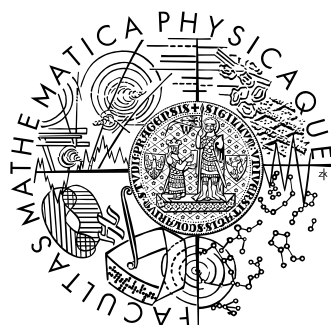


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



MUDr. Antonín Škoch, Ph.D.

Měření příčné relaxace metodami spinového echa

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Zdeněk Tošner, Ph.D.

Servisní centrum chemické sekce PŘF UK

Studijní program: fyzika, obecná fyzika

2008

Chtěl bych poděkovat vedoucímu bakalářské práce RNDr. Zdeňku Tošnerovi, Ph.D. za poskytnutí zdrojových kódů pro kvantově mechanické simulace a za odbornou pomoc při práci na tomto tématu.

Dále bych rád poděkoval Ing. Milanu Hájkovi, DrSc. za poskytnutí zázemí pro vypracování této práce.

Můj veliký dík patří mé manželce Janě za její trpělivost a obětavost.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsal samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne 29. května 2008

Antonín Škoch

Obsah

1 Úvod.....	7
1.1. Historie a současnost nukleární magnetické rezonance.....	7
1.2. Motivace a cíle práce.....	8
1.3. Uspořádání práce.....	9
2 NMR jev, NMR interakce.....	10
2.1. NMR jev.....	10
2.2. Spinový hamiltonián izolované částice.....	10
2.3. Původ NMR interakcí.....	11
2.4. Chemický posun.....	11
2.5. J-vazba, nepřímá spin-spinová interakce.....	12
2.6. Silná a slabá J-vazba.....	12
3 NMR Relaxace.....	14
3.1. Rovnovážný stav.....	14
3.2. Nerovnovážný stav, radiofrekvenční puls.....	14
3.3. T_1 a T_2 relaxační čas.....	14
3.4. Mechanismus relaxace.....	15
3.5. Korelační čas.....	15
4 NMR experiment.....	17
4.1. Úvod k pulsním sekvencím.....	17
4.2. FID sekvence.....	17
4.3. Spinové echo.....	17
4.4. Spinové echo a homonukleární J-vazba, J-modulace.....	18
4.5. CPMG sekvence.....	21
5 Kvantový popis NMR.....	23
5.1. Matice (operátor) hustoty.....	23
5.2. Liouville-von Neumannova rovnice.....	24
5.3. Kvantová simulace NMR experimentu.....	24
6 Metody.....	26
6.1. Simulace.....	26
6.2. Experiment.....	27
7 Výsledky.....	29
7.1. Výsledky simulací J-modulace, bez relaxace.....	29
7.1.1. CPMG sekvence, $\theta = 180^\circ$	29
7.1.2. CPMG sekvence, $\theta \neq 180^\circ$	30
7.2. Výsledky simulací J-modulace při zahrnutí relaxace.....	34

7.3.	Výsledky měření	36
7.3.1.	CPMG - efekt snížení θ	36
7.3.2.	CPMG - experiment versus simulace	37
7.3.3.	Spinové echo	38
8	Diskuze	40
8.1.	Simulace bez relaxace	40
8.2.	Simulace se započtením relaxace	41
8.3.	Experiment	42
9	Závěr	44
	Literatura	46

Název práce: Měření příčné relaxace metodami spinového echa

Autor: MUDr. Antonín Škoch, Ph.D.

Katedra: Katedra fyziky nízkých teplot MFF UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Zdeněk Tošner, Ph.D.

Servisní centrum chemické sekce PřF UK

e-mail vedoucího: tošner@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt:

Studium relaxačních mechanismů jader pomocí NMR přináší významnou informaci o struktuře a pohyblivosti molekul. T_2 relaxační doba je nejčastěji měřena pomocí pulsní sekvence CPMG. Avšak u systémů s homonukleární J-vazbou jsou v relaxační křivce přítomné modulace, které komplikují stanovení T_2 . Tyto J-modulace lze odstranit, pokud perioda opakování refokusačního pulsu τ v CPMG splňuje podmínku

$$\tau \ll \frac{1}{\Delta\nu}, \quad (1)$$

kde $\Delta\nu$ je rozdíl rezonančních frekvencí jader.

Podmínku (1) však nelze vždy splnit. Cílem práce bylo prozkoumat charakter J-modulací a relaxačního chování systému dvou spinů spojených J-vazbou při různých parametrech CPMG experimentu. Byly použity jednak simulace založené na numerickém řešení Liouville-von Neumannovy rovnice a simulace relaxací dle Redfieldovy teorie, jednak experimentální měření relaxací CH_2 skupiny citrátu. Bylo prokázáno, že k vymizení J-modulací dojde i při vyšším τ , než je dáno podmínkou (1), pokud sklápěcí úhel refokusačního pulsu CPMG $\theta \neq 180^\circ$. Byly zjištěny periodické podmínky τ , kdy J-modulace vymizí (dekapling),

$$\tau_{dec} = \frac{2k}{\Delta\nu}, \quad k = 1, 2, 3, \dots, \quad (2)$$

a kdy jsou maximální (rekapling)

$$\tau_{rec} = \frac{2k-1}{\Delta\nu}, \quad k = 1, 2, 3, \dots \quad (3)$$

Kvalita dekaplingu je horší pro silnou J-vazbu a obecně se oblastech τ_{dec} při rostoucím indexu k postupně zhoršuje. Simulace relaxací ukázala, že hodnota T_2 se v oblastech dekaplingu neliší od očekávané hodnoty. Pro určité τ byla pozorována nenulová limita $t \rightarrow \infty$ relaxační křivky, což má praktickou implikaci pro stanovení T_2 .

Klíčová slova: NMR, J-vazba, T_2 relaxace, CPMG, citrát

Title: Measurement of transverse relaxation using spin echo methods

Author: MUDr. Antonín Škoch, Ph.D.

Department: Department of Low Temperature Physics

Supervisor: RNDr. Zdeněk Tošner, Ph.D.

NMR laboratory, of Faculty of science, Charles University in Prague

Supervisor's e-mail address: tošner@karlov.mff.cuni.cz

Abstract:

The study of T_2 relaxation in systems with homonuclear J-coupling is complicated by modulation in the relaxation curve. This J-modulation can be removed when CPMG sequence is used and the period of repetition of refocusing pulse τ fulfils a condition

$$\tau \ll \frac{1}{\Delta\nu} \quad (1)$$

where $\Delta\nu$ is the frequency difference of coupled nuclei. However, the condition (1) cannot be in practice always fulfilled. The aim of this work was to investigate J-modulation and relaxation behaviour of homonuclear J-coupled system in various parameters of CPMG sequence. Simulations based on numerical solution of Liouville-von Neumann equation and Redfield theory were performed. Relaxation curves of CH_2 group of citrate were measured on high-resolution NMR spectrometer. It was found that the suppression of J-modulation can be achieved also for τ longer than required by the condition (1) providing that the refocusing angle in CPMG for both J-coupling partners $\theta \neq 180^\circ$. The simulations yielded conditions for τ when J-modulation vanishes (decoupling)

$$\tau_{rec} = \frac{2k-1}{\Delta\nu}, k = 1, 2, 3, \dots \quad (2)$$

and when it is maximal (recoupling)

$$\tau_{dec} = \frac{2k}{\Delta\nu}, k = 1, 2, 3, \dots \quad (3)$$

The decoupling is systematically worse in strong coupling and worsening of decoupling in τ_{dec} was observed when k is increased. The simulation of relaxation showed no significant difference in T_2 from its expecting value.

Keywords: NMR, J-coupling, T_2 relaxation, CPMG, citrate

Kapitola 1

Úvod

1.1. Historie a současnost nukleární magnetické rezonance

Od roku 1945, kdy byl poprvé pozorován elektromagnetický signál pocházející z jader atomů, našel jev nukleární magnetické rezonance (NMR) široké použití. Při podrobnějším studiu tohoto jevu byly nejprve objeveny a teoreticky popsány elektromagnetické interakce mezi jádrem a externím magnetickým polem, mezi jednotlivými jádry atomů a interakce mezi jádrem a elektronovým obalem v přítomnosti externího magnetického pole. První NMR experimenty potvrdily, že NMR jev lze velmi užitečně využít ke studiu fyzikálních a chemických vlastností látek.

Bouřlivý vývoj počítačových technologií v 50. letech minulého století umožnil analyzovat NMR signál pomocí Fourierovy transformace a poskytl podmínky ke zdokonalení NMR spektrometrů. Metoda NMR spektroskopie se postupně stala významným nástrojem při studiu chemické struktury látek. Studium NMR interakcí v látkách navíc umožňuje určovat konformaci molekul a tak mapovat např. terciární a kvartérní strukturu proteinů.

V polovině 70. let pak bylo NMR jevu úspěšně použito při vývoji techniky MR zobrazování. Technika speciálních pulsních sekvencí a aplikace gradientů magnetického pole umožnila vytvořit obraz struktury objektu. Tento objev otevřel dveře k aplikaci NMR jevu v medicíně: MR tomografie, uvedené do klinické praxe v 80. letech otevřely novou dimenzi v radiologickém zobrazování měkkých tkání. Tato technika byla v medicíně postupně využita při diagnostice patologií mozku a míchy, později byla využita k vyšetřování dalších orgánů. Rozvoj aplikace MR tomografie stále pokračuje; v posledních 10 letech byla tato technika úspěšně aplikována pro morfologické zobrazování srdce. Byly zavedeny sofistikovanější techniky využívající MR kontrastu, např. technika mapování aktivity jednotlivých center mozkové kůry (tzv. funkční MR zobrazování – fMRI), nebo technika difúzně váženého zobrazování pro mapování nervových spojů v centrálním nervovém systému (tzv. fiber tracking nebo diffusion tensor imaging - DTI).

Rozsáhlá aplikace NMR spektroskopie v chemii dala inspiraci k její aplikaci v medicíně. S rozvojem MR tomografií byla NMR spektroskopie použita v humánní praxi pro studium biochemických procesů ve tkáních a stala se tak jednou z mála technik umožňujících neinvazivní studium metabolismu živých tkání.

Techniky NMR jsou nyní významnými nástroji v mnoha oblastech vědy a medicíny. Do budoucna lze očekávat jejich další vývoj a široké využití.

1.2. Motivace a cíle práce

Studium relaxačních mechanismů, které provází NMR jev, přináší významnou informaci o struktuře a pohyblivosti molekul. Relaxační proces je kvantitativně popsán dvěma základními parametry – T_1 a T_2 relaxačními časy. Pro stanovení T_2 relaxačního času se nejčastěji využívá sekvence CPMG, jejíž princip je založen na fenoménu spinového echa [1,2].

Signál jader vzájemně interagujících J-vazbou je při spinovém echu ovlivněn tzv. J-modulacemi, které komplikují relaxační křivku a ztěžují kvantitativní určení T_2 relaxační konstanty. Je známo, že pokud perioda opakování refokusačního pulsu τ v CPMG splní podmínku

$$\tau \ll \frac{1}{\Delta\nu}, \quad (1.1)$$

kde $\Delta\nu$ je rozdíl v rezonančních frekvencích jednotlivých interagujících komponent, signál detekovaného echa J-modulacemi ovlivněn není [3]. Podmínku (1.1) z různých důvodů však nelze vždy splnit. Proto by bylo prakticky velmi užitečné najít alternativní metodu, která by odstranila J-modulace i při vyšší hodnotě τ .

Nedávno bylo prokázáno, že k vymizení J-modulací při CPMG experimentu může dojít i při τ vyšším, než by odpovídalo podmínce (1.1), pokud refokusační puls má omezenou šířku pásma a jeho frekvence je nastavena tak, že jedno z jader, které se účastní J-interakce, je excitováno refokusačním pulsem mimo svou rezonanční frekvenci, tj. je sklápěno podle osy, která neleží v rovině xy [4,5].

Cílem této práce bylo teoreticky prozkoumat a na experimentu ověřit možné další podmínky, při kterých vymizí J-modulace při CPMG experimentu. Jedním z konkrétních úkolů bylo ověřit, zdali nelze podobný efekt vymizení modulací pozorovat i při refokusačním pulsu, který je širokopásmový, ale jeho sklápěcí úhel θ není 180° . V případě, že by takový efekt byl pozorován, dalším úkolem by bylo stanovit optimální hodnotu sklápěcího úhlu refokusačního pulsu a ověřit platnost jevu jak pro silnou, tak pro slabou J-vazbu.

Vzhledem k tomu, že CPMG sekvence se užívá ke stanovení T_2 relaxačního času, dalším úkolem bylo teoreticky simulovat T_2 relaxační proces při CPMG s rozdílnými hodnotami τ a θ . Cílem bylo prokázat, jestli nastavení těchto parametrů CPMG sekvence ovlivňuje naměřený relaxační čas T_2 .

1.3. Uspořádání práce

V teoretické části této práce v kapitolách 1-5 je podán stručný teoretický popis jevů, týkajících se problematiky popsané v experimentální části. Podrobnější teoretický popis jevu NMR a problematiky týkající se tématu práce lze nalézt např. v publikacích [6,7]. Druhá část práce (kapitoly 6-9) se věnuje metodám a výsledkům simulací a experimentů, které byly v rámci studia J-modulací a relaxačního chování dvoujaderného spinového systému provedeny.

Kapitola 2

NMR jev, NMR interakce

2.1. NMR jev

Studujme nyní makroskopický systém, skládající se z velkého počtu částic se spinovým kvantovým číslem $I = \frac{1}{2}$. Takový systém se může skládat např. ze souboru jader atomů vodíku, které se skládají z jednoho protonu. Vzhledem k existenci spinu (vnitřního momentu hybnosti) mají částice v systému i vlastní magnetický moment μ . Z kvantové teorie vyplývá, že spinová částice může v externím magnetickém poli nabývat pouze diskretních hodnot energie. Pro obecný spinový vícehladinový makroskopický systém pravděpodobnost výskytu částice v k -té energetické hladině ρ_k s energií E_k a jí odpovídající úhlovou frekvencí záření ω_k je dána Boltzmannovým rozdělením, které má tvar

$$\rho_k = \frac{e^{-\frac{E_k}{k_B T}}}{\sum_l e^{-\frac{E_l}{k_B T}}} = \frac{e^{-\frac{\hbar\omega_k}{k_B T}}}{\sum_l e^{-\frac{\hbar\omega_l}{k_B T}}}, \quad (2.1)$$

kde $k_B = 1,38066 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ je Boltzmannova konstanta a suma probíhá přes všechny možné hladiny energie l (tzv. statistická suma) [8].

