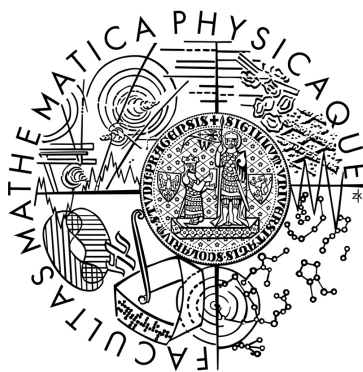


Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

# DIPLOMOVÁ PRÁCE



Petr Dvořák

## Studium dynamického chování směsi $H_2O/D_2O$ pomocí NMR relaxací

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jan Lang, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2013

Děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. RNDr. Janu Langovi, Ph.D. za trpělivost a příkladné vedení při psaní této práce. Děkuji konzultantům prof. RNDr. Jiřímu Englichovi, DrSc. a Mgr. Pavlu Srbovi, Ph.D. za poskytnuté konzultace. Dále děkuji všem ostatním členům laboratoře NMR vysokého rozlišení KFNT MFF UK za pomoc s obsluhou spektrometru NMR vysokého rozlišení.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne 29.7.2013

Petr Dvořák

Název práce: Studium dynamického chování směsi H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O pomocí NMR relaxací

Autor: Petr Dvořák

Katedra: Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jan Lang, Ph.D., Katedra fyziky nízkých teplot

Abstrakt: Předmětem této diplomové práce je chemická výměna ve směsi lehké a těžké vody, která byla studována metodami NMR spektroskopie vysokého rozlišení. První část této práce se zabývá metodikou přípravy vzorků a metodikou měření relaxačních dob směsi lehké a těžké vody. Zde byly řešeny experimentální komplikace s vymýváním iontů ze skla kyvety, odplyněním vzorků, radiačním dampingem a zahříváním vzorku radiofrekvenčními pulsy. V druhé části této práce byly naměřeny relaxační parametry chemické výměny vybraného vzorku při různých teplotách. Bylo zde navrženo několik interpretací naměřených dat – ionizace, molekulární clustery a izotopová rovnováha.

Klíčová slova: NMR, relaxace, voda, dynamika, chemická výměna

Title: Study of dynamical behavior of H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O mixtures by NMR relaxation

Author: Petr Dvořák

Department: Department of Low Temperature Physics

Supervisor: doc. RNDr. Jan Lang, Ph.D., Department of Low Temperature Physics

Abstract: The subject of this diploma thesis is the chemical exchange in the mixture of light and heavy water, which was studied by methods of high resolution NMR. The first part of this thesis concerns methodology of sample preparation and methodology of measurement of relaxation times of mixture of light and heavy water. Experimental complications with elution of ions from tube glass, degassing of samples, radiation damping and sample heating by radio-frequency pulses were solved there. In the second part of this thesis the relaxation parameters of chemical exchange of selected sample at various temperatures were measured. Interpretations of experimental data (ionization, molecular clusters and isotopic equilibrium) was suggested.

Keywords: NMR, relaxation, water, dynamics, chemical exchange

# Obsah

Úvod.....	1
Motivace a cíle práce.....	1
Členění práce.....	2
1. Teorie.....	3
1.1. Voda.....	3
1.1.1. Struktura molekuly vody.....	3
1.1.2. Vodíkové můstky.....	4
1.1.3. Ionizace molekul vody.....	5
1.1.4. Difuze iontů $H_3O^+$ a $OH^-$ .....	7
1.1.5. Rovnováha molekul $H_2O$ , $HDO$ a $D_2O$ .....	8
1.2. Nukleární magnetická rezonance.....	8
1.2.1. Jaderný spin v magnetickém poli.....	8
1.2.2. Soubor jaderných spinů v magnetickém poli – Blochovy rovnice.....	11
1.3. Interakce ve spinovém systému.....	12
1.3.1. Chemický posun a chemické stínění.....	13
1.3.2. Dipól-dipólová interakce.....	14
1.3.3. J-interakce.....	14
1.4. Relaxační mechanismy.....	15
1.4.1. Obecný relaxační mechanismus.....	15
1.4.2. Relaxace vlivem dipól-dipólové interakce.....	16
1.4.3. Relaxace vlivem anizotropie chemického stínění.....	19
1.5. Chemická výměna.....	20
1.5.1. Základní pojmy.....	20
1.5.2. Bloch-McConnellovy rovnice.....	21
1.5.3. Projevy chemické výměny ve spektru.....	21
1.5.4. Vliv chemické výměny na relaxace.....	22
2. Experimentální metody měření relaxačních dob.....	28
2.1. Základní pulsní sekvence.....	28
2.1.1. Inversion recovery.....	28
2.1.2. Spinové echo.....	29
2.1.3. Sekvence CPMG.....	30
2.2. Radiační damping.....	31
2.2.1. Vliv radiačního dampingu na měření $T_1$ .....	33
2.2.2. Vliv radiačního dampingu na měření $T_2$ .....	35
2.2.3. Metody potlačení radiačního dampingu.....	36
3. Parametry měření.....	38
3.1. Parametry vzorků.....	38
3.1.1. Příprava vzorků.....	38
3.1.2. Kyvety použité při měření.....	39
3.1.3. Odplynění vzorků.....	40
3.2. Spektrometr vysokého rozlišení.....	41
3.2.1. Nastavení a kalibrace teploty.....	41
3.2.2. Parametry měření.....	43
4. Výsledky měření a diskuse.....	45
4.1. Komplikace spojené s měřením NMR vody.....	45
4.1.1. Radiační damping.....	45

4.1.2. Zahřívání vzorku radiofrekvenčními pulsy.....	46
4.1.3. Stabilita vzorku.....	55
4.2. Chemická výměna.....	62
4.2.1. Výsledky měření.....	62
4.2.2. Diskuse.....	67
Závěr.....	81
Seznam použité literatury.....	83
Seznam tabulek.....	87
Seznam použitých zkratk.....	88
Přílohy.....	89
Příloha 1: Pulzní program sekvence CPMG vyrovnávající teplotu pro $k=11$ .....	89

# Úvod

## Motivace a cíle práce

Voda je nejvíce zastoupenou látkou na planetě Zemi. Její význam pro život je zcela zásadní. Spolu se zemskou atmosférou vytváří základní podmínky pro existenci života a je také místem, kde život vznikl.

Struktura molekuly vody je velmi jednoduchá. Skládá se ze dvou atomů vodíku a jednoho atomu kyslíku, přičemž atomy vodíku jsou s kyslíkem svázány kovalentní vazbou. Nelze ovšem říct, že by voda jako taková byla jednoduchou sloučeninou. Voda má řadu anomálních vlastností, přičemž původ řady z nich nebyl dodnes přesvědčivě objasněn. Z nejznámějších anomálií vody lze uvést maximum hustoty v okolí 4° C nebo změnu objemu při přechodu mezi kapalnou a pevnou fází. Ovšem je zde i řada méně známých anomálií – například anomálie izotermické kompresibility, anomálie specifické tepelné kapacity při konstantním tlaku a mnoha dalších – podle [1] má voda přes 60 anomálních vlastností.

Obecně se předpokládá, že podstata těchto anomálních vlastností je ukryta ve struktuře a dynamice molekulárních sítí pospojovaných vodíkovými můstky, jichž voda tvoří velmi mnoho. Ovšem konkrétní představa o takovéto supramolekulární struktuře a její dynamice je stále předmětem debat a neustále se vyvíjí. [2, 3]

Jaderné magnetické rezonance (NMR) vysokého rozlišení je jednou z technik, které jsou schopny poskytnout informace o takovýchto supramolekulárních strukturách. Především detailní interpretace relaxačních dob úzce souvisí s dynamikou molekul a molekulárních struktur. Je ovšem zajímavé, že NMR vodíkové relaxační doby samotné vody byly hojně studovány v 50.-60. letech minulého století [4, 5], ale poté došlo k útlumu těchto studií, přičemž tyto studie však nepřinesly příliš přesvědčivé závěry.

Toto se tedy stalo impulzem pro vznik této práce, jejíž hlavní cíle jsou

- vypracovat metodiku přípravy odplyněných vzorků různých koncentrací  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ,
- vypracovat metodiku měření relaxačních dob na vzorcích  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ , které jsou specifické tím, že jsou neobvykle dlouhé a také tím, že signál vody je



velmi silný, což s sebou přináší řadu experimentálních komplikací,

- na vybraných vzorcích naměřit relaxační parametry a naměřené výsledky interpretovat v souvislosti s dynamickými ději, které ve vodě mohou probíhat.

## Členění práce

Tato práce je rozčleněna do čtyř kapitol.

První kapitola se věnuje teorii jevu jaderné magnetické rezonance a relaxacím jaderných spinů.

V druhé kapitole jsou popsány standardní techniky měření relaxačních dob a také je zde popsán pojem radiačního dampingu a jeho dopady na měření silných NMR signálů.

Třetí kapitola popisuje přípravu vzorků, které byly při měření použity, a také spektrometr NMR vysokého rozlišení, na kterém byla měřena data pro tuto práci.

A čtvrtá kapitola je věnována samotným výsledkům a jejich interpretaci. Je složena ze dvou částí. První se věnuje vypracování metodiky přípravy vzorků a metodiky měření relaxačních dob vzorků H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O. A druhá část se věnuje měření relaxačních parametrů vybraných vzorků, zejména parametrům chemické výměny.

# 1. Teorie

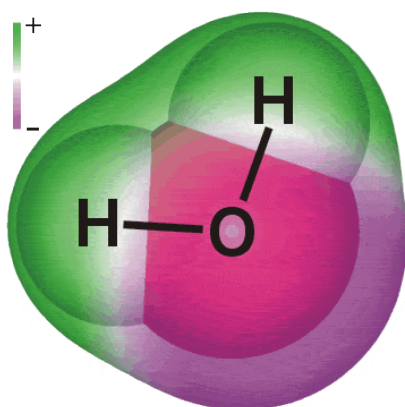
## 1.1. Voda

### 1.1.1. Struktura molekuly vody

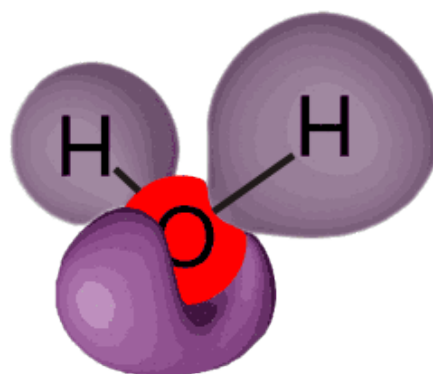
Molekula vody je složena ze dvou atomů vodíku a jednoho atomu kyslíku. V případě těžké vody jsou atomy vodíku nahrazeny atomy deuteria.

Molekula vody má tvar písmene V. Symetrii molekuly lze popsat bodovou grupou  $C_{2v}$ , tedy má dvě roviny zrcadlení a dvou-četnou osu rotace.

Její elektronovou strukturu lze přibližně popsat čtyřmi  $sp^3$  hybridizovanými elektronovými páry mířícími do vrcholů čtyřstěnu, přičemž dva tyto páry tvoří kovalentní vazbu s vodíky a dva páry jsou nevazebné. V takovémto uspořádání by úhel mezi jednotlivými elektronovými páry (vazebnými i nevazebnými) byl  $109,47^\circ$ . Ab initio výpočty však ukazují, že elektronová hustota obou nevazebných párů je delokalizovaná podél jejich spojnice. Dále tato hustota leží blíže u středu atomu kyslíku než elektronová hustota tvořící vazby s vodíky. Výsledná vypočtená struktura izolované molekuly vody s rozložením náboje a elektronové hustoty je zobrazena na obrázcích 1.1. a 1.2. Délka O-H vazby je  $0,957854 \text{ \AA}$  a vazebný úhel mezi atomy vodíku je  $104,50^\circ$ . V případě těžké vody je délka O-D vazby  $0,957835 \text{ \AA}$  a vazebný úhel  $104,49^\circ$ . [1,6]



Obr.1.1: Struktura izolované molekuly vody s rozložením náboje. [1]



Obr.1.2: Struktura izolované molekuly vody s rozložením elektronové hustoty. [1]

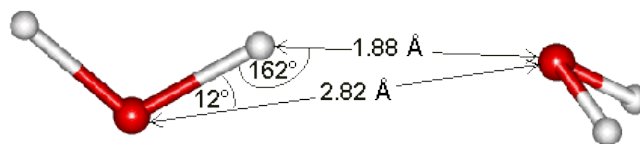
### 1.1.2. Vodíkové můstky

Voda v kapalném stavu je výjimečná tím, že tvoří přibližně stejný počet vodíkových vazeb jako kovalentních vazeb. Ve vodíkových můstcích je atom vodíků vázán jednak kovalentně ke svému atomu kyslíku, ale také elektrostaticky interaguje s atomem kyslíku sousední molekuly. Přesněji řečeno je vodíková vazba ve vodě z cca 10 % kovalentní a z cca 90 % elektrostatickou interakcí mezi dvěma dipóly. [1,7]

Vodíková vazba je silnější než van der Waalsova interakce, což způsobuje, že molekuly vody jsou o cca 15% blíže sobě, než by byly, kdyby voda byla pouze kapalina s van der Waalsovými interakcemi. Na druhou stranu jsou vodíkové vazby směrové, což snižuje počet molekul v okolí dané molekuly cca na 4. [1]

Vytvořením vodíkové vazby mezi dvěma molekulami vody dojde ke změně elektronové hustoty v molekule a tím se změní schopnost tvorby další vodíkové vazby. V molekule, která je donorem vodíku do vodíkové vazby, dojde ke zvýšení elektronové hustoty v oblasti jejích volných párů, čímž se zvýší její schopnost přijmout další vodík a vytvořit tak další vodíkovou vazbu. V molekule, která je akceptorem vodíku, dojde ke snížení elektronové hustoty na jejích vodících a na jejím zbývajícím volném páru, což zvyšuje její další schopnost být donorem vodíku, ale snižuje se schopnost být akceptorem dalšího vodíku. Tato změna elektronové hustoty tedy vede jednak ke kooperativitě (přijetím jednoho vodíku dojde ke zvýšení schopnosti být donorem vodíku) a i k antikooperativitě (přijetí jednoho vodíku snižuje schopnost přijmout druhý) při vytváření vodíkových můstků ve vodních sítích. Kooperativní tvorba vodíkové vazby vede k prodloužení kovalentní vazby vodíku a kyslíku ale také ke zkrácení vodíkové vazby s druhou molekulou a ke zkrácení vzdálenosti mezi atomy kyslíku obou molekul. [1,8,9]

Se změnou délky vodíkové vazby souvisí i změna síly vodíkové vazby. Síla vodíkové vazby závisí také na tom, jestli je vazba přímá. Voda v kapalném stavu je směsí krátkých, přímých a silných vodíkových vazeb a dlouhých, ohnutých a slabých vodíkových vazeb s mnoha mezistavy mezi těmito dvěma extrémy. Ze studií magnetického stínění protonů ve vodě plynou průměrné strukturní parametry vodního dimeru při 4 °C uvedené na obrázku 1.3. Délka vodíkové vazby závisí na teplotě a tlaku, kdežto délka kovalentní vazby mezi kyslíkem a vodíkem ve vodě závisí na teplotě a tlaku podstatně méně. [1,10]



Obr. 1.3: Průměrné strukturální parametry dimeru vody. [1]

Jak už jsme uvedli v úvodu této práce, voda má mnoho anomálních vlastností. Je-li se voda od jiných kapalin liší právě v četnosti vodíkových vazeb, lze se domnívat, že podstata anomálních vlastností vody je ukryta právě ve vodíkových vazbách. Obecně se předpokládá, že molekuly vody jsou v kapalném skupenství organizované a vytváří molekulární clustery. O struktuře a dynamice těchto clusterů se však příliš mnoho neví. Existuje mnoho ab initio výpočtů struktur izolovaných clusterů různých velikostí (viz. např. [11]), ale představa struktury reálných clusterů je stále předmětem diskusí [1].

### 1.1.3. Ionizace molekul vody

V kapitole 1.1.1 jsme popsali vodu jako molekulu složenou ze dvou atomů vodíku a jednoho atomu kyslíku. Ve skutečnosti však část molekul vody ionizuje, což umožňuje migraci vodíků mezi jednotlivými molekulami.

Ionizací vody rozumíme děj, při kterém dochází k rozpadu molekuly  $H_2O$  na ionty  $H^+$  a  $OH^-$ . Je to endotermický děj, jehož příčinou jsou fluktuace elektrického pole mezi sousedícími molekulami, přičemž příčinou těchto fluktuací jsou molekulární librace. Většina z takto vzniklých dvojic iontů  $H^+$  a  $OH^-$  velmi rychle rekombinuje. Občas (při  $25^\circ C$  jednou za cca 8 hodin na molekulu) dojde k oddělení těchto iontů, po kterém iont  $H^+$  okamžitě hydratuje. Vzniklé ionty  $H_3O^+$  a  $OH^-$  jsou pak stabilizovány vytvořením vodíkových můstků a solvatací, a pokračují ve své separátní existenci. Vypočtené struktury iontů  $H_3O^+$  a  $OH^-$  s rozložením náboje jsou zobrazeny na obrázcích 1.5 a 1.6. [1,12]

Výsledek ionizace vody lze tedy popsat chemickou rovnicí:



Rovnovážná koncentrace iontů  $H_3O^+$  se udává pomocí pH, kde

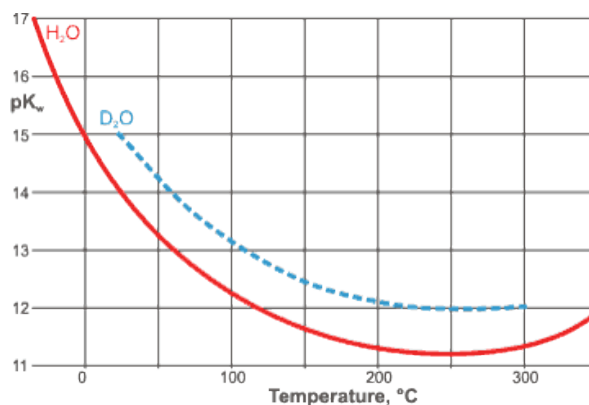
$$pH = -\log_{10}[H_3O^+] , \quad (1.2)$$

kde hranaté závorky mají význam molární koncentrace. Za normálních podmínek je pH čisté vody rovno 7. [1]

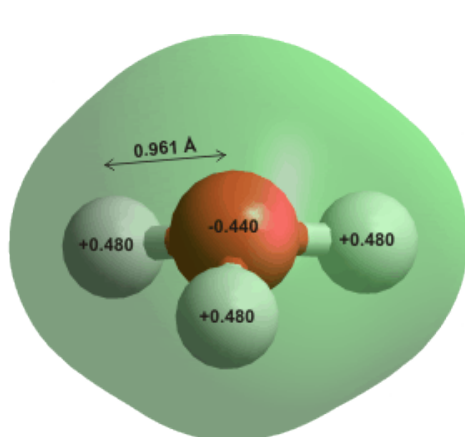
Dále se zavádí takzvaný iontový součin vody

$$K_w = [H_3O^+][OH^-]. \quad (1.3)$$

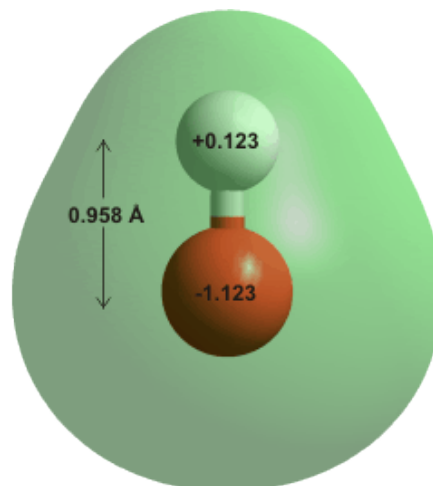
Tento součin závisí na teplotě a tlaku. Závislost iontového součinu lehké a těžké vody je zobrazen na obrázku 1.4 ( $pK_w = -\log_{10} K_w$ ). Z tohoto obrázku je vidět, že těžká voda ionizuje méně. Důvodem je to, že vazba mezi deuteriem a kyslíkem je silnější než vazba mezi vodíkem a kyslíkem, protože deuterium je těžší než vodík, díky čemuž je energie nulových kmitů těžké vody nižší než u lehké vody. [1,13]



