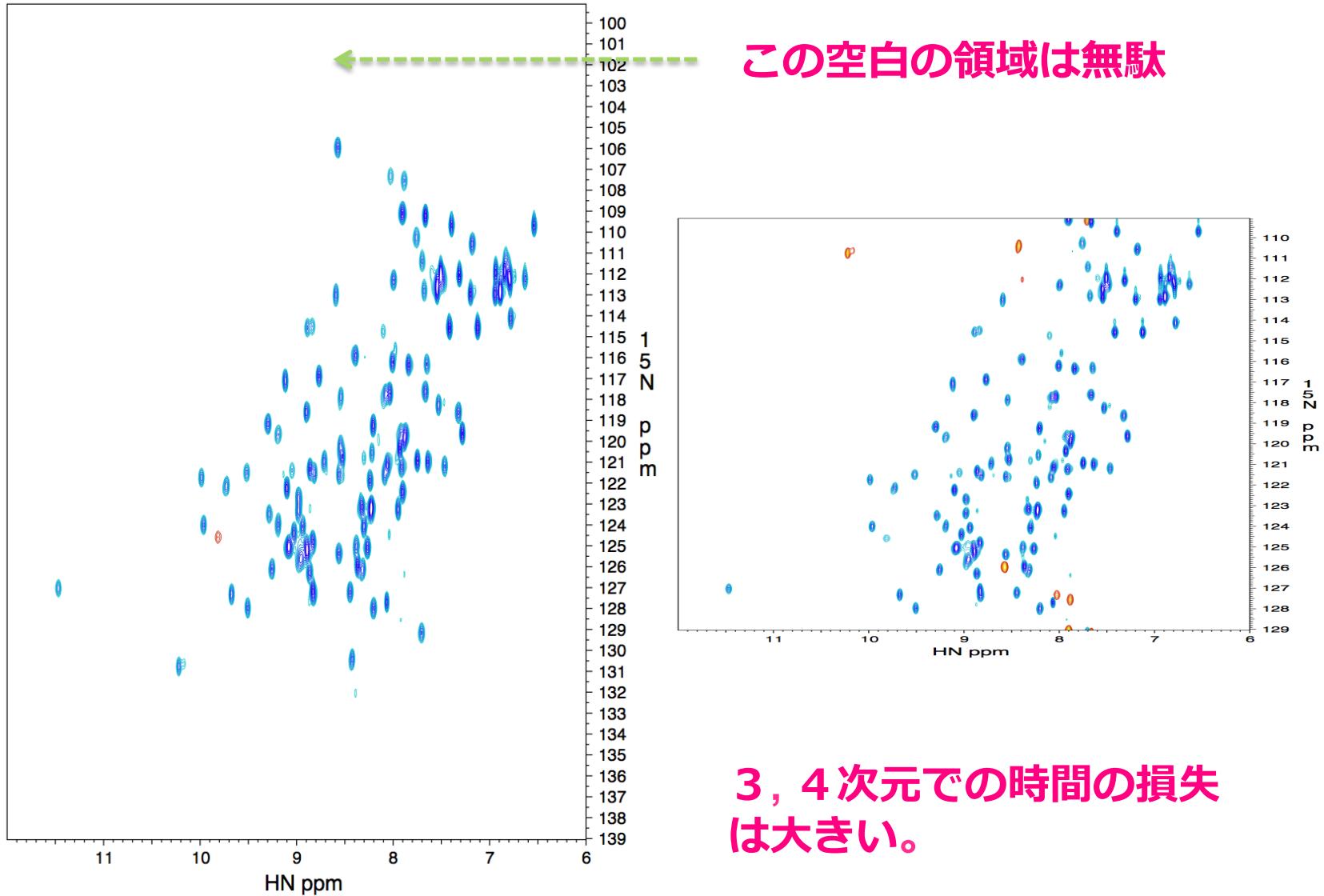
0 次の位相補正: -90°
1 次の位相補正: 180°

t_1 がきっちりと 0 から始まる

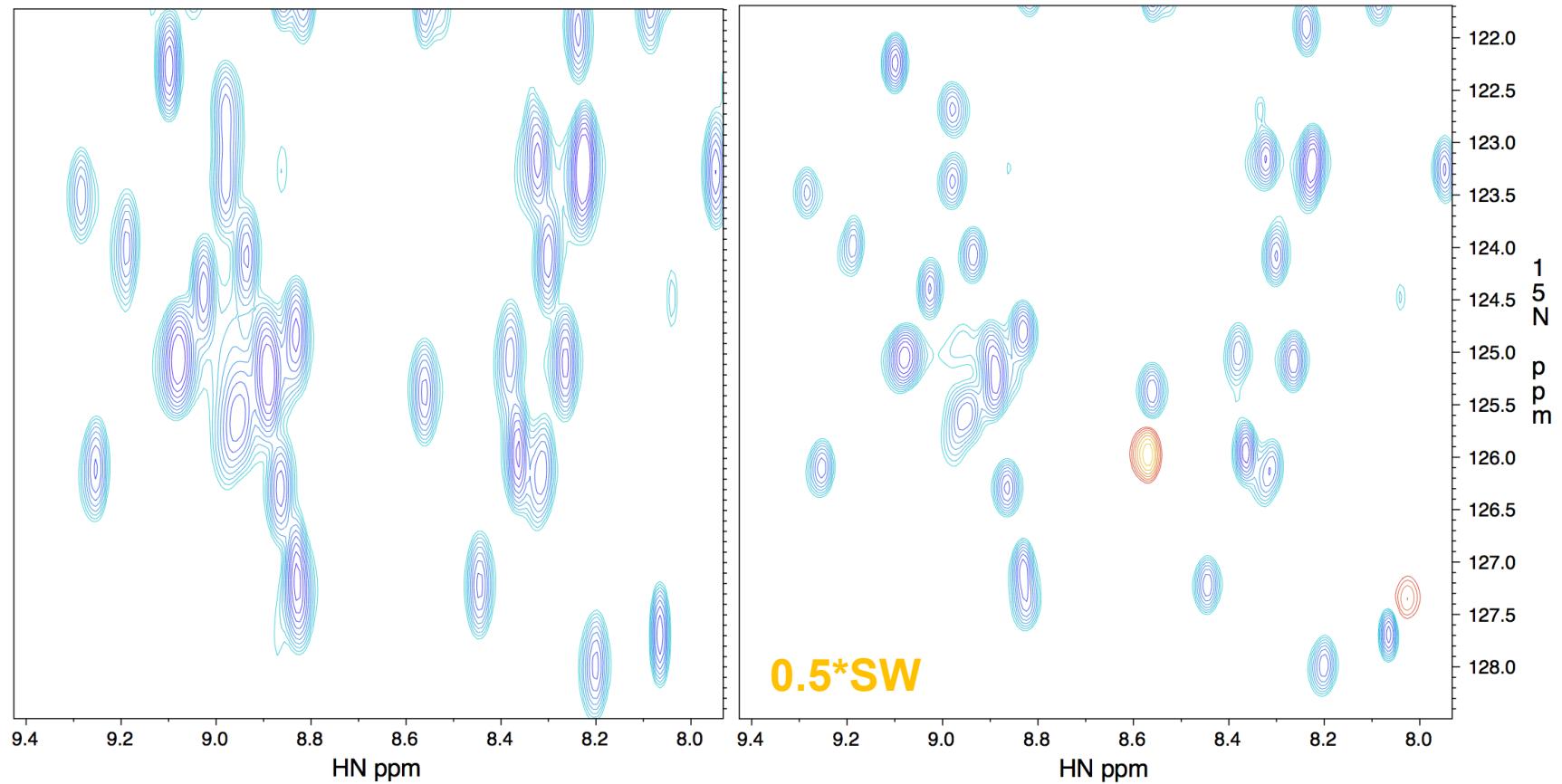


短冊の左半分がマイナス時間に食い込んでしまうのを
防ぐため、 $t_1=0$ の強度を半分にする ($FCOR=0.5$)。

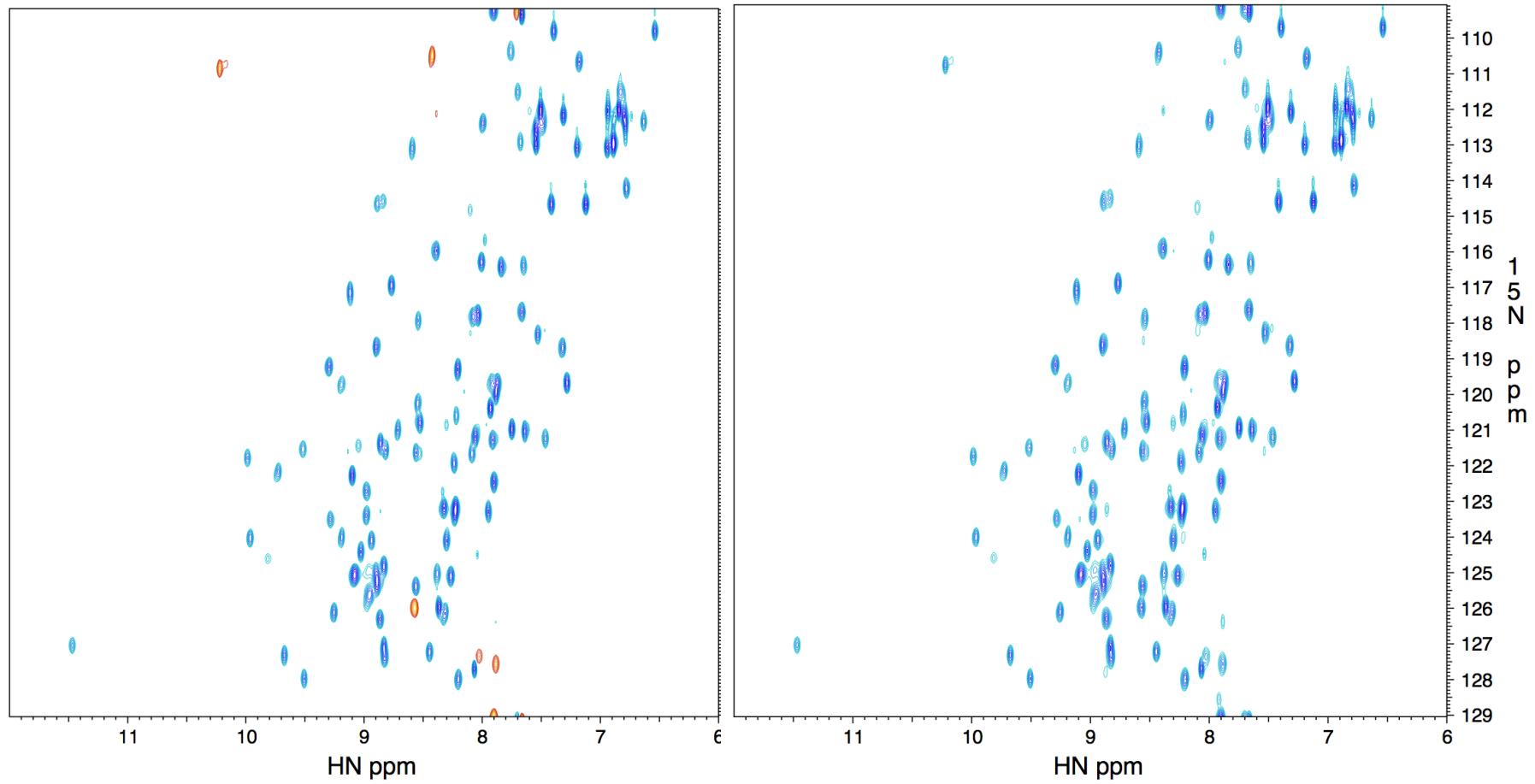
0.5 Δt_1 から始める場合には $FCOR=1.0$



同じ測定時間ならば、もっと高い分解能でとれたはず

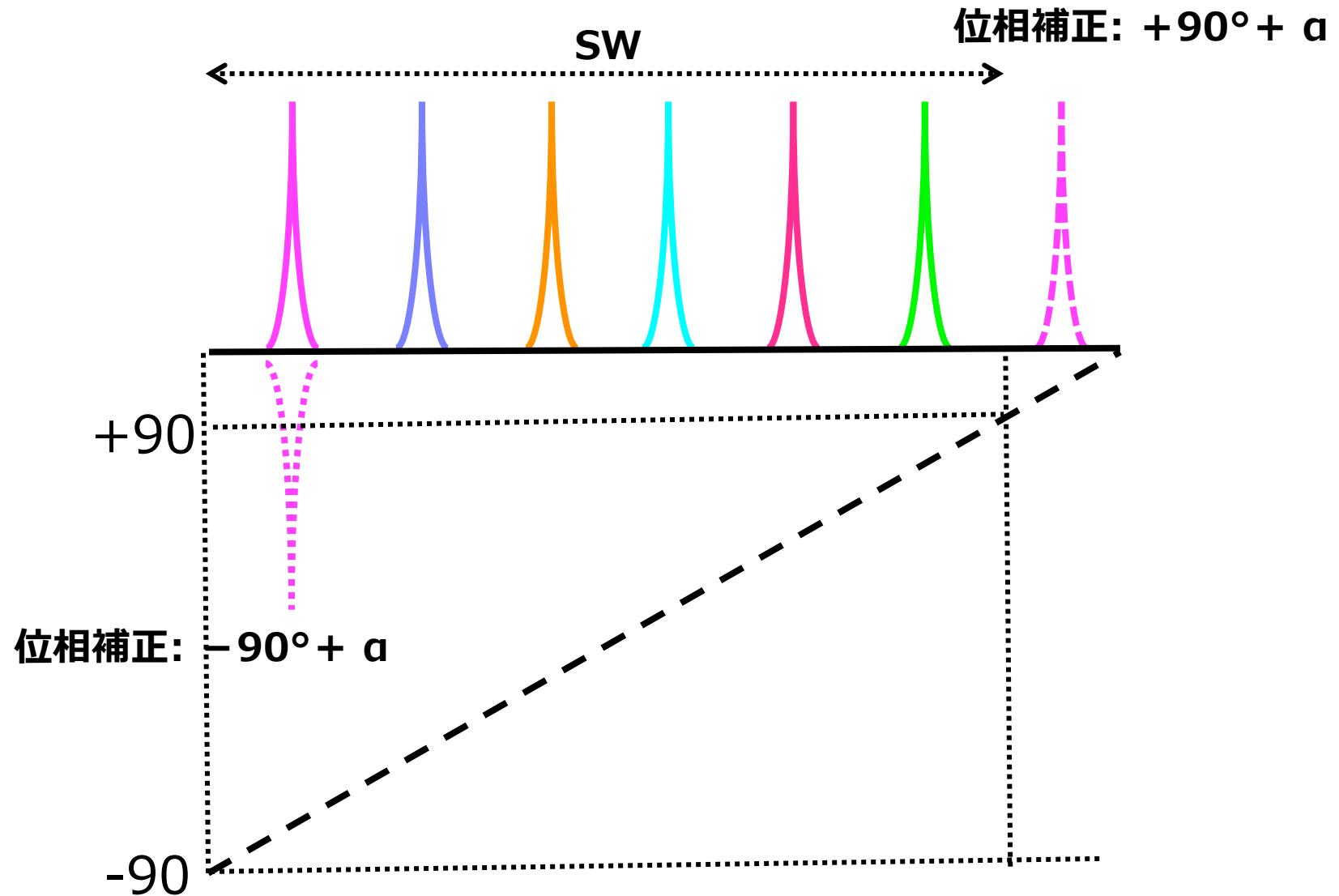


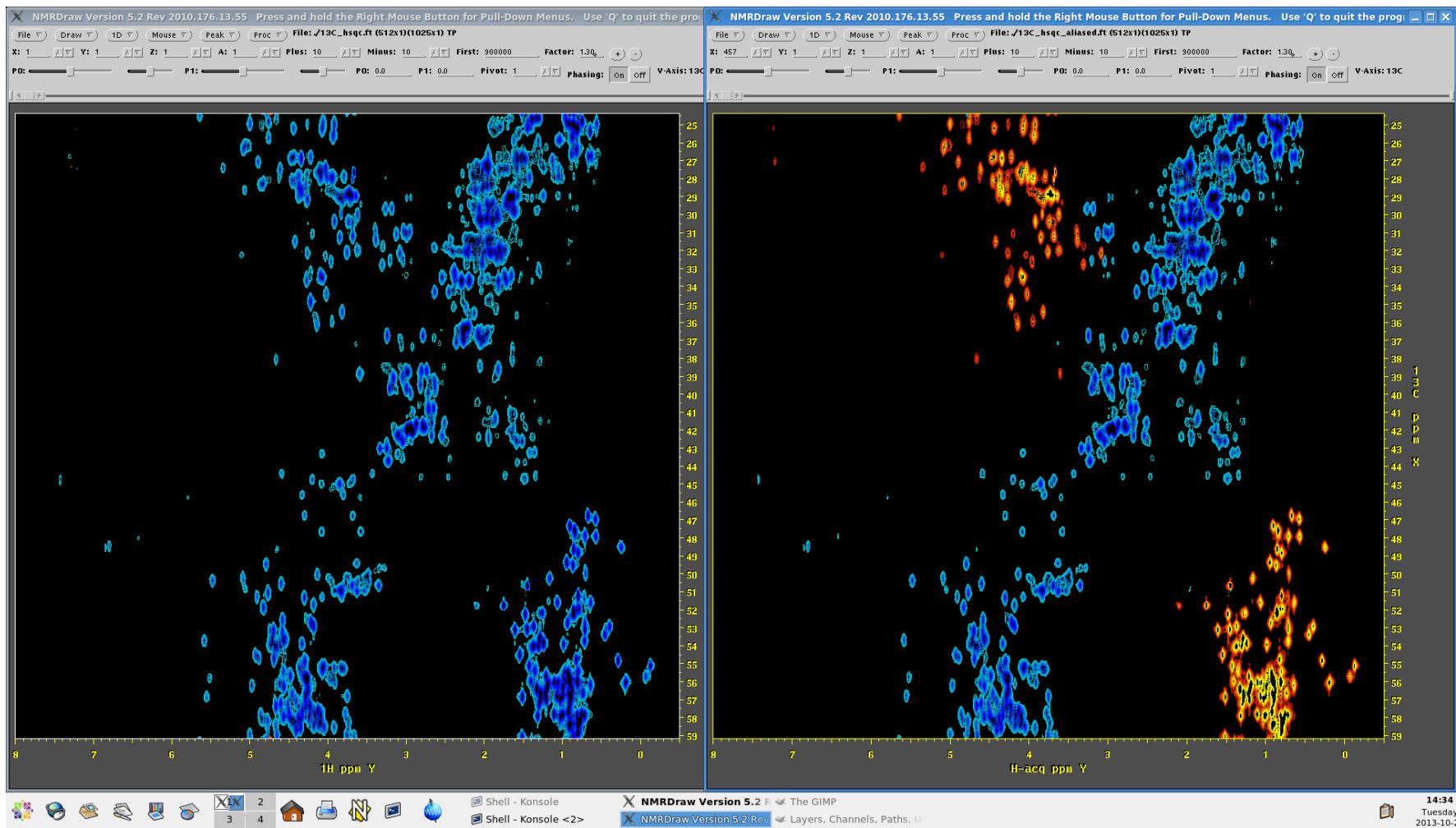
もし、3,4次元で ω_1 and ω_2 それぞれを半分のスペクトル幅に縮めることができれば、測定時間は $1/4$ となる（あるいは、感度を倍にできる）。



$t_1(0)$ を $\Delta t_1/2$ に設定すれば、折り返ったピークは負になるので識別できる。タンパク NMR を測る場合には、 ^{15}N SW はできるだけ縮めよう。しかし、直接測定軸（FID）のスペクトル幅を減らしてはいけない。

t_1 の開始を $0.5\Delta t_1$ 分だけ遅らせると、折り返り
ピークは負になる。





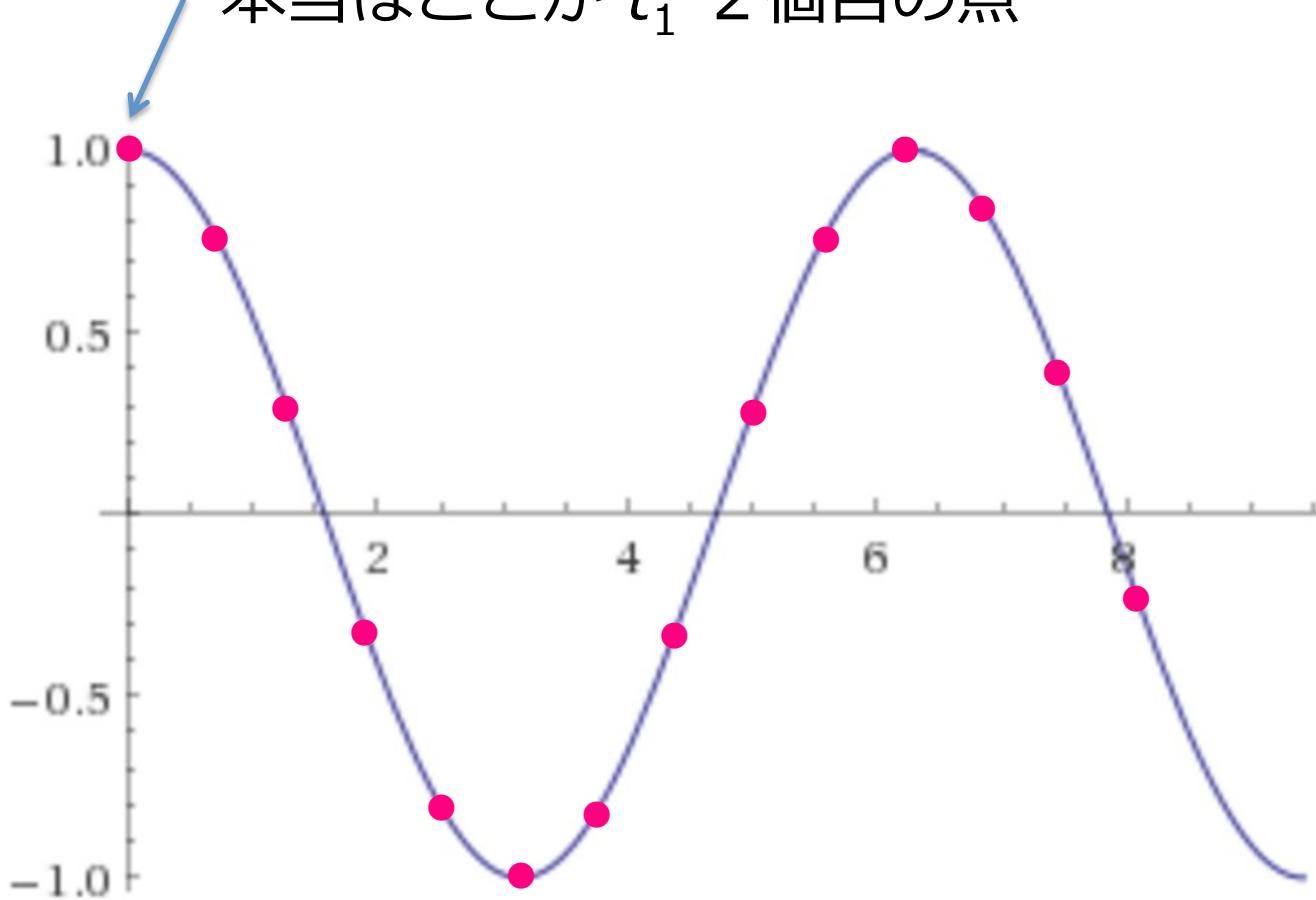
タンパク質の立体構造解析では重要な 3D ^{13}C -edited NOESY でも、