V případě spinového systému $I = \frac{1}{2}$ v magnetickém poli jsou energetické hladiny pouze dvě. Pro energetický rozdíl ΔE mezi hladinami platí

$$\Delta E = -\hbar\omega_0 = -\hbar\gamma B^0, \quad (2.2)$$

kde B^0 je velikost magnetické indukce externího magnetického pole a γ je konstanta úměrnosti (tzv. gyromagnetický poměr), charakteristická pro danou částici.

Pro úhlovou frekvenci vlnění absorbovaného záření ω_0 , které způsobí přechod mezi hladinami energie, pak platí vztah

$$\omega_0 = -\gamma B^0. \quad (2.3)$$

Tuto úhlovou frekvenci nazýváme Larmorovou frekvencí a jev přechodu mezi diskretními energetickými hladinami jádra nacházejícího se v externím magnetickém poli nazýváme nukleární magnetickou rezonancí (NMR).

2.2. Spinový hamiltonián izolované částice

Abychom mohli podrobněji studovat jev NMR, je třeba kvantitativně popsat interakce částic s vnějším magnetickým polem a interakce mezi jednotlivými částicemi v magnetickém poli pomocí kvantové mechaniky. K tomuto účelu je

zaveden operátor celkové energie systému, tzv. hamiltonián \hat{H} [9]. Pro účely NMR lze hamiltonián zjednodušit a brát jen tu jeho část, která obsahuje jaderný spin – tzv. spinový hamiltonián. Předpokládejme, že soustava souřadnic je zavedena tak, že vnější statické magnetické pole míří v ose z. Spinový hamiltonián izolované částice s $I = \frac{1}{2}$ v magnetickém poli má potom tvar

$$\hat{H}^0 = -\gamma \hbar B^0 \hat{I}_z. \quad (2.4)$$

kde \hat{I}_z je operátor z-ové složky spinu částice. V teorii NMR se pro zjednodušení Planckova konstanta ve vyjádření hamiltoniánu většinou vypouští, energie je pak vyjádřena v jednotkách $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. V dalším textu se budeme držet formulace hamiltoniánu bez \hbar .

2.3. Původ NMR interakcí

Spinové částice nejsou ve vzorku magneticky izolované. Kromě externího pole působícího na spinové částice je přítomno ve studovaném souboru částic další, slabší magnetické pole, které pochází ze vzorku samého. Toto slabší magnetické pole, které má původ ve vzájemných elektromagnetických interakcích jader, elektronů a externího magnetického pole, se přičítá k vnějšímu magnetickému poli a modifikuje tak celkový hamiltonián systému. V tomto přehledu budou uvedeny pouze dvě základní interakce, které dávají za vznik typickému tvaru NMR spektra – chemický posun a J-vazba. Celkový přehled NMR interakcí lze nalézt např. v publikaci [6].

2.4. Chemický posun

Jedním ze zdrojů lokálního magnetického pole vzorku jsou elektrony, obklopující studované jádro. Tyto elektrony svým pohybem generují lokální slabé magnetické pole a modifikují tak základní hamiltonián (v izotropních kapalinách) na tvar

$$\hat{H}^{0+CS} = -\gamma B^0 (1 + \delta) \hat{I}_z \quad (2.5)$$

kde δ je skalární veličina, jejíž hodnota závisí na uspořádání elektronového obalu a je charakteristická pro každou funkční skupinu. Tato interakce, nazvaná chemický posun, určuje polohu signálu ve spektru. Při NMR experimentu tato interakce dává možnost rozlišit signály jednotlivých funkčních skupin ve studovaném vzorku a je tedy esenciální interakcí pro použití NMR jako analytické metody v chemii. Velikost příspěvku této interakce závisí na velikosti vnějšího magnetického pole, což je jeden z důvodů, proč získáváme lepší rozlišení jednotlivých spektrálních komponent na přístrojích s vyšším magnetickým polem.

2.5. J-vazba, nepřímá spin-spinová interakce

Jednotlivé spinové částice na sebe ve vzorku vzájemně působí svými magnetickými momenty. Kromě tzv. přímé dipól-dipólové interakce, která se v izotropních kapalinách ve spektru neprojevuje, existuje nepřímá dipól-dipólová interakce (tzv. J-vazba), kterou zprostředkují elektrony chemické vazby. Tato interakce se tedy projevuje pouze mezi jádry, která jsou mezi sebou spojena chemickou vazbou. Její dosah je přibližně 3-4 chemické vazby. Neprojevuje se mezi tzv. magneticky ekvivalentními jádry (což jsou např. vodíky v CH₃ skupině). Hamiltonián této interakce závisí na počtu částic, které jsou mezi sebou v interakci. V případě dvou částic, které na sebe působí J-vazbou, má hamiltonián při započtení jejich chemického posunu tvar

$$\hat{H}_{12}^{0+CS+J} = -\gamma_1 B^0 (1 + \delta_1) \hat{I}_{1z} - \gamma_2 B^0 (1 + \delta_2) \hat{I}_{2z} + 2\pi J_{12} \hat{\mathbf{I}}_1 \cdot \hat{\mathbf{I}}_2 \quad (2.6)$$

kde J je konstanta určující sílu interakce. V případě, že se jedná o složitější molekulu a interakce se účastní více jader, má hamiltonián složitější tvar. Hodnota J-vazby nezávisí na magnetickém poli. Podle toho, jestli interakce zahrnuje jádra stejných nebo různých izotopů (tj. jestli se rovnají nebo nerovnají jejich γ), rozlišujeme tzv. homonukleární nebo heteronukleární typ J-vazby. Velikost J konstanty se v homonukleárním případě u vodíku pohybuje mezi 0-16 Hz. J-vazba je zodpovědná mimo jiné za rozštěpení signálů ve spektru na multiplety.

2.6. Silná a slabá J-vazba

Hamiltonián této interakce lze v určitých případech zjednodušit tzv. sekulární aproximací, kdy z hamiltoniánu vezmeme pouze ty části, které komutují se základním spinovým hamiltoniánem, jehož tvar odpovídá vztahu (2.6) bez posledního členu na pravé straně. V případě J-vazby se při sekulární aproximaci ve skalárním součinu vektorů spinových operátorů uvažují pouze jejich z-ové složky. Hamiltonián má pak tvar

$$\hat{H}_{12}^{0+CS+J} = -\gamma_1 B^0 (1 + \delta_1) \hat{I}_{1z} - \gamma_2 B^0 (1 + \delta_2) \hat{I}_{2z} + 2\pi J_{12} I_{1z} I_{2z} \quad (2.7)$$

V heteronukleárním případě tuto aproximaci lze udělat vždy. V homonukleárním případě lze tuto aproximaci udělat, pokud je splněna podmínka

$$\frac{J}{\Delta\nu} \ll 1, \quad (2.8)$$

kde

$$\Delta\nu = \frac{\gamma B^0}{2\pi} |\delta_2 - \delta_1| \quad (2.9)$$

je rozdíl v chemických posunech jednotlivých interagujících komponent (v Hz). V případě, kdy je splněna podmínka (2.8), mluvíme o slabé J-vazbě, v případě, kdy splněna není, mluvíme o silné J-vazbě.

Kapitola 3

NMR Relaxace

3.1. Rovnovážný stav

Relaxace je pojem popisující proces návratu makroskopického systému k rovnovážnému stavu. Rovnovážným stavem systému se rozumí stav, při kterém je systém v čase stabilní, tj. nemění se jeho vnitřní parametry. Pokud na spinový systém nepůsobí jiné než statické magnetické pole, v rovnovážném stavu počet částic v jednotlivých energetických hladinách splňuje Boltzmannovo rozdělení. Z makroskopického hlediska součtem magnetických momentů jednotlivých spinových částic vzniká celkový vektor magnetizace vzorku \mathbf{M} , který v rovnovážném stavu míří podél směru externího pole \mathbf{B}^0 . Složka \mathbf{M} mířící podél \mathbf{B}^0 (z-ová složka) se obvykle nazývá podélnou složkou \mathbf{M} . Složka v rovině na ní kolmé (tedy složka v rovině xy, která je v rovnovážném stavu nulová) bývá nazývána příčná složka \mathbf{M} .

3.2. Nerovnovážný stav, radiofrekvenční puls

Pokud popisujeme relaxační proces, je třeba ustanovit a popsat výchozí nerovnovážný stav, ze kterého systém bude k rovnovážnému stavu směřovat. V NMR se k ustanovení nerovnovážného stavu užívá impuls elektromagnetického pole (tzv. radiofrekvenční, RF puls), který vyvádí studovaný makroskopický systém z rovnovážného stavu a nastoluje výchozí nerovnovážný stav. Z mikroskopického hlediska radiofrekvenční puls mění rozložení v energetických hladinách a vytváří stav, ve kterém kvantová střední hodnota x-ové resp. y-ové složky spinového operátoru, středovaná v jednom časovém okamžiku přes celý spinový systém, je nenulová. Z makroskopického hlediska aplikace radiofrekvenčního pulsu na systém v rovnovážném stavu sklápí vektor magnetizace z osy z směrem do roviny xy, tedy snižuje velikost podélné složky magnetizace a vytváří novou příčnou magnetizaci.

3.3. T_1 a T_2 relaxační čas

V principu se při studiu relaxačních procesů v NMR rozlišujeme dva základní typy procesů. Při tzv. T_1 (resp. podélné) relaxaci spinový systém odevzdává svoji energii okolnímu rezervoáru ve formě tepla a nastoluje se výchozí Boltzmannova distribuce spinových populací. Okolní rezervoár je z historických důvodů nazýván mřížkou. O rezervoáru ve formě krystalické mřížky, do jejíž vibračních módů se energie spinového systému dissipuje, však můžeme hovořit v užším smyslu pouze

v případě pevného vzorku. V případě kapaliny je energie spinového systému dissipována do kinetické energie Brownova pohybu molekul kapaliny. Z makroskopického hlediska T_1 relaxace popisuje proces obnovení podélné složky \mathbf{M} . Při tzv. T_2 (resp. příčné) relaxaci postupně mizí koherence mezi příčnými složkami dílčích vektorů magnetizace ve vzorku, přičemž nedochází k změně vnitřní energie. Z makroskopického hlediska T_2 relaxace popisuje proces postupného vymizení příčné složky \mathbf{M} . T_1 i T_2 relaxační proces má exponenciální charakter a jeho rychlost je popsána dvěma časovými konstantami - T_1 a T_2 relaxačním časem. V případě systému navzájem interagujících spinů je relaxační proces složitější a k jeho popisu je třeba více parametrů, než výše uvedené dva.

3.4. Mechanismus relaxace

Kdybychom mohli sledovat lokální magnetické pole v místě konkrétní částice, zjistili bychom, že se neustále mění. V kapitole 2 bylo zmíněno, že částice s magnetickým momentem na sebe vzájemně působí dipól-dipólovou interakcí. Tato tzv. přímá dipól-dipólová interakce je ve spojení s tepelným pohybem okolních částic v kapalinách zodpovědná za největší změny lokálního magnetického pole v místě studované částice. Druhým možným mechanismem fluktuace lokálního pole je tzv. anizotropie chemického posunu [6] a existují další mechanismy.

3.5. Korelační čas

Pro popis relaxačního procesu je důležité kvantitativně popsat míru fluktuace lokálního magnetického pole $B(t)$. K tomuto účelu je zavedena tzv. autokorelační funkce G předpisem

$$G(\tau) = \langle B(t)B(t + \tau) \rangle, \quad (3.1)$$

kde lomené závorky značí středování přes teoreticky nekonečně dlouhý časový interval. Autokorelační funkce je obecně klesající funkcí τ , její hodnota $G(0)$ bývá zavedena jako

$$G(0) = \langle B^2(t) \rangle, \quad (3.2)$$

což je rozptyl velikosti B .

Autokorelační funkce se často bere v analytickém tvaru

$$G(\tau) = \langle B^2(t) \rangle e^{-\frac{|\tau|}{\tau_c}}, \quad (3.3)$$

kde parametr τ_c , tzv. korelační čas, je parametrem charakterizujícím rychlost fluktuací. Tento parametr lze interpretovat různým způsobem. V případě, kdy studujeme relaxaci molekuly v kapalině, τ_c lze interpretovat jako čas, za který se molekula otočí o 1 radián. Z této interpretace vyplývá, že měření relaxačních časů

umožňuje velmi efektivně studovat rychlost rotace jednotlivých funkčních skupin v molekule, celkovou pohyblivost molekul a tak podrobněji studovat fyzikálně-chemické vlastnosti látek.

Samotný relaxační mechanismus, který zahrnuje interakci magnetických dipólů jednotlivých molekul, anizotropii chemického posunu a J-vazbu lze efektivně popsat s použitím Redfieldovy teorie, jejíž detailní popis lze nalézt v publikaci [10].

Kapitola 4

NMR experiment

4.1. Úvod k pulsním sekvencím

Pulsní sekvence tvoří základní část NMR experimentu. Každá pulsní sekvence se skládá z excitační části, která obsahuje jeden nebo více radiofrekvenčních pulsů, a z detekční části, při které je detekován NMR signál. V NMR experimentu se využívá řada různých typů pulsních sekvencí, které manipulují spinovým systémem a umožňují tak ve výsledném signálu získat informaci, kterou požadujeme.

4.2. FID sekvence

Nejjednodušší pulsní NMR sekvence je sekvence free induction decay (FID). Její schéma je uvedeno na obr. 4.1.

$90^\circ - acq$

Obr. 4.1. Schéma sekvence FID

Na začátku pulsní sekvence je excitační radiofrekvenční (RF) puls, jehož frekvence odpovídá Larmorově frekvenci studovaných izotopů ve vzorku. Účelem tohoto pulsu je sklopit magnetizaci z rovnovážné polohy v ose z a vytvořit příčnou magnetizaci v rovině xy . Parametr pulsu, který určuje, o jak veliký úhel bude magnetizace sklopena, se nazývá sklápěcí úhel θ a je funkcí délky pulsu a též amplitudy radiofrekvenčního pole. Za excitačním pulsem začíná detekční část, kdy je detekován NMR signál.

4.3. Spinové echo

Schéma sekvence spinového echa je uvedeno na obr. 4.2.

$90^\circ - \frac{t}{2} - 180^\circ - \frac{t}{2} - acq$

Obr. 4.2 Schéma sekvence spinového echa.