Obr. 1.4: Závislost  $pK_w$  na teplotě. [1]



Obr.1.5: Struktura  $H_3O^+$  iontu. [1]

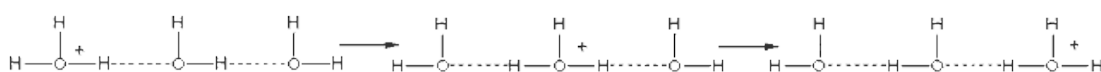


Obr.1.6: Struktura  $OH^-$  iontu. [1]

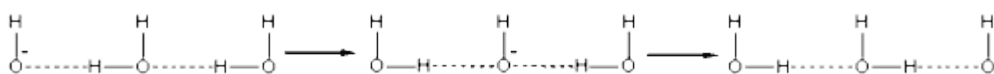
### 1.1.4. Difuze iontů $\text{H}_3\text{O}^+$ a $\text{OH}^-$

Je obecně známo, že protony a hydroxidové ionty ve vodě velmi rychle difundují, přičemž protony difundují přibližně dvakrát rychleji než hydroxidové ionty. Je ovšem třeba říct, že tento závěr byl učiněn z měření driftové pohyblivosti iontů  $\text{H}^+$  a  $\text{OH}^-$  v elektrickém poli  $100 \text{ V m}^{-1}$ , která při teplotě 298 K je  $36,23$  a  $20,64 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$  a skutečný difuzní pohyb těchto iontů tedy může být menší. Obvyklým mechanismem, který se používá pro popis difuze těchto iontů je tzv. Grotthussův mechanismus. Podstatou Grotthussova mechanismu jsou termálně indukované přeskoky protonů od jedné molekuly k druhé přes vodíkovou vazbu. [1,14,15]

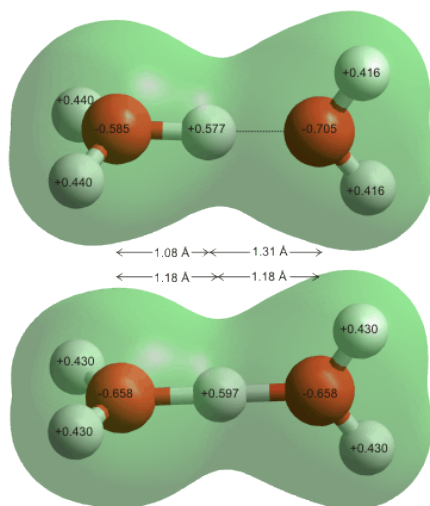
Difuze iontů  $\text{H}^+$  a  $\text{OH}^-$  Grotthusovým mechanismem je schématicky znázorněna na obrázcích 1.7 a 1.8. Dále na obrázcích 1.9 a 1.10 jsou zobrazeny vypočtené struktury dimerů  $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{O}^+$  a  $\text{H}_2\text{O}-\text{OH}^-$  s vyznačenými vzdálenostmi a rozložením náboje.



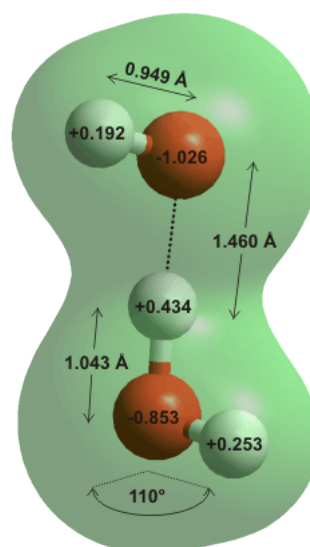
Obr.1.7: Schéma difuze  $\text{H}_3\text{O}^+$  iontu Grotthusovým mechanismem. [1]



Obr.1.8: Schéma difuze  $\text{OH}^-$  iontu Grotthusovým mechanismem. [1]



Obr.1.9: Struktura dimeru  $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{O}^+$ . [1]



Obr.1.10: Struktura dimeru  $\text{H}_2\text{O}-\text{OH}^-$ . [1]

### 1.1.5. Rovnováha molekul H<sub>2</sub>O, HDO a D<sub>2</sub>O

Z předchozích kapitol je zřejmé, že dané dva vodíky nezůstávají věčně u svého atomu kyslíku, ale v důsledku Grotthussova mechanismu „putují“ mezi jednotlivými atomy kyslíku ve vzorku. Jinak řečeno atomy vodíku ve vodě podléhají chemické výměně. Důsledkem tohoto je, že pokud smícháme lehkou a těžkou vodu, tak po dosažení rovnováhy ve vzorku kromě molekul H<sub>2</sub>O a D<sub>2</sub>O nalezneme i molekuly HDO.

Předpokládáme-li, že v rovnováze je rozdělení atomů vodíku a deuteria v jednotlivých pozicích na kyslicích zcela náhodné, pak ze statistiky dostaneme pro molární zlomky molekul H<sub>2</sub>O, HDO a D<sub>2</sub>O následující vztahy

$$x_{H_2O} = x_0^2, \quad (1.4)$$

$$x_{HDO} = 2x_0(1-x_0), \quad (1.5)$$

$$x_{D_2O} = (1-x_0)^2, \quad (1.6)$$

kde  $x_0$  je počáteční namíchaný molární zlomek H<sub>2</sub>O. Toto číslo také udává zastoupení atomů lehkého vodíku ve vzorku a tedy i pravděpodobnost výběru lehkého vodíku.

Ve skutečnosti tento model neodpovídá zcela realitě, neboť podle výsledků práce [16] je mírně upřednostněna tvorba molekul H<sub>2</sub>O a D<sub>2</sub>O nad molekulami HDO, přičemž pro  $x_0 = 0,5$  dostáváme  $x_{H_2O} = 0,254$ ,  $x_{D_2O} = 0,254$  a  $x_{HDO} = 0,491$  oproti výše uvedenému modelu, který předpovídá  $x_{H_2O} = 0,25$ ,  $x_{D_2O} = 0,25$  a  $x_{HDO} = 0,5$ . Pro potřeby této práce je však tento model postačující.

## 1.2. Nukleární magnetická rezonance

Pod pojmem nukleární magnetické rezonance (NMR) rozumíme jev, kdy dochází k rezonančnímu chování atomových jader s nenulovým spinem v magnetickém poli.

### 1.2.1. Jaderný spin v magnetickém poli

Má-li jádro nenulový moment hybnosti (jaderný spin)  $\hat{I}$ , má i nenulový jaderný magnetický dipólový moment

$$\hat{\mu} = \gamma \hbar \hat{I}, \quad (1.7)$$

kde  $\hbar$  je redukovaná Planckova konstanta a  $\gamma$  je gyromagnetický poměr.

Umístíme-li takovouto částici do vnějšího statického magnetického pole  $\mathbf{B}_0$ , dojde k interakci magnetického momentu částice s vnějším polem. Tato interakce se nazývá Zeemanova interakce a lze ji popsat hamiltoniánem

$$\hat{H}_0 = -\hat{\boldsymbol{\mu}} \cdot \mathbf{B}_0 . \quad (1.8)$$

Umístíme-li vnější magnetické pole do směru souřadné osy z  $\mathbf{B}_0 = (0, 0, B_0)$ , pak se vztah (1.8) zjednoduší na

$$\hat{H}_0 = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar I_z B_0 , \quad (1.9)$$

kde  $\mu_z$  je z-ová složka jaderného magnetického momentu a  $I_z$  je z-ová složka jaderného spinu.

Řešením Schrödingerovy rovnice s hamiltoniánem (1.9) dostaneme soustavu  $2I+1$  vlastních hodnot energie částice v magnetickém poli

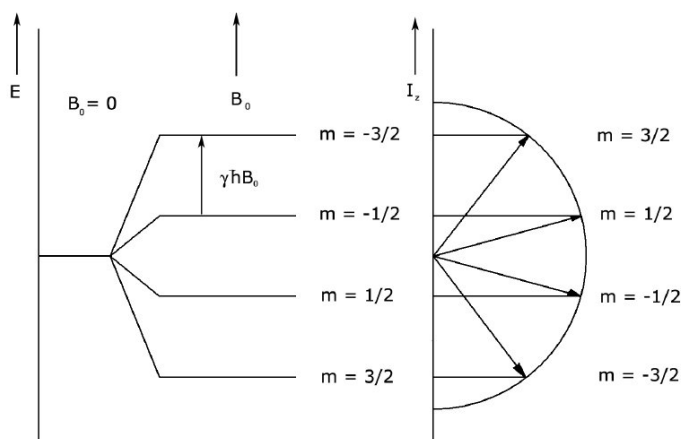
$$E_m = -\gamma \hbar B_0 m , \quad (1.10)$$

kde  $m$  je magnetické kvantové číslo.

Jednotlivé energetické hladiny jsou ekvidistantní a vzdálenost dvou sousedních hladin je rovna

$$\Delta E = |\gamma| \hbar B_0 . \quad (1.11)$$

Soustava těchto  $2I+1$  energetických hladin se nazývá Zeemanův multiplet. Jednotlivé hladiny tohoto multipletu odpovídají různým orientacím jaderného magnetického momentu částice vzhledem ke statickému magnetickému poli. Příklad Zeemanova multipletu pro  $I=3/2$  je zobrazen na obrázku 1.11.



Obr.1.11: Zeemanův multiplet pro  $I=3/2$ .



Dále uvažme situaci, kdy na částici, kromě statického magnetického pole  $\mathbf{B}_0$  orientovaného ve směru osy z, působí ještě časově proměnné pole s konstantní amplitudou  $B_1$ , jehož vektor magnetické indukce rotuje konstantní úhlovou rychlostí  $\omega$  v rovině xy. Na částici tedy působí pole

$$\mathbf{B} = B_1(\mathbf{i} \cos \omega t + \mathbf{j} \sin \omega t) + \mathbf{k} B_0, \quad (1.12)$$

kde  $\mathbf{i}, \mathbf{j}, \mathbf{k}$  jsou jednotkové vektory ve směru os x, y, z.

Hamiltonián interakce magnetického momentu částice s polem je pak dán součtem dvou členů

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_1(t), \quad (1.13)$$

kde první člen popisuje interakci se statickým magnetickým polem a je dán vztahem (1.9), a druhý člen popisuje interakci s proměnným magnetickým polem a je roven

$$\begin{aligned} \hat{H}_1(t) &= -\hat{\boldsymbol{\mu}} \cdot \mathbf{B}_1 = -\gamma B_1 (I_x \cos \omega t + I_y \sin \omega t) = \\ &= -\frac{B_1}{2} \gamma \hbar (e^{i\omega t} I_- + e^{-i\omega t} I_+) \end{aligned}, \quad (1.14)$$

kde operátory  $I_+, I_-$  jsou tzv. „zvyšovací“ a „snižovací“ operátory definované vztahem

$$I_{\pm} = I_x \pm I_y. \quad (1.15)$$

Předpokládáme-li  $B_1 \ll B_0$ , pak můžeme vliv časově závislého hamiltoniánu  $H_1(t)$  považovat za časově závislou poruchu. Z poruchového počtu pak plyne, že malá časově závislá porucha může indukovat přechody mezi vlastními stavy neporušeného hamiltoniánu (tedy přechody mezi hladinami Zemanova multipletu). Pravděpodobnost přechodu mezi stavem s kvantovým číslem  $m'$  a  $m$  je úměrná maticovému elementu poruchy

$$P_{m',m} \approx |\langle m' | H_1 | m \rangle|^2. \quad (1.16)$$

Hamiltonián (1.14) obsahuje operátory  $I_+$  a  $I_-$ . Je tedy zřejmé, že nenulové jsou pouze maticové elementy, pro které platí  $m' = m \pm 1$ . Magnetické pole  $\mathbf{B}_1$  tedy může indukovat přechody pouze mezi dvěma sousedními hladinami Zeemanova multipletu, přičemž díky symetrii maticových elementů  $\langle m' | H_1 | m \rangle$  je pravděpodobnost přechodu na vyšší i na nižší hladinu stejná.

S přechodem mezi sousedními hladinami Zeemanova multipletu je spojena absorpce či emise kvanta energie daného vztahem (1.11). Označíme-li  $\Delta E = \hbar \omega_0$  dostaneme z (1.11) podmínku pro tzv. Larmorovu frekvenci (frekvenci Larmorovy precese)

$$\omega_0 = |\gamma| B_0 . \quad (1.17)$$

Tato podmínka nám říká, jakou úhlovou frekvenci musí časově proměnné pole  $\mathbf{B}_1$  mít, aby mohlo indukovat přechody mezi hladinami Zeemanova multipletu.

Jev, kdy časově proměnné pole  $\mathbf{B}_1$  indukuje přechody mezi hladinami Zeemanova multipletu nazýváme nukleární magnetickou rezonancí. [17]

### 1.2.2. Soubor jaderných spinů v magnetickém poli – Blochovy rovnice

Dosud jsme se zabývali popisem chování izolovaného jádra (jaderného spinu) v magnetickém poli. Takovýto přístup sice dává základní představy o podstatě jevu NMR, ale při studiu jevu NMR v látkách prakticky nelze použít, neboť látka jako taková představuje soubor mnoha jader a nikdy nelze zcela zanedbat vzájemné interakce mezi jádry a interakce s ostatními stupni volnosti, které souhrnně nazýváme mřížkou.

Proto je při popisu chování souboru jader v magnetickém poli nutné studovat chování výsledného magnetického momentu jader připadajícího na jednotkový objem, tedy chování vektoru magnetizace  $\mathbf{M}$  tvořeného souborem jaderných magnetických momentů sledovaných jader.

Vektor magnetizace je tedy makroskopická veličina a jeho chování v magnetickém poli lze popsat klasicky. Působí-li na soubor jader pole typu (1.12), pak lze chování magnetizace popsat jednoduchými fenomenologickými rovnicemi, které nazýváme Blochovy rovnice

$$\begin{aligned} \frac{d M_x}{d t} &= \gamma (\mathbf{M} \times \mathbf{B})_x - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{d M_y}{d t} &= \gamma (\mathbf{M} \times \mathbf{B})_y - \frac{M_y}{T_2} \\ \frac{d M_z}{d t} &= \gamma (\mathbf{M} \times \mathbf{B})_z - \frac{M_z - M_0}{T_1} \end{aligned} . \quad (1.18)$$

Tyto rovnice vycházejí z pohybové rovnice pro střední hodnotu magnetického momentu jádra v magnetickém poli

$$\frac{d\langle \boldsymbol{\mu} \rangle}{dt} = \gamma [\langle \boldsymbol{\mu} \rangle \times \vec{B}], \quad (1.19)$$

ale obsahují další členy popisující spin-spinovou a spin-mřížkovou interakci. Spin-spinová interakce uvnitř soustavy jaderných spinů souvisí s jejich kolektivním chováním, kdežto spin-mřížková interakce souvisí výměnou energie mezi spiny a mřížkou. Tedy se spinový systém vyvíjí do stavu tepelné rovnováhy s mřížkou. Je-li zapnuto pouze stacionární magnetické pole  $\mathbf{B}_0$ , je rovnovážná hodnota magnetizace  $\mathbf{M}_0$  zřejmě orientovaná ve směru pole  $\mathbf{B}_0$ .

Blochovy rovnice předpokládají relaxační charakter ustavování rovnováhy mezi spinovým systémem a mřížkou. Pro podélnou složku magnetizace  $M_z$  se zavádí podélná relaxační doba (spin-mřížková)  $T_1$  a pro příčné složky  $M_x$ ,  $M_y$  příčná relaxační doba (spin-spinová)  $T_2$ . [17]

### 1.3. Interakce ve spinovém systému

Interakce souboru jaderných spinů lze obecně rozdělit na interakce vnější a vnitřní. Vnějšími interakcemi rozumíme interakce s vnějším magnetickým polem. Těmito interakcemi jsme se zabývali v předchozích kapitolách. Jde o interakci se statickým magnetickým polem (Zeemanova interakce), kterou potřebujeme pro pozorování jevu NMR. A o interakci s proměnným magnetickým polem, která nám umožňuje manipulovat se stavem spinového systému – umožňuje nám například vychylovat magnetizaci z rovnovážného stavu. Aplikujeme-li proměnné pole  $\mathbf{B}_1$ , kolmé na směr rovnovážné magnetizace, po dobu  $\tau$ , pak magnetizace bude s osou z svírat úhel

$$\phi = \gamma B_1 \tau. \quad (1.20)$$

Další důležitou interakcí s vnějším polem, která ovlivňuje tvar spektra, je chemický posun, a proto se ním zde budeme podrobněji zabývat.

Vnitřními interakcemi rozumíme interakce uvnitř souboru spinů. Mohou to být interakce mezi jadernými spiny nebo interakce s elektronovým obalem atomů. Tyto interakce mají vliv na tvar spektra a také jsou příčinou relaxačních mechanismů, jak si ukážeme v kapitole 1.4. V této kapitole se budeme zabývat projevy těchto interakcí ve spektrech. Tato práce se věnuje vodíkům ve směsích  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ . Jelikož vodík má spin  $1/2$ , tak se zde budeme věnovat dipól-dipólové interakci a J-interakci. Další dů-

ležitou interakcí uvnitř spinového systému je kvadrupólová interakce, ta však působí pouze na jádra s  $I > 1/2$ , neboť pouze tato jádra mají nenulový elektrický kvadrupólový moment, a proto se jí zde zabývat nebudeme.

### 1.3.1. Chemický posun a chemické stínění

Vložíme-li soubor atomů do vnějšího statického magnetického pole, dojde k interakci mezi elektronovým obalem atomu a magnetickým polem, která vede k polarizaci elektronů v okolí sledovaného jádra. Důsledkem toho je, že lokální pole v místě sledovaného jádra je mírně odlišné od přiloženého statického pole a tedy dochází k mírnému posunu rezonanční frekvence.

Chemické stínění je obecně anizotropní interakcí a popisuje se tenzorem chemického stínění  $\vec{\sigma}$ , který je časově nezávislý v souřadném systému molekuly. Larmorova frekvence sledovaného jádra je potom dána vztahem

$$\omega_0 = -\gamma \mathbf{B}_0 (1 - \vec{\sigma}) . \quad (1.21)$$

Jelikož orientace jednotlivých molekul ve vzorku je různá, měli bychom ve spektru pozorovat rozšířené čáry. V kapalinách se ale díky rychlým rotacím molekul příspěvky různých směrů středují. Ve spektru se tedy projeví pouze izotropní část tenzoru chemického stínění, která je rovna třetině stopy tenzoru chemického stínění a značí se  $\sigma$ . Rezonanční frekvence sledovaných jader v kapalinách je potom rovna

$$\omega_0 = -\gamma \mathbf{B}_0 (1 - \sigma) . \quad (1.22)$$

Velikost chemického stínění lze udávat ve frekvenčních jednotkách. Takto udaná hodnota ovšem závisí na velikosti statického pole  $\mathbf{B}_0$ . Proto se v praxi zavádí tzv. chemický posun, který se uvádí v jednotkách ppm (parts per million), je nezávislý na poli a je definován vztahem

$$\delta_{izo} [ppm] = \frac{\omega_0 - \omega_{st}}{\omega_{st}} \cdot 10^6 = \frac{\sigma_{st} - \sigma_{izo}}{1 - \sigma_{st}} \cdot 10^6 \approx (\sigma_{st} - \sigma_{izo}) \cdot 10^6 , \quad (1.23)$$

kde  $\omega_0$  je Larmorova frekvence jader,  $\omega_{st}$  je Larmorova frekvence jader zvoleného standardu,  $\sigma_{st}$  a  $\sigma_{izo}$  jsou izotropní části tenzorů chemického stínění zvoleného standardu a měřených jader. Jako standard pro měření vodíkových spekter nejčastěji používá signál molekuly TMS (tetramethylsilan,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ).