折り返しを活用することで高分解能にとれる。

FID の開始が 1 ポイント遅れると …

1. そのまま FT し、Ph0=180, Ph1=-360 で補正する。
2. インターフェログラムを 1 点だけ右にシフトさせ、最初の点を backward-LP する。
3. 最初の点を 0 として FT し、0 次ベースライン補正する。

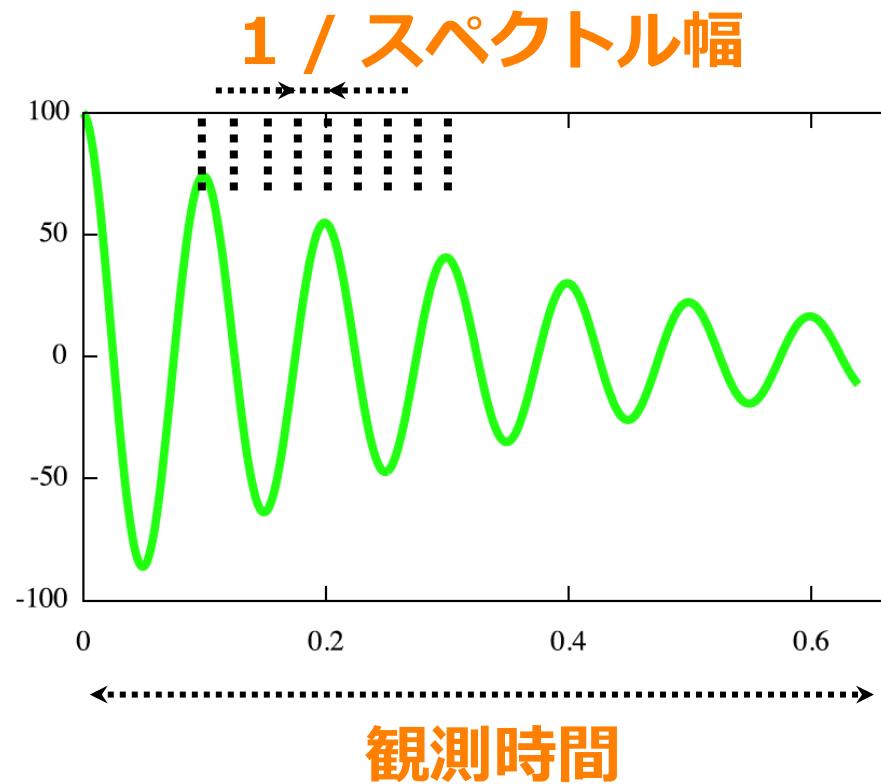
```
| nmrPipe -fn LP  
| nmrPipe -fn ZF -pad 1  
| nmrPipe -fn RS -rs 1 -sw  
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.99 -pow 2 -c 1.0  
| nmrPipe -fn ZF -size 256  
| nmrPipe -fn FT  
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di  
| nmrPipe -fn POLY -auto -ord 0
```

本当はここが t_1 2 個目の点



分解能とスペクトル幅の関係

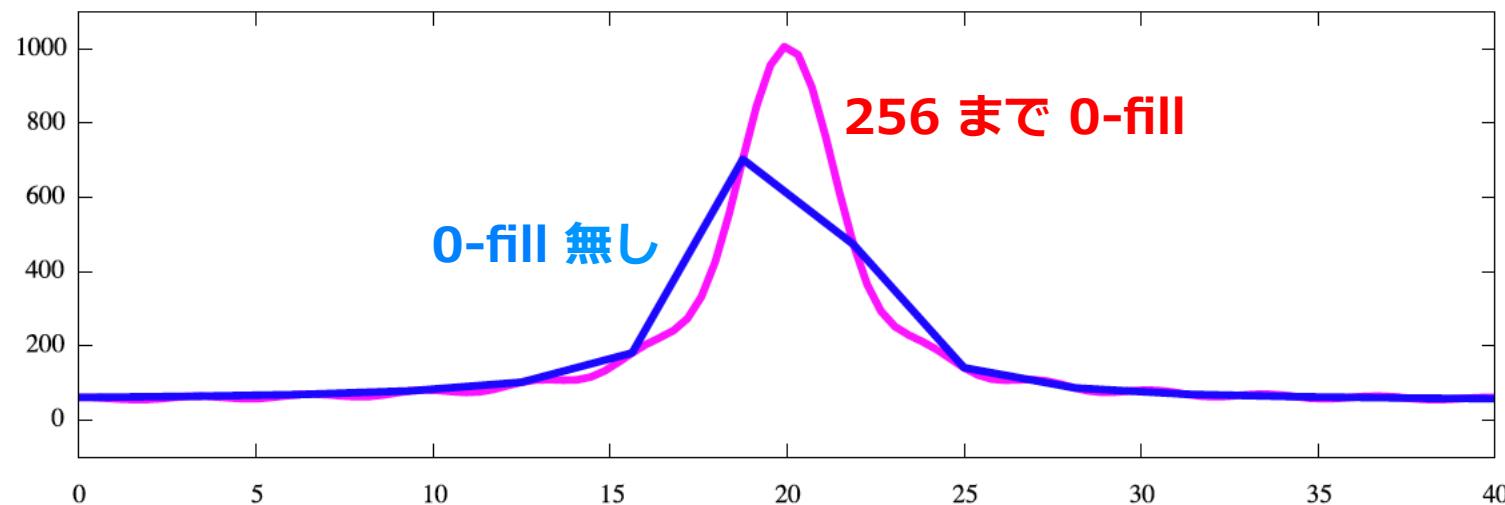
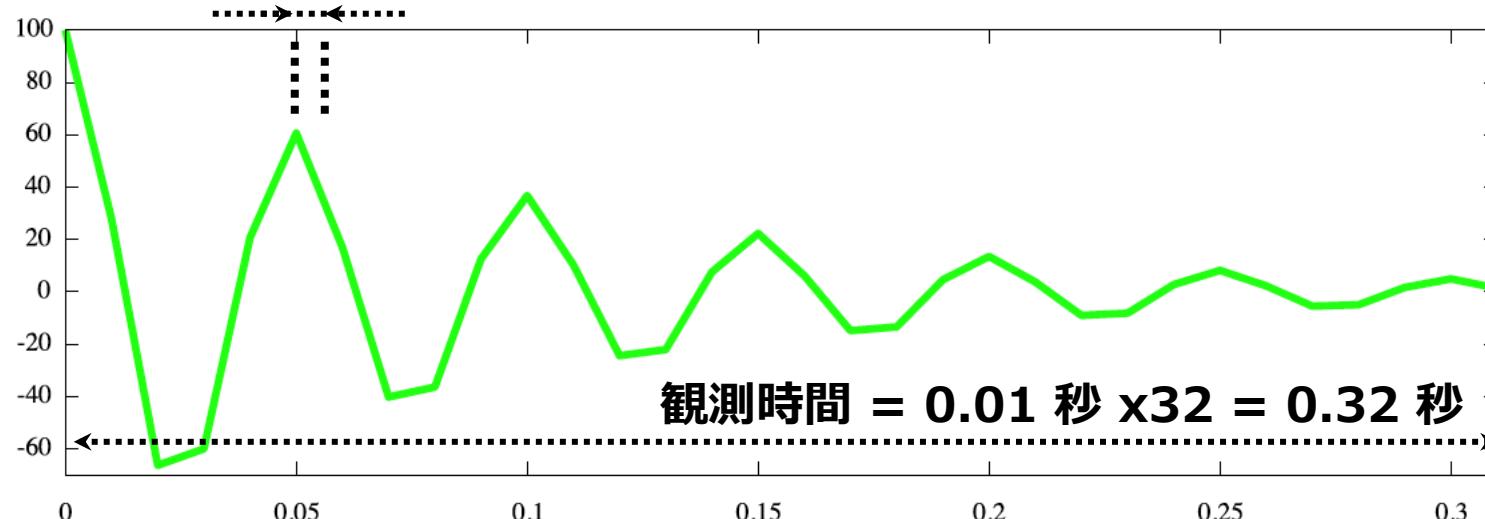
$$acquisition \ time = \frac{point \ number}{spectral \ width} = \frac{1}{resolution}$$