Excitační puls s $\theta = 90^\circ$, vytvoří magnetizaci v ose xy . Příčná magnetizace však po excitaci velmi rychle zaniká. Tento zánik magnetizace, způsobený vzájemným rozfázováním jednotlivých dílčích vektorů magnetizace, je podmíněn několika mechanismy. Hlavním faktorem, způsobujícím rychlý zánik příčné složky magnetizace po excitaci, je přítomnost statických nehomogenit magnetického

pole \mathbf{B}^0 ve vzorku. Dalšími faktory, které přispívají k rozfázování, je interakce chemického posunu, J-vazba a T_2 relaxace.

Efekt přítomnosti nehomogenit magnetického pole, interakci chemického posunu a heteronukleární J-vazbu lze kompenzovat aplikací druhého, tzv. refokusačního pulsu, jehož $\theta = 180^\circ$. Tento puls způsobí otočení dílčích vektorů magnetizace kolem určité osy v rovině xy a po určité době po aplikaci refokusačního pulsu pozorujeme opětovný nárůst signálu – tzv. spinové echo. Interval mezi maximem spinového echa a středem refokusačního pulsu $t/2$ je stejný jako vzdálenost středů excitačního a refokusačního pulsu.

Amplituda detekovaného signálu při spinovém echu A' je ovlivněna procesy, které nejsou kompenzovatelné aplikací refokusačního pulsu. Obecně můžeme závislost amplitudy spinového echa na t vyjádřit vztahem

$$A'(t) = A'_0 A'_R(t) A'_J(t) A'_D(t), \quad (4.1)$$

kde A'_0 je počáteční amplituda příčné složky magnetizace, člen $A'_R(t)$ vyjadřuje příspěvek T_2 relaxace, $A'_J(t)$ příspěvek homonukleární J-vazby a $A'_D(t)$ příspěvek difúze v nehomogenitách magnetického pole. $A'_R(t)$ lze vyjádřit jako funkci t pomocí vztahu

$$A'_R(t) = e^{-\frac{t}{T_2}}, \quad (4.2)$$

kde parametr T_2 je T_2 relaxační čas. Amplituda signálu je obecně komplexní číslo.

Sekvence založené na fenoménu spinového echa se často užívají pro měření T_2 relaxačních časů. K přesnému stanovení T_2 relaxačních časů by však bylo třeba, aby časová závislost amplitudy spinového echa (viz vztah 4.1) byla podmíněna pouze členem A'_R . Tento cíl lze dosáhnout pouze v některých případech.

4.4. Spinové echo a homonukleární J-vazba, J-modulace

Pokud bychom provedli opakovaný experiment spinového echa u vzorku obsahující atomy interagující mezi sebou homonukleární J-vazbou a sledovali časový vývoj integrálu některého z píků (resp. multiplétů, jestliže se jedná o J-vazbu), zjistili bychom, že velikost integrálu dotyčného multiplétu je modulovaná periodickou funkcí. Tento efekt, nazvaný J-modulace, je způsobený postupným vzájemným posunem fází jednotlivých komponent multiplétu. Efekt není refokusován aplikací 180° pulsu, protože tento puls s otočením spinových operátorů jednotlivých interagujících atomů též provede inverzi spinových populací. Lze ukázat, že pro nejjednodušší případ dvou jaderných spinů, funkce, která moduluje časový vývoj velikosti integrálu příslušného multiplétu při spinovém echu A_J má analytické vyjádření

$$A_J(t) = \left(\frac{2\pi^2 J^2}{p^2} + \frac{\pi J}{p} \right) \cdot \cos\left(\pi J t - \frac{p t}{2} \right) + \left(\frac{2\pi^2 J^2}{p^2} - \frac{\pi J}{p} \right) \cdot \cos\left(\pi J t + \frac{p t}{2} \right) + \frac{(2\pi \Delta \nu)^2}{p^2} \cdot \cos(\pi J t), \quad (4.3)$$

kde

$$p = \sqrt{4\pi^2 J^2 + (2\pi \Delta \nu)^2}. \quad (4.4)$$

Je vidět, že pro slabou J-vazbu, kde

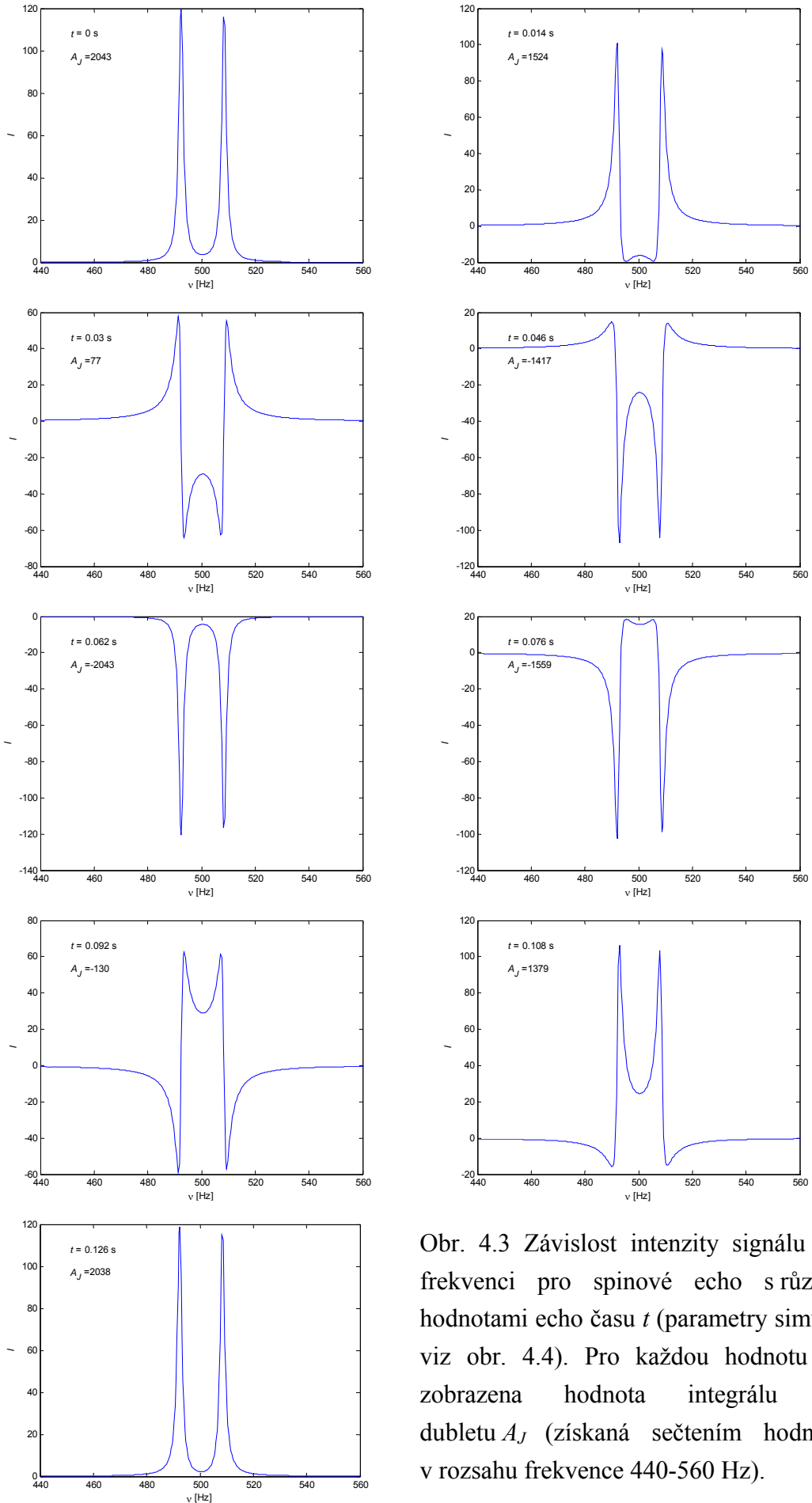
$$\frac{J}{\Delta \nu} \ll 1 \quad (4.5)$$

lze první dva členy vztahu (4.3) zanedbat a vztah se tak v limitě blíží vztahu

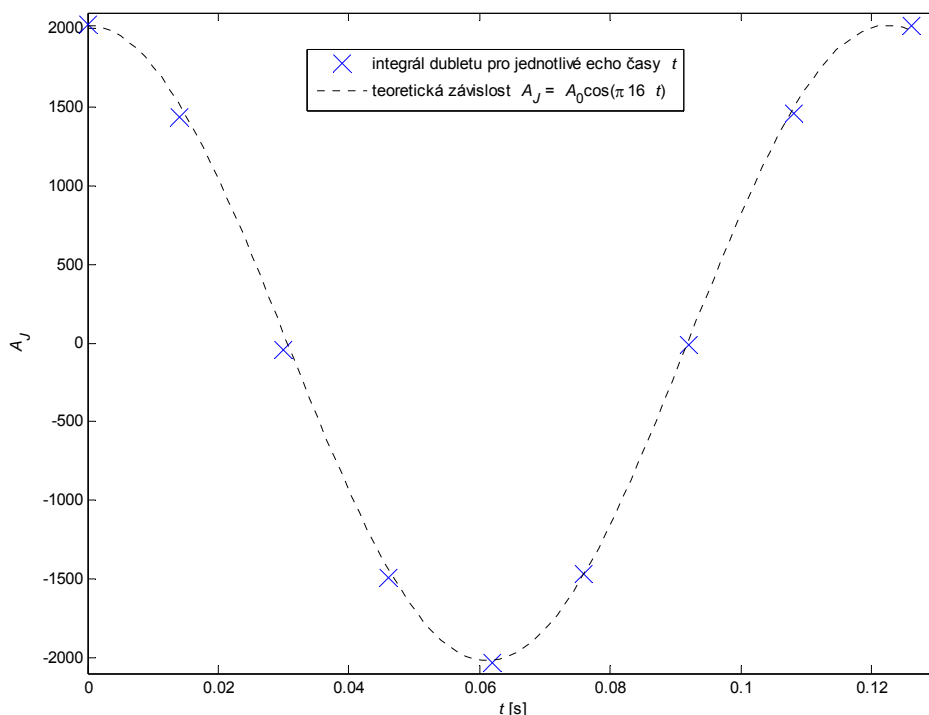
$$A_J(t) = \cos(\pi J t). \quad (4.6)$$

Simulovaná spektra spinového echa s různou hodnotou echo času t pro systém dvou spinů spojených slabou J-vazbou jsou uvedena na obr. 4.3. Na obr. 4.4 je zobrazena závislost integrálu dubletu na t , která odpovídá vztahu (4.6).

Analytický popis vlivu J-vazby na integrál multipletu u spinového echa a dalších složitějších sekvencí lze v případě slabé J-vazby udělat pomocí formalismu produktových operátorů, jejichž podrobný výklad přesahuje rámec této práce, ale je uveden např. v publikaci [11].



Obr. 4.3 Závislost intenzity signálu I na frekvenci pro spinové echo s různými hodnotami echo času t (parametry simulace viz obr. 4.4). Pro každou hodnotu t je zobrazena hodnota integrálu píku dubletu A_J (získaná sečtením hodnot I v rozsahu frekvence 440-560 Hz).



Obr. 4.4 Závislost integrálu dubletu A_J na echo čase t u sekvence spinového echa. A_J byl vyhodnocen sečtením hodnot intenzity jednotlivých spekter na obr. 4.3 v rozsahu 440-560 Hz. Vstupní data byla získána simulací opakovaného experimentu spinového echa na systému dvou spinů vzájemně spojených slabou J-vazbou, $J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 1000$ Hz, bez započtení relaxace. Z křivky proložené daty je vidět, že závislost A_J na t splňuje vztah (4.6).

4.5. CPMG sekvence

Kromě J-modulace a T_2 relaxace je signál při spinovém echu tlumen difúzí molekul v přítomnosti lokálních nehomogenit magnetického pole. Tento efekt v případě spinového echa způsobuje další zkreslení při kvantifikaci T_2 relaxačního času. Efekt difúze však lze eliminovat modifikovanou technikou spinového echa, tzv. Carr – Purcell – Meiboom – Gill (CPMG) sekvencí, jejíž schéma je uvedeno na obr. 4.5.

$$90^\circ - \left[-\frac{\tau}{2} - 180^\circ - \frac{\tau}{2} - \right]_N - acq$$

Obr. 4.5 Schéma sekvence CPMG.

Tato sekvence je nejčastěji užívanou sekvencí pro měření T_2 relaxačního času v NMR; konkrétní experiment je pak realizován opakovaným měřením vzorku

sekvencí CPMG při konstantní hodnotě τ , ale proměnném počtu opakování základního echa. Výsledný echo čas je pak pro každý experiment dán hodnotou $N \cdot \tau$.

Hodnota τ je v CPMG experimentu důležitým parametrem, který ovlivňuje míru vlivu difúze na amplitudu detekovaného signálu; zkracování hodnoty τ snižuje citlivost na difúzi spinů v nehomogenitách magnetického pole. Experimenty dále ukázaly, že τ ovlivňuje i charakter J-modulací. Pokud perioda pulsování splní podmínku

$$\tau \ll \frac{1}{\Delta\nu} \quad (4.7)$$

člen A'_J v závislosti (4.1) vymizí [3]. K vysvětlení, proč tomu tak je, lze zjednodušeně říci, že při velmi krátké periodě pulsování se partneři, kteří se účastní J-vazby, chovají jako magneticky ekvivalentní jádra, mezi nimiž J-vazba není přítomna. Pokud bychom tedy zajistili dostatečně krátkou periodu τ , aby byla podmínka (4.7) splněna, eliminovali bychom vliv difúzí i J-vazby a výsledná amplituda echa by pak byla pouze funkcí T_2 , což by zajistilo ideální podmínky pro stanovení T_2 relaxačních časů.

Periodu pulsování však nelze neomezeně zkracovat. Jednak je zde omezení hardwaru NMR spektrometru, kdy při vysoké frekvenci pulsování dochází k přehřívání RF zesilovače, a dále vysoká RF energie deponovaná do vzorku způsobuje jeho ohřev. Ohřátí vzorku pak ovlivňuje samotný relaxační proces díky změně rychlosti pohybu molekul; extrémní ohřátí vzorku by pak mohlo mít i za důsledek chemickou přeměnu sloučenin vzorku (např. denaturaci bílkovin) a tím i znehodnocení vzorku. Limitace ve zkracování τ , aby byl splněn vztah (4.7), je v praxi dosažena pro jádra, mající mezi sebou vysokou hodnotu rozdílu v chemických posunech $\Delta\nu$. Tento problém je závažnější na spektrometrech pracujících při vyšších magnetických polích, protože $\Delta\nu$ roste při zvyšování magnetické indukce spektrometru.