Jak již bylo řečeno, anizotropní část tenzoru chemického stínění se ve spektrech

kapalin neprojeví. Projeví se však v relaxacích – viz kapitola 1.4. [17]

### 1.3.2. Dipól-dipólová interakce

Další důležitou interakcí uvnitř souboru jader je dipól dipólová interakce, která je v souboru spinů 1/2 nejsilnější interakcí. Jde o přímou interakci mezi dvojicí jaderných magnetických momentů  $\boldsymbol{\mu}_1$ ,  $\boldsymbol{\mu}_2$  (magnetických dipólů), které jsou v prostoru blízko sebe. Každý magnetický dipól kolem sebe vytváří lokální magnetické pole, které působí na ostatní dipóly.

Lokální pole, které kolem sebe vytváří magnetický moment  $\boldsymbol{\mu}_2$  v místě  $\mathbf{r}$  je dáno vztahem

$$\mathbf{B}_{loc} = -\frac{\mu_0}{4\pi r^3} \left( \boldsymbol{\mu}_2 - 3 \frac{\boldsymbol{\mu}_2 \cdot \mathbf{r}}{r^2} \mathbf{r} \right), \quad (1.24)$$

kde  $\mu_0$  je permeabilita vakua a  $r$  je vzdálenost od počátku souřadnic. Hamiltonián dipól-dipólové interakce pro jedno vybrané jádro  $i$  je

$$\hat{H}_D = \frac{\mu_0}{4\pi} \sum_{\substack{j \\ i \neq j}} \frac{\boldsymbol{\mu}_i \cdot \boldsymbol{\mu}_j}{r_{ij}^3} - 3 \frac{(\boldsymbol{\mu}_i \cdot \mathbf{r}_{ij})(\boldsymbol{\mu}_j \cdot \mathbf{r}_{ij})}{r_{ij}^5}, \quad (1.25)$$

kde index  $j$  probíhá přes všechny ostatní jádra v systému,  $\boldsymbol{\mu}_i = \gamma_i \mathbf{I}_i$ ,  $\boldsymbol{\mu}_j = \gamma_j \mathbf{I}_j$  jsou magnetické momenty jednotlivých jader a  $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j$ , kde  $\mathbf{r}_i$  a  $\mathbf{r}_j$  jsou polohové vektory jader  $i$  a  $j$ .

V pevných látkách dipól-dipólová interakce způsobuje rozšíření čar. V kapalinách se tato interakce díky rychlým izotropním rotacím molekul středuje k nule a ve spektrech se neprojeví. V souboru jader se spinem 1/2 je však hlavním relaxačním mechanismem – viz. kapitola 1.4. [17]

### 1.3.3. J-interakce

J-interakcí (J-vazbou, J-couplingem) rozumíme nepřímou dipól-dipólovou interakci mezi dvojicí jaderných magnetických momentů, která je zprostředkována vazebnými elektrony. Na rozdíl od přímé dipól-dipólové interakce, se nestředuje k nule molekulárním pohybem a ovlivňuje tak spektra kapalin.

J-interakci mezi dvěma jádry  $I$  a  $S$  popisuje Hamiltonián

$$\hat{H}_J = 2\pi \hat{\mathbf{I}} \cdot \vec{\mathbf{J}} \cdot \hat{\mathbf{S}}, \quad (1.26)$$

kde  $\vec{J}$  je tenzor J-interakce a  $\hat{I}$ ,  $\hat{S}$  jsou operátory jaderného spinu jader  $I$  a  $S$ .

Projevem J-interakce ve spektru NMR je charakteristické štěpení rezonanční čáry, které odpovídá počtu možných hodnot celkového magnetického momentu sousedních interagujících skupin ekvivalentních jader, tj. jader se stejným chemickým okolím v molekule. Velikost této interakce nezávisí na velikosti statického magnetického pole. [17]

## 1.4. Relaxační mechanismy

Relaxací spinového systému rozumíme proces návratu souboru excitovaných spinových stavů do rovnováhy, kdy vektor magnetizace postupně nabývá své rovnovážné hodnoty. Rychlosti těchto procesů charakterizujeme relaxačními dobami, respektive jejími převrácenými hodnotami, které nazýváme relaxačními rychlostmi.

V kapitole 1.2.2. jsme fenomenologicky zavedli dva typy relaxačních procesů – spin-mřížkovou (podélnou) a spin-spinovou (příčnou) relaxaci, které jsou v Blochových rovnicích popsány relaxačními dobami  $T_1$  a  $T_2$ . Spin-mřížková relaxace popisuje vývoj podélné složky magnetizace  $M_z$  a spin-spinová relaxace popisuje vývoj příčných složek magnetizace  $M_x$  a  $M_y$ . Spin-mřížková relaxace zahrnuje procesy výměny energie mezi spiny a ostatními stupni volnosti (mřížkou), kdežto spin-spinová relaxace souvisí s interakcí mezi spiny navzájem, přičemž jde o adiabatický proces a energie spinového systému se nemění.

V této kapitole se budeme podrobněji zabývat původem relaxačních procesů, přičemž se omezíme pouze na soubor spinů  $1/2$  a na mechanismy, které v tomto souboru působí.

### 1.4.1. Obecný relaxační mechanismus

Zcela obecně lze za původ relaxací označit fluktuace magnetického pole v místě sledovaného jádra. Zdroji těchto fluktuací jsou pohyby molekul, interakce s ostatními jádry (např. dipól-dipólové interakce) a další interakce.

Pro konkrétnější představu se podívejme třeba na x-ovou složku magnetického pole  $B_x$ . Pro jednoduchost předpokládejme zcela náhodné fluktuace magnetického pole. Potom časová střední hodnota x-ové složky  $B_x$  magnetického pole je rovna nule  $\langle B_x(t) \rangle = 0$ . Totéž platí i v případě, kdy nestředujeme přes čas ale přes soubor. Dále

platí, že střední kvadratická odchylka náhodně fluktuujícího pole je nenulová  $\langle B_x^2(t) \rangle \neq 0$  a je stejná pro všechna ekvivalentní jádra v celém systému spinů.

Náhodně fluktuující funkce se popisují pomocí tzv. korelační funkce. V našem případě je náhodně fluktuující funkcí x-ová složka magnetického pole a korelační funkce je tedy rovna

$$K(\tau) = \langle B_x(t) B_x(t+\tau) \rangle, \quad (1.27)$$

kde se střeďuje přes čas  $t$ .

Protože funkce  $B_x(t)$  fluktuuje náhodně, musí korelační funkce splňovat podmínku  $K(\tau) \rightarrow 0$  pro  $\tau \rightarrow \infty$  a také musí v  $\tau=0$  nabývat svého maxima. Tyto požadavky splňuje exponenciální funkce

$$K(\tau) = \langle B_x^2(t) \rangle e^{-\frac{|\tau|}{\tau_c}}, \quad (1.28)$$

kde  $\tau_c$  je korelační čas udávající rychlost fluktuace.

Relaxačních mechanismy se popisují spektrální hustotou korelační funkce, která je definovaná vztahem

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} K(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau. \quad (1.29)$$

Pro výše diskutované náhodně fluktuujícího pole pak přímou integrací dostaneme

$$J(\omega) = \langle B_x^2(t) \rangle \frac{2\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2}. \quad (1.30)$$

Pro spin-mřížkovou relaxační rychlost pak máme

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = \frac{\gamma^2}{2} \langle B_x^2(t) \rangle \frac{\tau_c}{1+\omega_0^2\tau_c^2}. \quad (1.31)$$

### 1.4.2. Relaxace vlivem dipól-dipólové interakce

V předchozí kapitole jsme uvedli, že původ relaxací je obecně ve fluktuacích pole v místě jádra a také jsme uvedli to, že jedním ze zdrojů těchto fluktuací je dipól-dipólová interakce. V souboru jader se spinem 1/2 je tato interakce nejsilnější interakcí, a proto se jí zde budeme podrobněji zabývat.

Relaxaci dipól-dipólovou interakcí poprvé podrobně popsali N. Bloembergen, E. M. Purcell a R.V. Pound v publikaci [18].

Při odvozování vztahů pro relaxační rychlosti dané dipól-dipólovou interakcí vyjde-  
me z hamiltoniánu systém spinů vloženého do magnetického pole

$$\hat{H} = \sum_i \gamma_i \hbar \mathbf{I}_i \cdot \mathbf{B}_0 + \sum_i \gamma_i \hbar \mathbf{I}_i \cdot \sum_j \frac{\gamma_j \hbar \mathbf{I}_j}{r_{ij}^3} - \frac{3 \gamma_j \hbar \mathbf{r}_{ij} \cdot (\mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{I}_j)}{r_{ij}^5}. \quad (1.32)$$

První člen popisuje Zeemanovu interakci se statickým polem a druhý člen popisuje  
dipól-dipólovou interakci. V sumaci přes  $j$  je ukryto lokální magnetické pole, které  
vzniká dipól-dipólovou interakcí mezi jádry v systému a které cítí každé sledované  
jádro. Přejdeme-li do sférických souřadnic, pak lze člen popisující dipól-dipólovou  
interakci v tomto hamiltoniánu vhodnými úpravami převést do tvaru

$$\hat{H}_{DD} = \sum_i \sum_j \frac{\gamma_i^2 \hbar^2}{r_{ij}^3} (A + B + C + D + E + F), \quad (1.33)$$

kde

$$\begin{aligned} A &= I_{zi} I_{zj} (1 - 3 \cos^2 \theta_{ij}) \\ B &= -\frac{1}{4} (I_i^+ I_j^+ + I_i^- I_j^-) (1 - 3 \cos^2 \theta_{ij}) \\ C &= -\frac{3}{2} (I_i^+ I_{zj} + I_j^+ I_{zi}) \sin \theta_{ij} \cos \theta_{ij} e^{-i \phi_{ij}} e^{i \gamma H_0 t} \\ D &= -\frac{3}{2} (I_i^- I_{zj} + I_j^- I_{zi}) \sin \theta_{ij} \cos \theta_{ij} e^{i \phi_{ij}} e^{-i \gamma H_0 t}, \\ E &= -\frac{3}{4} I_i^+ I_j^+ \sin^2 \theta_{ij} e^{-2i \phi_{ij}} e^{2i \gamma H_0 t} \\ F &= -\frac{3}{4} I_i^- I_j^- \sin^2 \theta_{ij} e^{2i \phi_{ij}} e^{-2i \gamma H_0 t} \end{aligned} \quad (1.34)$$

kde  $I_x^\pm = I_x \pm i I_y$  jsou zvyšovací a snižovací operátory.

Členy A a B jsou poruchou nezávislou na čase, kdežto členy C až F jsou periodickou  
poruchou malé amplitudy. Je-li celková energie systému popsána kvantovým číslem  
 $m$ , můžeme členy A až F rozdělit do tří skupin podle působení na vlnovou funkci  
celého systému. Členy A a B nemění hodnotu kvantového čísla  $m$ , členy C a D zvy-  
šují, resp. snižují kvantové číslo  $m$  o jedničku ( $\Delta m = 1$ ) a členy E a F zvyšují, resp.  
snižují kvantové číslo  $m$  o dvě ( $\Delta m = 2$ ).



Pokud bychom uvažovali zcela rigidní mřížku, pak by přechody dané členy C až F byly zakázané. Jestliže ale mřížka není zcela rigidní, potom členy C až F mohou indukovat přechody mezi jednotlivými energetickými hladinami, čímž dochází k výměně energie mezi systémem a mřížkou a tedy k relaxaci do rovnovážného stavu.

Dále definujeme Fourierovy obrazy jednotlivých prostorových částí v členech A až F násobených  $r_{ij}^{-3}$

$$\begin{aligned} \left\langle \sum_j \left| (1 - 3 \cos^2 \theta_{ij}(t)) r_{ij}^{-3}(t) \right|^2 \right\rangle &= \int_{-\infty}^{\infty} J^{(0)}(\omega) d\omega \\ \left\langle \sum_j \left| \sin \theta_{ij}(t) \cos \theta_{ij}(t) e^{i\phi_{ij}(t)} r_{ij}^{-3}(t) \right|^2 \right\rangle &= \int_{-\infty}^{\infty} J^{(1)}(\omega) d\omega, \\ \left\langle \sum_j \left| \sin^2 \theta_{ij}(t) e^{2i\phi_{ij}(t)} r_{ij}^{-3}(t) \right|^2 \right\rangle &= \int_{-\infty}^{\infty} J^{(2)}(\omega) d\omega \end{aligned} \quad (1.35)$$

kde  $\omega$  je úhlová frekvence.

Uvažme členy C až F. Nastane-li případ kdy  $J^{(1)}(-\omega_0)$  a  $J^{(1)}(\omega_0)$ , kde  $\omega_0$  je úhlová frekvence Larmorovy precese, jsou nenulové, pak se členy C a D stanou poruchami nezávislými na čase, což umožní přechody s  $\Delta m = 1$ . Podobně jsou-li  $J^{(2)}(-2\omega_0)$  a  $J^{(2)}(2\omega_0)$  nenulové, pak se členy E a F stanou poruchami nezávislými na čase a umožní se přechody s  $\Delta m = 2$ .

Dále pomocí poruchové teorie můžeme vypočítat pravděpodobnost přechodu s  $\Delta m = 1$ . Pro soubor stejných jader dostaneme

$$W_{m_i \rightarrow m_i+1} = \frac{3}{4} \gamma^4 \hbar^2 (I - m_i)(I + m_i + 1) I(I + 1) \left( J^{(1)}(\omega_0) + \frac{1}{2} J^{(2)}(2\omega_0) \right) \quad (1.36)$$

a pro soubor různých jader

$$W_{m_i \rightarrow m_i+1} = \frac{3}{4} \gamma_i^2 \hbar^2 (I_i - m_i)(I_i + m_i + 1) \left( \sum_j \gamma_j^2 I_j(I_j + 1) \right) \left( J_j^{(1)}(\omega_{0i}) + \frac{1}{2} J_j^{(2)}(\omega_{0j} + \omega_{0i}) \right), \quad (1.37)$$

kde  $\omega_{0j} = \gamma_j B_0$ . [18]

A nyní konečně můžeme na základě rozboru pravděpodobností přechodů mezi hladinami s uvážením, že populace v rovnovážném stavu jsou rozděleny Boltzmanovsky,

odvodit vztahy pro spin-mřížkovou a spin-spinovou relaxační rychlost. Pro soubor stejných jader dostaneme [17,18]

$$R_1^{DD} = \frac{1}{T_1^{DD}} = \frac{3}{2} \gamma^4 \hbar^2 I(I+1) \left( J^{(1)}(\omega_0) + \frac{1}{2} J^{(2)}(2\omega_0) \right), \quad (1.38)$$

$$R_2^{DD} = \frac{1}{T_2^{DD}} = \gamma^4 \hbar^2 I(I+1) \left( \frac{3}{8} J^{(0)}(0) + \frac{15}{4} J^{(1)}(\omega_0) + \frac{3}{8} J^{(2)}(2\omega_0) \right), \quad (1.39)$$

kde  $J^{(0)}(\omega)$ ,  $J^{(1)}(\omega)$ ,  $J^{(2)}(\omega)$  jsou definovány vztahy (1.35).

Pokud zavedeme následující funkce (jedná se o funkce souřadnic vystupujících v členech (1.34) násobených  $r_{ij}^{-3}$ )

$$\begin{aligned} F_0 &= (1 - 3 \cos^2 \theta_{ij}) r_{ij}^{-3} \\ F_1 &= \sin \theta_{ij} \cos \theta_{ij} e^{i\phi_{ij}} r_{ij}^{-3} \\ F_2 &= \sin^2 \theta_{ij} e^{2i\phi_{ij}} r_{ij}^{-3} \end{aligned} \quad (1.40)$$

Potom pro spektrální hustoty  $J^{(k)}(\omega)$ , kde  $k=0,1,2$ , podle [18] máme

$$J^{(k)}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} K^{(k)}(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau, \quad (1.41)$$

kde

$$K^{(k)}(\tau) = \langle F_k(t) F_k^*(t) \rangle e^{-\frac{|\tau|}{\tau_c}}. \quad (1.42)$$

A integrací dostaneme spektrální funkci

$$J^{(k)}(\omega) = \langle F_k(t) F_k^*(t) \rangle \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}. \quad (1.43)$$

Jsou-li procesy probíhající ve vzorku dostatečně rychlé, že platí  $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$ , pak podle [19] platí

$$R_1^{DD} = R_2^{DD}. \quad (1.44)$$

### 1.4.3. Relaxace vlivem anizotropie chemického stínění

Dalším relaxačním mechanismem v souboru jader se spinem 1/2 je anizotropie chemického stínění.

Tenzor chemického stínění je obecně anizotropní. Pokud v takovémto případě mole-

kula rotuje, pak se v místě sledovaného jádra tvoří lokální fluktuující magnetické pole. Označíme-li amplitudu této interakce, která závisí na složkách tenzoru chemického stínění,  $CSA_{eff}$ , pak příspěvky k relaxačním rychlostem od anizotropie chemického stínění jsou dány vztahy [19]

$$R_1^{CSA} = \frac{1}{3} (\gamma B_0)^2 CSA_{eff}^2 \left( \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right), \quad (1.45)$$

$$R_2^{CSA} = \frac{1}{3} (\gamma B_0)^2 CSA_{eff}^2 \left[ \frac{2 \tau_c}{3} + \frac{1}{2} \left( \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \right]. \quad (1.46)$$

## 1.5. Chemická výměna

Chemickou výměnou obecně rozumíme jakýkoliv proces, při kterém dochází ke změně chemického okolí sledovaného jádra a tedy i ke změně jeho chemického posunu. Takovýmto procesem může být například chemická reakce, konformační změna, tvorba molekulových komplexů, apod. V NMR lze chemickou výměnu pozorovat jednak ve spektru a jednak v relaxacích.

### 1.5.1. Základní pojmy

Uvažme proces výměny mezi dvěma stavy  $A$  a  $B$  s relativními populacemi  $p_A$  a  $p_B$ , kdy rychlost dopředné přeměny je charakterizována rychlostní konstantou prvního řádu  $k_1$  a zpětná přeměna je charakterizována rychlostní konstantou  $k_{-1}$ .



Potom tento proces lze charakterizovat rychlostní konstantou chemické výměny

$$k_{ex} = k_1 + k_{-1} = \frac{k_1}{p_B} = \frac{k_{-1}}{p_A}. \quad (1.47)$$

Dále můžeme chemické výměně přiřadit korelační čas

$$\tau_{ex} = \frac{1}{k_{ex}}, \quad (1.48)$$

který charakterizuje doby života jednotlivých stavů.