0-fill は線幅を変えずにギザギザを無くす → 安全

1 / スペクトル幅 = 0.01 秒

一方、LP は FID の未来を予測
して伸ばし、線幅を細くする。



オーバーサンプリング・デジタルフィルター

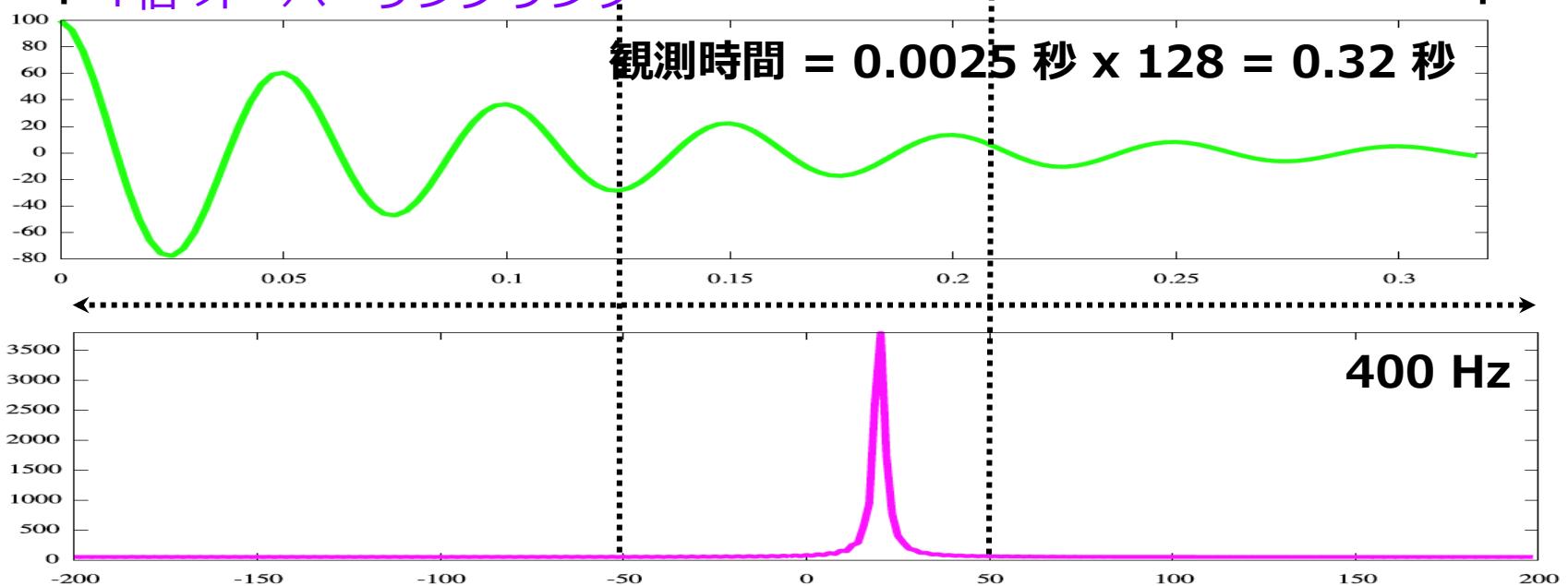
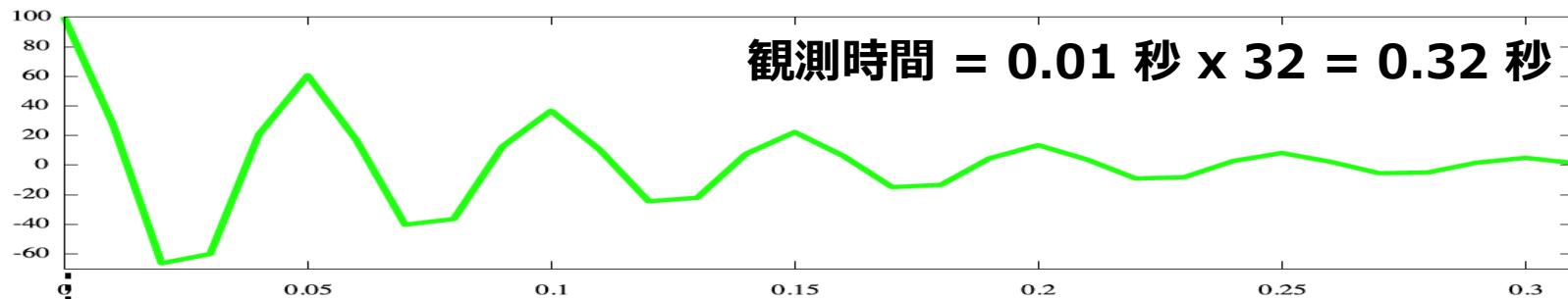
CD プレーヤーの宣伝文章より

新開発の 16 ビット 4 倍オーバーサンプリング LSI を投入しており、176.4kHz で動作することで、4 倍オーバーサンプリング方式本来の優れた位相特性と通過帯域 30kHz に及ぶ高い過渡応答特性を得ています。

20 ビット 8 倍オーバーサンプリングデジタルフィルター採用。低レベルでの徹底した音質の向上を図るため、エンファシス演算精度を改善したデジタルフィルターを採用。さらに正確な再生を可能にするとともに、デジタル段階で出力レベルを 12 段階まできめ細かくコントロール。出力レベルでの音質劣化が無く、鮮やかな響きを実現します。

N 倍オーバーサンプリング

通常よりも N 倍速く（短い間隔で）検出する。



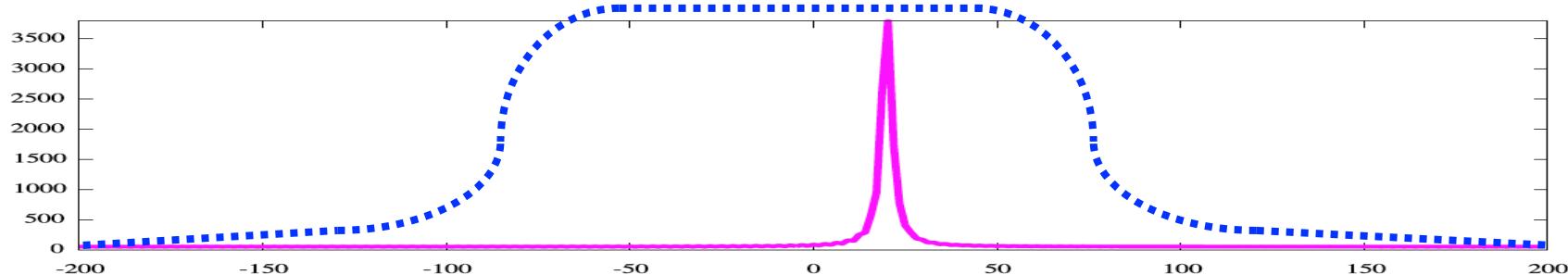
N 倍オーバーサンプリング

通常よりも N 倍速く（短い Δt 間隔で）検出する。

スペクトル幅が N 倍に広がる。

ノイズを分散できる。

折り返しが起こらないように、高周波数側と低周波数側を削らないといけないが、スペクトル幅が広いので、無理の無いフィルターをかけられる。



デジタルフィルター

FID データを一つずつずらしながら、重みをかけて、足し算し、平均値を求める。

$$\left. \begin{array}{l} \text{data (i)} \quad \dots \times a \dots \rightarrow \\ \text{data (i-1)} \quad \dots \times b \dots \rightarrow \\ \text{data (i-2)} \quad \dots \times c \dots \rightarrow \\ \text{data (i-3)} \quad \dots \times d \dots \rightarrow \\ \text{data (i-4)} \quad \dots \times e \dots \rightarrow \end{array} \right\} \text{重み平均値}$$

波形が滑らかになる効果 = 高周波数を削る効果
low-pass filter

共分散 Covariance NMR

フーリエ変換

$$S(k, \tau_m, \omega_2) = \text{Re} \int_0^{t_{2,\max}} dt_2 \exp(-i\omega_2 t_2) s(k, \tau_m, t_2).$$

$$k = 1..N_1 \quad t_1 = k \Delta t_1$$

共分散

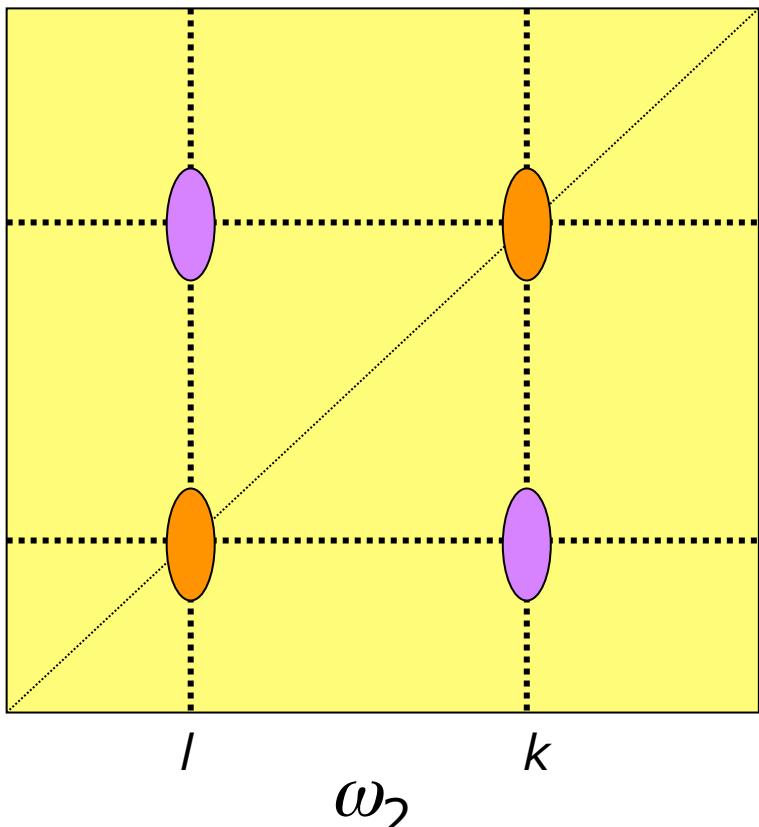
$$C_{ij} = \frac{1}{N_1 - 1} \sum_{k=1}^{N_1} (S(k, i) - \langle S(i) \rangle)(S(k, j) - \langle S(j) \rangle)$$

$i=j$ の時を分散とよぶ。その平方根が標準偏差となる。

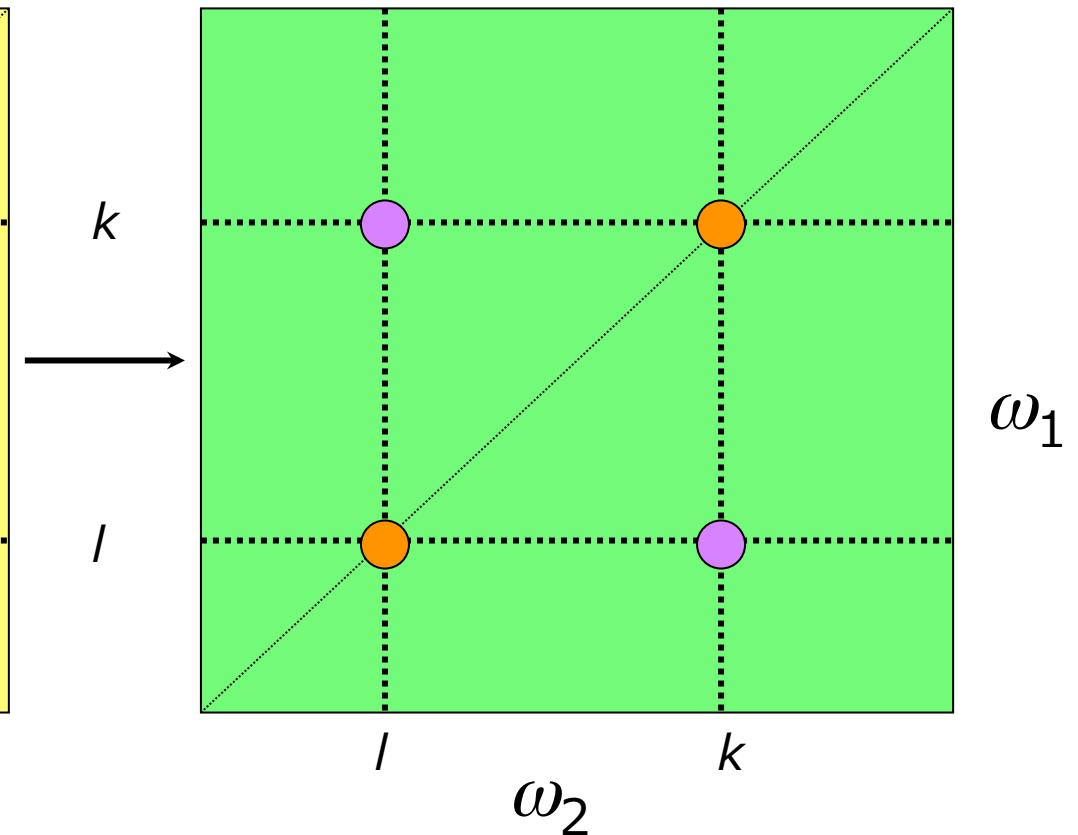
Brüschweiler, R. et al. (2004) *J.Chem.Phys* **120**, 5253.