Kapitola 5

Kvantový popis NMR

5.1. Matice (operátor) hustoty

Běžný popis stavu v kvantové mechanice je zpravidla realizován s použitím vlnové funkce $|\psi\rangle$. Za účelem kvantitativního popisu stavu velkého množství částic, nacházejících se ve stavech charakterizovaných různými vlnovými funkcemi (což je případ tzv. smíšeného stavu), lze s výhodou využít formalismu operátoru hustoty [9]. Obecný tvar pro zavedení operátoru hustoty $\hat{\rho}$ je

$$\hat{\rho} = \sum_i p_i |\psi_i\rangle\langle\psi_i|, \quad (5.1)$$

kde p_i je četnost (pravděpodobnost) výskytu částice ve stavu $|\psi_i\rangle$. Operátor hustoty je pro účely NMR většinou vyjádřen v bázi vlastních vektorů operátoru \hat{I}_z , má tedy maticový tvar. Označíme-li jednotlivé vlastní stavy operátoru \hat{I}_z jako $|\alpha\rangle, |\beta\rangle$, pak pro neinteragující částici s $I = 1/2$ lze $\hat{\rho}$ (a též jakýkoliv jiný operátor) vyjádřit maticí

$$\rho = \begin{pmatrix} \langle\alpha|\hat{\rho}|\alpha\rangle & \langle\alpha|\hat{\rho}|\beta\rangle \\ \langle\beta|\hat{\rho}|\alpha\rangle & \langle\beta|\hat{\rho}|\beta\rangle \end{pmatrix}. \quad (5.2)$$

Máme-li smíšený stav, tj. soubor vlnových funkcí čistých stavů spolu s jejich pravděpodobnostmi

$$\{|\psi_i\rangle; p_i\} \quad (5.3)$$

a vyjádříme-li každý čistý stav $|\psi_i\rangle$ v bázi $|\alpha\rangle, |\beta\rangle$, provedeme-li tedy rozvoj

$$|\psi_i\rangle = c_{\alpha,i}|\alpha\rangle + c_{\beta,i}|\beta\rangle, \quad (5.4)$$

má s využitím (5.2) jeho příslušná matice hustoty tvar

$$\rho = \begin{pmatrix} \sum_i p_i c_{\alpha,i} c_{\alpha,i}^* & \sum_i p_i c_{\alpha,i} c_{\beta,i}^* \\ \sum_i p_i c_{\beta,i} c_{\alpha,i}^* & \sum_i p_i c_{\beta,i} c_{\beta,i}^* \end{pmatrix}. \quad (5.5)$$

Pro popis měření v kvantové mechanice je důležité vyjádření střední hodnoty operátoru $\langle\hat{A}\rangle$, které má ve formalismu matice hustoty tvar

$$\langle\hat{A}\rangle = \text{Tr}(\rho A), \quad (5.6)$$

kde jsme využili maticové vyjádření operátorů ρ, A . Výraz ρA je tedy matice a Tr značí její stopu.

5.2. Liouville-von Neumannova rovnice

V kvantové mechanice, která využívá k popisu stavu částice vlnovou funkcií, je ústřední rovnicí, určující stav částice a vývoj jejího stavu v čase, Schroedingerova rovnice. Ve formalismu matice hustoty plní tuto úlohu Liouville-von Neumannova rovnice, která má tvar

$$\frac{\partial}{\partial t} \hat{\rho} = -i [\hat{H}, \hat{\rho}], \quad (5.7)$$

kde \hat{H} je hamiltonián (operátor celkové energie částice). Symbol $[\ ,]$ značí komutátor, který má v případě maticové formulace operátorů tvar

$$[H, \rho] = H\rho - \rho H. \quad (5.8)$$

Pokud je hamiltonián nezávislý na čase, lze řešení rovnice (5.7) psát pomocí exponenciály operátorů ve tvaru

$$\hat{\rho}(t) = e^{-i\hat{H}t} \hat{\rho}(0) e^{i\hat{H}t}. \quad (5.9)$$

Pokud je hamiltonián závislý na čase tak, že je vždy konstantní po určitý časový interval a poté se změní, ale je znovu po určitý časový interval konstantní, je třeba řešení Liouville-von Neumannovy rovnice napsat v obecnějším tvaru. Nechť např. po časový interval t_1 lze interakce v systému popsat hamiltoniánem \hat{H}_1 , poté po časový interval t_2 působí interakce charakterizované hamiltoniánem \hat{H}_2 , můžeme matici hustoty v čase $t_1 + t_2$ vypočítat vztahem

$$\hat{\rho}(t_1 + t_2) = e^{-i\hat{H}_2 t_2} e^{-i\hat{H}_1 t_1} \hat{\rho}(0) e^{i\hat{H}_1 t_1} e^{i\hat{H}_2 t_2} \quad (5.10)$$

Postupným obkládáním členu na pravé straně rovnice dalšími exponenciálními členy lze získat tvar matice hustoty pro libovolný čas po libovolném počtu časových intervalů s konstantním hamiltoniánem.

5.3. Kvantová simulace NMR experimentu

Kvantovou simulaci NMR experimentu lze charakterizovat těmito kroky: Nejprve definujeme matici hustoty pro spinový systém, který budeme „měřit“, tj. jehož časový vývoj budeme sledovat. Poté definujeme hamiltonián systému v případě přítomnosti vnějšího statického magnetického pole (tzv. hamiltonián volné precese). Do tohoto hamiltoniánu zahrneme všechny interakce uvnitř systému a též interakci s vnějším magnetickým polem. Dále definujeme hamiltonián, který charakterizuje interakci systému s radiofrekvenčním polem během pulsu. Nakonec definujeme operátor, který představuje detekci. Poté „sendvičovým způsobem“ obložíme matici hustoty jednotlivými exponenciálními členy, ve kterých vystupují časy definující délku působení jednotlivých hamiltoniánů. Nakonec provedeme „měření“, tj. určíme střední hodnotu příslušného operátoru detekce v systému

určeném výslednou maticí hustoty podle vztahu (5.6). Tato operace nám dá jednu hodnotu, která odpovídá velikosti vektoru magnetizace ve směru daném detekčním operátorem, odpovídá tedy jednomu bodu NMR signálu. Pro určení hodnoty dalšího bodu je třeba matici hustoty obložit exponenciálou operátoru volné precese, jehož časový interval odpovídá vzorkovacímu času. Poté můžeme provést měření dalšího bodu a tak postupně navzorkovat signál podobně jako v NMR experimentu. Tato metoda se využívá pro simulace výsledků NMR experimentu pro libovolný spinový systém.

Výše popsáný postup však nezahrnuje podstatný efekt ovlivňující NMR signál v experimentu – časově proměnné interakce způsobující relaxaci spinového systému. Zahrnutí těchto efektů do výpočtu časového vývoje matice hustoty vyžaduje složitější přístup založený na časové poruchové teorii. Relaxační teorie a její aplikace pro NMR výpočty s využitím formalismu matice hustoty byla podrobně rozpracována Redfieldem. Podrobný výklad Redfieldovy relaxační teorie lze nalézt např. v publikaci [10].

Kapitola 6

Metody

6.1. Simulace

V této práci bylo využito numerické simulace vývoje spinového systému ke stanovení amplitudy echa při měření sekvencí CPMG a sekvencí jednoduchého spinového echa.

Při simulacích sekvence CPMG byly sledovány J-modulace jako závislost integrálu píku na echo čase $A_J(t); t = N \cdot \tau$, kde τ je perioda opakování refokusačního pulsu a N je počet period jeho opakování. Postupně byly měněny další parametry CPMG sekvence i spinového systému a sledován vliv změny parametrů na charakter J-modulací. Byly měněny hodnoty J , $\Delta\nu$, aby byly prostudovány J-modulace při silné i při slabé J-vazbě a též bylo sledováno, jestli se charakter J-modulací změní při změně J , $\Delta\nu$, pokud je poměr $J/\Delta\nu$ zachován konstantní. Poté byla sledována závislost na sklápěcím úhlu refokusačního pulsu θ v CPMG experimentu. Pro studium J-modulací nebyla v tomto prvním kroku zahrnuta relaxace.

Obdobně byla v případě spinového echa sledována závislost A_J na echo čase t . Simulace J-modulací byly provedeny jak pro případ slabé, tak silné J-vazby. Parametry J konstanty a chemického posunu interagujících jader byly nastaveny tak, aby bylo možné výsledky simulací porovnat s experimentem.

Jako model spinového systému byla zvolena dvojice částic s $I = \frac{1}{2}$ mající mezi sebou J-vazbu. K simulacím bylo využito formalismu matice hustoty a numerického řešení Liouville-von Neumannovy rovnice. Hodnota integrálu píku detekovaného signálu A_J pro příslušné parametry sekvence byla vždy vypočtena jako

$$A_J(t) = \langle \hat{I}_+ \rangle = \text{Tr}(\rho \hat{I}_+), \quad (6.1)$$

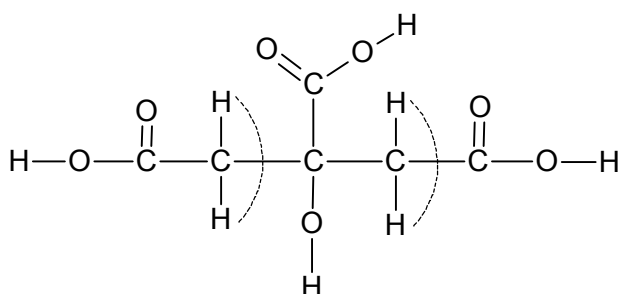
kde \hat{I}_+ je tzv. zvyšující operátor, který reprezentuje operátor detekce NMR signálu.

Simulace pro účely studia J-modulací byly provedeny bez zahrnutí relaxace. K simulaci relaxačního procesu způsobeného vzájemnou dipól-dipólovou interakcí dvou spinových částic bylo využito Redfieldovy teorie a modelu rigid body, tj. modelu otáčející se kuličky. Detailní vyložení principu této teorie přesahuje rámec této práce; podklady pro numerickou simulaci byly poskytnuty vedoucím práce.

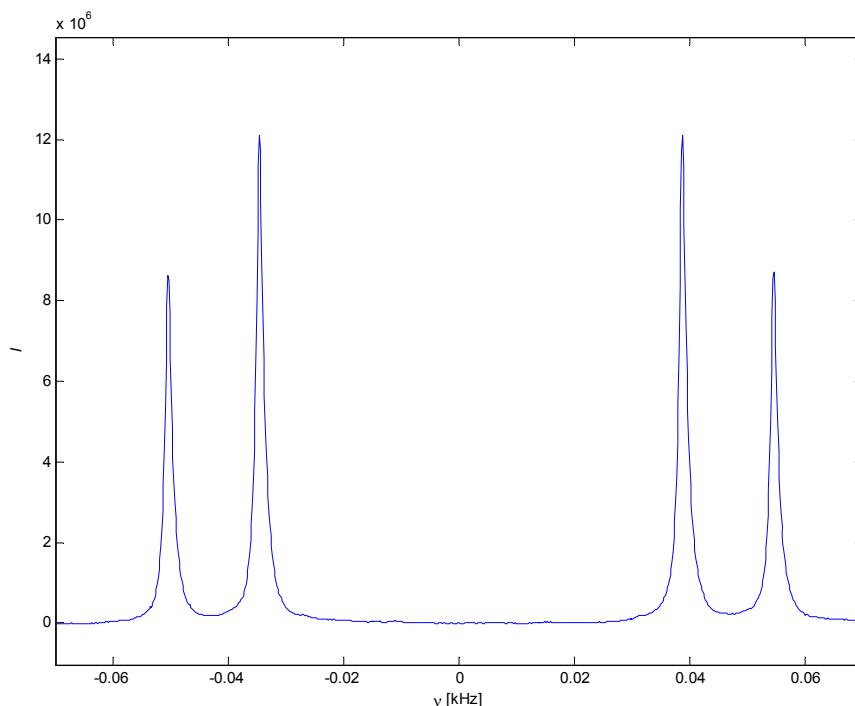
Ve všech simulacích MR sekvencí byl předpokládán ideální, nekonečně krátký refokusační puls. Zcela byl zanedbán vliv difúzních procesů. Výpočty J-modulací a relaxace byly provedeny v prostředí MATLAB.

6.2. Experiment

Cílem experimentu bylo pozorovat charakter J-modulací v relaxačních křivkách získaných měření sekvencí CPMG a sekvencí jednoduchého spinového echa. V případě CPMG bylo provedeno několik experimentů při různých parametrech sekvence: byla jednak měněna hodnota sklápěcího úhlu refokusačního pulsu θ , jednak perioda opakování refokusačního pulsu τ . Jako testovací vzorek byl použit roztok citrátu, což je molekula s J-vazbou ($J = 16$ Hz) mezi vodíky ve dvou magneticky ekvivalentních CH_2 skupinách. Strukturální vzorec citrátu spolu s vyznačením polohy příslušné dvojice vodíků je zobrazen na obr. 6.1., jeho spektrum získané pomocí sekvence FID je zobrazeno na obr. 6.2.



Obr. 6.1 Strukturální vzorec citrátu. Přerušované čáry vyznačují vodíky, mezi nimiž je přítomna J-vazba.



Obr. 6.2. Spektrum citrátu měřené sekvencí FID. Zobrazené píky odpovídají signálu CH_2 skupiny (citrát obsahuje dvě magneticky ekvivalentní CH_2 skupiny). Rozštěpení signálů na dublety je způsobeno J-vazbou.

FID sekvence je vhodná k analýze spektra (stanovení J konstant a chemického posunu jednotlivých spektrálních komponent), protože v tomto typu sekvence nejsou J-modulace přítomny.

Experiment byl proveden na NMR spektrometru Bruker Avance, pracujícím na frekvenci 500 MHz, s využitím TBO sondy. Byly měřeny jak experimenty spinového echa, tak experimenty CPMG. Data byla zpracována numerickou integrací pomocí softwaru Topspin.