### 1.5.2. Bloch-McConnellovy rovnice

Dochází-li v sledovaném systému k chemické výměně, je třeba Blochovy rovnice upravit tak, aby zahrnovaly tok magnetizace mezi stavy  $A$  a  $B$ . Takto upravené rovnice pak nazýváme Bloch-McConnellovy a pro případ výše popsané dvoustavové výměny mají tvar[20]:

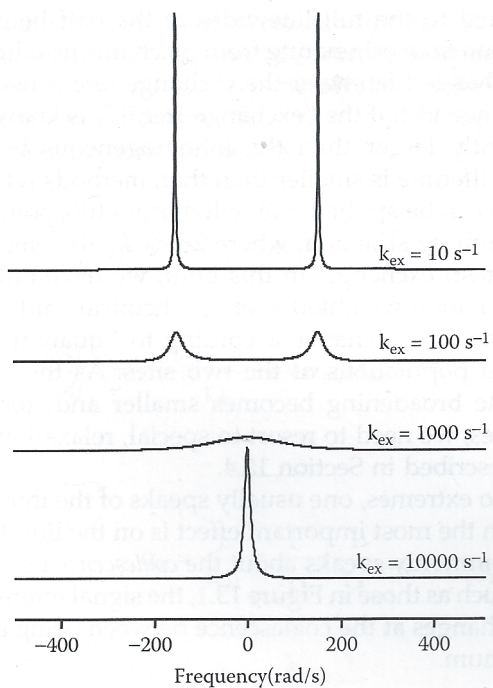
$$\begin{aligned}
 \frac{d M_x^A}{d t} &= \gamma(\mathbf{M}^A \times \mathbf{B}^A)_x - \frac{M_x^A}{T_2^A} - k_1 M_x^A + k_{-1} M_x^B \\
 \frac{d M_y^A}{d t} &= \gamma(\mathbf{M}^A \times \mathbf{B}^A)_y - \frac{M_y^A}{T_2^A} - k_1 M_y^A + k_{-1} M_y^B \\
 \frac{d M_z^A}{d t} &= \gamma(\mathbf{M}^A \times \mathbf{B}^A)_z - \frac{M_z^A - M_0^A}{T_1^A} - k_1 M_z^A + k_{-1} M_z^B \\
 \frac{d M_x^B}{d t} &= \gamma(\mathbf{M}^B \times \mathbf{B}^B)_x - \frac{M_x^B}{T_2^B} - k_{-1} M_x^B + k_1 M_x^A \\
 \frac{d M_y^B}{d t} &= \gamma(\mathbf{M}^B \times \mathbf{B}^B)_y - \frac{M_y^B}{T_2^B} - k_{-1} M_y^B + k_1 M_y^A \\
 \frac{d M_z^B}{d t} &= \gamma(\mathbf{M}^B \times \mathbf{B}^B)_z - \frac{M_z^B - M_0^B}{T_1^B} - k_{-1} M_z^B + k_1 M_z^A
 \end{aligned} \tag{1.49}$$

kde  $\mathbf{M}^A$ ,  $\mathbf{M}^B$  je magnetizace jader ve stavu  $A$ , resp.  $B$ ,  $M_x^A$ ,  $M_y^A$ ,  $M_z^A$ ,  $M_x^B$ ,  $M_y^B$ ,  $M_z^B$  jsou jednotlivé složky magnetizace jader ve stavu  $A$ , resp.  $B$ ,  $\mathbf{B}^A$ ,  $\mathbf{B}^B$  je magnetické pole v místě jader ve stavu  $A$ , resp.  $B$ ,  $T_1^A$ ,  $T_1^B$ ,  $T_2^A$ ,  $T_2^B$  jsou spin-mřížkové a spin-spinové relaxační doby v jednotlivých stavech,  $\gamma$  je gyromagnetický poměr a  $k_1$ ,  $k_{-1}$  jsou rychlostní konstanty dopředné a zpětné reakce prvního řádu. Chemická výměna je v těchto rovnicích popsána posledníma dvěma členy každé rovnice, které popisují úbytek a nárůst magnetizace jednotlivých stavů chemickou výměnou. Zbylé členy pocházejí ze standardních Blochových rovnic (1.18).

### 1.5.3. Projevy chemické výměny ve spektru

Je-li chemická výměna pomalá, čímž rozumíme  $k_{ex} \ll \Delta \omega$ , kde  $\Delta \omega$  je rozdíl rezonančních úhlových frekvencí ve stavu  $A$  a  $B$ , pak ve spektru pozorujeme dvě úzké

čáry, jejichž intenzita je daná populacemi jednotlivých stavů. Bude-li se rychlost chemické výměny zvyšovat, pak se tyto čáry začnou postupně rozšiřovat, až splynou v jednu širokou čáru. S dalším růstem rychlosti chemické výměny dochází k postupnému zužování této čáry. Typický průběh tvaru spektra v závislosti na rychlosti chemické výměny je zobrazen na obrázku 1.12. [21]



Obr.1.12: Typický tvar spektra v závislosti na rychlosti chemické výměny pro  $p_A = p_B = 1/2$ ,  $\Delta \omega = 300 \text{ rad s}^{-1}$ . [21]

#### 1.5.4. Vliv chemické výměny na relaxace

V předchozí kapitole jsme popsali projevy chemické výměny ve spektru v závislosti na rychlosti chemické výměny. Je-li rychlost chemické výměny natolik velká, že rozšíření signálu ve spektru je velmi malé a tudíž přímo nepozorovatelné, lze chemickou výměnu studovat pomocí relaxací. Konkrétně chemická výměna přispívá k spin-spinové relaxační době, přičemž tento příspěvek je navíc na rozdíl od ostatních relaxačních mechanismů závislý na echočasu v sekvenci CPMG, která se používá pro měření spin-spinové relaxační doby (viz. kapitola 2.1.3.).

Předpokládejme, že ve sledovaném systému probíhá chemická výměna mezi dvěma stavy  $A$  a  $B$  popsaná v kapitole 1.5.1. Dále předpokládejme, že systém je v

rovnováže a že jádra ve stavech  $A$  a  $B$  relaxují se stejnou relaxační dobou. Potom podle [22] dostaneme řešením Bloch-McConnelových rovnic následující závislost spin-spinové relaxační rychlosti na echočasu:

$$R_2 = R_2^{nonex} + \frac{p_A p_B (\Delta \omega)^2}{k_{ex}} \left[ 1 - \frac{2}{t_{echo} k_{ex}} \tanh \left( \frac{k_{ex} t_{echo}}{2} \right) \right], \quad (1.50)$$

kde  $R_2^{nonex}$  je příspěvek od ostatních interakcí (např. dipól-dipólová interakce, anizotropie chemického stínění, ...),  $t_{echo}$  je echočas,  $p_A$ ,  $p_B$  jsou relativní populace jednotlivých stavů,  $\Delta \omega = \omega_A - \omega_B$  je rozdíl rezonančních kruhových frekvencí v jednotlivých stavech a  $k_{ex}$  je rychlost výměny daná vztahem (1.47).

Dále uvažme případ, kdy ve sledovaném systému probíhají dva procesy chemické výměny, tedy případ popsany chemickou rovnicí



kde stavy  $A$ ,  $B$  a  $C$  jsou charakterizovány svými populacemi ( $p_A$ ,  $p_B$ ,  $p_C$ ) a svými kruhovými rezonančními frekvencemi ( $\omega_A$ ,  $\omega_B$ ,  $\omega_C$ ) potažmo chemickými posuny. Konstanty  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_{-2}$  jsou rychlostní konstanty prvního řádu popisující průběh jednotlivých reakcí.

V takovémto případě pro závislost spin-spinové relaxační rychlosti na echo-čase platí [23]

$$R_2 = R_2^{nonex} + \frac{\Phi_1}{k_1^{ex}} \left[ 1 - \frac{2}{t_{echo} k_1^{ex}} \tanh \left( \frac{k_1^{ex} t_{echo}}{2} \right) \right] + \frac{\Phi_2}{k_2^{ex}} \left[ 1 - \frac{2}{t_{echo} k_2^{ex}} \tanh \left( \frac{k_2^{ex} t_{echo}}{2} \right) \right], \quad (1.51)$$

kde  $R_2^{nonex}$  je příspěvek od ostatních interakcí (např. dipól-dipólová interakce, anizotropie chemického stínění, ...),  $t_{echo}$  je echočas a

$$\Phi_1 = \frac{-k_2^{ex} \alpha_1 + \alpha_2}{Z}, \quad (1.52)$$

$$\Phi_2 = \frac{-k_1^{ex} \alpha_1 + \alpha_2}{Z}, \quad (1.53)$$

$$k_1^{ex} = \frac{k_{ex} + Z}{2}, \quad (1.54)$$

$$k_2^{ex} = \frac{k_{ex} - Z}{2}, \quad (1.55)$$

$$k_{ex} = k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}, \quad (1.56)$$

$$Z = \sqrt{k_{ex}^2 - 4B}, \quad (1.57)$$

$$B = k_{-1}k_{-2} + k_1k_{-2} + k_{-1}k_2, \quad (1.58)$$

$$\alpha_1 = p_A p_B (\Delta \omega_{AB})^2 + p_B p_C (\Delta \omega_{BC})^2 + p_A p_C (\Delta \omega_{AC})^2, \quad (1.59)$$

$$\alpha_2 = p_A [k_1 (\Delta \omega_{AB})^2 + k_2 (\Delta \omega_{AC})^2], \quad (1.60)$$

$$\Delta \omega_{AB} = \omega_B - \omega_A, \quad (1.61)$$

$$\Delta \omega_{BC} = \omega_C - \omega_B, \quad (1.62)$$

$$\Delta \omega_{AC} = \omega_C - \omega_A, \quad (1.63)$$

$$p_A = \frac{k_{-1}k_{-2}}{B}, \quad (1.64)$$

$$p_B = \frac{k_1k_{-2}}{B}, \quad (1.65)$$

$$p_C = \frac{k_{-1}k_2}{B}. \quad (1.66)$$

Dále pro účely dalšího textu této práce budeme potřebovat ze vztahů (1.52)-(1.66) odvodit několik následujících vztahů.

Nejprve budeme chtít vyjádřit vztahy pro kvadráty rozdílů úhlových rezonančních frekvencí v jednotlivých stavech v závislosti na naměřených datech ( $k_1^{ex}$ ,  $k_2^{ex}$ ,  $\Phi_1$  a  $\Phi_2$ ) a na populacích ( $p_A$ ,  $p_B$ ,  $p_C$ ), o kterých předpokládáme, že je známe. K tomu bude potřeba odvodit několik následujících pomocných vztahů.

Sečtením a odečtením vztahů (1.54) a (1.55) dostaneme

$$k_{ex} = k_1^{ex} + k_2^{ex}, \quad (1.67)$$

$$Z = k_1^{ex} - k_2^{ex} . \quad (1.68)$$

Dosazením (1.68) do (1.52) a (1.53) a vyřešením vzniklé soustavy rovnic dostaneme

$$\alpha_1 = \Phi_1 - \Phi_2 , \quad (1.69)$$

$$\alpha_2 = \frac{1}{2} [(k_1^{ex} - k_2^{ex})(\Phi_1 + \Phi_2) + (k_1^{ex} + k_2^{ex})(\Phi_1 - \Phi_2)] . \quad (1.70)$$

Dosadíme-li (1.67) a (1.68) do (1.57) dostaneme

$$B = k_1^{ex} k_2^{ex} . \quad (1.71)$$

Dále uvažme, že v rovnováze chemického děje popsaného rovnicí (II) platí

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_{-1}[B] = 0 , \quad (1.72)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2[A] - k_{-2}[C] = 0 . \quad (1.73)$$

Odtud potom máme

$$k_{-1} = \frac{[A]}{[B]} k_1 = \frac{p_A}{p_B} k_1 , \quad (1.74)$$

$$k_{-2} = \frac{[A]}{[C]} k_2 = \frac{p_A}{p_C} k_2 , \quad (1.75)$$

kde  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $[C]$  značí molární koncentraci jader ve stavech A, B a C. Poměry molárních koncentrací ve vztazích (1.74) a (1.75) jsou rovny poměrům populací, neboť také platí

$$p_A = \frac{[A]}{[A] + [B] + [C]} , \quad (1.76)$$

$$p_B = \frac{[B]}{[A] + [B] + [C]} , \quad (1.77)$$

$$p_C = \frac{[C]}{[A] + [B] + [C]} . \quad (1.78)$$

Dosadíme-li (1.74) a (1.75) do (1.56) a (1.58) dostaneme soustavu rovnic pro  $k_1$ ,  $k_2$ , jejíž řešením je:



$$k_1^{1,2} = \frac{k_{ex} \pm \sqrt{k_{ex}^2 - 4 B p_B \left(1 + \frac{p_A}{p_B}\right) \left(1 + \frac{p_C}{p_A}\right)}}{2 \left(1 + \frac{p_A}{p_B}\right)}, \quad (1.79)$$

$$k_2^{1,2} = \frac{B p_B p_C}{p_A} \frac{1}{k_1^{1,2}}. \quad (1.80)$$

A nyní můžeme konečně odvodit vztahy pro  $(\Delta \omega_{AB})^2$ ,  $(\Delta \omega_{BC})^2$  a  $(\Delta \omega_{AC})^2$ . Z (1.61) až (1.63) plyne

$$(\Delta \omega_{BC})^2 = (\Delta \omega_{AC} - \Delta \omega_{AB})^2. \quad (1.81)$$

A vyřešíme-li soustavu rovnic (1.59), (1.60) a (1.81) dostaneme

$$(\Delta \omega_{AB})_{1,2}^2 = \frac{-S \pm \sqrt{S^2 - 4RT}}{2R}, \quad (1.82)$$

$$(\Delta \omega_{AC})_{1,2}^2 = \frac{\alpha_2 - p_A k_1 (\Delta \omega_{AB})_{1,2}^2}{p_A k_2}, \quad (1.83)$$

kde

$$R = a - b \frac{k_1}{k_2} + e \frac{k_1^2}{k_2^2}, \quad (1.84)$$

$$S = \frac{b \alpha_2}{p_A k_2} - c + d \frac{k_1}{k_2} - 2e \frac{\alpha_2 k_1}{p_A k_2^2}, \quad (1.85)$$

$$T = \frac{e \alpha_2^2}{p_A^2 k_2^2} - \frac{d \alpha_2}{p_A k_2} + \alpha_1^2, \quad (1.86)$$

$$a = p_B^2 (p_A + p_C)^2, \quad (1.87)$$

$$b = 2 p_B p_C (p_A + p_B)(p_A + p_C) - 4 p_B^2 p_C^2, \quad (1.88)$$

$$c = 2 \alpha_1 p_B (p_A + p_C), \quad (1.89)$$

$$d = 2 \alpha_1 p_C (p_A + p_B), \quad (1.90)$$

$$e = p_C^2 (p_A + p_B)^2. \quad (1.91)$$

A dále také budeme v dalším textu potřebovat opačný postup, kdy naopak budeme předpokládat, že známe jednotlivé rozdíly úhlových rezonančních frekvencí v jednotlivých stavech a budeme z naměřených dat chtít určit populace jednotlivých stavů.

Populace jednotlivých stavů jsou definovány tak, že platí

$$p_A + p_B + p_C = 1 . \quad (1.92)$$

Dále k této rovnici přidáme rovnici (1.59) a (1.60), do které za  $k_1$  a  $k_2$  dosadíme z (1.79) a (1.80). Takto získáme soustavu tří nelineárních rovnic pro tři neznámé  $p_A$ ,  $p_B$ ,  $p_C$ . Tato soustava je však natolik složitá, že její řešení je snadnější hledat numericky.

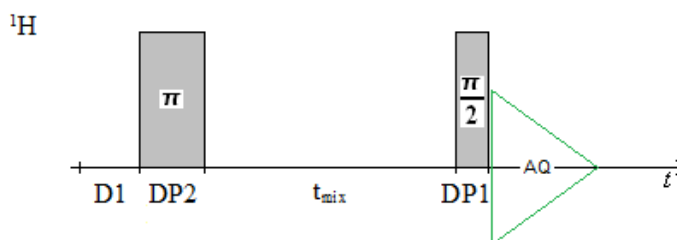
## 2. Experimentální metody měření relaxačních dob

### 2.1. Základní pulsní sekvence

#### 2.1.1. Inversion recovery

Nejčastěji používanou pulsní sekvencí pro měření spin-mřížkové relaxační doby je sekvence Inversion recovery (IR) (v překladu „obnova po inverzi“). [17]

Sekvence se skládá z dvou pulsů -  $\pi$  a  $\pi/2$  (viz. obr.2.1). Před prvním pulsem je zařazena opakovací doba  $DI$ , kterou je třeba nastavit dostatečně dlouhou, aby systém dospěl do rovnováhy – standardně se používá  $DI \geq 5 T_1$ . Po skončení této doby následuje první  $\pi$  puls, který otočí magnetizaci okolo osy  $x$  o úhel  $\pi$ . Po prvním pulsu je tedy magnetizace orientována v záporném směru osy  $z$  a její velikost je rovna rovnovážné hodnotě, tedy  $\mathbf{M}=(0,0,-M_0)$ . Po tomto pulsu následuje směšovací perioda (tzv. „mixing time“,  $t_{mix}$ ), během níž magnetizace, respektive její  $z$ -ová složka, relaxuje v důsledku spin-mřížkové relaxace k rovnovážné hodnotě. Dále je v čase  $t_{mix}$  aplikován druhý, tentokrát  $\pi/2$  puls, kterým se magnetizace otočí kolem osy  $x$  do směru osy  $-y$ . Po tomto pulsu následuje akvizice, během níž je nabírán vzniklý signál volné precese (FID). Amplituda tohoto signálu je úměrná složce magnetizace  $M_z$  v čase  $t_{mix}$ .



Obr. 2.1: Sekvence Inversion recovery.  
 $DI$  -opakovací doba,  $DP1$  -délka  $\pi/2$  -pulsu  $DP2$  -  
délka  $\pi$  -pulsu,  $t_{mix}$  -směšovací perioda,  $AQ$  - akvizice  
dat.

Řešením Blochovy rovnice

$$\frac{dM_z}{dt_{mix}} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (2.1)$$

s počáteční podmínkou  $M_z(0) = -M_0$  dostaneme vztah pro intenzitu signálu v závislosti na délce směřovací periody  $t_{mix}$

$$M_z(t_{mix}) = M_0 \left( 1 - 2e^{-\frac{t_{mix}}{T_1}} \right). \quad (2.2)$$

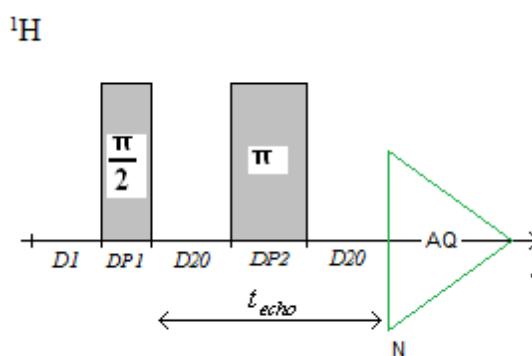
Naměřením intenzity signálu pro různé hodnoty délky směřovací periody  $t_{mix}$  lze následným fitem naměřených dat závislostí (2.2) určit hodnotu spin-mřížkové relaxační doby. V praxi se však jen obtížně povede nastavit délky pulsů přesně tak, aby sklápely přesně o  $\pi$ , resp. o  $\pi/2$ . Proto je třeba naměřená data fitovat vztahem

$$M_z(t_{mix}) = A - 2Be^{-\frac{t_{mix}}{T_1}}. \quad (2.3)$$

### 2.1.2. Spinové echo

Základní metodou měření spin-spinové relaxační doby je sekvence spinového echa (SE). [17]

Na začátku sekvence je opět zařazena opakovací doba. Po této době jsou v sekvenci zařazeny dva pulsy -  $\pi/2$  a  $\pi$  (viz. obr.2.2), které jsou odděleny dobou  $D20$ . Čas  $t_{echo} = 2D20 + DP2$ , kde  $DP2$  je délka  $\pi$ -pulsu, nazýváme echo-časem.