$$C_{ij} = \frac{1}{N_1 - 1} \sum_{k=1}^{N_1} (S(k,i) - \langle S(i) \rangle)(S(k,j) - \langle S(j) \rangle)$$

低分解能スペクトル

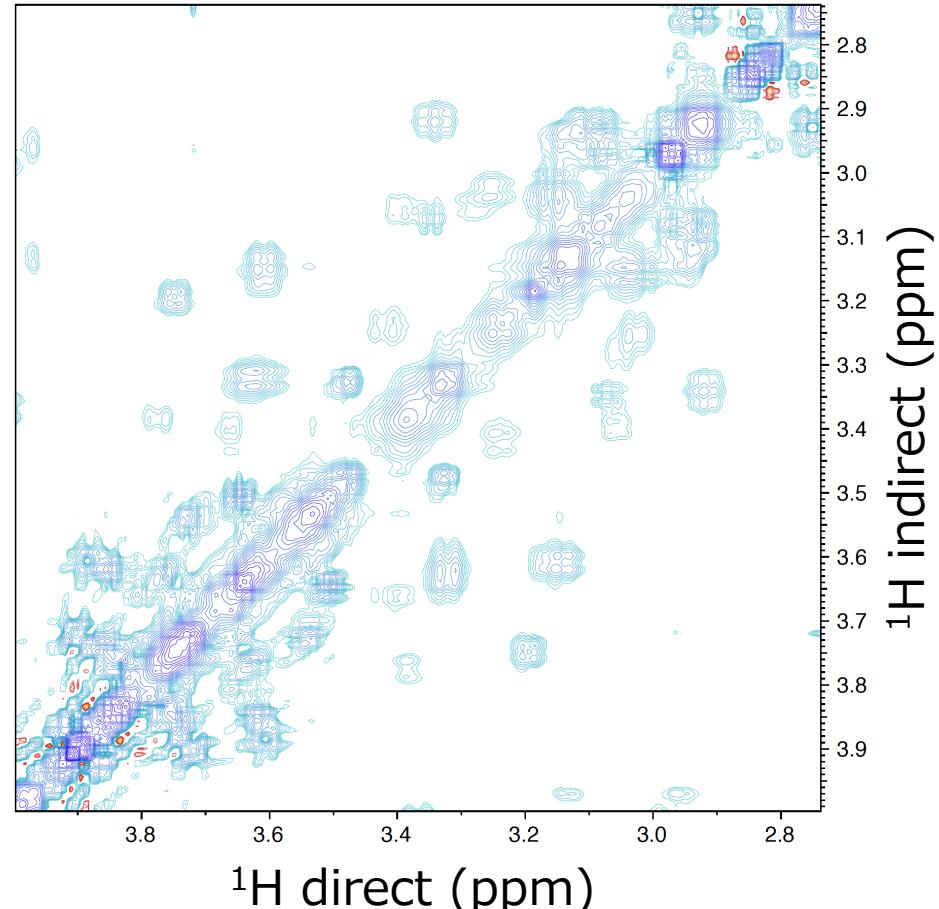
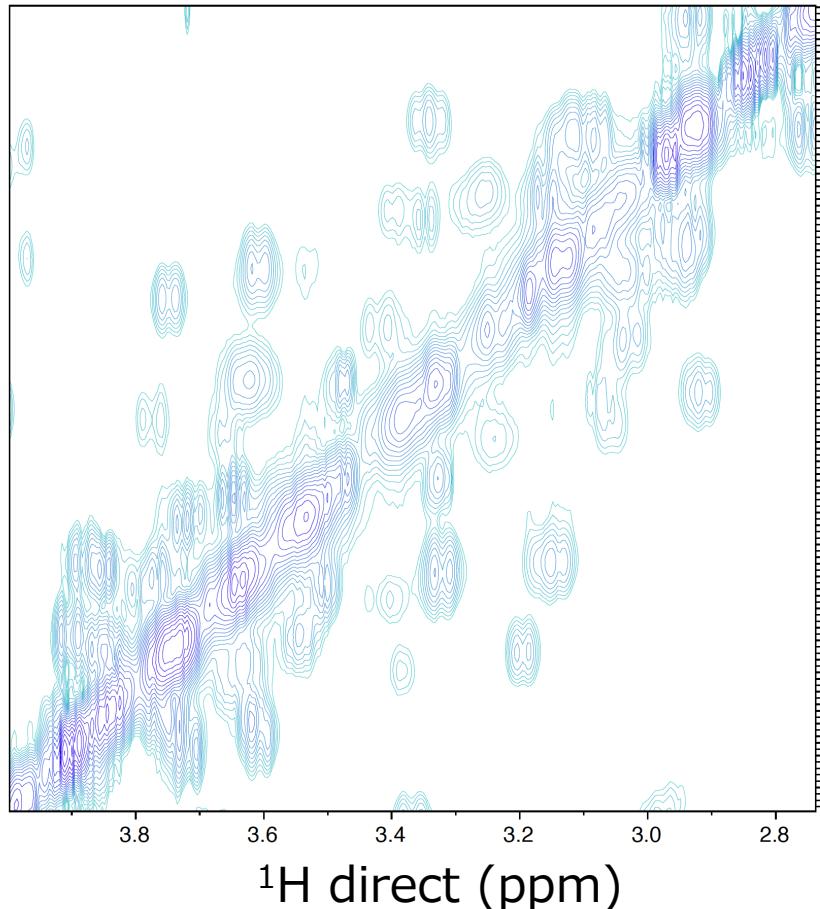


共分散による高分解能化スペクトル



ω_1 軸に対してではなく、 t_1 軸に対しても可能
スペクトル（行列）の平方根が必要

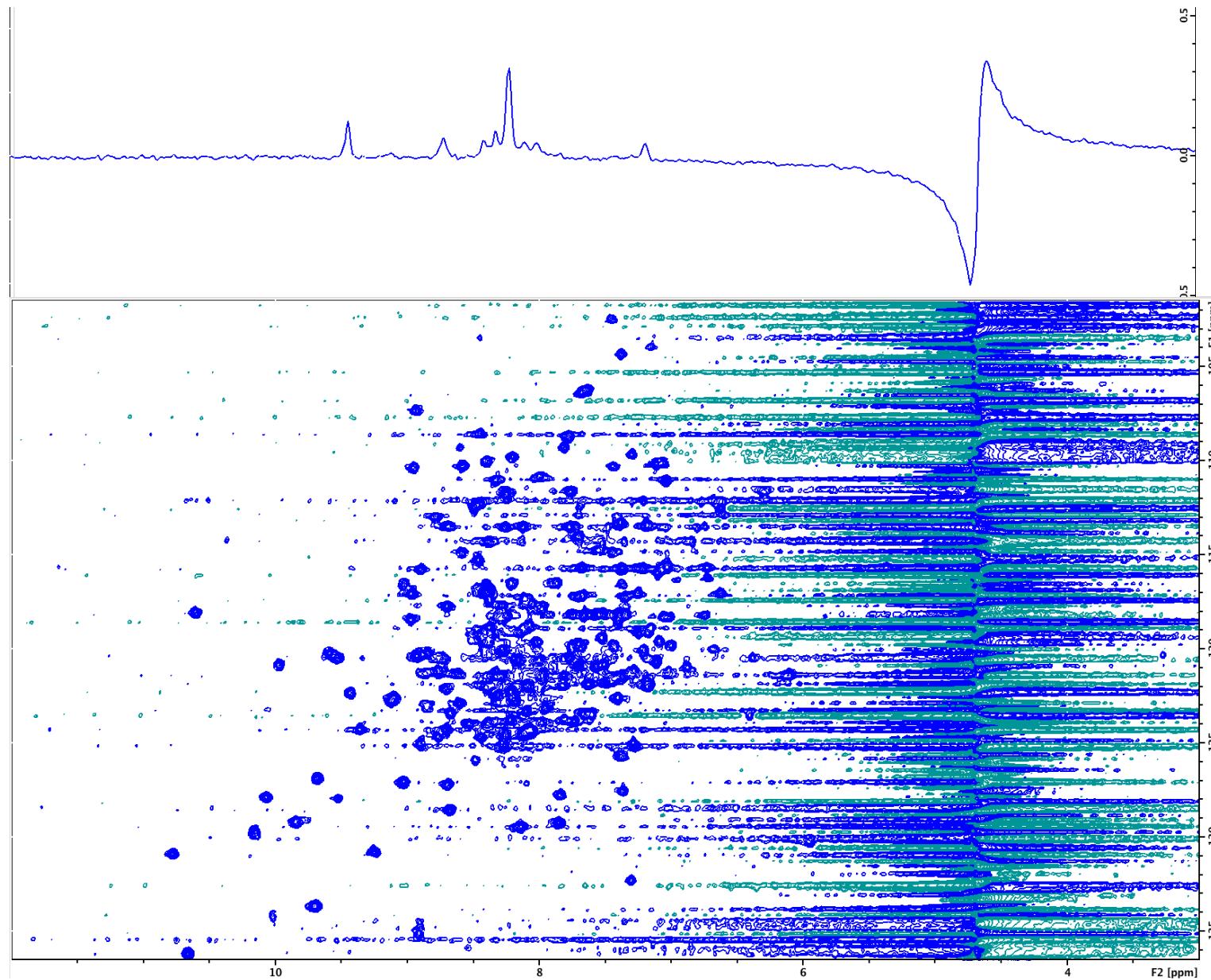
二次元スペクトルにおいては ω_1 軸の分解能は
covariance によりかなり上がる。



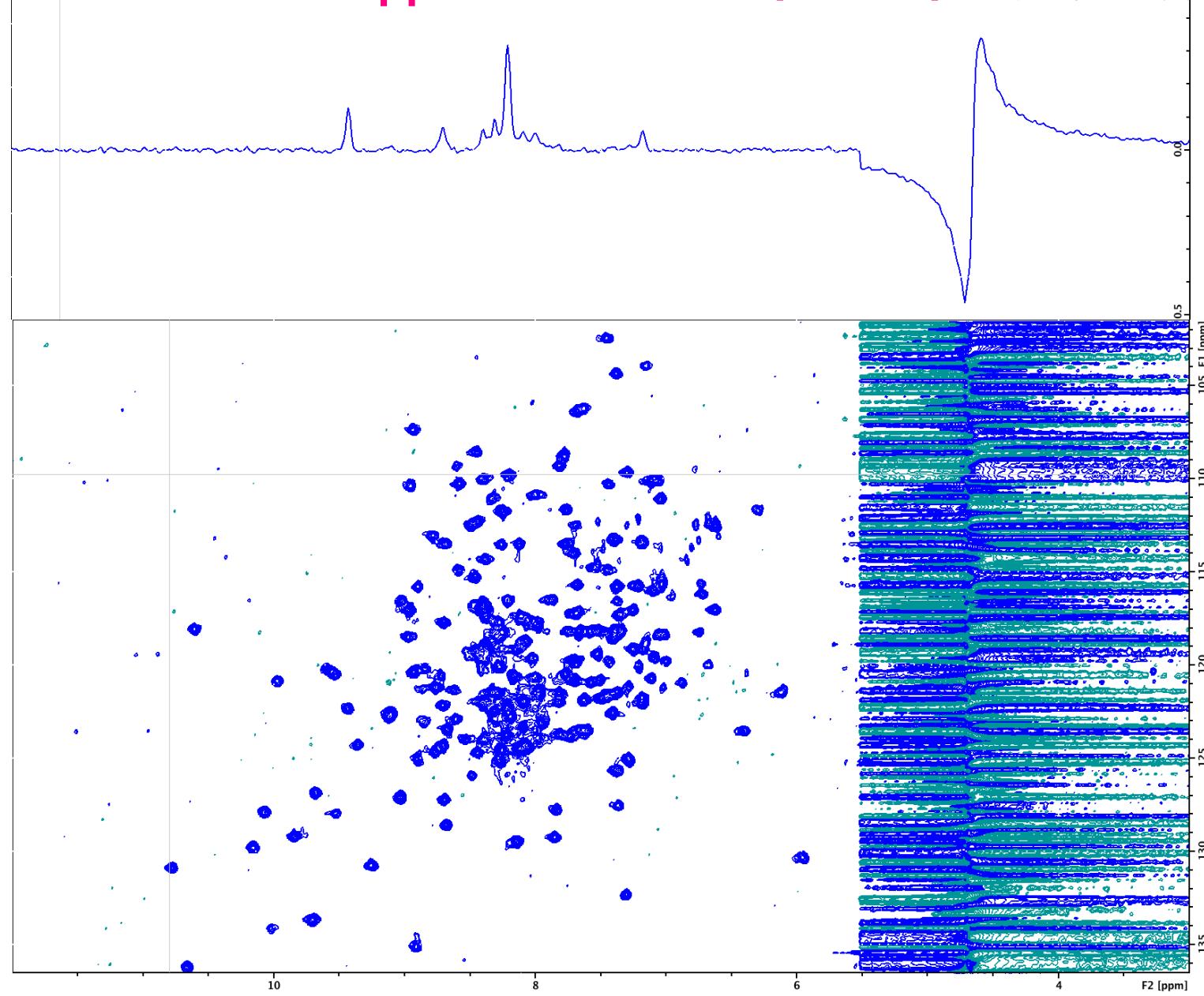
3087 (ω_2) \times (200* $t_1 \rightarrow$ FT)

3087 (ω_2) \times (200* $t_1 \rightarrow$ covariance)