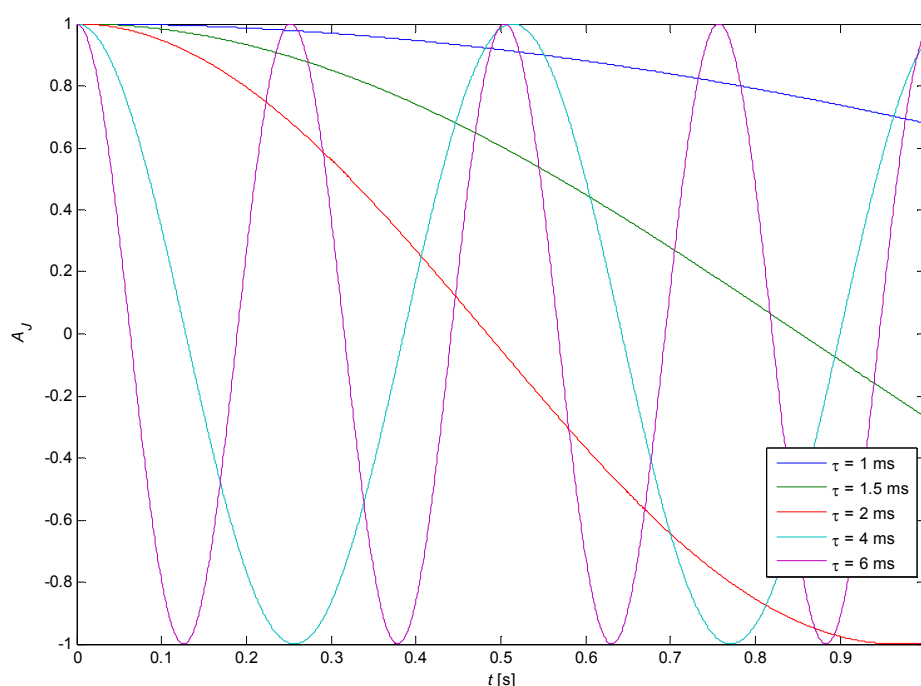
Kapitola 7

Výsledky

7.1. Výsledky simulací J-modulace, bez relaxace

7.1.1. CPMG sekvence, $\theta = 180^\circ$

V první fázi byly sledovány J-modulace pro CPMG s refokusačním pulsem na hodnotě $\theta = 180^\circ$, s konstantní hodnotou $J = 16$ Hz. Charakter J-modulací pro několik hodnot τ je uveden na obr. 7.1.



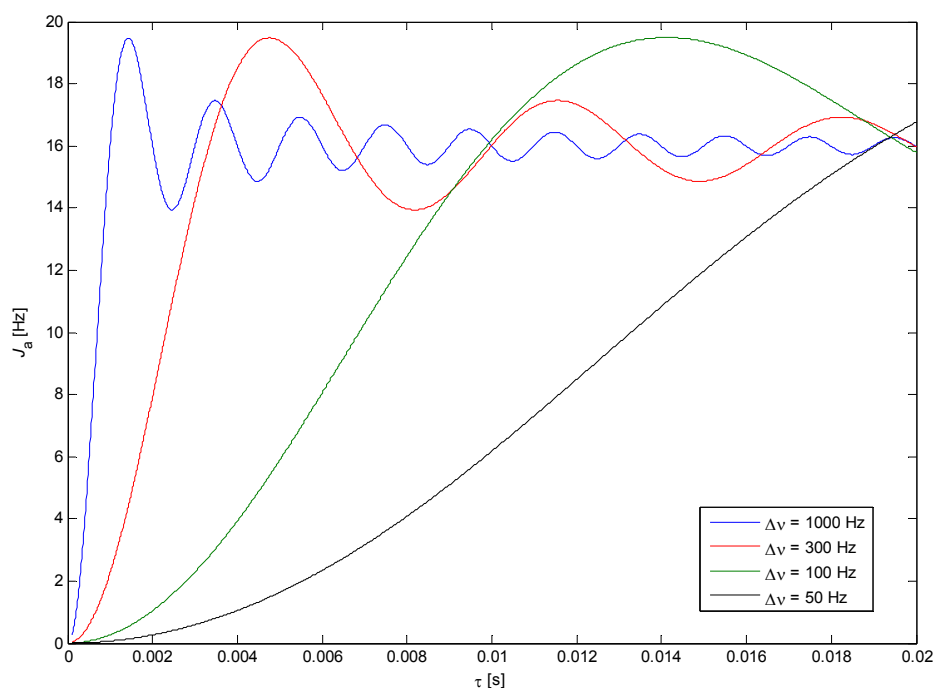
Obr. 7.1 Závislost integrálu dubletu A_J na echo čase t v CPMG sekvenci (J-modulace). Simulováno pro $J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 1000$ Hz, sklápěcí úhel refokusačního pulsu $\theta = 180^\circ$, pro různé hodnoty periody opakování refokusačního pulsu τ , bez zahrnutí relaxace.

Výsledky ukazují, že J-modulace jsou vždy přítomny a závislost integrálu na echo čase t má tvar

$$A_J(t) = \cos(\pi J_a t) . \quad (7.1)$$

Tato kosinová závislost byla v dalším kroku naitována parametrem J_a , aby byla získána hodnota aparentní frekvence modulací J_a pro různé hodnoty τ . Výsledná

závislost frekvence modulací pro různé hodnoty τ a několik hodnot $\Delta\nu$ je zobrazena na obr. 7.2.



Obr. 7.2 Závislost aparentní frekvence modulací J_a na periodě opakování refokusačního pulsu τ a různé hodnoty rozdílu v chemických posunech interagujících partnerů $\Delta\nu$ pro sekvenci CPMG se sklápěcím úhlem $\theta = 180^\circ$.

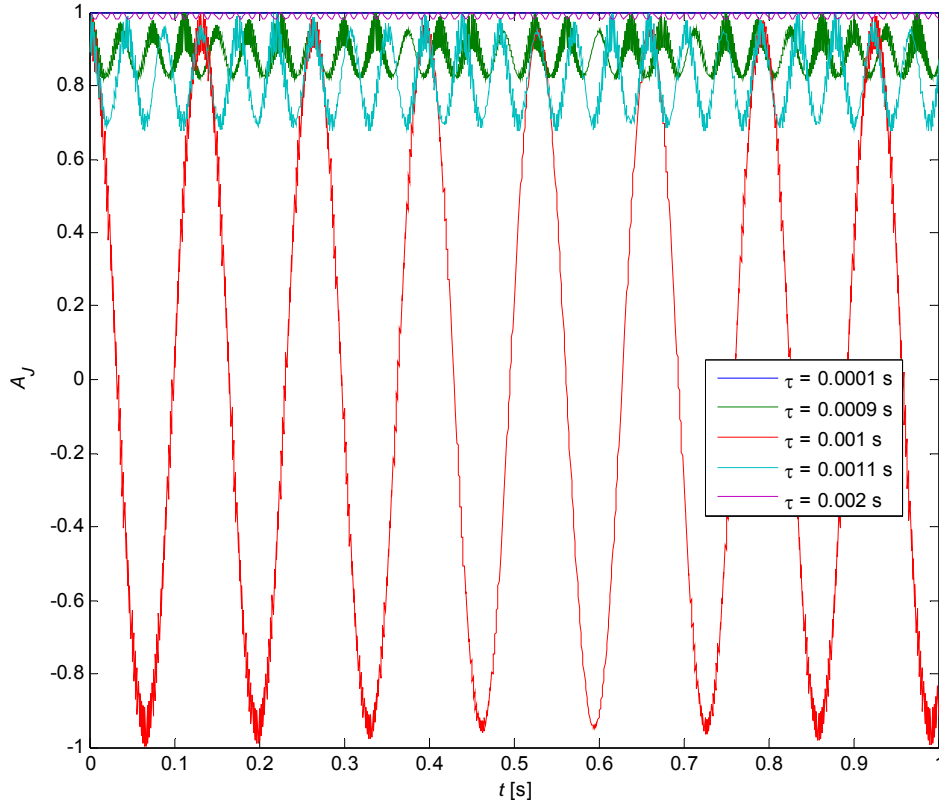
Z grafu je vidět, že pro hodně krátké τ (limitně nulové) je frekvence J-modulací nulová (perioda kosinu nekonečná, tj. blíží se ke konstantní funkci). Při zvyšování τ se frekvence J-modulací prodlužuje, až dospěje k hodnotě, která odpovídá frekvenci J-modulací pro spinové echo, vyjádřené vztahem (7.2). Kolem této hodnoty pak frekvence oscilací při dalším prodlužování τ periodicky osciluje a limitně se k ní blíží.

7.1.2. CPMG sekvence, $\theta \neq 180^\circ$

Provedené simulace CPMG experimentu s $\theta \neq 180^\circ$ prokazují, že J-modulace mají v tomto případě zcela jiný charakter, než pro případ $\theta = 180^\circ$. Charakter J-modulací pro určité vybrané hodnoty τ je zobrazen na obr. 7.3. Do určité hodnoty τ J-modulace nejsou přítomny nebo se projevují pouze nevýznamnou fluktuací kolem hodnoty 1 (A_J hodnotu 1 ale nikdy nepřesáhne). Poté se náhle J-modulace objevují, pro určité τ mají tvar velmi podobný vztahu

$$A_J(t) = \cos(\pi J t), \quad (7.2)$$

a poté znovu mizí. Při dalším prodlužování τ dochází periodicky k plnému výskytu J-modulací (tento efekt bude dále v textu označen jako rekapling) a k jejich vymizení, buď částečnému, nebo úplnému (tzv. dekapling).



Obr. 7.3 Závislost integrálu dubletu A_J na echo čase t v CPMG sekvenci (J-modulace). Simulováno pro $J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 1000$ Hz, sklápěcí úhel refokusačního pulsu $\theta = 153^\circ$, pro vybrané hodnoty periody opakování refokusačního pulsu τ , bez zahrnutí relaxace. Pro hodnoty τ do cca 0,9 ms J-modulace nejsou přítomny (rovná čára případně pouze malá fluktuace v okolí hodnoty 1 v grafu), poté se náhle objevují, plně jsou přítomny pro $\tau = 1$ ms, kdy mají tvar velmi podobný vztahu (7.2), poté znovu postupně mizí. Téměř nejsou přítomny pro $\tau = 2$ ms, poté se znovu postupně začínají objevovat.

Pro další studium J-modulací a jejich popisu v relevanci k T_2 relaxometrii je třeba kvantitativně popsat kvalitu dekaplingu, resp. rekaplingu. Za tímto účelem byl zaveden parametr kvality Q předpisem

$$Q = \max\{1 - A_J\}, \quad (7.3)$$

kde hodnota A_J je vyhodnocována pro dostatečně dlouhý interval echo času t , aby byla navzorkována alespoň jedna perioda J-modulace.

Ze způsobu zavedení Q vyplývá, že nabývá hodnot v intervalu $[0,2]$; hodnota 0 odpovídá maximálnímu dekaplingu, kdy A_J nabývá konstantní hodnoty 1 a

nejdou tedy žádné J-modulace přítomné, hodnota 2 znamená maximální rekapling, kdy A_J osciluje v intervalu $[-1,1]$.

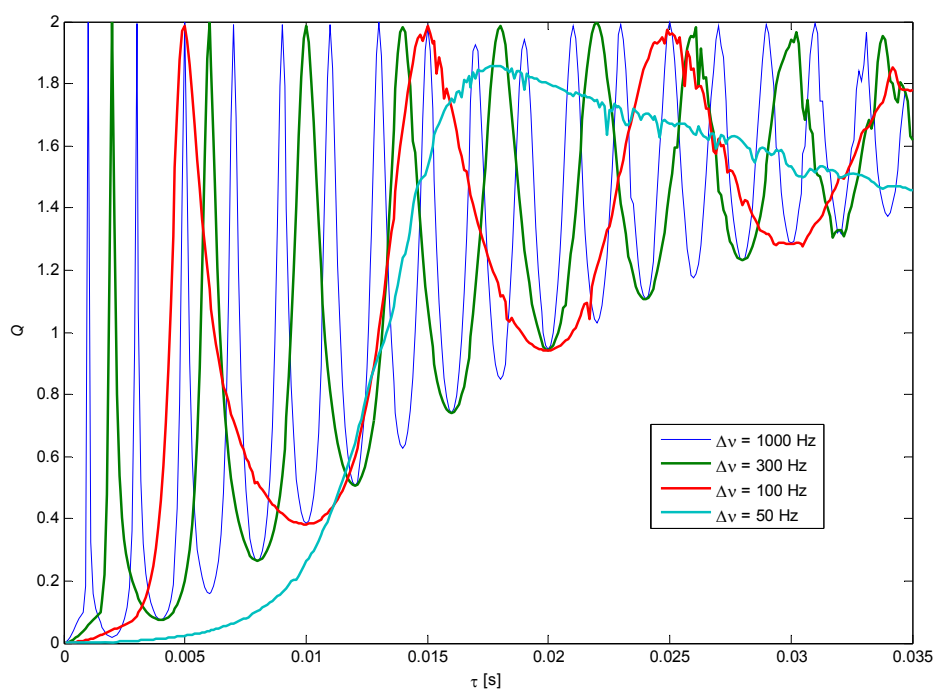
Na obr. 7.4 je znázorněna závislost kvality dekaplingu Q na periodě opakování refokusačního pulsu τ a rozdílu v chemických posunech $\Delta\nu$ pro konstantní hodnotu $J = 16$ Hz. Na obrázku je vidět určitá periodicitu Q , kde perioda výskytu dekaplingu, resp. rekaplingu závisí na hodnotě $\Delta\nu$. Zároveň při zvyšování τ pozorujeme postupné zhoršování kvality dekaplingu. Z výsledků simulací ilustrovaných na obr. 7.4 a z analýzy polohy lokálních minim a maxim Q vyplývá, že pro hodnoty τ splňující rekapling (lokální maxima Q) můžeme psát podmínku

$$\tau_{rec} = \frac{2k-1}{\Delta\nu}, k = 1,2,3,\dots \quad (7.4)$$

Pro hodnoty τ splňující dekapling (lokální minima Q) platí vztah

$$\tau_{dec} = \frac{2k}{\Delta\nu}, k = 1,2,3,\dots \quad (7.5)$$

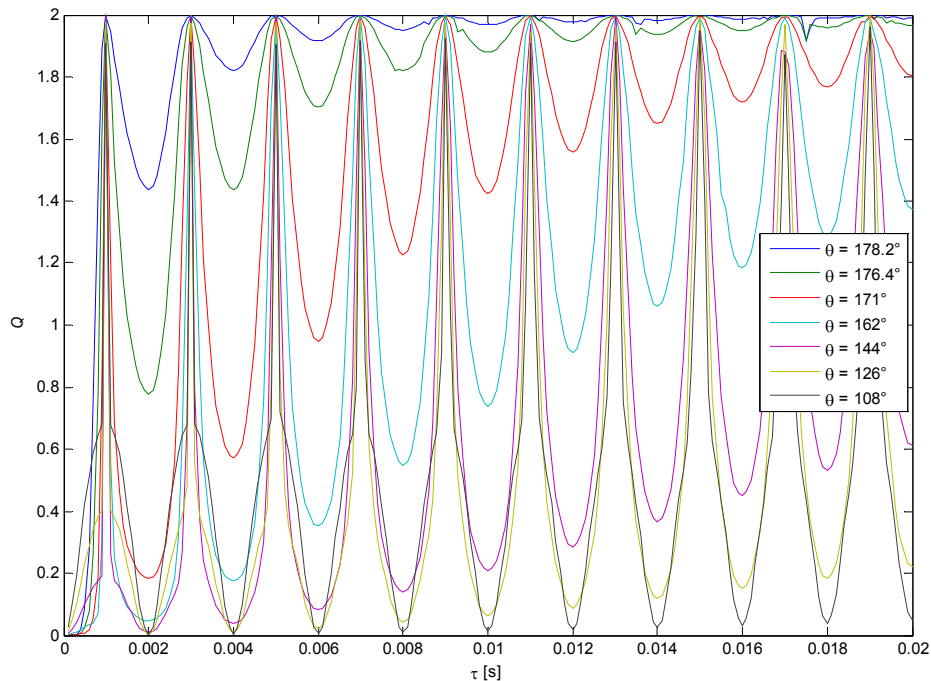
Můžeme též pozorovat, že s rostoucí silou J-vazby hodnota τ , kdy poprvé dochází k rekaplingu, postupně roste, ale zároveň se zhoršuje kvalita dekaplingu v oblastech τ_{dec} .