Obr. 2.2: Sekvence spinového echa.  $D1$  -opakovací doba,  $DP1$  -délka  $\pi/2$  -pulsu  $DP2$  -délka  $\pi$  -pulsu,  $D20$  -doba mezi pulsy,  $t_{echo}$  echo čas,  $AQ$  - akvizice dat.

Po prvním pulsu vzniká signál volné precese, který je v důsledku relaxačních procesů a nehomogenit statického magnetického pole utlumován (na obrázku není vyznačen). Bezprostředně po vymizení signálu volné precese ale systém spinů není v rovnovážném stavu. Příčné složky magnetizace v jednotlivých místech vzorku jsou nenulové, ale v důsledku nehomogenit pole precedují s různými fázemi a tudíž se vzájemně vyruší. Druhým  $\pi$ -pulesem dojde ke sklopení magnetizace kolem osy  $x$  o úhel  $\pi$ . Důsledkem tohoto je, že v čase  $D20$  po druhém pulsu dojde k opětovnému zfázování příčných složek magnetizace a vznikne signál spinového echa, který nabíráme při akvizici.

Intenzita naměřeného signálu je úměrná příčné složce magnetizace, jejíž velikost je závislá na echo čase  $t_{echo}$ . Řešením Blochových rovnic pro příčné složky magnetizace

$$\begin{aligned}\frac{d M_x}{d t} &= \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_x - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{d M_y}{d t} &= \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_y - \frac{M_y}{T_2},\end{aligned}\tag{2.4}$$

dostaneme

$$M_{x,y}(t_{echo}) = M_0 e^{-\frac{t_{echo}}{T_2}}.\tag{2.5}$$

Naměřením intenzity signálu spinového echa pro různé echo časy a následným fitem naměřených dat závislostí (2.5) můžeme určit spin-spinovou relaxační dobu.

### 2.1.3. Sekvence CPMG

Měření  $T_2$  sekvencí spinového echa se v praxi potýká s problémem nehomogenit statického magnetického pole a s difuzí.

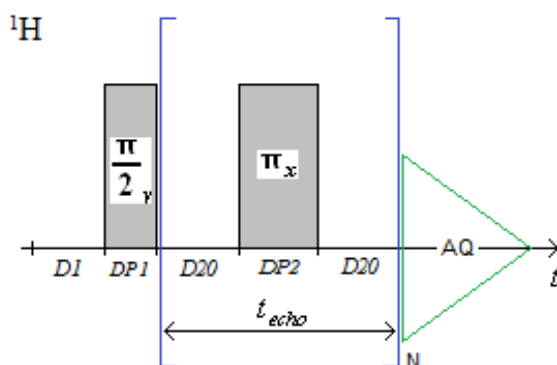
Nehomogenity statického magnetického pole se projeví v průběhu závislosti intenzity signálu na echo čase. Excitované jádro preceduje s frekvencí danou lokální hodnotou magnetického pole. Díky difuzi se ale po nějaké době dostane do jiného místa v prostoru, kde preceduje s jinou frekvencí danou jinou hodnotou lokálního pole. Poté se opět přemístí do jiného místa s další hodnotou Larmorovy frekvence, atd. Závislost intenzity signálu spinového echa na echo čase je z tohoto důvodu odlišná od závislosti v dokonale homogenním magnetickém poli, protože vliv neho-

mogenit a difuze způsobí rychlejší pokles intenzity spinového echa. V takovémto případě tedy vztah (2.5) nelze použít.

Vliv difuze lze však potlačit použitím speciální pulsní sekvence CPMG, jejíž název je odvozen od jmen autorů této sekvence: Carr, Purcell, Meiboom, Gill. [24]

Sekvence je zobrazena na obrázku 2.3. Sekvence se skládá z opakovací doby  $DI$  následované  $\pi/2$  pulsem aplikovaným ve směru osy  $y$ . Po tomto pulsu následuje  $N$  opakování podsekvence složené z doby  $D20$ ,  $\pi$ -pulsu v ose  $x$  o délce  $DP2$  a doby  $D20$ . Echo čas  $t_{echo} = 2D20 + DP2$  zůstává v této sekvenci konstantní a tedy měříme závislost intenzity signálu spinového echa na počtu ech  $N$  (subsekvencí  $D20 - \pi - D20$ ), přičemž tato závislost je daná vztahem

$$M_{xy}(N t_{echo}) = M_0 e^{-\frac{N t_{echo}}{T_2}} \quad (2.6)$$



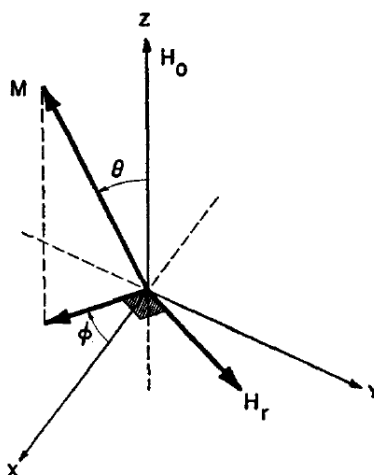
Obr. 2.3: Sekvence CPMG.  
 $DI$  -opakovací doba,  $DP1$  -délka  $\pi/2$  -pulsu  
 $DP2$  -délka  $\pi$  -pulsu,  $D20$  -doba mezi pulsy,  
 $t_{echo}$  echo čas,  $AQ$  - akvizice dat.

## 2.2. Radiační damping

Radiační damping je jev, který negativně ovlivňuje měření silných NMR signálů, a tedy ovlivňuje i měření relaxačních dob vzorků se silným NMR signálem. Protože signál čisté vody je díky vysoké koncentraci vodíků ( $110,6 \text{ mol l}^{-1}$ ) velmi silný, budeme se zde podrobněji zabývat podstatou radiačního dampingu.

Uvažme vzorek umístěný v konstantním magnetickém poli orientovaném v ose  $z$  o intenzitě  $H_0$ . Dále uvažme, že na vzorek působí kontinuální radiofrekvenční pole  $2H_1 \cos \omega t$  ve směru osy  $x$ . Potom magnetizace vzorku  $\mathbf{M}$  preceduje kolem osy  $z$  pod úhlem  $\theta$  (viz. obr.2.4) a její složky jsou

$$\begin{aligned} M_x &= M \sin \theta \cos \phi \\ M_y &= -M \sin \theta \sin \phi \\ M_z &= M \cos \theta \end{aligned} \quad (2.7)$$



Obr. 2.4: Situace za přítomnosti radiačního dampingu. [25]

Složka magnetizace v rovině  $xy$  je rovna  $M \sin \theta$ . V důsledku rotace této složky kolem osy  $z$  se v cívce rezonančního obvodu sondy indukují proudy, které vytváří další „radiačně-dampingové“ radiofrekvenční pole  $H_r$ , které působí na soubor spinů ve vzorku. Toto pole je kolmé na projekci magnetizace do roviny  $xy$  a jeho velikost je daná vztahem

$$H_r = k M \sin \theta, \quad (2.8)$$

kde

$$k = 2\pi Q f, \quad (2.9)$$

kde  $Q$  je faktor kvality charakterizující rezonanční obvod sondy a  $f$  je faktor plnění udávající vyplnění cívky vzorkem [25].

Rozložením radiofrekvenčního pole do dvou proti sobě rotujících složek v rovině  $xy$

o velikosti  $H_1$  a uvážením pouze složky rotující souhlasně se směrem precese magnetizace dostaneme složky celkového pole působícího na vzorek

$$\begin{aligned} H_x &= H_1 \cos \omega t + H_r \sin \phi \\ H_y &= -H_1 \sin \omega t + H_r \cos \phi \\ H_z &= H_0 \end{aligned} \quad (2.10)$$

Uvážíme-li vliv relaxačních mechanismů, dostaneme Blochovy rovnice s radiačním dampingem ve tvaru

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} M_{x,y} &= \gamma (\mathbf{M} \times \mathbf{H})_{x,y} - \frac{M_{x,y}}{T_2} \\ \frac{d}{dt} M_z &= \gamma (\mathbf{M} \times \mathbf{H})_z - \frac{M_z - M_0}{T_1} \end{aligned} \quad (2.11)$$

kde  $\gamma$  je gyromagnetický poměr,  $M_0$  je velikost magnetizace ve stavu v rovnováze,  $T_1$  je spin-mřížková a  $T_2$  spin-spinová relaxační doba.

V pulsních technikách NMR bezprostředně po odeznění radiofrekvenčního pole platí  $H_1=0$  a rovnice (2.11) se zjednoduší na tvar

$$\begin{aligned} \frac{d H_r}{dt} + \frac{H_r}{T_2} + \gamma k H_r M_z &= 0 \\ \frac{d M_z}{dt} + \frac{M_z - M_0}{T_1} - \gamma \frac{H_r^2}{k} &= 0 \end{aligned} \quad (2.12)$$

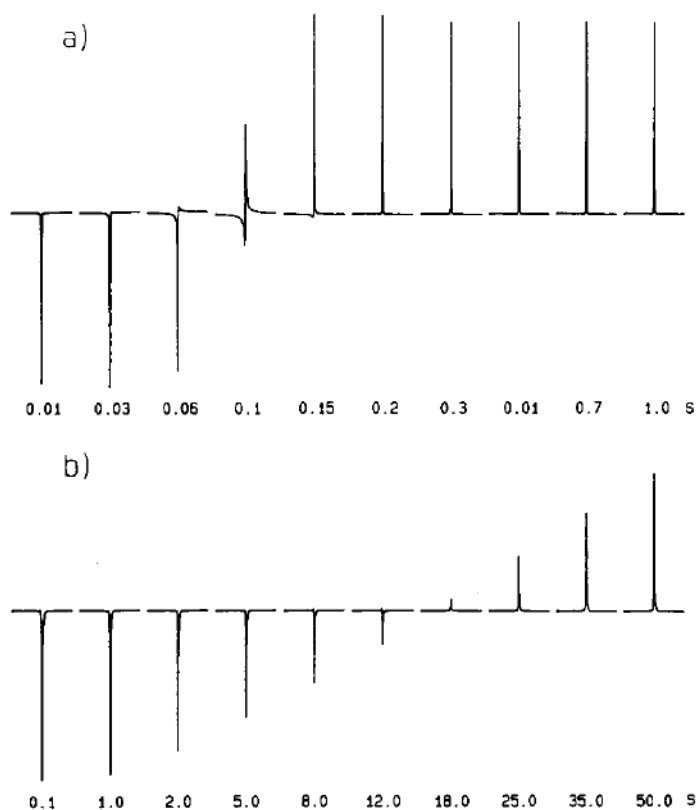
Z rovnic (2.12) je tedy zřejmé, že radiační damping ovlivní měření relaxačních dob. Soustava (2.12) je ovšem natolik složitá, že nemá obecné analytické řešení. Řešení lze nalézt pouze za jistých omezujících předpokladů (například „vypneme-li“ spin-mřížkovou relaxaci, tedy položíme-li  $1/T_1=0$ ) - viz. např. [25,26]. Takovéto předpoklady ale v reálných systémech nejsou splněny a proto se v následujících kapitolách budeme zabývat popisem vlivu radiačního dampingu na měření relaxačních dob a metodám jeho potlačení.

### 2.2.1. Vliv radiačního dampingu na měření $T_1$

Ovlivnění měření spin-mřížkové relaxační doby radiačním dampingem je patrné z obrázku 2.5. Na obrázku jsou dvě závislosti intenzity signálu inversion-recovery na  $t_{mix}$  (hodnoty  $t_{mix}$  jsou uvedeny pod jednotlivými čarami) stejného vzorku 80% benzenu v acetonu- $d_6$  měřené za a) 5 mm inverzní sondou a za b) 10 mm observe



sondou. Rozdíl mezi inverzní a observe sondou je v tom, že inverzní sonda má vodíkovou cívku blíže vzorku než je cívka pro ostatní jádra, kdežto u observe sondy je tomu naopak. A tedy observe sonda má horší  $Q$ -faktor než inverzní sonda která byla použita pro měření a). Dále v případě b) je menší  $i$  faktor plnění  $f$  než v případě a), neboť zde byl do 10 mm sondy vložen 5 mm vzorek. Důsledkem tohoto je, že spinový systém v případě b) relaxuje déle, neboť konstanta  $k$  vystupující ve vztahu pro velikost dampingového pole (2.8) je zde menší než v případě a). Měření a) je tedy ovlivněno radiačním dampingem, kdy dodatečné dampingové magnetické pole sklápí magnetizaci směrem k rovnovážné poloze, čímž urychluje relaxaci, kdežto u měření b) byl vliv radiačního dampingu potlačen výše popsáním snížením velikosti dampingového pole [27].

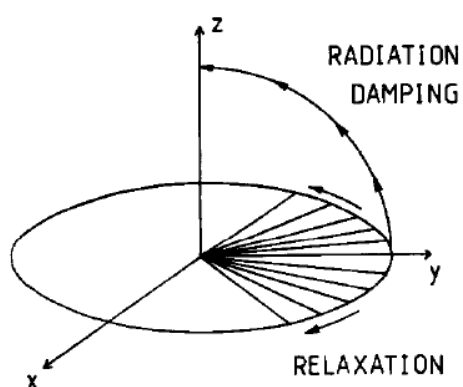


Obr. 2.5: Závislosti intenzity signálu inversion recovery na  $t_{mix}$  stejného vzorku 80% benzenu v acetonu- $d_6$  měřené a) 5mm inverzní sondou, b) 10mm observe sondou. Čísla pod jednotlivými píky udávají časový rozestup pulsů. [27]

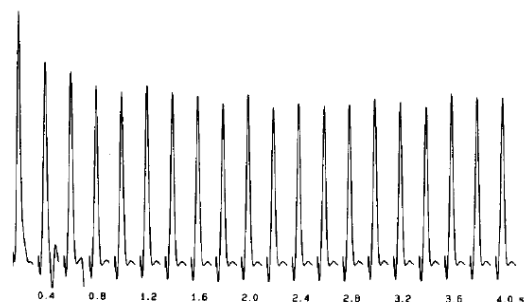
### 2.2.2. Vliv radiačního dampingu na měření $T_2$

Vliv radiačního dampingu na měření  $T_2$  je popsán například v [28]. Při měření  $T_2$  spinovým echem je měření ovlivněno následujícím způsobem:

První  $\pi/2$  puls magnetizaci sklopí do roviny  $xy$ . V důsledku nehomogenit magnetického pole po čase dojde k rozfázování složek magnetizace v rovině  $xy$ . Ale před tím, než dojde k úplnému rozfázování, stačí vzniknout dodatečné dampingové pole, které magnetizaci sklápí do rovnovážné polohy (viz. obr. 2.6). Po aplikaci  $\pi$  pulsu můžeme v čase  $t_{echo}$  pozorovat signál spinového echa. Pokud je ale vliv radiačního dampingu silný, může potlačit spin-spinový relaxační proces a pozorované echo ve skutečnosti není skutečné spinové echo, ale jeho obálka má tvar hyperbolické výseče [28]. Je-li echo-čas příliš dlouhý, pak spinový systém dospěje do rovnováhy před aplikací  $\pi$  pulsu. V takovémto případě pak závislost intenzity signálu spinového echa na echo čase neklesá k nule, ale pro velké echo časy je konstantní (viz. obr. 2.7).



Obr. 2.6: Diagram pro vysvětlení vlivu radiačního dampingu na spinový systém [28].



Obr. 2.7: Závislost intenzity signálu spinového echa na echo čase pro vzorek 80% benzenu v acetonu- $d_6$  měřená inverzní sondou. Čísla pod jednotlivými píky udávají  $t_{echo}$ . [28]

Měříme-li  $T_2$  sekvencí CPMG a je-li použit dostatečně krátký echo-čas, pak se podle [28] radiační damping neprojeví:

Prvním  $\pi/2$  pulsem sklopíme magnetizaci do roviny  $xy$ . Během doby  $t_{echo}/2$  dojde ke sklopení magnetizace radiačním dampingem někam mezi rovinu  $xy$  a osu  $z$ . Následně aplikací  $\pi$  pulsu magnetizaci otočíme okolo osy  $y$  o úhel  $\pi$ . Po tomto pulsu se spinový systém opět vyvíjí po dobu  $t_{echo}/2$ , přičemž dojde ke sklopení magnetizace

radiačním dampingem zpět do roviny  $xy$ . Amplituda magnetizace v rovině  $xy$  je zkrácena spin-spinovou relaxací. Po skončení čekací doby  $t_{echo}/2$  se aplikuje další  $\pi$  puls a vše se opakuje.

### 2.2.3. Metody potlačení radiačního dampingu

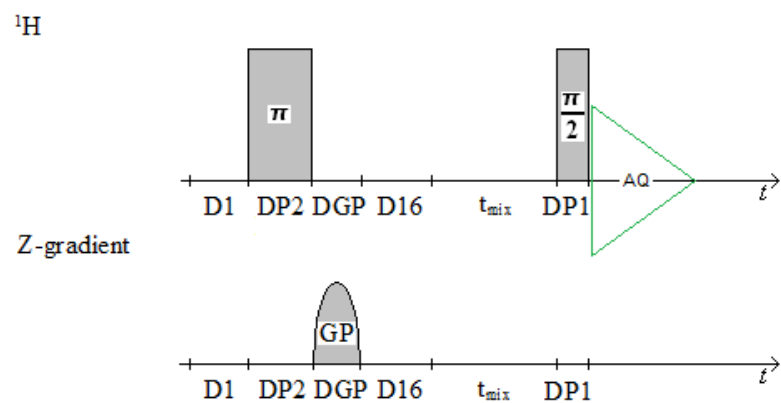
Metodám potlačení radiačního dampingu je věnováno mnoho prací – např. [29,30,31].

Základní metody snížení vlivu radiačního dampingu jsou založeny na snížení konstanty  $k$  ve vztahu (2.8) a tím na snížení dampingového pole. Jednou metodou je použití sondy s nízkým faktorem kvality  $Q$ , čehož lze dosáhnout například přidáním odporu do rezonančního obvodu sondy, nebo použitím speciální sondy umožňující přepínání mezi dvěma  $Q$  faktory [30],[32]. Druhou metodou je snížení vyplnění sondy vzorkem, tedy snížení faktoru plnění  $f$ . Tohoto lze dosáhnout použitím užších kyvet než jsou kyvety, pro které je daná sonda vyrobená nebo použitím speciálních kapilárních insertů, které lze vložit do standardních kyvet.

Další možností potlačení radiačního dampingu je použití speciálních pulsních sekvencí. Pro měření  $T_1$  lze například použít modifikovanou sekvenci Inversion Recovery podle obrázku 2.8. [33]

Od standardní sekvence IR se tato sekvence liší tím, že za  $\pi$  pulsem je aplikován gradientní puls v ose  $z$ . Díky tomuto gradientu dojde po  $\pi$  pulsu k rychlému rozfázování příčné složky magnetizace, čímž se projekce magnetizace v rovině  $xy$  středuje k nule a vliv radiačního dampingu se zmírní.