溶媒の大きなピークの裾野で「ベースライン」が上下してしまう。

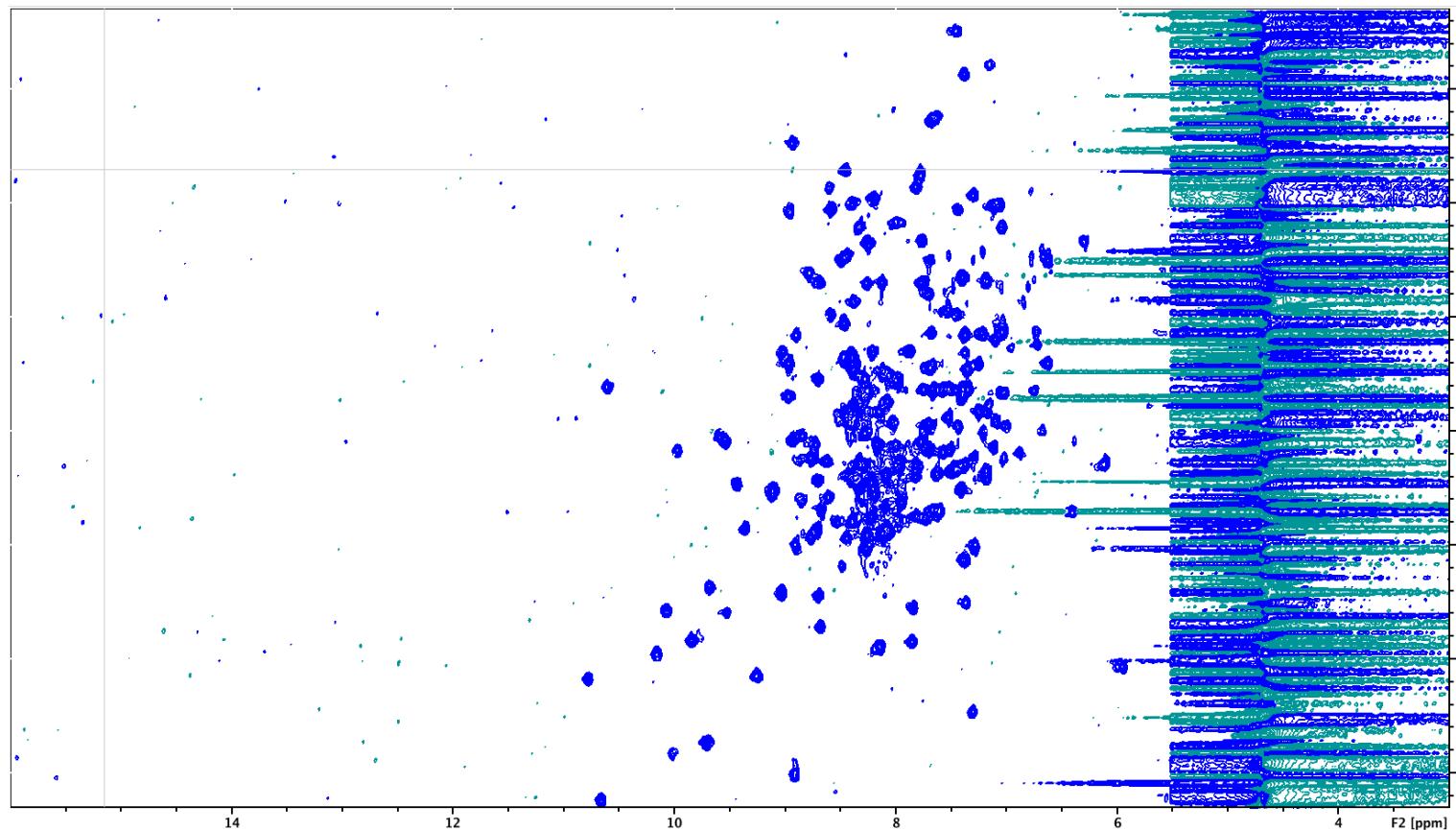


FT の後に 5.5~12.0 ppm で多項式補正（次数: 3）をかけてみた。

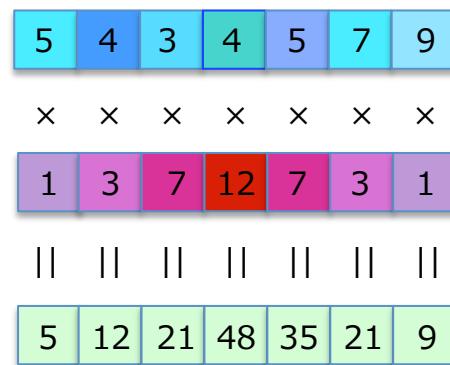
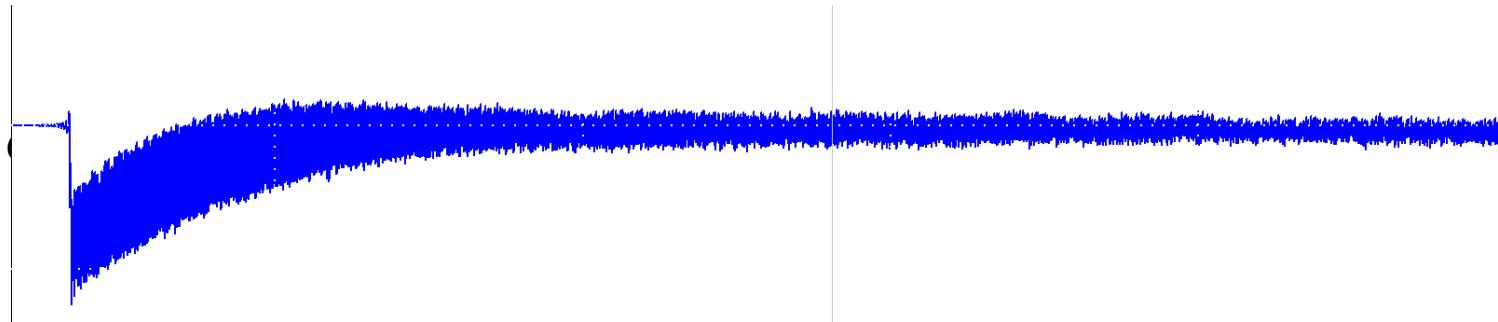


FT の後に 5.5~16.0 ppm で多項式補正（次数: 3, 5）をかけてみた。

- 12~16 ppm のように flat な領域が長すぎると、多項式における高次の寄与が小さくなってしまうのだろうか？
- 一方の端だけ極端に曲がるようなベースラインの補正が苦手。



フィルターによる FID 段階での補正 (high-pass filter)



$$\frac{5+12+21+48+35+21+9}{1+3+7+12+7+3+1} = 4.4$$

4.0 - 4.4

4.4

-0.4

FID 信号強度

フィルター

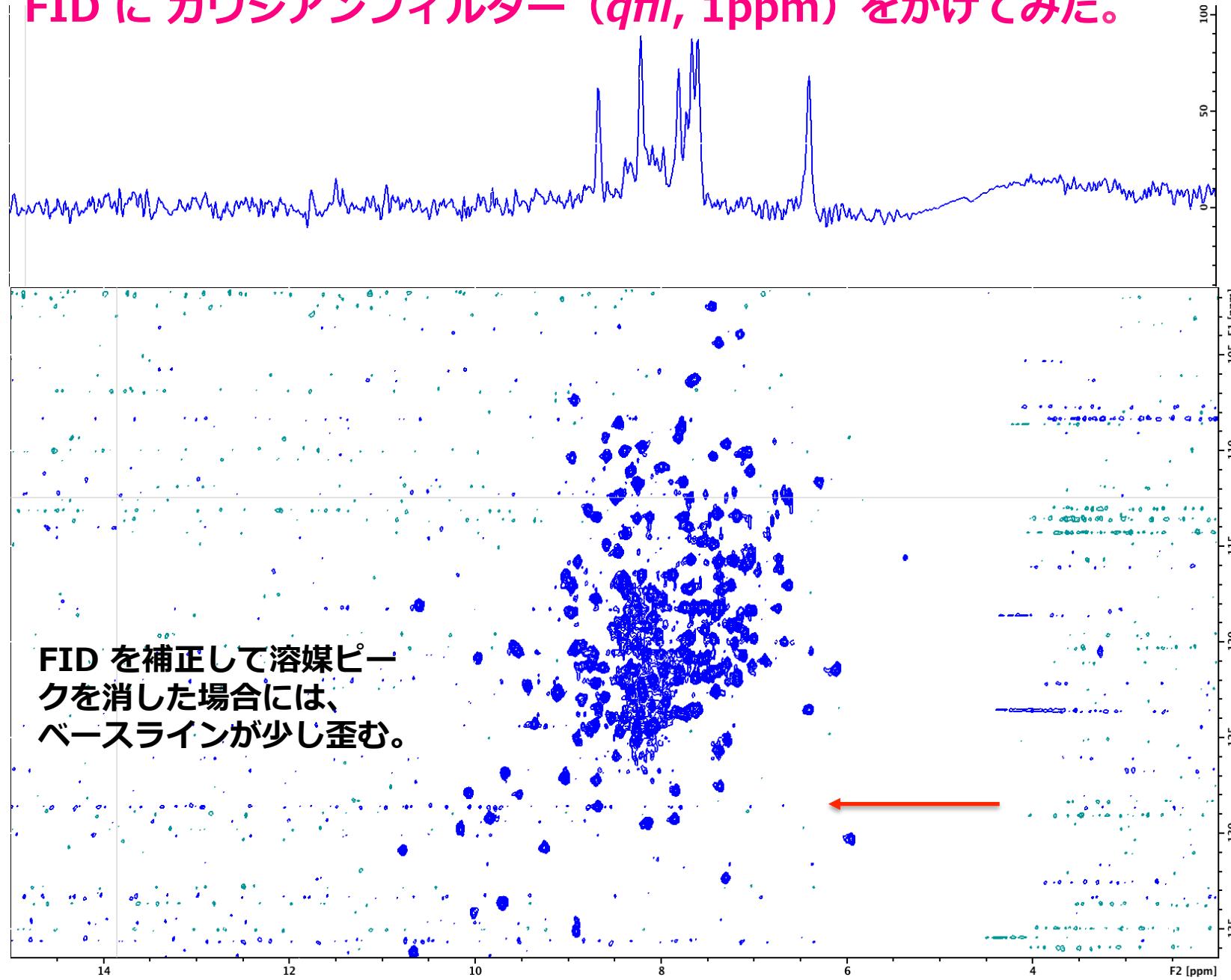
畳み込み積分 (convolution)

相加平均

低周波数成分 (溶媒)

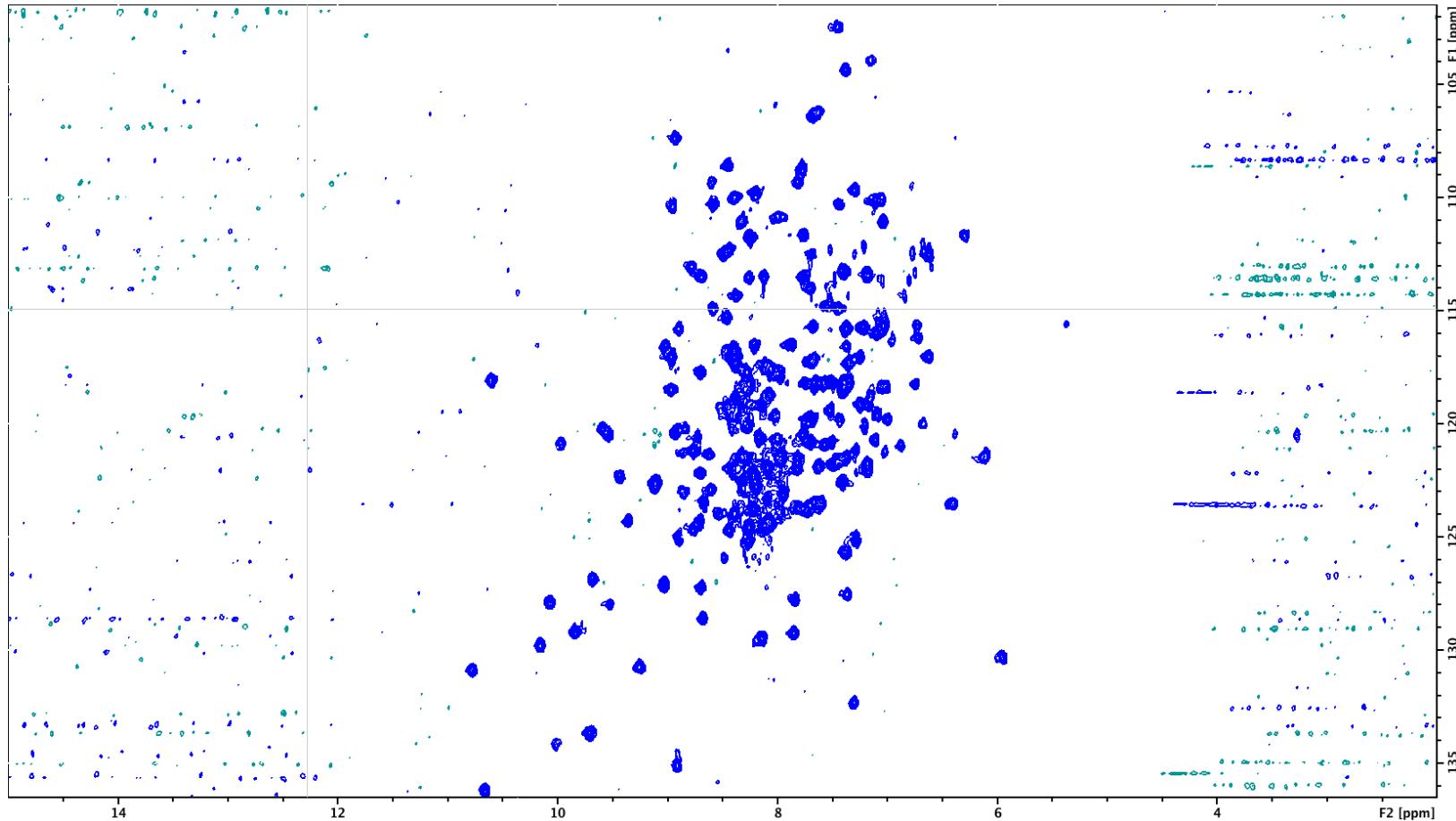
高周波数成分 (溶質)