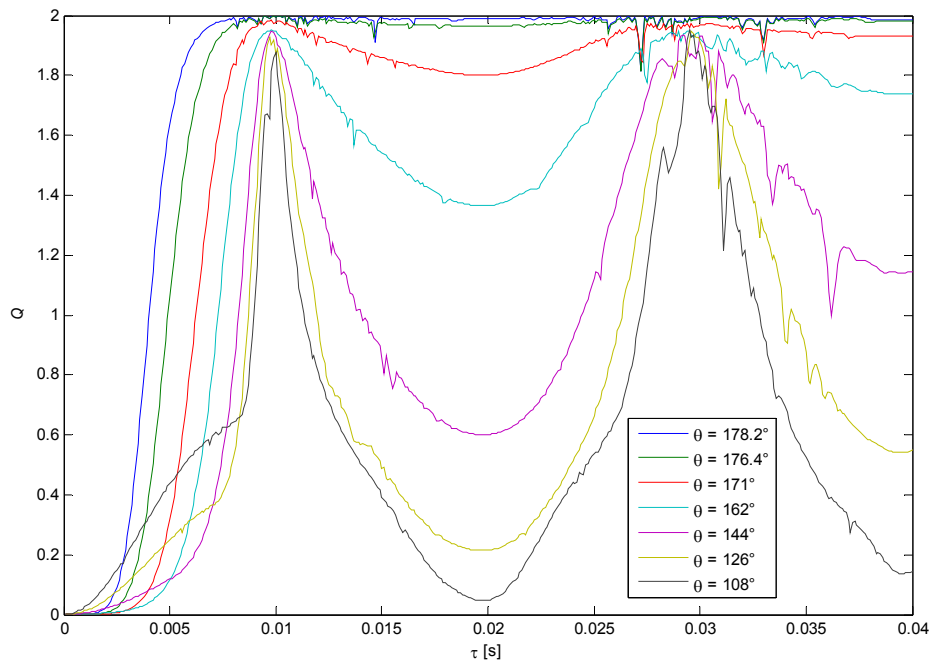
Obr. 7.4 Závislost kvality dekaplingu Q na periodě opakování refokusačního pulsu τ v CPMG sekvenci a rozdílu v chemických posunech $\Delta\nu$. Simulováno pro konstantní hodnotu $J = 16$ Hz, $\theta = 153^\circ$.

V další fázi byla studována kvalita dekaplingu v závislosti na τ a na sklápěcím úhlu refokusačního pulsu θ při konstantním $J = 16$ Hz a $\Delta\nu = 1000$ Hz

(jedná se tedy o slabou J-vazbu). Výsledná závislost je zobrazena v obr. 7.5. Je vidět, že hodnoty τ pro lokální maxima a minima Q zůstávají při změně θ nezměněny. Zároveň můžeme pozorovat zlepšení kvality dekaplingu v oblastech lokálních minim Q při snižování θ . Sledujeme-li kvalitu dekaplingu při zvyšování τ v lokálních minimech Q , pozorujeme, že ke zhoršování kvality dekaplingu postupně dochází pro všechny zobrazené hodnoty θ . Identická závislost pro silnou J-vazbu ($J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 100$ Hz) je uvedena na obr. 7.6. Hodnoty lokálních minim a maxim Q splňují podmínky (7.4), (7.5) a závislost kvality dekaplingu na τ a θ má podobný charakter jako pro slabou J-vazbu. Do simulovaného rozsahu τ se vešly pouze dvě lokální maxima; další zvyšování τ při simulacích by znamenalo, že J-modulace, jejíž perioda je $2/J = 2/16 = 125$ ms, by nebyla navzorkována v dostatečném počtu bodů, a nebylo by možné spolehlivě vyhodnotit kvalitu dekaplingu. Maximální zvolená hodnota τ pro simulaci (40 ms) odpovídá přibližně čtyřem bodům na periodu J-modulace.



Obr. 7.5 Závislost kvality dekaplingu Q na periodě opakování refokusačního pulsu τ v CPMG a jeho sklápěcím úhlu θ . Simulováno pro konstantní $J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 1000$ Hz.



Obr. 7.6 Závislost kvality dekaplingu Q na periodě opakování refokusačního pulsu τ v CPMG a jeho sklápěcím úhlu θ . Simulováno pro konstantní $J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 100$ Hz.

Bylo zjištěno, že pro charakter modulací v závislosti na θ je rozhodující parametr $|\theta - 180|$, tedy odchylka θ od hodnoty θ u „ideálního“ refokusačního pulsu s $\theta = 180^\circ$. Identické výsledky jako na obr. 7.5, 7.6 bychom tedy pozorovali i pro CPMG se zvýšenými hodnotami θ . Zvyšování θ v CPMG však nemá praktický význam, neboť naopak zvyšuje radiofrekvenční zatížení objektu a hardwaru NMR spektrometru. Proto byla většina simulací a všechny experimenty prováděny s $\theta < 180^\circ$.

Studium kvality dekaplingu prokázalo, že charakter modulací a dekaplingu se při změně J , $\Delta\nu$ nemění, je-li zachována hodnota poměru $J/\Delta\nu$.

7.2. Výsledky simulací J-modulace při zahrnutí relaxace

Tyto simulace měly na rozdíl od předchozích simulací při výpočtu časového vývoje matice hustoty zahrnutý i člen zodpovědný za relaxaci vlivem dipól-dipólové interakce. Při tomto typu simulací byl sledován charakter J-modulací v závislosti na τ . Bylo provedeno porovnání charakteru J-modulací s J-modulacemi bez zahrnutí relaxace. Dále jsme pro hodnoty τ splňující podmínku dekaplingu fitovali relaxační křivku a porovnávali výsledné fitované parametry s referenční hodnotou T_2 , která byla stanovena fitováním J-modulace při spinovém echu rovnicí

$$A = A_0 \cos(\pi J_a t) \cdot e^{-\frac{t}{T_2}}. \quad (7.6)$$

Modelováním J-modulací spolu s relaxačním procesem a porovnáním s výsledky předchozích simulací bylo zjištěno, že charakter J-modulací se se zahrnutím relaxace nemění; pravidla pro dekapling a rekapling zůstávají nezměněna. Zůstává též rozdílné chování dekaplingu pro slabou a silnou J-vazbu; v případě silné J-vazby je kvalita dekaplingu v periodách τ_{dec} systematicky horší, než v případě slabé J-vazby.

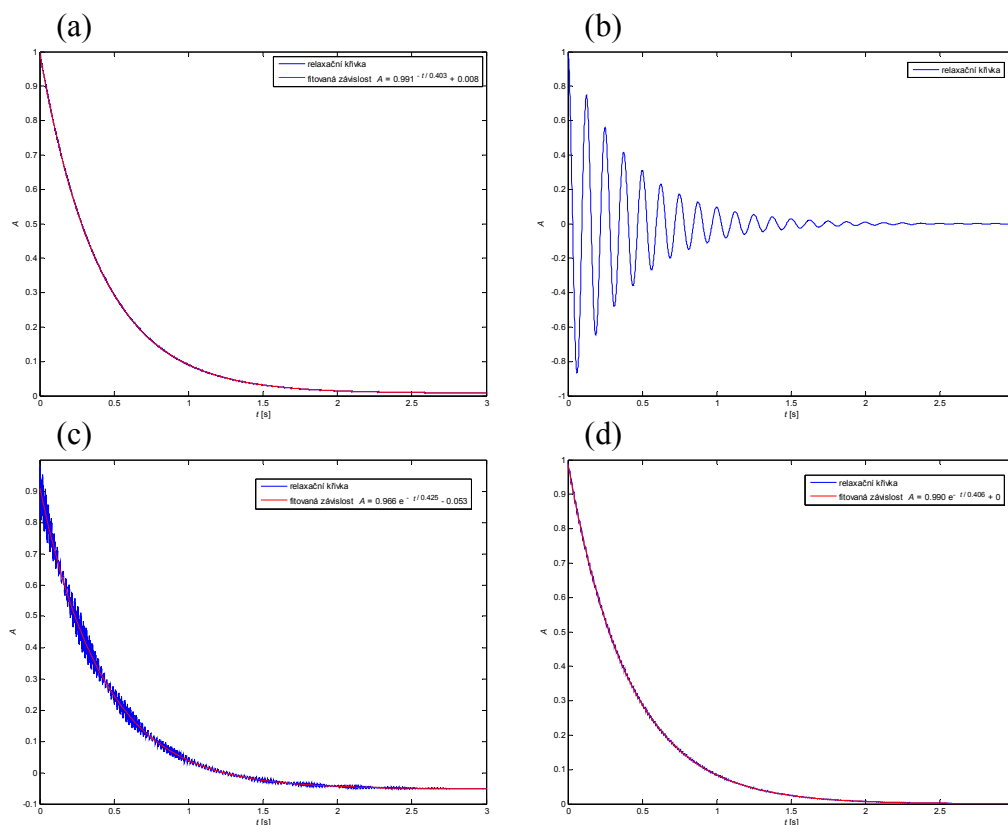
V oblastech kvalitního dekaplingu je závislost integrálu na echo čase t ideální exponenciální křivkou. Fitováním relaxační křivky v oblastech τ_{dec} závislostí

$$A = A_0 \cdot e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (7.7)$$

nebyla zjištěna významná odlišnost od referenční hodnoty T_2 . Pro τ splňující podmínky τ_{rec} má relaxační křivka průběh odpovídající závislosti integrálu na t při spinovém echu danou analyticky vzorcem 7.6.

Pro hodnoty $\theta \neq 180^\circ$, pro τ v oblastech mezi τ_{dec} a τ_{rec} a pro τ blížíící se zleva k hodnotě $\tau_{\text{rec}, k=1}$ má relaxační křivka složitý průběh. K charakterizaci průběhu křivky se dá zjednodušeně říci, že pro τ blížíící se τ_{dec} má křivka tvar podobný exponenciále, pro τ blížíící se τ_{rec} se podobá křivce popsané vztahem (7.6). V mezioblastech má relaxační křivka charakter přechodu mezi oběma výše popsanými typy závislostí.

V relaxačních křivkách pozorujeme ještě jeden důležitý efekt: pro hodnoty τ v oblastech mezi τ_{dec} a τ_{rec} a pro τ blížíící se zleva k hodnotě $\tau_{\text{rec}, k=1}$ se v limitě $t \rightarrow \infty$ relaxační křivka neblíží nule, ale určité konstantní hodnotě (označme ji B). Simulace ukázaly, že B má nejvyšší absolutní hodnotu pro τ hodnotami přesně uprostřed mezi τ_{rec} a τ_{dec} , přičemž znaménko hodnoty lokálního extrému B se periodicky střídá (v jedné oblasti mezi τ_{rec} a τ_{dec} je B kladné, v další oblasti záporné). Absolutní hodnota B roste při snižování θ . Modelový průběh relaxační křivky pro několik reprezentativních hodnot τ je ilustrativně zobrazen na obr. 7.7.



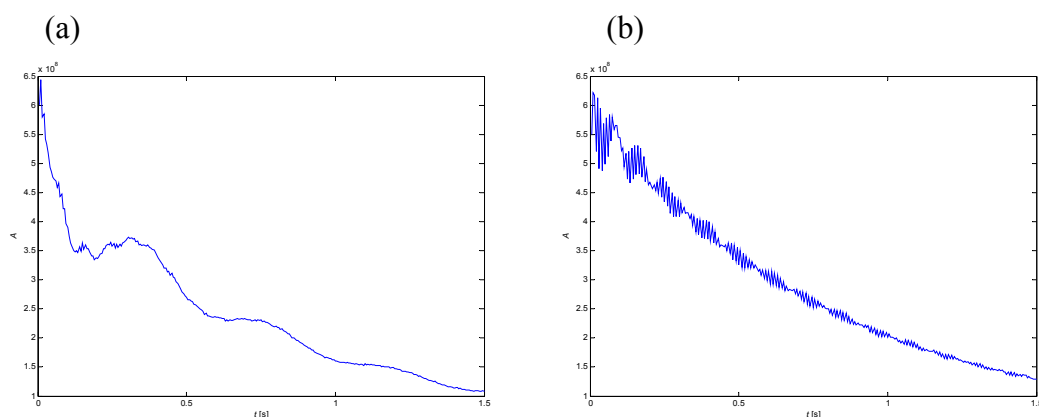
Obr. 7.7 Simulované relaxační křivky CPMG experimentu s parametry $\theta = 153^\circ$, $\Delta\nu = 1000$ Hz, $J = 16$ Hz, pro různé hodnoty τ . (a) $\tau = 0,05$ ms, situace odpovídá podmínce (4.5), J-modulace jsou potlačeny, je vidět nevýznamná hodnota členu B . (b) $\tau = 1$ ms splňuje podmínku τ_{rec} , J-modulace mají tvar (7.6). (c) $\tau = 1,5$ ms odpovídá hodnotě τ uprostřed mezi τ_{rec} a τ_{dec} , J-modulace mají složitý tvar s nenulovou hodnotou B . (d) $\tau = 2$ ms odpovídá τ_{dec} , J-modulace nejsou přítomny, B má nulovou hodnotu.