Poznámka: Pro odstranění vlivu radiačního dampingu na měření  $T_1$  sekvencí Inversion Recovery by teoreticky stačilo pečlivé nastavení pulsní sekvence, neboť zdrojem dampingového pole je magnetizace v rovině  $xy$ . Pokud by se podařilo prvním  $\pi$  pulsem magnetizaci sklopit přesně do směru  $-z$ , pak by velikost složky magnetizace v rovině  $xy$  byla nulová a dampingové pole by pak bylo také nulové. Nastavit pulsní sekvenci takto přesně se ale v konkrétním experimentu z různých důvodů často nepodaří.



Obr. 2.8: Sekvence Inversion Recovery s gradientním pulsem.  $D1$  -opakovací doba,  $DP1$  -délka  $\pi/2$  -pulsu  $DP2$  -délka  $\pi$  -pulsu,  $DGP$  -délka gradientního pulsu,  $D16$  -čekací doba po gradientním pulsu,  $t_{mix}$  -směšovací perioda,  $AQ$  - akvizice dat.

Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, tak pro potlačení vlivu radiačního dampingu na měření  $T_2$  lze použít samotnou sekvenci CPMG kdy, je-li použit dostatečně krátký echo-čas, pak tato sekvence problém s radiačním dampingem odstraní.

# 3. Parametry měření

## 3.1. Parametry vzorků

### 3.1.1. Příprava vzorků

Vzorky různých koncentrací  $H_2O$  v  $D_2O$  měřené v této práci byly připraveny z deionizované vody o měrném odporu  $15,6 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-3}$  z Fyziologického Ústavu Akademie Věd v Praze, která byla skladována v silikonové lahvi o objemu 250 ml, a ze dvou  $D_2O$ . První  $D_2O$  byla  $D_2O$  o izotopové čistotě 99,9% atomů deuteria od firmy Sigma-Aldrich. Tato  $D_2O$  byla skladována v tmavé skleněné lahvi o objemu 100 ml. Druhou  $D_2O$  byla  $D_2O$  o izotopové čistotě 99,8% atomů deuteria od firmy Armar Chemicals. Tato  $D_2O$  byla skladována v ampulkách z tmavého skla o objemu 0,75 ml.

Vzorky byly míchány v plastových mikrozkuřavkách, přičemž celkový objem namíchaného vzorku byl vždy 500  $\mu\text{l}$ . Pro odměřování potřebných objemů jednotlivých substancí byla pro objemy do 100  $\mu\text{l}$  použita automatická pipeta o maximálním objemu 100  $\mu\text{l}$  a velikosti nejmenšího dílku 0,1  $\mu\text{l}$ . Pro větší objemy byla použita automatická pipeta o maximálním objemu 1000  $\mu\text{l}$  a velikosti nejmenšího dílku 1  $\mu\text{l}$ .

Z lahvové  $D_2O$  o izotopové čistotě 99,9% byly připraveny dva vzorky následujících objemových koncentrací  $H_2O$ :

$$\text{vzorek 1: } C_{H_2O} = 0,1\% ,$$

$$\text{vzorek 2: } C_{H_2O} = (20,08 \pm 0,04)\% .$$

Uvedená chyba byla vypočtena z přesnosti odměření příslušných objemů jednotlivých substancí, přičemž tato přesnost byla odhadnuta velikostí nejmenších dílků pipet uvedených výše. Vzorek o koncentraci 0,1 % byl pouze přenesen z lahve do kyvety, tedy nebyl nijak míchán a proto u něj není uvedena žádná chyba. Ve skutečnosti však bude chyba koncentrace těchto vzorků pravděpodobně mnohem vyšší, neboť tato  $D_2O$  může být stará i více jak 3 roky, přičemž byla používána i jinými členy laboratoře, takže je pravděpodobné, že se do ní při častém otevírání dostala vzdušná vlhkost. Uvedené koncentrace těchto vzorků tak mohou být až o 1 objemové procento vyšší.

Z ampulkové  $D_2O$  o izotopové čistotě 99,8 % byl připraven jeden vzorek o následující-

cí objemové koncentraci  $H_2O$ :

$$\text{vzorek 3: } C_{H_2O} = (2,20 \pm 0,02) \% .$$

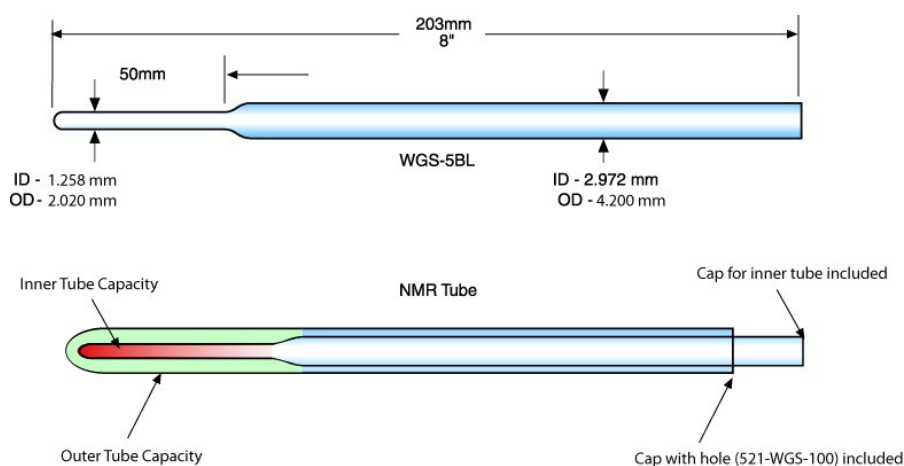
Uvedená chyba je opět daná přesností odměření objemů jednotlivých substancí. Tento vzorek ale není znečištěn vzdušnou vlhkostí, neboť ampulka s  $D_2O$  ze které byl namíchán, byla otevřena těsně před namícháním vzorku. Uvedenou chybu lze tedy považovat za relevantní.

Po namíchání daného vzorku pak byl vzorek přenesen automatickou pipetou do jedné z kyvet popsaných v následující kapitole.

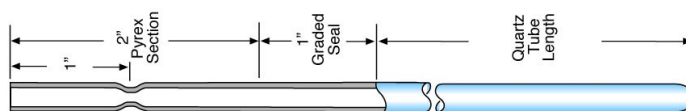
### 3.1.2. Kyvety použité při měření

Standardně se pro odlišení různých druhů NMR kyvet používá vnější průměr. Například mluvíme-li o 5 mm kyvetě, máme na mysli kyvetu s vnějším průměrem 5 mm. Podobná notace se používá i u sond, kdy se jako parametr sondy uvádí vnější průměr kyvety, na který je sonda konstruována. Zde uvedeme i další parametry použitých kyvet.

Z důvodů, které budou popsány v kapitole 4, byly při měřeních v této práci použity tři druhy kyvet od výrobce Wilmad-LabGlass. Jednak skleněný kapilární insert o vnitřním průměru 1,26 mm - viz. obr 3.1. Dále standardní 5 mm křemenná o vnitřním průměru 4,2 mm. A třetí kyvetou byla 4 mm křemenná kyveta o vnitřním průměru 3 mm, která má ve své horní části přechod k obyčejnému sklu – viz. obr 3.2.



Obr. 3.1: Skleněný koaxiální insert [34].



Obr. 3.2: Křemenná 4 mm kyveta s přechodem k obyčejnému sklu [34].

Většina měření v této práci byla provedena v 8 mm sondě. Při vlastním měření tedy byly tyto kyvety se vzorkem umístěny do 8 mm kyvety, přičemž vycentrování bylo zajištěno teflonovým spacerem. Prostor mezi touto 8 mm kyvetou a kyvetou se vzorkem byl vyplněn deuterovaným chloroformem, který zde plnil úlohu teplotní lázně a v případě nízkých koncentrací  $D_2O$  ve vzorku byl použit pro lock. Některé vzorky byly také měřeny na 5 mm sondě. Jednalo se ale pouze o vzorky v 5 mm křemenné kyvetě, takže se nijak nelišily od standardních NMR vzorků.

### 3.1.3. Odplynění vzorků

Rozpuštěné plyny ve vzorku ovlivňují relaxace. Například rozpuštěný kyslík zkracuje relaxační doby paramagnetickým příspěvkem, nebo rozpuštěný  $CO_2$  ovlivňuje pH vzorku, na kterém může záviset příspěvek chemické výměny k relaxacím. Jednotlivé vzorky proto byly po přenesení do kyvet odplyněny metodou Freeze-Pump-Thaw (FPT). Při metodě FPT se vzorek nejdříve zmrazí, poté se evakuuje prostor nad vzorkem a nakonec se vzorek nechá roztát. Tento postup se 3-5 krát opakuje. Princip této metody je založen na tom, že po roztátí vzorku dojde k vyrovnání parciálních tlaků plynů nad vzorkem a plynů rozpuštěných ve vzorku, což po několikerém opakování postupu vede ke snížení koncentrace rozpuštěných plynů a zároveň se minimalizuje odpor kapaliny.

Pro mražení vzorků byl použit technický líh vychlazený kapalným dusíkem. Vzorky byly mrazeny pomalu ode dna kyvety tak, aby kyveta nepraskla.

Účinnost této metody lze demonstrovat na změně spin-mřížkové relaxační doby deionizované vody za pokojové teploty z  $T_1=2,803$  s před odplyněním na  $T_1=3,123$  s po odplynění třemi cykly FPT, která ukazuje na snížení koncentrace rozpuštěného kyslíku. Snížení koncentrace  $CO_2$  lze demonstrovat měřením pH – pH deionizované

vody stoupne po odplynění třemi cykly FPT z hodnoty 5,8 na hodnotu 6,5.

## 3.2. Spektrometr vysokého rozlišení

Všechna měření v této práci byla provedena na komerčním spektrometru NMR vysokého rozlišení Bruker Avance 500 Katedry fyziky nízkých teplot MFF UK.

Tento spektrometr je vybaven mnoha sondami, které umožňují měřit mnoho jader v kapalinách (např.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$ , ...), přičemž tyto sondy umožňují generaci radiofrekvenčních pulsů na více kanálech.

Při měřeních v této práci byly použity dvě sondy – TXI a BBO. Sonda TXI je 8 mm inverzní sonda, což znamená, že její radiofrekvenční cívka určená pro měření na vodíkových jádrech je umístěna nejbliže k vzorku, kdežto ostatní cívky jsou více vzdálené. Kromě vodíkového kanálu má tato sonda ještě další 3 kanály -  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  a  $^2\text{H}$  pro účely udržení stability magnetického pole (tzv. lock). BBO je 5 mm observe sonda, která naopak má vodíkovou cívku nejdále od vzorku. Tato sonda je vybavena třemi kanály -  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  pro lock, a třetí laditelný pro více jader (např.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ , ...).

Statické magnetické pole tohoto spektrometru vytváří supravodivá cívka. Velikost tohoto pole je  $B_0=11,744\text{ T}$  a rezonanční frekvence jader  $^1\text{H}$  příslušící tomuto poli je  $\nu_0=500,13\text{ MHz}$ .

### 3.2.1. Nastavení a kalibrace teploty

Každá sonda je vybavena topnou spirálou a termočlánkem pro měření teploty. Sonda je dále protékána plynným dusíkem, který je předchlazen ledničkou. Tok dusíku je konstantní a je možno ho nastavit na několik hodnot. K nastavení a udržení stabilní teploty slouží počítačem řízená teplotní jednotka spektrometru. Tato jednotka podle aktuální teploty udávané termočlánkem koriguje topný výkon spirály tak, aby se zabránilo teplotním výkyvům.

Všechna měření v této práci byla provedena s průtokem dusíku 800 l/h a maximálním topným výkonem spirály 20 %.

Skutečná teplota vzorku se však nemusí přesně shodovat s teplotou udávanou termočlánkem sondy a pro její přesnější určení je třeba provést kalibraci. K tomu se obvykle využívá látek (standardů) s dobře popsanou závislostí chemických posunů na teplotě. Pro teploty v rozsahu 175 K – 330 K se jako teplotní standard používá

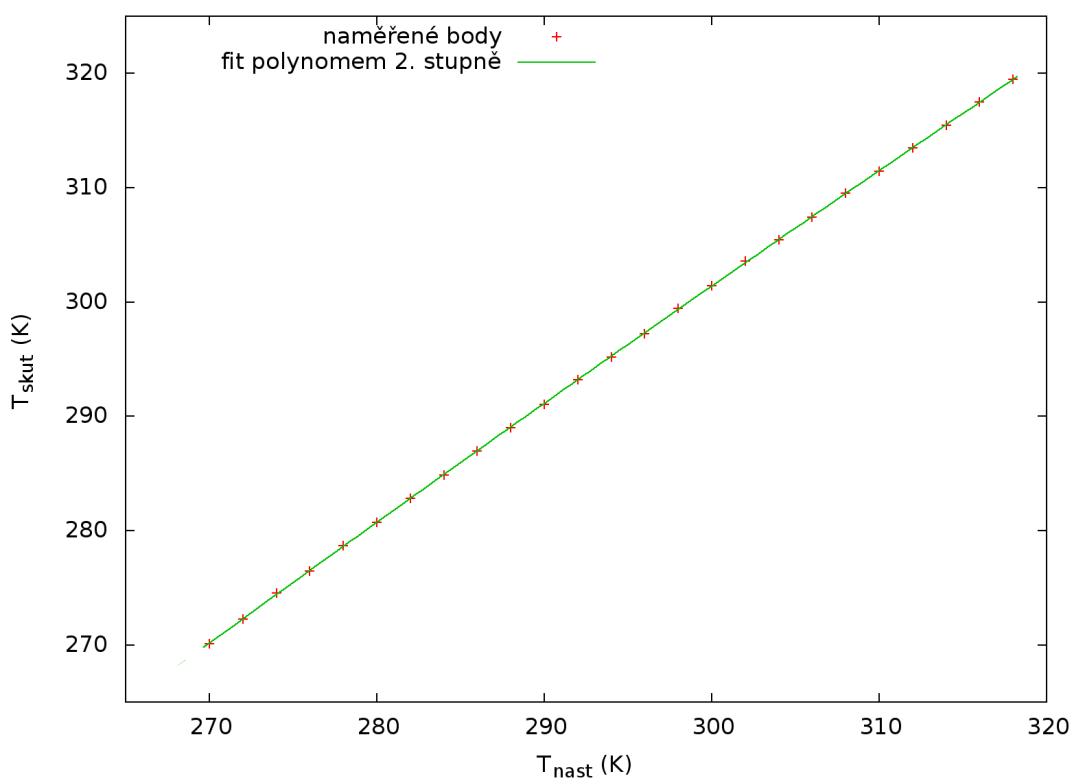


methanol ( $\text{CH}_3\text{-OH}$ ). Změříme-li spektrum methanolového standardu a odečteme-li rozdíl chemického posunu čáry  $\text{CH}_3$  skupiny a  $\text{OH}$  skupiny, který označíme  $\Delta$ , pak teplota vzorku je daná vztahem [35]

$$T = 403,0 - 29,46 \Delta - 23,832 \Delta^2. \quad (3.1)$$

Přesnost takto určené teploty je 0,5 K.

Kalibrace teploty na TXI sondě proběhla v uspořádání, kdy do 8 mm kyvety byl vložen methanolový teplotní standard v 5 mm kyvetě a prostor mezi kyvetami byl vyplněn deuterovaným chloroformem. Vycentrování bylo zajištěno teflonovým spacerem. Takto byla naměřena spektra methanolového standardu pro nastavené teploty v rozsahu 270 – 318 K s krokem 2 K. Před každým měřením byl vzorek 20 minut temperován. Z těchto spekter pak byl odečten rozdíl chemických posunů čar  $\text{CH}_3$  a  $\text{OH}$  skupiny a podle (3.1) byla určena skutečná teplota vzorku. Výsledek je zobrazen na následujícím grafu.



Graf 3.1: Teplotní kalibrace na TXI sondě.

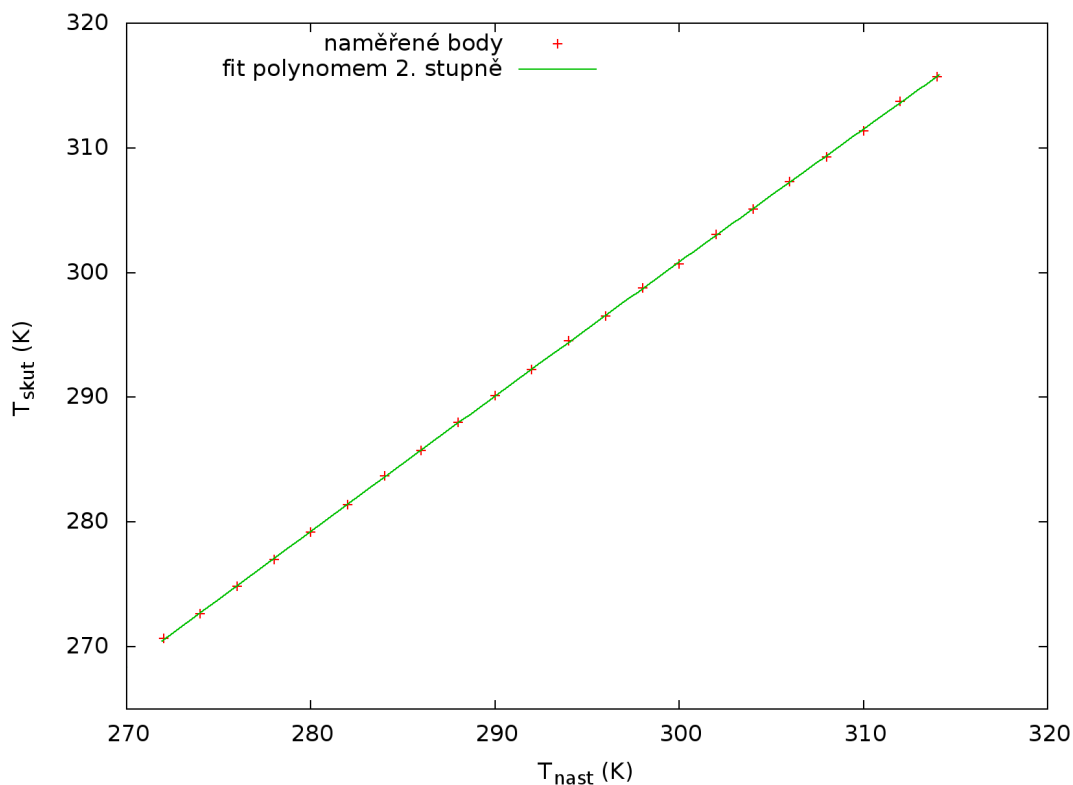
Naměřená závislost skutečné teploty na nastavené teplotě byla nafitována polynomem druhého stupně  $T_{\text{skut}} = A + B T_{\text{nast}} + C T_{\text{nast}}^2$  s výsledkem

$$A = (-74,1 \pm 5,1) K$$

$$B = (1,485 \pm 0,035)$$

$$C = (-0,00078 \pm 0,00006) K^{-1}$$

Podobným způsobem byla provedena kalibrace na BBO sondě. Pouze zde nebyl methanolvý standard vkládán do 8 mm kyvety, protože BBO je 5 mm sonda. U BBO sondy byla provedena kalibrace v rozsahu nastavených teplot 272 K – 314 K opět s krokem 2 K a dobou temperování 20 minut. Výsledek je zobrazen v grafu 3.2.



Graf 3.2: Teplotní kalibrace na BBO sondě.