FID に ガウシアンフィルター (*qfil*, 1ppm) をかけてみた。



さらに 5.5~12.0 ppm で多項式補正（次数: 5）をかけてみた。

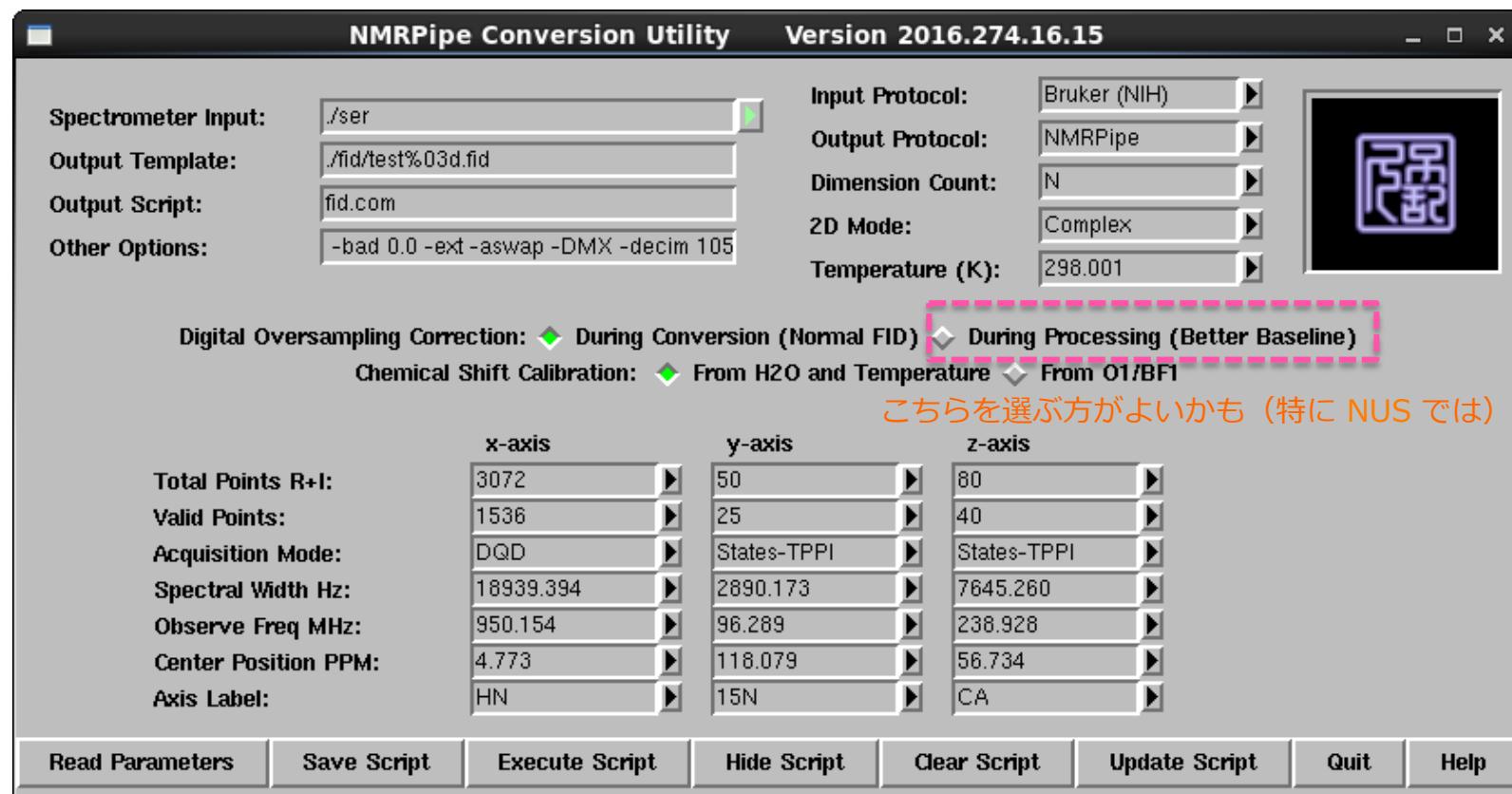
ベースライン補正をかけた領域の中では横線が消えた。



間接測定軸に LP をかけたい場合には、FID にベースライン補正をしない方がよいのでは？インターフェログラムを不規則に加工してしまうから。

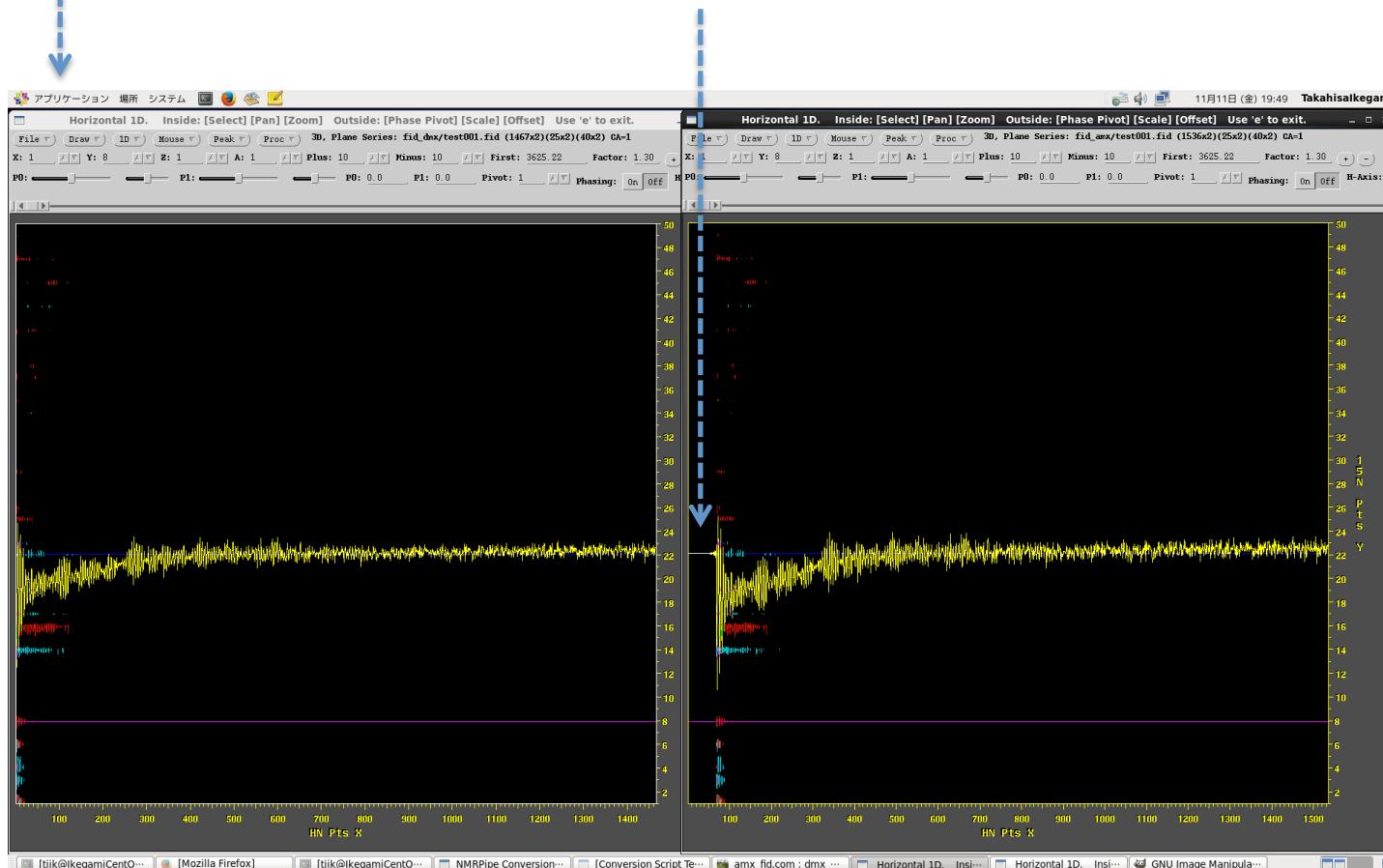
直接測定 (FID) 軸のベースライン補正

FID 軸のフーリエ変換の後、最初にスペクトルの両端を少しずつ切っておく（その後の FT 用の時間を節約するため）。両端はデジタルフィルターの影響で変な曲がり方を示すことが多い。そして、全ての間接測定軸をフーリエ変換した後に、直接測定軸のベースラインを溶媒から片方ずつ補正し、最後に見たい箇所の周波数幅になるように切りとる。



デジタルフィルターによる影響を conversion の段階で補正した。しかし、その補正が完璧ではないため、スペクトルの両端が少し歪む。

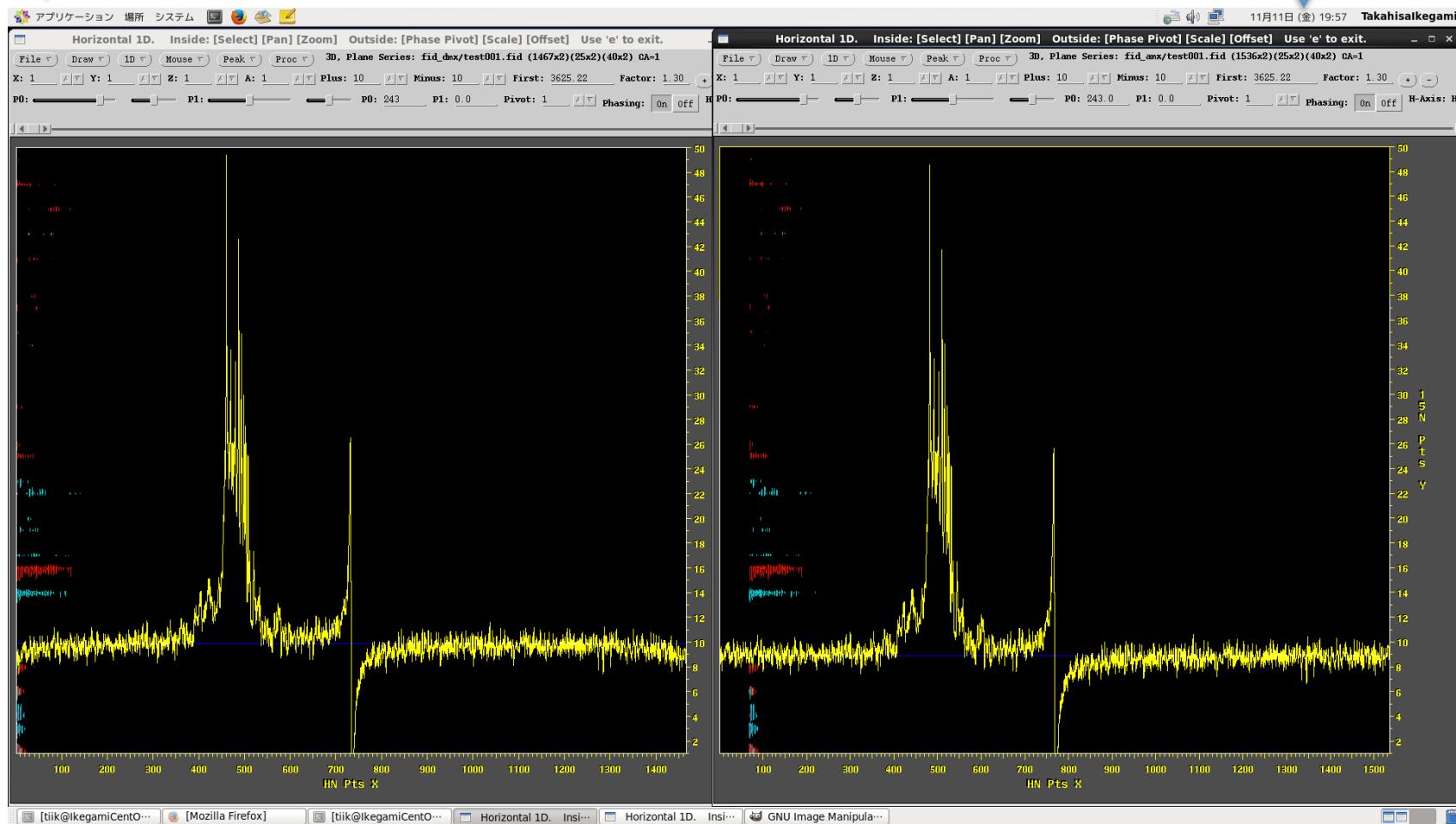
デジタルフィルターによる影響を conversion の段階で補正しなかつた。補正はフーリエ変換の時に行われるので、FID の時点では最初の数十点が変。しかし、この方がベースラインがフラットになる。



デジタルフィルターによってスペクトルの両端が少し歪んでいる。これにベースライン補正を施してしまうと、しばしば失敗する。



FT の最中に補正する方がきれい。

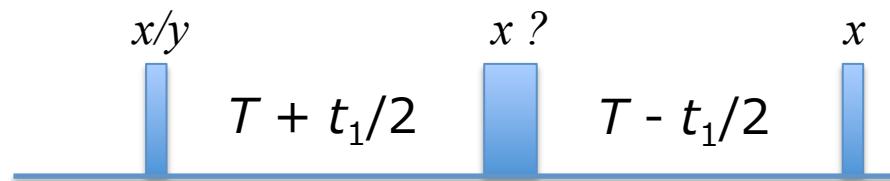


間接測定軸の位相補正

きっちりと 90° , -180° ($0, 0$) 補正をしたとしても、少しだけ位相がずれことがある。

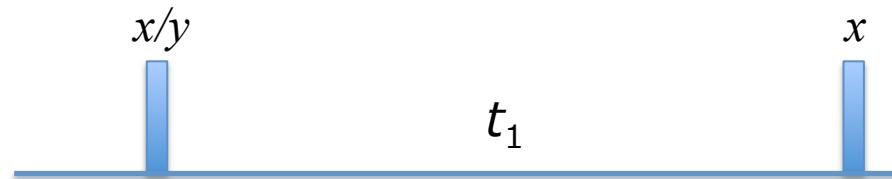
これは $90-180-90$ パルスでパワーを変えた場合などに起こる。つまり、 90° パルスと 180° パルスの間で位相が数度ずれているのである。しかたがないので ph0 で補正するのであるが、ミラーイメージの Linear-predictionをかける場合、インターフェログラムの段階で位相を補正しておき、その後に linear-prediction をかけないといけない。位相がずれたままだと、ミラーイメージが崩れるため。