7.3. Výsledky měření

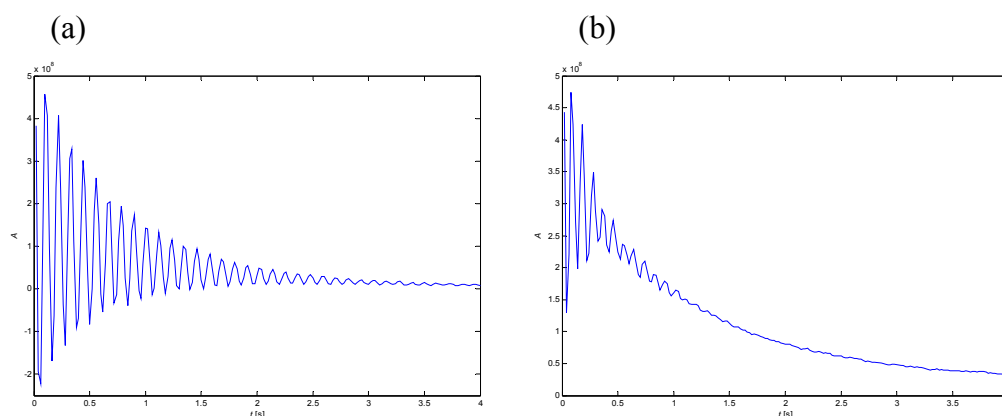
7.3.1. CPMG - efekt snížení θ

Na obr. 7.8 jsou vidět naměřené relaxační křivky CH_2 skupiny citrátu (získané numerickou integrací citrátového dubletu v reálném módu spektra) získané měřením sekvencí CPMG s $\tau = 5$ ms a dvěma různými hodnotami θ (180° a 150°). Je vidět, že při snížení θ došlo ke snížení superponovaných fluktuací a relaxační křivka se více podobá exponenciále. Došlo tedy ke zlepšení průběhu relaxační křivky a případná kvantifikace T_2 by byla zatížena nižší chybou. Na obr. 7.9 jsou vidět identické relaxační křivky pro CPMG měřené s vyšší hodnotou $\tau = 20$ ms. Tato hodnota τ nesplňuje předpoklady dané vztahem (4.7), a proto při $\theta = 180^\circ$ zde

pozorujeme přítomnost J-modulací podobných situaci úplného rekaplingu. Při snížení θ vidíme potlačení J-modulací, které je ale v tomto případě neúplné.



Obr 7.8 Relaxační křivka citrátového dubletu měřená sekvencí CPMG s $\tau = 5$ ms a dvěma různými hodnotami θ : 180° (a), 150° (b).



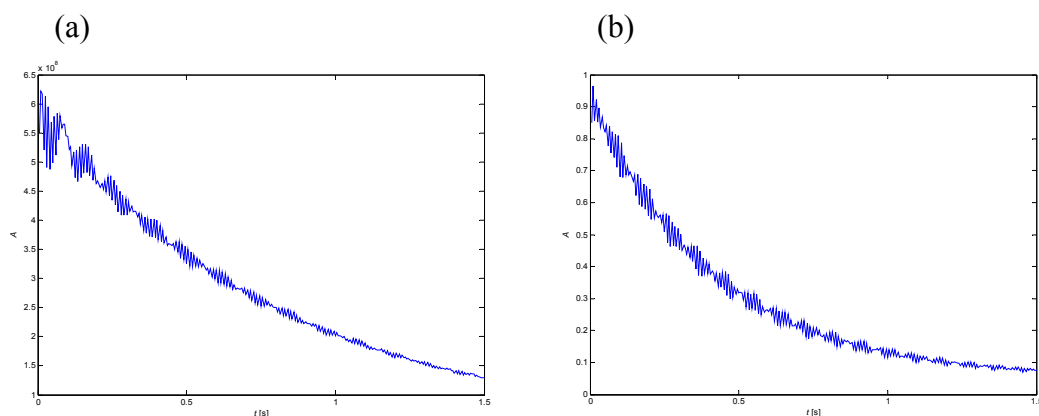
Obr 7.9 Relaxační křivka citrátového dubletu měřená sekvencí CPMG s $\tau = 20$ ms a dvěma různými hodnotami θ . 180° (a), 150° (b).

7.3.2. CPMG - experiment versus simulace

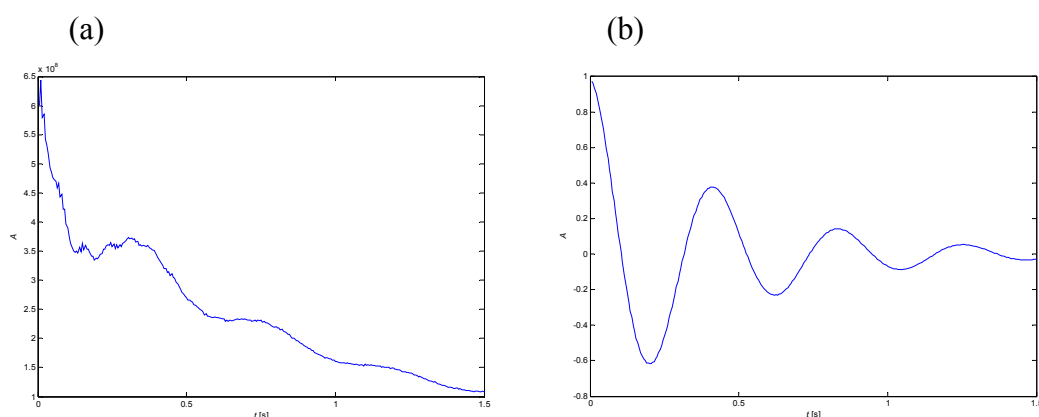
Důležitou informací při studiu J-modulací podá porovnání výsledku simulace s výsledkem experimentu. Kvantitativní parametry spinového systému, potřebné pro simulaci, konkrétně hodnota J (16 Hz) a $\Delta\nu$ (89,5 Hz), byly stanoveny vyhodnocením naměřeného NMR spektra citrátu. Na obr. 7.10 je provedeno porovnání experimentálních dat z CPMG s parametry $\tau = 5$ ms, $\theta = 150^\circ$ se simulací NMR experimentu s použitím identických parametrů CPMG a spinového systému. Vidíme, že simulovaná relaxační křivka má charakter velmi podobný experimentální relaxační křivce. Fluktuační superponované k exponenciále mají podobnou amplitudu, křivky se pouze liší počáteční velikostí signálu a též v parametru

exponenciálního útlumu, což jsou parametry, které nejsou pro studium charakteru J-modulací významné.

Na obr. 7.11 vidíme identické porovnání simulace a experimentu pro $\tau = 5$ ms, $\theta = 180^\circ$. Na rozdíl od předchozího případu zde vidíme, že v tomto případě simulace experimentu příliš neodpovídá.



Obr. 7.10 (a) Relaxační křivka citrátového dubletu měřená sekvencí CPMG s $\tau = 5$ ms, $\theta = 150^\circ$. (b) Simulovaná relaxační křivka s parametry identickými s experimentem: CPMG sekvence, $\tau = 5$ ms, $\theta = 150^\circ$, $J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 89,5$ Hz.

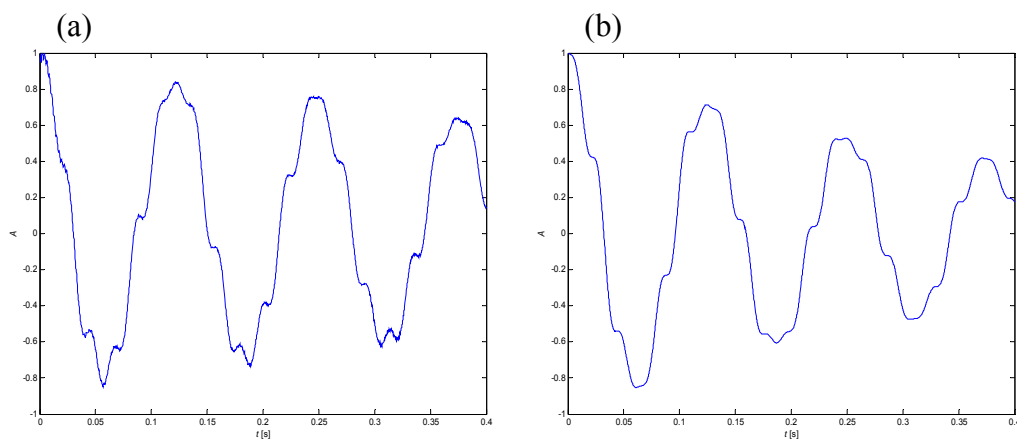


Obr. 7.11 (a) Relaxační křivka citrátového dubletu měřená sekvencí CPMG s $\tau = 5$ ms, $\theta = 180^\circ$. (b) Simulovaná relaxační křivka s parametry identickými s experimentem: CPMG sekvence, $\tau = 5$ ms, $\theta = 180^\circ$, $J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 89,5$ Hz.

7.3.3. Spinové echo

V prvním kroku byla provedena simulace experimentu spinového echa na spinovém systému s parametry odpovídajícími CH_2 skupině citrátu, bez zahrnutí relaxace. Porovnání získané křivky modulací s analytickým tvarem vyjádřeným vztahem (4.3) ukázalo, že simulovaná křivka se s analytickým tvarem přesně shoduje.

V dalším kroku bylo provedeno porovnání simulovaných a experimentálních dat. Na obr. 7.12 (a), (b) je vidět relaxační křivka citrátu měřená sekvencí spinového echa a křivka získaná simulací experimentu spinového echa s identickými parametry sekvence a spinového systému, se započtením relaxace. Kromě rozdílu v relaxačním čase je navíc vidět subtilní rozdíl v „zářezech“ křivek, základní perioda J-modulace je ale identická.



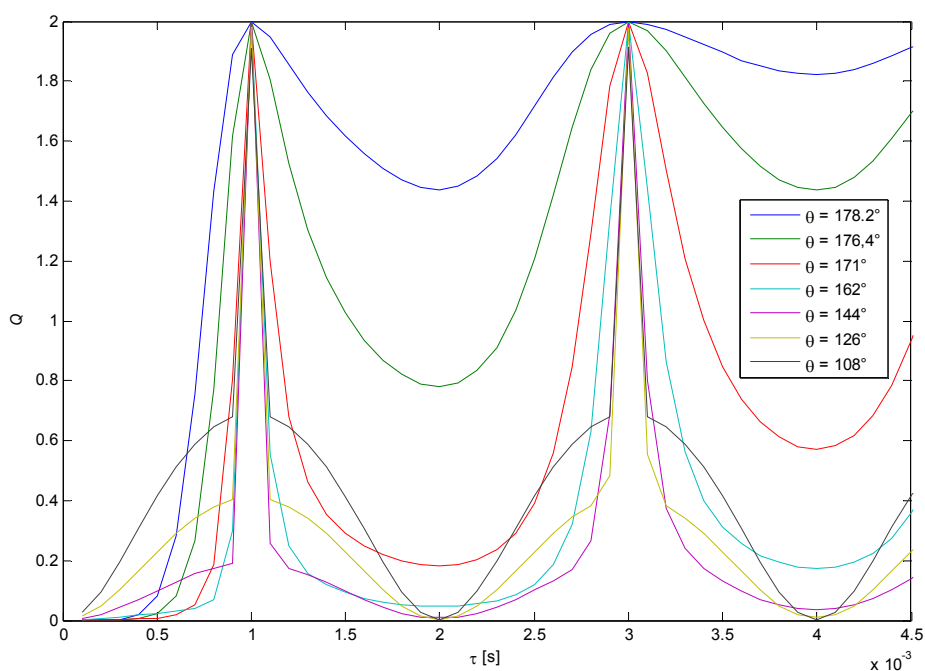
Obr. 7.12 (a) Relaxační křivka citrátového dubletu měřená sekvencí jednoduchého spinového echa. (b) Simulovaná relaxační křivka pro sekvenci spinového echa s parametry identickými s experimentem: $J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 89,5$ Hz.

Kapitola 8

Diskuze

8.1. Simulace bez relaxace

S výše uvedených výsledků simulací vyplývá, že důležitou otázkou při studiu J-modulací při CPMG experimentu je volba optimální hodnoty sklápěcího úhlu refokusačního pulsu θ . Pokud studujeme závislost kvality dekaplingu při snižování θ , vidíme, že hlavní tendencí je zlepšování kvality dekaplingu. Tato tendence však neplatí paušálně pro všechny hodnoty τ . Podíváme-li se podrobněji na kvalitu dekaplingu v oblastech prvních několika maxim Q (obr. 8.1 ukazuje situaci pro první dvě maxima Q), vidíme, že při snižování θ pod určitou prahovou hodnotu začínají hodnoty Q v okolí maxim Q růst a dochází ke zhoršování kvality dekaplingu při patách maxim Q . Tento efekt je výrazný pro okolí několika prvních maxim a postupně se snižuje.



Obr. 8.1 Detailní pohled na závislost kvality dekaplingu Q na τ a θ v simulovaném CPMG experimentu. Je vidět zhoršování kvality dekaplingu při patách maxim Q při snižování θ pod určitou prahovou hodnotu. Simulováno pro konstantní $J = 16$ Hz, $\Delta\nu = 1000$ Hz.

Druhým faktorem, který je třeba při rozhodování o volbě optimální hodnoty θ vzít v úvahu, je vliv θ na potlačení difúzních efektů. Podrobnější studium vlivu θ na úbytek signálu vlivem difúze v CPMG přesahuje rámec této práce, nicméně lze

očekávat, že vliv difúze při snižování θ bude růst a určení T_2 relaxačních časů tak bude postupně zkreslováno. Z těchto výše uvedených důvodů byla jako optimální hodnota θ stanovena hodnota $\theta = 153^\circ$, která odpovídá hraničnímu θ , při kterém ještě nedochází k výskytu zvýšených hodnot Q při patách píků (viz obr. 8.1).