Naměřená závislost byla opět nafitována polynomem druhého stupně s výsledkem

$$A = (-63 \pm 11) K$$

$$B = (1,355 \pm 0,076)$$

$$C = (-0,00047 \pm 0,00013) K^{-1}$$

### 3.2.2. Parametry měření

Měření a zpracování spekter bylo provedeno pomocí programu Bruker Topspin 1.3. Šířka spekter měřených v této práci byla nastavena na  $SW = 14 \text{ ppm}$  (  $7003 \text{ Hz}$  ). Počet bodů měřeného signálu volné precese byl v závislosti na potřebné délce akvizice

nastavován v intervalu  $TD \in (36864, 262144)$ , čemuž odpovídá délka akvizice  $AQ \in (2,6, 18,7)$  s. Při zpracování naměřených dat byl signál volné precese doplněn nulami do dvojnásobného počtu měřených bodů a byla použita apodizace signálu volné precese s parametrem  $LB = 15 \text{ Hz}$ .

Spin-mřížková relaxační rychlost byla měřena na 14 bodů závislosti (2.2). Spin-spinová relaxační rychlost byla měřena na 10 bodů závislosti (2.5).

Další parametry jednotlivých měření jsou pro přehlednost uváděny v tabulkách přímo v kapitole 4 s výsledky měření.

# 4. Výsledky měření a diskuse

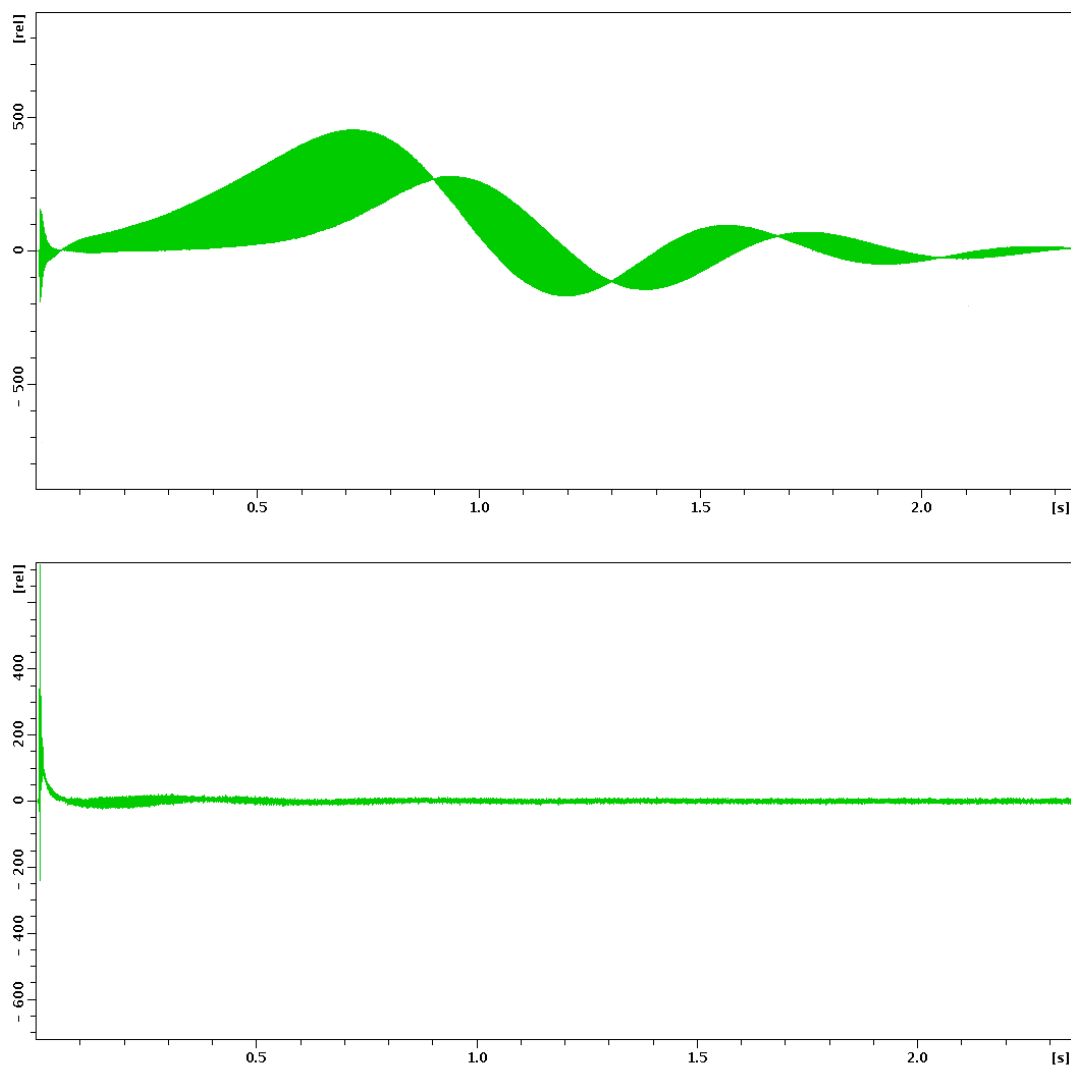
## 4.1. Komplikace spojené s měřením NMR vody

### 4.1.1. Radiační damping

Přítomnost tohoto jevu při měření NMR vody lze demonstrovat na signálu volné precese po  $\pi$ -pulsu jak je ukázáno na obrázku 4.1. V horní části obrázku je signál volné precese vzorku o objemové koncentraci 20,08 %  $\text{H}_2\text{O}$  v 5 mm křemenné kyvetě měřený BBO sondou. Vidíme, že signál není nulový, což je způsobeno právě radiačním dampingem. V dolní části obrázku je pro srovnání ukázán signál volné precese po  $\pi$ -pulsu vzorku o objemové koncentraci 0,1 %  $\text{H}_2\text{O}$  v 5 mm křemenné kyvetě měřený toutéž sondou. Zde je signál téměř nulový (malý signál na začátku je důsledkem nepřesnosti v nastavení délky pulsu). V tomto případě tedy radiační damping měření neovlivňuje, neboť koncentrace vodíkových jader je malá.

Je tedy jasné, že komplikaci s radiačním dampingem lze při měření relaxací vody očekávat a je nutné radiační damping potlačit. K tomu bylo využito jednak sekvence Inversion recovery s vloženým gradientním pulsem (viz. obr. 2.8) pro měření  $T_1$  a sekvence CPMG pro měření  $T_2$ . Dále pro potlačení dampingu byl zmenšen objem vzorku. Toho bylo dosaženo použitím speciálního kapilárního insertu nebo měřením vzorku v menší kyvetě – viz kapitola 3.1.

Praktickým závěrem je, že v 5 mm BBO sondě lze v 5 mm kyvetě měřit vzorky o koncentraci maximálně v řádu jednotek procent, nebo pokud rozladíme rezonanční obvod (čímž snížíme Q-faktor cívky), lze měřit i koncentrace přibližně do 20 %. Umístíme-li vzorek do kapilárního insertu, lze v BBO sondě měřit koncentrace přibližně do 50 %. V 4 mm kyvetě lze na BBO sondě měřit koncentrace přibližně do 30 %. Na 8 mm TXI sondě lze v kapilárním insertu měřit koncentrace bez omezení, tedy do 100 % , v 4 mm kyvetě přibližně do 60 % a v 5 mm kyvetě přibližně do 40 %.

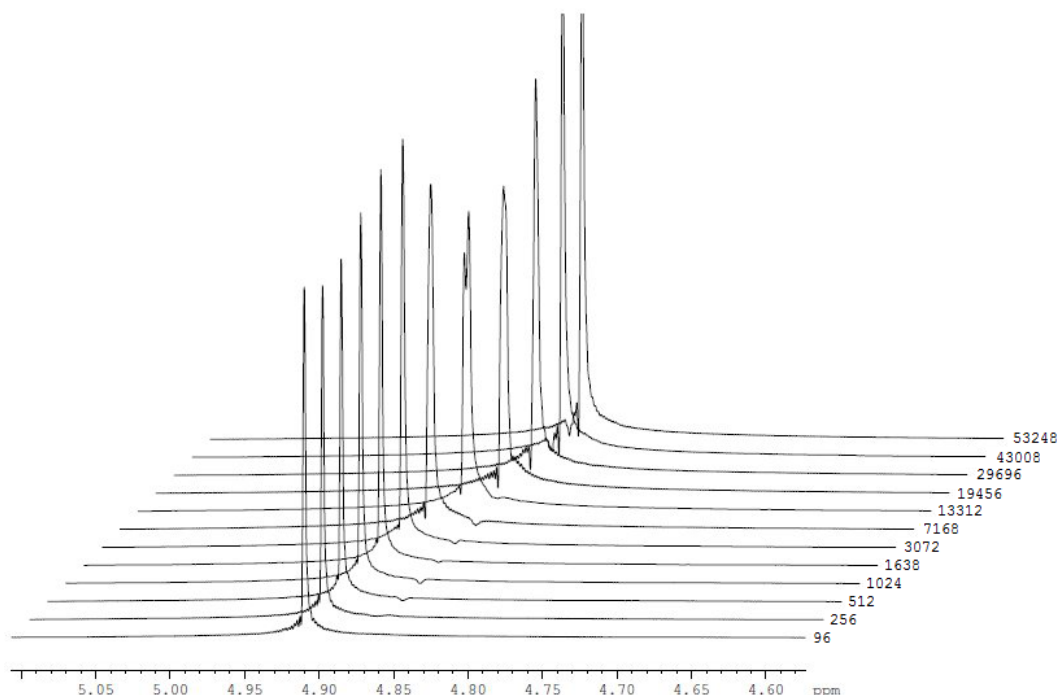


Obr. 4.1: Signál volné precese po  $180^\circ$  pulsu.  
 Nahore: vzorek 20,08 %  $\text{H}_2\text{O}$ , dole: vzorek 0,1 %  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### 4.1.2. Zahřívání vzorku radiofrekvenčními pulsy

Další komplikace s měřením NMR vody souvisí s abnormální délkou relaxačních dob. Vodíkové relaxační doby vody při pokojové teplotě se v závislosti na objemové koncentraci od 100 %  $\text{H}_2\text{O}$  k 0 %  $\text{H}_2\text{O}$  pohybují v rozpětí zhruba od 2 do 40 sekund. Při měření spin-spinové relaxační doby sekvencí CPMG je proto třeba aplikovat velmi mnoho  $180^\circ$ -ti stupňových pulsů. Například pro změření spin-spinové relaxační doby dlouhé 10 sekund sekvencí CPMG s echo-časem 0,4 ms je třeba proměřit závislost intenzity signálu na počtu ech v intervalu cca 200-35000. Při měření s echo-časem 50 ms je pro změření 10-ti sekundové relaxační doby třeba měřit v intervalu

počtu ech cca 2-300. Vzhledem k tomu, že voda má významnou absorpci radi-ofrekvenčního či mikrovlnného záření [36], dochází během celého měření k proměnlivému ohřevu vzorku, neboť celkový výkon dodaný během jednoho skenu je pro první body závislosti intenzity signálu na počtu ech (2.6) menší, než pro poslední body. Důsledkem je, že první body této závislosti jsou měřeny při nižší teplotě než poslední body. Dále je také rozdílná teplota vzorku při měření spin-spinové relaxační rychlosti s různými echo-časy, protože celkový výkon dodaný během celé sekvence je při krátkých echo-časech větší než při dlouhých echo-časech.



Obr. 4.2: Spektra vzorku 100 % H<sub>2</sub>O v závislosti na počtu předřazených off-rezonančních pulsů (čísla vpravo).

To, že k zahřívání vzorku během měření skutečně dochází demonstruje obrázek 4.2. Na tomto obrázku jsou spektra vzorku 100 % H<sub>2</sub>O, která byla naměřena po 90-ti stupňovém pulsu, před kterým bylo aplikováno několik off-rezonančních (frekvenčně posunutých o 1 MHz) 180-ti stupňových pulsů oddělených časovou prodlevou 0,0006 s (počet předřazených off-rezonančních pulsů udávají čísla vpravo). Vzorek byl umístěn ve skleněném kapilárním insertu a tento insert byl vložen do 8 mm kyvety a prostor mezi kyvetami byl vyplněn deuterovaným chloroformem. Měření bylo provedeno na TXI sondě. Čekací doba mezi jednotlivými měřeními byla nastavena

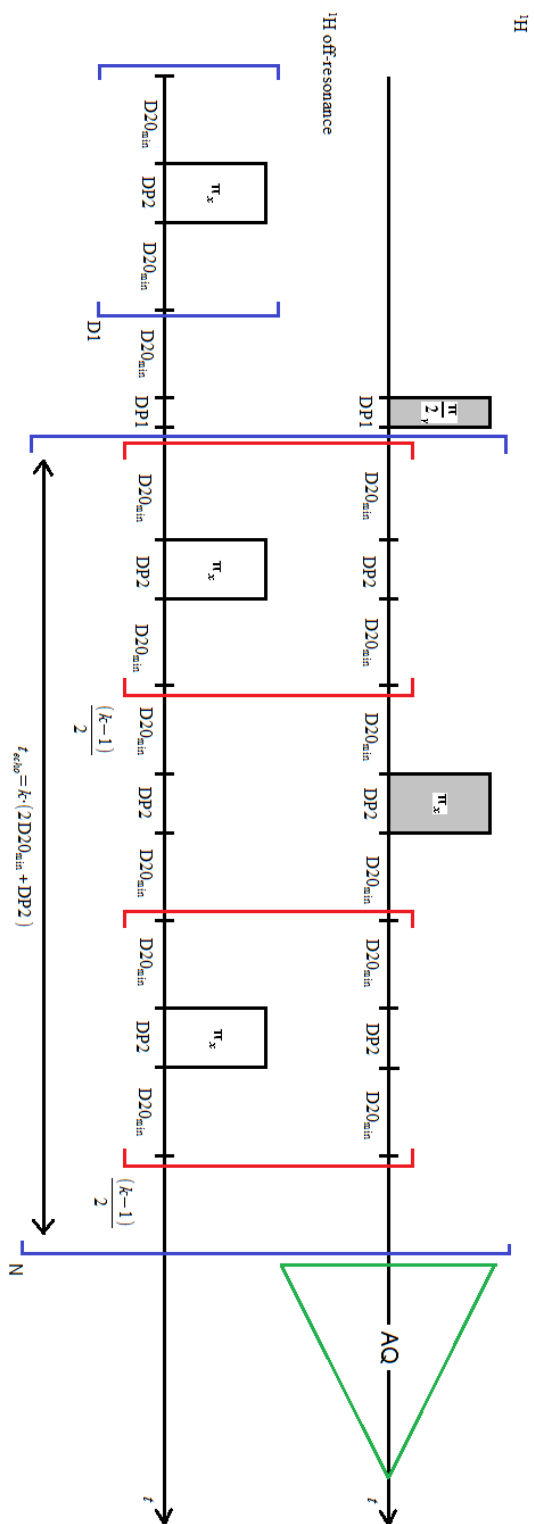
na 15 sekund (spin-mřížková relaxační doba čisté vody je přibližně 3 s). Teplotní jednotka byla nastavena na teplotu 292 K, což podle teplotní kalibrace odpovídá skutečné teplotě vzorku 293,2 K. Vidíme, že s rostoucím počtem předřazených pulsů dochází k posunu polohy rezonanční čáry z 4,92 ppm na 4,88 ppm. Tento posun je způsoben změnou teploty vzorku.

Pro odstranění problému s časově proměnlivou teplotou vzorku v důsledku proměnlivého průměrného množství radiofrekvenční energie absorbované vzorkem během experimentu (v důsledku měnícího se počtu pulsů v průběhu pulzní sekvence) byla navržena modifikace sekvence CPMG (schéma sekvence je na obr. 4.3). V modifikované sekvenci jsou kombinovány on-rezonanční a off-rezonanční pulzy tak, aby výkon dodaný do vzorku byl v čase konstantní. Výjimkou je relativně krátká doba nabírání signálu, kdy současné pulzování není možné. Off-rezonanční pulzy musí být nastaveny dostatečně daleko od rezonanční frekvence  $^1\text{H}$  jader vody, aby neovlivňovaly jejich NMR odezvu, v případě tvrdých pulzů se osvědčil rozdíl 1 MHz. Tyto off-rezonanční pulzy jsou aplikovány zejména během opakovací periody D1, která je velmi dlouhá, typicky 100 – 200 s. Rozestup těchto off-rezonančních pulzů je  $D20_{\min}$ . Samotná sekvence on-rezonančních CPMG pulzů je doplněna off-rezonančními pulzy tak, aby rozestupy aplikovaných pulzů v průběhu celého měření (kdy se mění počet on-rezonančních 180-ti stupňových pulzů a jejich odstup D20) zůstaly konstantní během celého měření. Echo-čas se tedy nenastavuje prostou změnou délky prodlevy D20, ale počtem aplikací off-rezonančních pulzů, z nichž každý je obložen časy  $D20_{\min}$ . Echo-čas v pulzní sekvenci je tedy roven

$$t_{\text{echo}} = k \cdot (2 D20_{\min} + DP2), \quad (4.1)$$

kde  $k$  je počet 180-ti stupňových pulsů vyplňujících echo-čas (off- i on-rezonančních), přičemž  $k$  je liché číslo a  $DP2$  je délka 180-ti stupňového pulsu.

Při praktické implementaci na spektrometru Bruker se ukázalo, že časté změny frekvence pulzů v rámci jednoho radiofrekvenčního kanálu vedou k fázové nestabilitě výsledného signálu. To znamená, že nedochází ke koherentní sumaci naměřeného signálu při více skenech. Tento problém byl odstraněn využitím dvou nezávislých radiofrekvenčních kanálů pro generaci on-rezonančních, resp. off-rezonančních pulzů, přičemž frekvenční nastavení obou kanálů je během celého měření neměnné. Pulzní program je přílohou 1 práce, typické nastavení je v příložených souborech.



Obr. 4.3: Sekvence CPMG vyrovnávající zahřívání vzorku pulsy.  
Horní řádek – on-rezonanční pulsy. Dolní řádek – off-rezonanční pulsy.  
 $DP1$ ,  $DP2$  -délky  $\pi/2$  a  $\pi$ -pulsu,  $D20_{min}$ -konstantní časová prodleva,  $D1$  -počet  $\pi$ -pulsů vyplňujících čekací dobu,  $k$  počet  $\pi$ -pulsů vyplňující echo-čas,  $N$  - počet ech,  $AQ$  -akvizice dat.



K funkci modifikované sekvence přispívá i stabilizační funkce teplotní jednotky. Proto samotnému měření musí předcházet alespoň 5 min pulzování bez nabírání signálu. V této době teplotní jednotka stabilizuje teplotu vzorku za situace konstantního přísunu RF energie do vzorku, tj. za stacionárních podmínek. Nestabilita způsobená přerušáním pulzování během nabírání signálu je potom bezpečně napravena během dlouhé periody D1 před dalším skenem.

Účinnost nové pulsní sekvence byla testována na vzorku 90 % H<sub>2</sub>O ve skleněném kapilárním insertu, který byl opět vložen do 8 mm kyvety a prostor mezi skly byl vyplněn deuterovaným chloroformem. Testování sekvence bylo tedy provedeno na TXI sondě, přičemž teplotní jednotka byla nastavena na 292 K, zalockováno bylo opět na chloroform. Hodnota D20<sub>min</sub> byla nastavena na 0,3 ms. Výsledkem tohoto testování je tabulka 4.1. V této tabulce jsou uvedeny hodnoty chemického posunu signálu 90 % H<sub>2</sub>O v závislosti na počtu ech (N) a počtu  $\pi$ -pulsů v echo-čase (k). Vidíme, že s přesností na dvě desetinná místa tyto hodnoty vycházejí stejně což ukazuje na to, že každý bod byl měřen při stejné teplotě nezávisle na k, tedy na délce echo-času .

k = 1		k = 11		k = 21		k = 41	
N	$\delta$ (ppm)	N	$\delta$ (ppm)	N	$\delta$ (ppm)	N	$\delta$ (ppm)
248	4,8770	22	4,8885	12	4,8897	6	4,8923
1392	4,8836	126	4,8857	66	4,8852	34	4,8846
2894	4,8860	262	4,8867	138	4,8852	70	4,8888
4946	4,8859	450	4,8866	236	4,8854	120	4,8818
7330	4,8855	666	4,8868	348	4,8867	178	4,8839
10686	4,8850	972	4,8867	508	4,8889	260	4,8858
14504	4,8847	1318	4,8869	690	4,8872	354	4,8853
20334	4,8844	1848	4,8873	968	4,8841	496	4,8871

Tabulka 4.1: Chemický posun 90 % H<sub>2</sub>O ( $\delta$ ) v závislosti na počtu ech (N) a počtu  $\pi$ -pulsů v echo-čase (k).