あるいは、Q5(90°) や Q3(180°) を打った時の磁化ベクトルの挙動が理想的ではないため。



間接測定軸の位相補正

Bloch-Siegert 効果がのっても ph0 の位相を調整することで補正はできる。ところが、それでも ph1 の助けが必要になる場合は、delay の設定が間違えている可能性がある。



t_1 の初期値として $(90^\circ\text{パルス幅}) \times (2/\pi) \times 2\text{本分}$ がかかってくる。

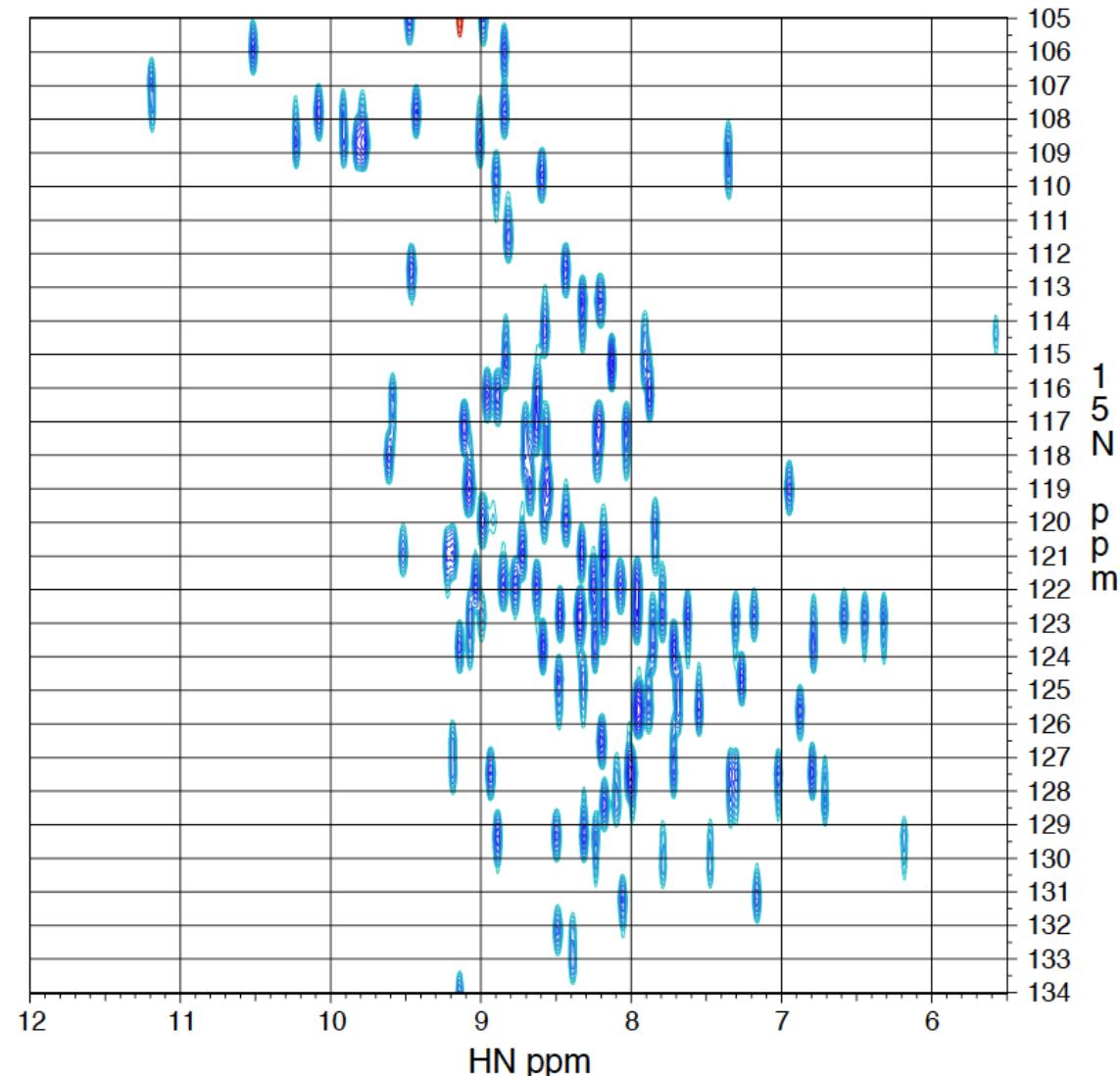
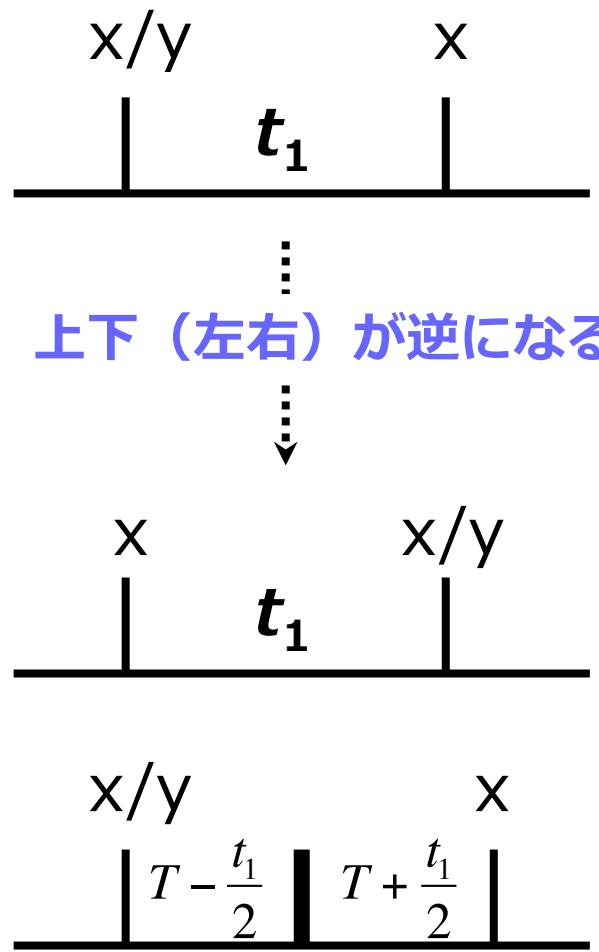
しまった！と思っても慌てずに、

0次の位相補正: -(ph1)/2

1次の位相補正: $360^\circ * (t_1 \text{ の初期値}) / \Delta t_1$

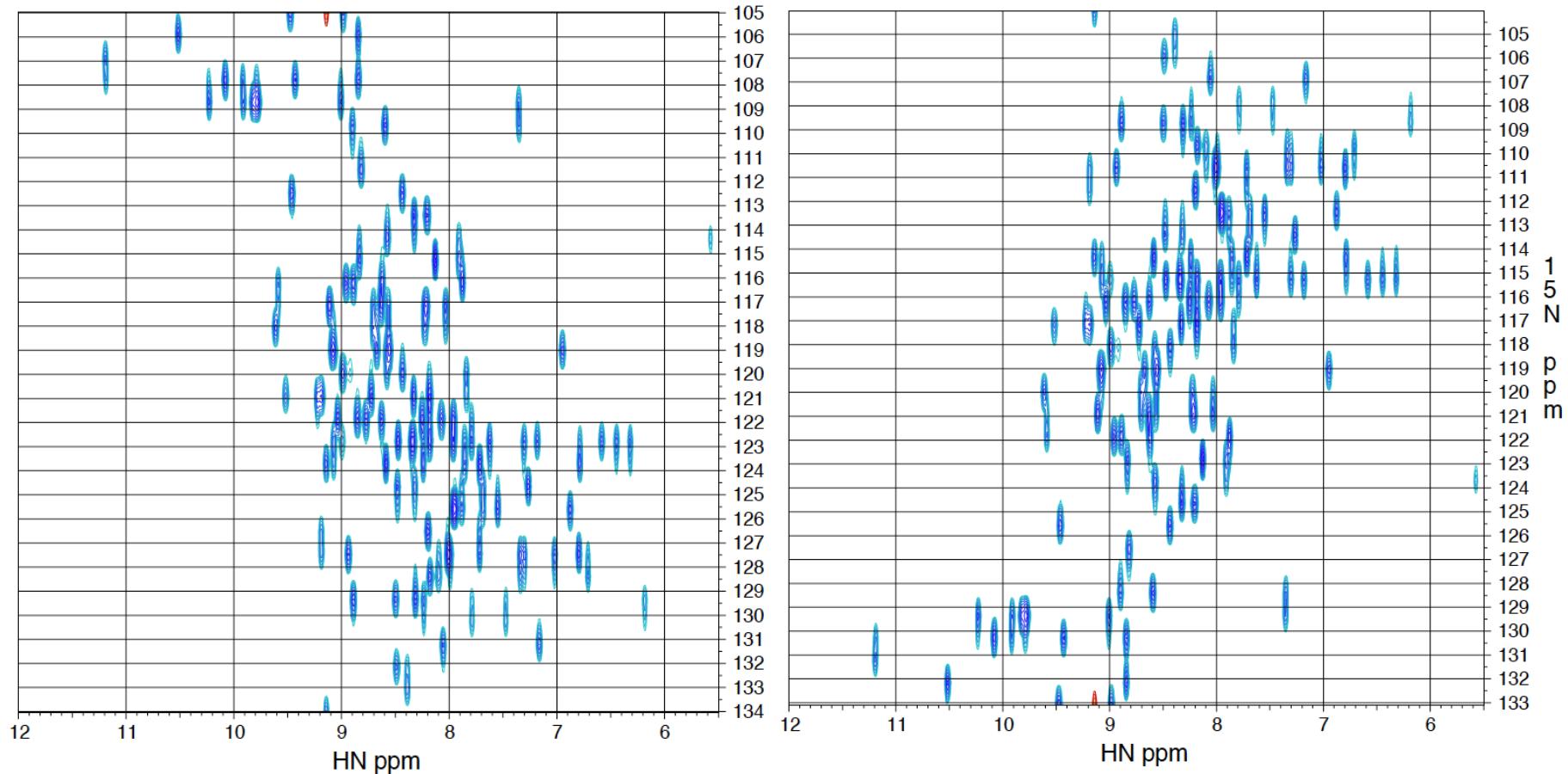
折り返ったピークの位相がずれることと、ほんの少しのベースラインの歪みだけの犠牲ですむ。なお、shaped-pulse の場合にはシミュレータを使う。