8.2. Simulace se započtením relaxace

Kvalitativní porovnání J-modulací pro simulace bez relaxace a s relaxací neprokázalo významný rozdíl v jejich charakteru. Pro exaktní porovnání J-modulací simulovaných s relaxací a bez relaxace by bylo i v případě relaxace vhodné zavést parametr, který by hodnotil kvalitu dekaplingu kvantitativně. V tomto případě je však situace komplikovanější. Křivky závislosti integrálu píku na echo čase t mají při zahrnutí relaxace složitější průběh, navíc komplikovaný výskytem nenulové hodnoty B (viz odstavec 7.2). Pro korektní zavedení parametru kvality dekaplingu by bylo nutné relaxační křivku nafitovat, tomu však brání neznalost exaktního analytického vyjádření relaxační křivky v oblastech τ mezi τ_{rec} a τ_{dec} . Proto bylo vzájemné porovnání J-modulací bez relaxace a s relaxací provedeno pouze na kvalitativní úrovni.

Neznalost analytického vyjádření relaxační křivky neumožnila korektně vyhodnotit T_2 relaxační čas v přítomnosti velkých fluktuací v relaxační závislosti. Proto byl T_2 relaxační čas určován pouze v oblastech kvalitního dekaplingu a v oblastech, kdy fluktuace superponované k exponenciální relaxační křivce nebyly příliš veliké. V ostatních oblastech nebylo možné hodnotu T_2 spolehlivě stanovit. Z toho plyne, že pro kvalitní vyhodnocení T_2 relaxační křivky je důležité zvolit τ buď dostatečně nízké, aby mohla být splněna podmínka (4.7), nebo lze zvolit τ větší, ale tak, aby splňovalo podmínku pro τ_{dec} .

Při simulacích se započtením relaxace byla pro určité τ nalezena nenulová hodnota členu B . Vzhledem k tomu, že hodnota B roste při snižování θ , stává se B dalším faktorem, který mluví proti neomezenému snižování θ v CPMG experimentu. Přítomnost členu B může, zvláště při malém počtu experimentálních relaxačních bodů, výrazně zkreslit hodnoty T_2 . V případech, kdy si nejsme jisti, jestli B nemůže být v relaxační závislosti přítomen, je nutno přidat do fitované závislosti další volný parametr – absolutní člen, tj. fitovat data závislostí

$$A = A_0 \cdot e^{-\frac{t}{T_2}} + B. \quad (8.1)$$

Přítomnost faktoru B v relaxační křivce lze bez hlubších teoretických úvah vysvětlit tak, že se v makroskopickém systému, který podstupuje kontinuální excitaci pulsem, jehož θ není přesně 180° , ustanovuje nový rovnovážný stav, který je charakterizován nenulovou hodnotou příčné magnetizace.

8.3. Experiment

V případě CPMG s $\theta = 180^\circ$ nesouhlasí tvar relaxační křivky experimentu a simulace. Podrobné studium J-modulací bez relaxace i s relaxací prokázalo, že simulovaná křivka J-modulací při CPMG s $\theta = 180^\circ$ má vždy analytický tvar daný vztahem (7.1). Při zkracování τ se mění pouze perioda oscilací, ale charakter oscilací zůstává zachován. Experimentálně zjištěná relaxační křivka pro $\theta = 180^\circ$ se více podobá datům simulovaným při θ splňující podmínku $\theta \neq 180^\circ$. Toto pozorování má implikaci takovou, že charakter J-modulací je významně citlivý na nastavení hodnoty θ a že při θ experimentálně stanoveném na hodnotu $\theta = 180^\circ$ mohou mít J-modulace velmi variabilní charakter podle toho, jaká je odchylka nastavené hodnoty θ od hodnoty nominální. Optimalizaci nastavení parametrů pulsu pro $\theta = 180^\circ$ je nutno provést před každým experimentem. Metoda optimalizace je iterativní a je vždy zatížena chybou, proto v praxi nenulová odchylka nominální a optimalizované hodnoty θ existuje vždy. Jestliže je charakter J-modulací velmi citlivý na nastavení hodnoty θ , může být charakter J-modulací ovlivněn i případnou nestabilitou hardwaru NMR spektrometru, která způsobí kolísání hodnoty θ .

Pro nižší hodnotu $\theta = 150^\circ$ si charakter J-modulací simulace a experimentu kvalitativně lépe odpovídá. Z toho je vidět, že při θ splňující $\theta \neq 180^\circ$ již charakter J-modulací není tolik citlivý na malé změny θ , které mohou vznikat např. díky nestabilitě hardwaru NMR spektrometru během experimentu nebo nepřesnou optimalizací nastavení hodnoty θ .

Relaxační křivky experimentu a simulace si neodpovídají v hodnotě relaxačního času a v multiplikačním faktoru před exponenciálou. Rozdíl v relaxačních parametrech však není překvapující: Hodnota korelačního času, a konstanta vyjadřující velikost dipól-dipólové interakce, což jsou parametry vstupující do numerické simulace relaxačního procesu, byly stanoveny odhadem bez konkrétní znalosti rychlosti pohyblivosti molekuly a její přesné struktury. Tyto parametry tedy v reálném experimentu mohou nabývat jiných hodnot. Tento nedostatek by bylo možné odstranit interaktivní volbou korelačního času tak, aby výsledný simulovaný T_2 relaxační čas odpovídal experimentálně naměřené hodnotě. Vzhledem k tomu, že cílem studie bylo stanovení kvantitativní změny T_2 relaxačního času při různých parametrech CPMG sekvence a ne relaxometrická studie pohyblivosti molekuly citrátu, tyto dodatečné výpočty provedeny nebyly. Stejně tak nabývá jiných hodnot multiplikační faktor, který je úměrný množství sledované látky v kyvetě spektrometru a též nastavení zisku zesilovače.

Pro $\tau = 20$ ms nebylo v experimentu dosaženo kvalitního dekaplingu při snížení θ . To lze očekávat, protože dle výsledků simulací hodnota $\tau = 20$ ms nesplňuje podmínku τ_{dec} , ale leží v intervalu mezi τ_{dec} a τ_{rec} . Použijeme-li vztah (7.5),

zjistíme, že optimální hodnota $\tau_{\text{dec}, k=1}$, při které by J-modulace měly vymizet, činí 22,3 ms. Detailní experimentální ověření podmínek dekaplingu a rekaplingu však nebylo v této práci provedeno, protože podmínky dané vztahy (7.4), (7.5) byly definovány na základě výsledků simulací až po experimentu, který měl pouze předběžný charakter. Experimentální ověření podmínek (7.4), (7.5) plánujeme provést v dohledné době.

Naměření relaxační křivky citrátu pomocí spinového echa prokázalo, že J-modulace citrátu nemají jednoduchý charakter daný vztahem (4.6), ale odpovídají případu silné J-vazby, jejíž modulační křivka je analyticky popsána vztahem (4.3).

Simulovaná závislost J-modulací se plně shoduje s jejím analytickým vyjádřením uvedeném ve vztahu (4.3). Charakter J-modulací těchto dvou metod se však mírně neshoduje s charakterem J-modulací získaných experimentem. Tato neshoda může mít příčinu v tom, že analytické vyjádření i simulace předpokládají, že použité radiofrekvenční pulsy mají nekonečně krátké trvání, což v reálném experimentu není splněno. V důsledku toho, že v reálném experimentu mají pulsy svojí konečnou délku, nelze v tomto případě zanedbat časový vývoj J interakce a relaxace během aplikace radiofrekvenčního pulsu.

NMR spektroskopie na živých organismech (tzv. in-vivo NMR spektroskopie) je technika která se využívá pro určení koncentrací metabolitů v živých tkáních [12]. Její výhodou je možnost kvantifikace metabolitů bez nutnosti odebírat vzorek příslušné tkáně. Některé metabolity, které lze detekovat ve tkáních pomocí NMR spektroskopie, vykazují přítomnost homonukleární J-vazby mezi jednotlivými vodíky v molekule. Jedná se např. o laktát, glutamin a jemu příbuzné látky v mozku, citrát v prostatě a lipidy ve svalech (tzv. intramyocelulární lipidy). Vzhledem k tomu, že se pro měření signálu metabolitů téměř ve všech situacích z důvodů nutné prostorové lokalizace signálu používá technik založených na sekvenci spinového echa, jsou J-modulace amplitudy signálu u metabolitů s J-vazbou ve spektrech vždy přítomné. J-modulace komplikují T_2 relaxační křivky těchto metabolitů a tak ztěžují stanovení T_2 relaxačního času, který je nutný pro stanovení jejich absolutních koncentrací. V případě humánní aplikace NMR existují přísné limity omezující množství RF energie aplikované do vyšetřovaného subjektu (tzv. SAR – specific absorption rate) [13], proto nelze při relaxometrickém měření sekvencí CPMG podmínku (4.7) pro τ většinou splnit. Proto jsou výsledky této práce, naznačující možnost odstranění J-modulací i při vyšším τ a tedy při nižší RF energii deponované do pacienta, prakticky využitelné i pro T_2 relaxometrii in-vivo.

Tato práce se zabývala studiem J-modulací u jednoduchého spinového systému: dvě jádra se stejným γ a J-vazbou. Pro složitější homonukleární spinový systém lze očekávat složitější závislost J-modulací; studium těchto systémů však nebylo tématem této práce.

Kapitola 9

Závěr

Výsledky práce prokázaly, že J-modulace dané homonukleární J-vazbou mají při simulovaném CPMG experimentu rozdílný charakter v závislosti na aktuální hodnotě sklápěcího úhlu refokusačního pulsu θ . Zásadní rozdíl v charakteru J-modulací je mezi $\theta = 180^\circ$ a $\theta \neq 180^\circ$. Dále bylo ověřeno simulací i experimentem, že k vymizení J-modulací může dojít i při vyšším τ , než je původně postulovaná podmínka pro τ

$$\tau \ll \frac{1}{\Delta\nu}, \quad (9.1)$$

pokud $\theta \neq 180^\circ$. Pomocí simulací byly zjištěny periodické podmínky pro τ , při kterých J-modulace vymizí (τ_{dec}) a při kterých jsou naopak maximální (τ_{rec}):

$$\tau_{\text{dec}} = \frac{2k}{\Delta\nu}, \quad k = 1, 2, 3, \dots \quad (9.2)$$

$$\tau_{\text{rec}} = \frac{2k-1}{\Delta\nu}, \quad k = 1, 2, 3, \dots \quad (9.3)$$

Ze vztahů (9.1) a (9.2) plyne, že hodnoty τ , při kterých je splněna podmínka dekaplingu, mohou tedy být v případě $\theta \neq 180^\circ$ o řád vyšší, než musí být v případě $\theta = 180^\circ$. Na základě výsledků simulací byla určena hodnota $\theta = 153^\circ$ jako optimální hodnota θ pro eliminaci J-modulací v CPMG experimentu.

Bylo zjištěno, že charakter úspěšnosti dekaplingu v CPMG experimentu závisí pouze na parametrech τ , $J/\Delta\nu$ a θ . Kvalita dekaplingu se oblastech τ_{dec} při rostoucím indexu k postupně zhoršuje. Ze simulací plyne, že kvalitní dekapling pro τ_{dec} a vyšší hodnoty k lze získat pouze pro relativně nízký θ , pro slabou J-vazbu a pro k nepřilíš vysoké.

Simulace relaxací ukázala, že hodnota T_2 se v oblastech dekaplingu neliší od referenční hodnoty T_2 . Pro určité hodnoty τ byla pozorována nenulová limita $t \rightarrow \infty$ relaxační křivky, což má praktickou implikaci pro stanovení T_2 .

Výsledky práce mají praktický význam pro experimentální měření T_2 . Pokud nelze pro periodu opakování refokusačního pulsu τ splnit podmínku (9.1), je třeba pro studovaný systém nejprve určit hodnoty J a $\Delta\nu$. Podle těchto hodnot a podle možností hardwaru NMR spektrometru pak určit optimální hodnotu τ tak, aby byl efekt J-modulací minimalizován.

Efekt homonukleárních J-modulací v CPMG experimentu, tak, jak byl prezentován v této práci, představuje poměrně komplexní problematiku, která doposud nebyla podrobněji studována. Další experimenty k ověření simulací, rozšíření simulací na vícespinové homonukleární systémy a analytický popis jevu,

jsou možné perspektivy další práce v této oblasti. Předkládaná práce ukazuje, že ačkoliv fenomén spinového echa byl popsán již před mnoha lety, stále poskytuje témata ke studiu a představuje tak stále nedopsanou kapitolu veliké knihy jménem „NMR jev a jeho využití“.

Literatura

- [1] Carr H. Y., Purcell E. M.: *Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments*, Phys. Rev. **94** (1954) 630-638.
- [2] Meiboom S., Gill D.: *Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times*, Rev. Sci. Instr. **29** (1958) 688-691.
- [3] Ernst R. R., Bodenhausen G., Wokaun A.: *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*, Oxford University Press, New York, 1987.
- [4] Dittmer J., Bodenhausen G.: *Quenching echo modulations in NMR spectroscopy*, ChemPhysChem **7** (2006) 831-836.
- [5] Gopalakrishnan K., Aeby N., Bodenhausen G.: *Quenching and recoupling of echo modulations in NMR spectroscopy*, ChemPhysChem **8** (2007) 1791-1802.
- [6] Levitt M. H.: *Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*, John Wiley & Sons, Chichester, 2001.
- [7] Hore P. J., Jones J. A., Wimperis S.: *NMR: the toolkit*, Oxford University Press, New York, 2000.
- [8] Callen H. B.: *Thermodynamics and an introduction to thermostatistics*, John Wiley & Sons, New York, 1985.
- [9] Davydov A. S.: *Kvantová mechanika*, SPN, Praha, 1978.
- [10] Kowalewski J., Maler L.: *Nuclear spin relaxation in liquids: theory, experiments, and applications*, Taylor & Francis, Boca Raton, 2006.
- [11] Sørensen O. W., Eich G. W., Levitt M. H., Bodenhausen G., Ernst R. R.: *Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments*, Progr. NMR Spectrosc. **16** (1983) 163-192.
- [12] de Graaf R. A.: *In vivo NMR spectroscopy, principles and techniques*, John Wiley & Sons, Chichester, 1998.
- [13] Haacke E., Brown R., Thompson M. R., Venkatesan R.: *Magnetic resonance imaging, physical principles and sequence design*, John Wiley & Sons, New York, 1999.