スペクトルが逆さまの時の処理



次元の周波数を逆転する操作を行うと…

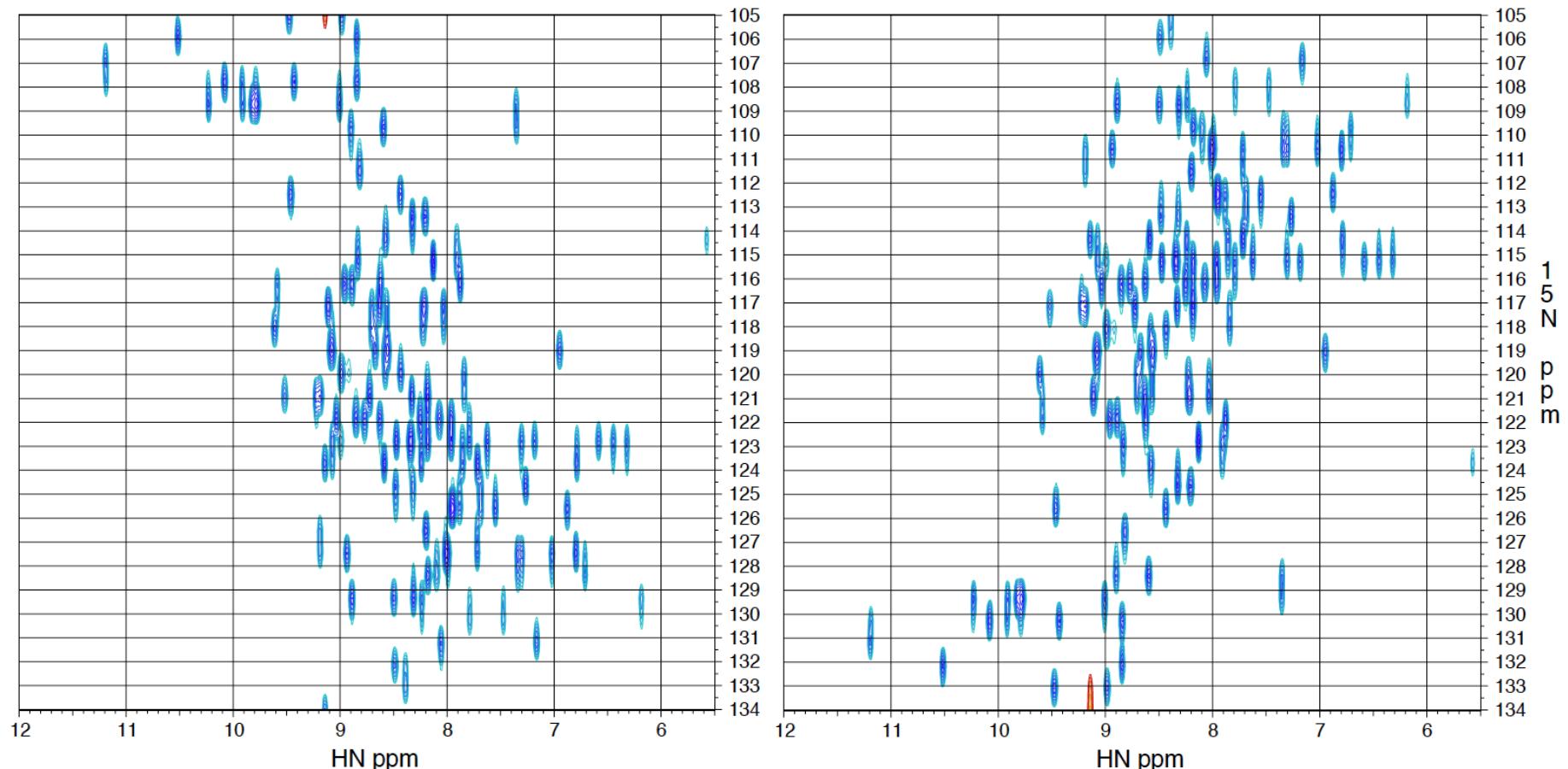
nmrPipe -fn REV -sw



画像が上下で入れ替わったが、
¹⁵N の周波数の上限と下限も変化してしまった。

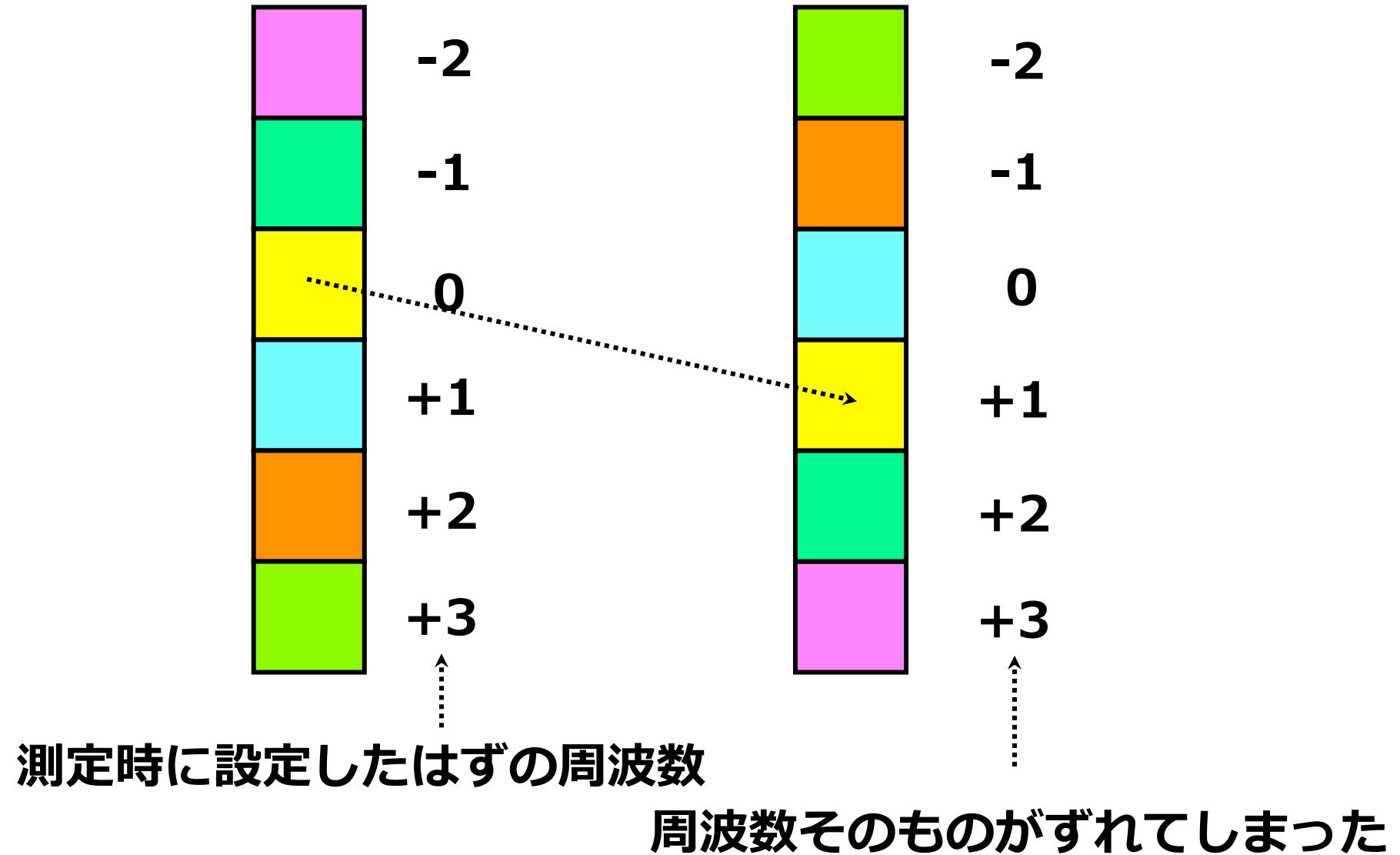
次元の周波数を正確に逆転する操作を行うと…

nmrPipe -fn FT -neg

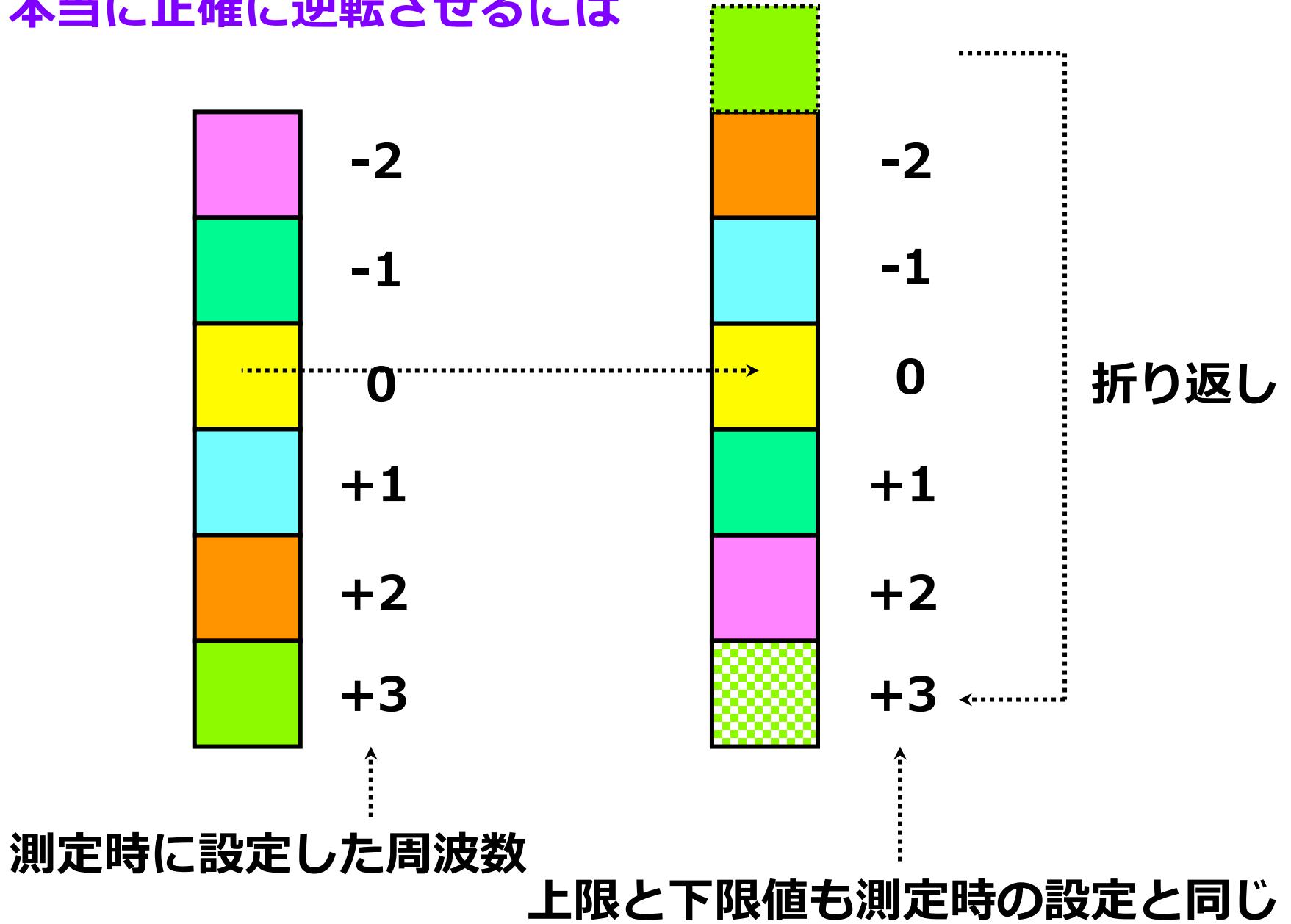


正確に周波数を逆転させた結果は、
単なる画像の上下（左右）入れ替えではない。

偶数のデジタルが原因



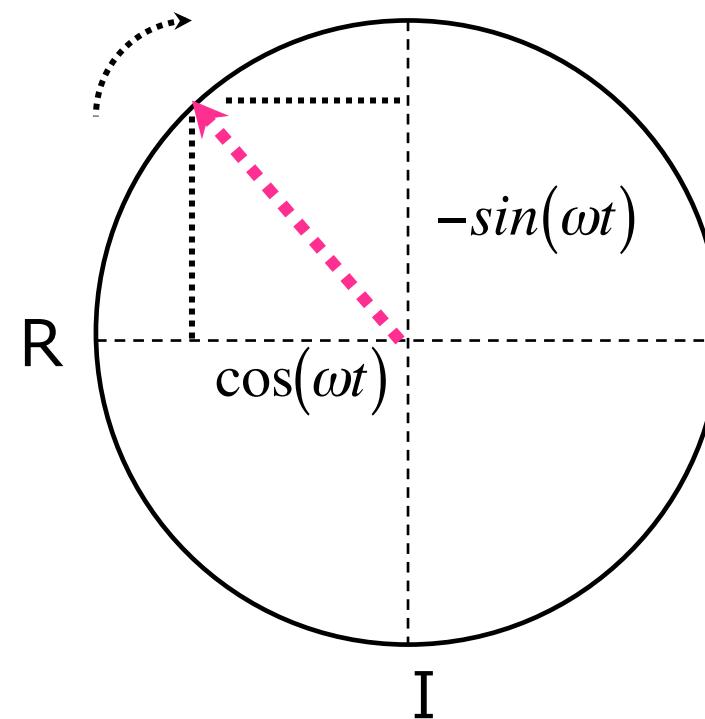
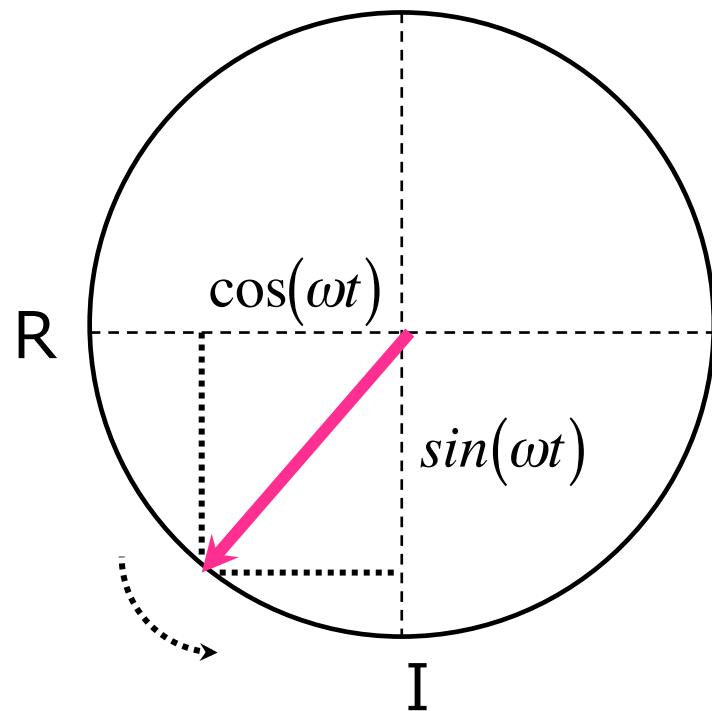
本当に正確に逆転させるには



周波数を逆転させるには、フーリエ変換での符号を逆転させる

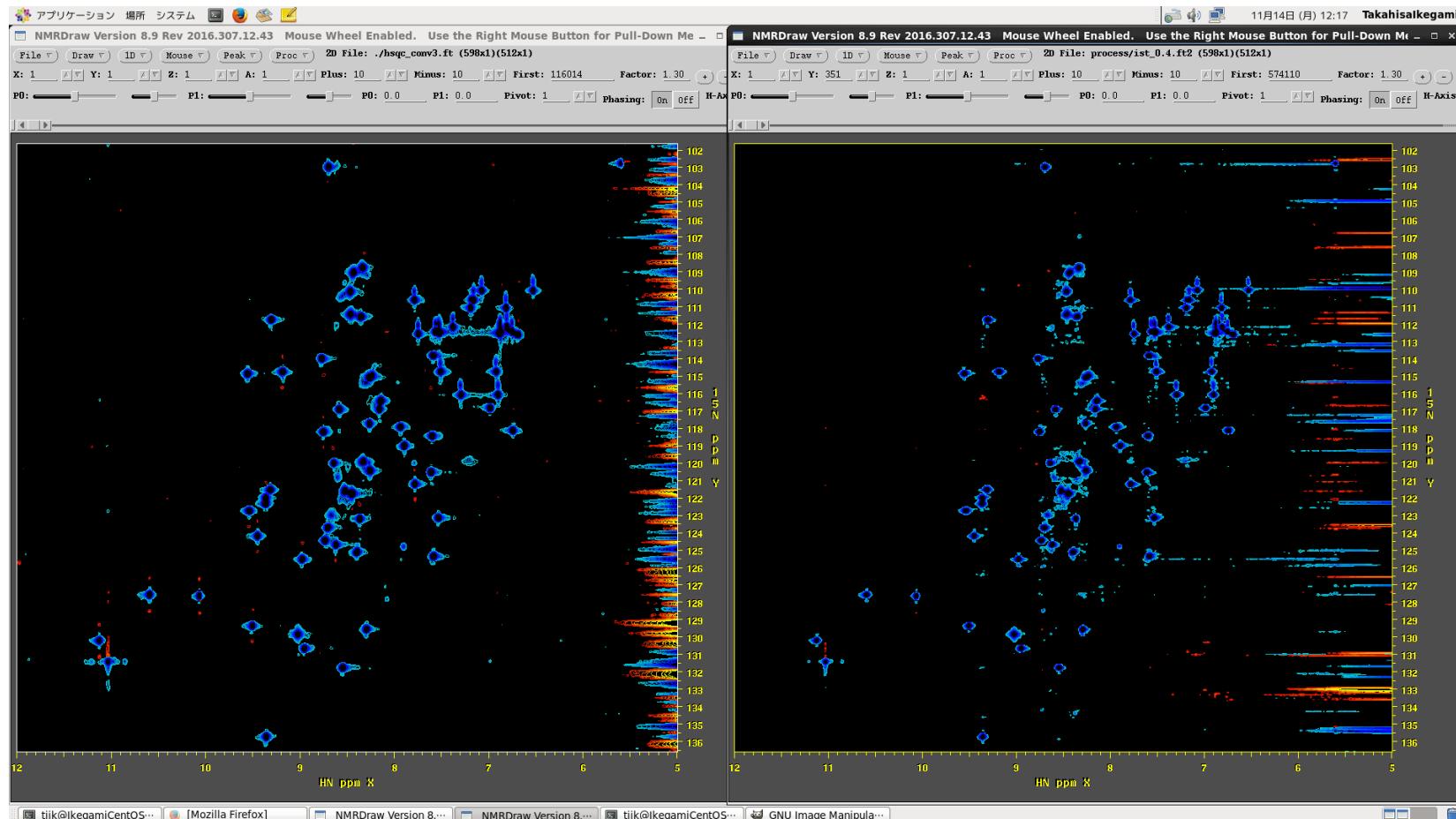
$$\exp(i\omega t) = \cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)$$

$$\begin{aligned}\exp(-i\omega t) &= \cos(-\omega t) + i \cdot \sin(-\omega t) \\ &= \cos(\omega t) - i \cdot \sin(\omega t)\end{aligned}$$



普通の測定 t_1 (150*)

NUS 測定 ($t_1 \rightarrow 1/4$)



Iterative Shrinkage Thresholding (IST 近接勾配法)

NMRPipe, Dr. Frank Delaglio

与えられた2つの方程式だけから3つの変数(x, y, z)を求められるか?

4, 5, 3 などが逆フーリエ変換の法則に相当

周波数軸スペクトル
(x, y, z の3点が相当)

$$4x + 5y - 8z = -3$$

$$3x - 3y - 2z = 8$$

NUS 時間軸データ
(1点を skip して -3, +8 の2点のみをサンプリング観測)

普通ならば、いろいろな x, y, z の組み合わせが出てきてしまうが、もし、x, y, z のうち少なくとも1つが0だと決めると、解けるかもしれない（どれが0かは事前に分からぬ）。あるいは、x, y, z の絶対値の合計ができるだけ小さくなるような（ノルム1を小さくする）組み合わせを選ぶのでも可能かもしれない。これは、時間軸と周波数軸の間の関係ができるだけ矛盾させないで（最小自乗法、ノルム2を小さくする）、周波数軸スペクトルができるだけ簡単にする（最大エントロピー法）ことに相当する。

水の中に落としたインク滴が広がるように（自然のエントロピーは放っておくと増える向きに進む）、スペクトルができるだけ滑らかにするという制限を加えることによって、この方程式をなんとか解く。

まとめ

PC が苦労すればするほど、計算するやりがいが出るものである。



PC の速度があまりに速くなり過ぎてしまったので、FT をしても得られる感動が少なくなってしまった。



もっとスペクトルをきれいにしようと思う闘志が湧いてこない。



今後はプロセスに一週間ほどかかるような 4 次元 NUS の方がよいかもしれない。



NUS は非線形的であるので、しばしば期待を裏切ってくれる。よつて闘志を再燃できるかも。それに対して線形計算である FT は、経験を積めば結果が予想できてしまうので（従順すぎ）、そろそろ卒業。