Po otestování účinnosti sekvence CPMG vyrovnávající zahřívání vzorku byla dále provedena kalibrace teploty při použití této sekvence. Jak už bylo řečeno v kapitole 3.2.1, tak ke kalibracím teploty vzorku se v rozsahu teplot 175 – 330 K používá methanolvý standard. Jelikož ale není zaručeno, že voda a methanol absorbují při 500 MHz stejně, tak k tomuto účelu byl připraven vzorek methanolu v D<sub>2</sub>O o objemové koncentraci 30%, který lze považovat za lepší přiblížení se k vzorku vody. Tento vzorek byl opět umístěn do skleněného kapilárního insertu, který byl vložen do

8 mm kyvety a prostor mezi skly byl vyplněn deuterovaným chloroformem. Z důvodu rychlé relaxace methanolu byla sekvence CPMG vyrovnávající zahřívání vzorku pro kalibrační měření upravena tak, že všechny pulsy byly vysílány na off-rezonanční frekvenci a nakonec byl aplikován jeden on-rezonanční 90-ti stupňový puls, po kterém bylo změřeno spektrum.

Parametry kalibračních měření jsou uvedeny v následující tabulce.

parametr	hodnota
průtok dusíku	800 l/h
doba temperování	20 min
počet D1 pulsů	430000
délka $\pi$ -pulsu	19,6 $\mu$ s
délka $\pi/2$ -pulsu	9,8 $\mu$ s
D20 <sub>min</sub>	0,2 ms
počet skenů	2

Tabulka 4.2: Parametry kalibračních měření.

Doba D20<sub>min</sub> byla zkrácena na 0,2 ms proto, že další měření v této práci proběhlo s tímto nastavením.

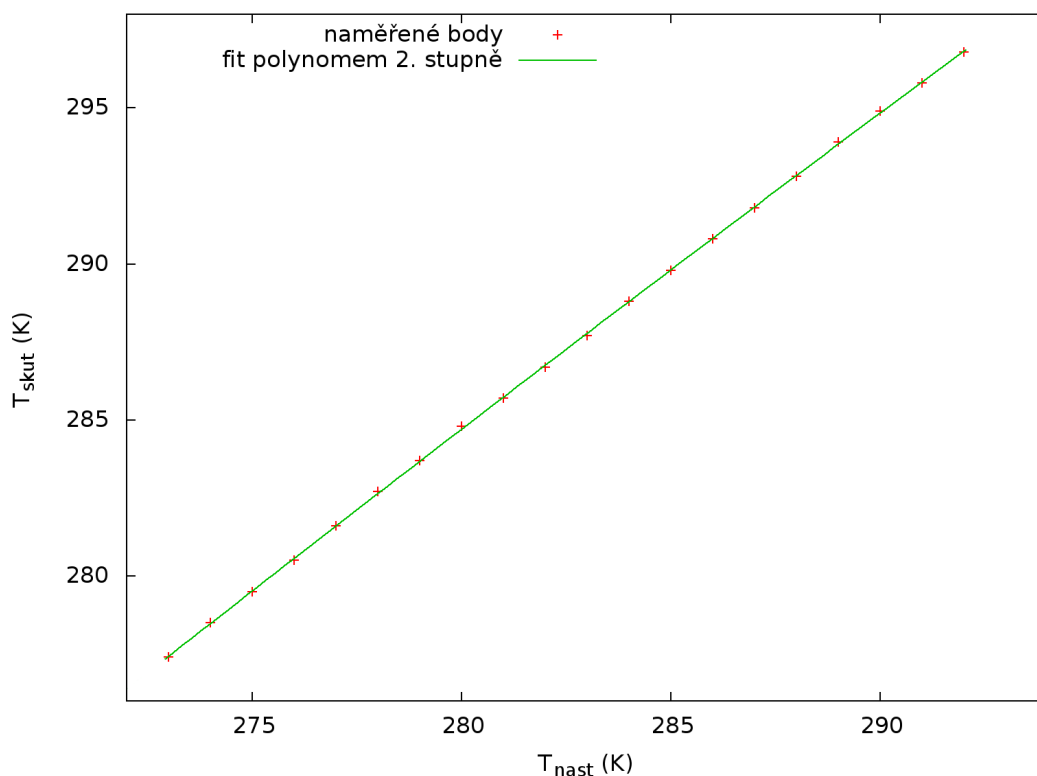
Protože se ukázalo, že vztah (3.1) nedává na vzorku 30% MeOH / D<sub>2</sub>O správnou teplotu, byla kalibrace provedena následujícím způsobem:

Nejprve byla naměřena obyčejná 1D spektra vzorku 30% MeOH / D<sub>2</sub>O pro nastavené teploty v rozsahu 273-292 K s krokem 1 K. Z těchto spekter byly odečteny vzdálenosti čar OH a CH<sub>3</sub> skupiny methanolu, a podle teplotní kalibrace na TXI sondě (viz. kapitola 3.2.1) byly k těmto vzdálenostem přiřazeny skutečné teploty.

Poté byly naměřeny vzdálenosti čar OH a CH<sub>3</sub> skupiny methanolu sekvencí CPMG vyrovnávající zahřívání vzorku (upravenou pro účel kalibrace podle popisu výše) pro nastavené teploty v rozsahu 273-292 K s krokem 1 K. Pro každou nastavenou teplotu bylo toto měření provedeno třikrát pro různé hodnoty počtu ech 5000, 15000 a 30000 a tyto tři naměřené hodnoty byly zprůměrovány. A konečně k takto získaným vzdálenostem čar byly podle výsledku měření z předcházejícího odstavce přiřazeny skutečné teploty vzorku. Výsledek teplotní kalibrace je zobrazen v grafu 4.1.

Naměřená závislost byla fitována polynomem druhého stupně ( $T_{skut} = A + B T_{nast} + C T_{nast}^2$ ) s výsledkem:

$$A = (-125 \pm 30) K, \quad B = (1,90 \pm 0,21), \quad C = (-0,00155 \pm 0,00037) K^{-1}.$$



Graf 4.1: Kalibrace teploty na TXI sondě při použití sekvence CPMG vyrovnávající zahřívání vzorku.

Přesnost této kalibrace lze odhadnout na 0,5 K.

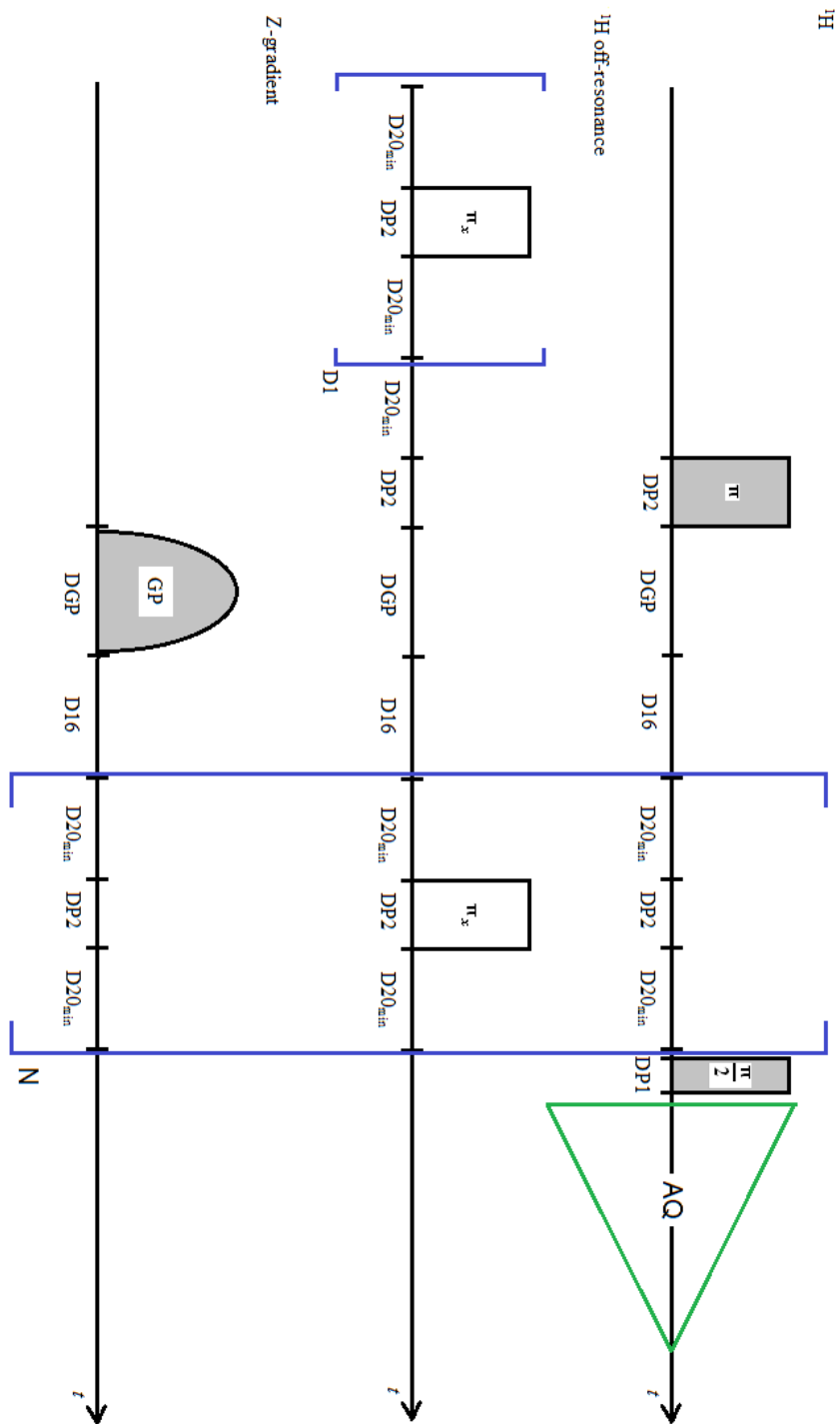
Z výsledku této kalibrace je také vidět, že skutečná teplota vzorku je asi o 5 K vyšší, než je nastavená teplota. Tedy je vzorek radiofrekvenčními pulsy poměrně značně zahříván a použití vyrovnávací sekvence je tedy důležité, neboť teplotní rozdíly o 5 K by při použití standardní sekvence CPMG způsobily značnou chybu měření.

Vytvořená pulsní sekvence byla dále modifikována tak, že tvrdé pulzy byly nahrazeny měkkými pulzy s amplitudou tvarovanou Gaussovou křivkou. Délka pulsu byla nastavena na 395  $\mu$ s, aby s nezbytnými vedlejšími prodlevami prakticky zcela vyplnila dostupnou časovou periodu  $D20_{\min}$ . Důvodem pro tuto úpravu byla možnost přiblížení off-rezonančního pulzu k rezonanční frekvenci. Bylo otestováno, že pulsy ve vzdálenosti 180 kHz (namísto 1000 kHz pro tvrdý puls) již spolehlivě neovlivňují jádra  $^1\text{H}$  vody. Důvodem pro tuto modifikaci byla snaha udržet off-rezonanční puls co nejbližší frekvenci naladění rezonančního obvodu sondy. Čím je frekvence vzdálenější, tím více hrozí, že přenesený RF výkon na vzorek bude nižší než v případě

on-rezonančních pulsů. Stabilizace teploty by pak mohla být jen částečná. Předpokládáme nicméně, že uvedená změna nemá přímý vliv na kalibraci teploty, neboť deponovaný výkon gausovského  $\pi$ -pulsu na vzorek je stejný jako deponovaný výkon tvrdého  $\pi$ -pulsu. Devadesátistupňový puls byl v sekvenci ponechán jako tvrdý puls. Nakonec aby bylo zaručeno, že měření spin-mřížkové relaxační doby proběhne při stejné teplotě jako měření spin-spinové relaxační doby, byla upravena sekvence Inversion Recovery s gradientním pulsem analogicky, jako byla upravena sekvence CPMG – viz. obrázek 4.4. Mixing time je v této sekvenci roven:

$$t_{mix} = DGP + DI6 + N(2D20_{min} + DP2), \quad (4.2)$$

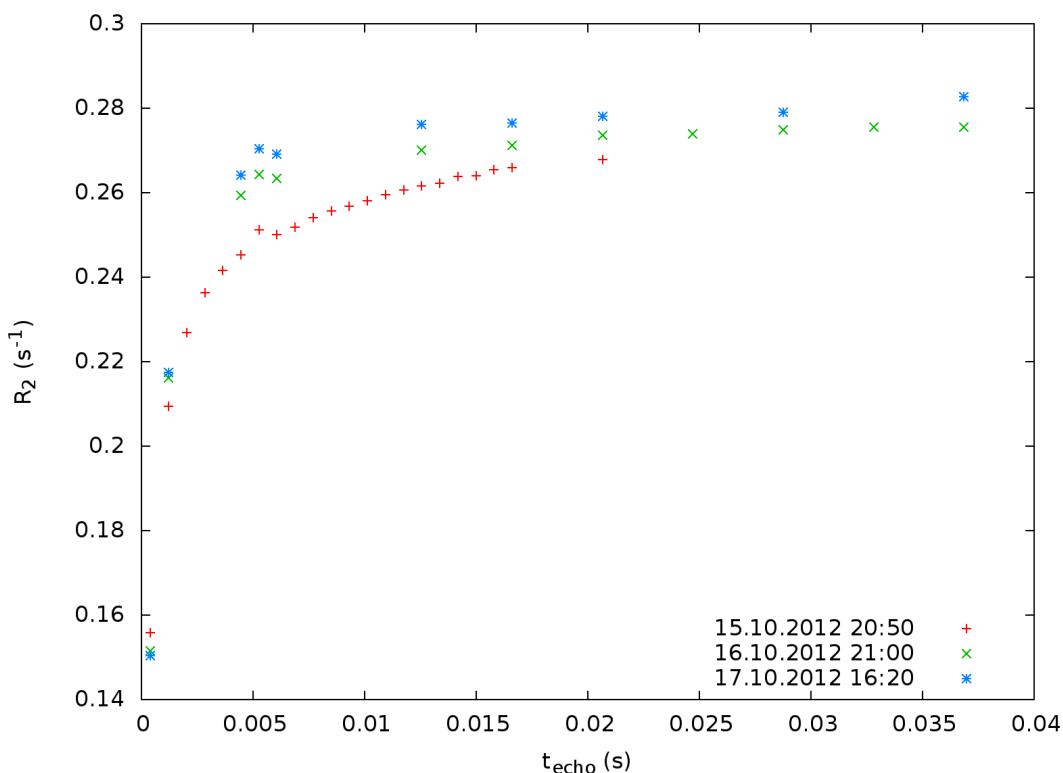
kde  $DGP$  je délka gradientního pulsu,  $DI6$  je čekací doba po gradientním pulsu a  $N$  je počet off-rezonančních  $\pi$ -pulsů délky  $DP2$  obložených dobou  $D20_{min}$ .



Obr. 4.4: Sekvence IR s gradientním pulsem a zahřívacími pulsy. Horní řádek – on-rezonanční pulsy. Prostřední řádek – off-rezonanční pulsy. Dolní řádek – gradienty v ose z.  $DP1$ ,  $DP2$  -délky  $\pi/2$  a  $\pi$ -pulsu,  $DGP$  -délka gradientního pulsu,  $D16$  -čekací doba po gradientním pulsu  $D20_{min}$  -konstantní časová prodleva,  $D1$  -počet  $\pi$ -pulsů vyplňujících čekací dobu,  $N$  - počet off-rezonančních pulsů,  $AQ$  -akvizice dat.

### 4.1.3. Stabilita vzorku

V grafu 4.2 je zobrazena závislost spin-spinové relaxační rychlosti na echo-čase vzorku 20,08 % H<sub>2</sub>O v kapilárním insertu, která byla změřena tři krát v rozmezí 3 dnů. Datum a čas začátku jednotlivých měření je uveden v legendě, jednotlivé řady byly měřeny postupně od krátkých echo-časů k dlouhým, délka měření jednoho bodu je přibližně 45 minut. Vzorek byl odplyněn 5-ti cykly FPT a po posledním cyklu byl uzavřen teflonovým ventilkem, aniž by se nad hladinu dostal vzduch. Měření bylo provedeno na TXI sondě. Parametry tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 4.3.



Graf 4.2: Závislost  $R_2$  na  $t_{\text{echo}}$  pro vzorek 20,08 % H<sub>2</sub>O ve skleněném kapilárním insertu, 5-krát FPT, uzavřený teflonovým ventilkem. V legendě jsou uvedena data a časy začátku měření jednotlivých sérií.

parametr	hodnota	pozn.
$T_{\text{skut}}$	297,6 K	
průtok dusíku	800 l/h	
délka $\pi/2$ -pulsu	19,3 $\mu\text{s}$	tvrdý puls
délka $\pi$ -pulsu	395 $\mu\text{s}$	gaussovský puls
$D20_{\text{min}}$	5 $\mu\text{s}$	
počet D1 pulsů	148148	D1 = 60 s
počet skenů	4	

Tabulka 4.3: Parametry měření dat v grafu 4.2.

Závislost  $R_2$  na echo-čase není konstantní, čili ve vzorku dochází k rychlé chemické výměně. Tu se zde ještě nebudeme snažit kvantifikovat, ale bude nás zajímat to, že z grafu 4.2 je vidět, že se celá závislost  $R_2$  na echo-čase postupně s časem systematicky posouvá nahoru. Toto ukazuje na to, že buď měřený vzorek není v rovnováze a tedy populace jednotlivých stavů mezi kterými dochází k chemické výměně se s časem mění, a nebo se mění relaxační doby.

Při řešení této komplikace bylo stanoveno několik možných zdrojů změn ve vzorku a byly navrženy cílené experimenty pro jejich potvrzení či vyvrácení.

Jednak je vzorek uzavřen teflonovým ventilkem, který teoreticky nemusí zcela těsnit. Díky tomu by se do vzorku mohl dostat zpět vzdušný kyslík, který je paramagnetický a tím zkracuje relaxační doby a tedy zvětšuje relaxační rychlosti. Postupné pronikání kyslíku do vzorku by se ale projevilo i na spin-mřížkové relaxační rychlosti, která ale ve všech třech měřeních vyšla v rámci chyby měření stejně –  $R_1$  byla vždy změřena na konci dané série měření  $R_2$ . Měření  $R_1$  bylo provedeno také s parametry v tabulce 4.3, akorát sekvence obsahovala gradientní puls (viz obr. 4.4) délky 1000  $\mu\text{s}$ , za kterým je čekací doba  $D16 = 100 \mu\text{s}$ . Jednotlivé naměřené  $R_1$  jsou:

$$R_1 = (0,09185 \pm 0,00014) s^{-1}, R_1 = (0,09190 \pm 0,00025) s^{-1} \text{ a}$$

$$R_1 = (0,09188 \pm 0,00021) s^{-1}. \text{ Uvedené chyby jsou chyby jednotlivých fitů.}$$

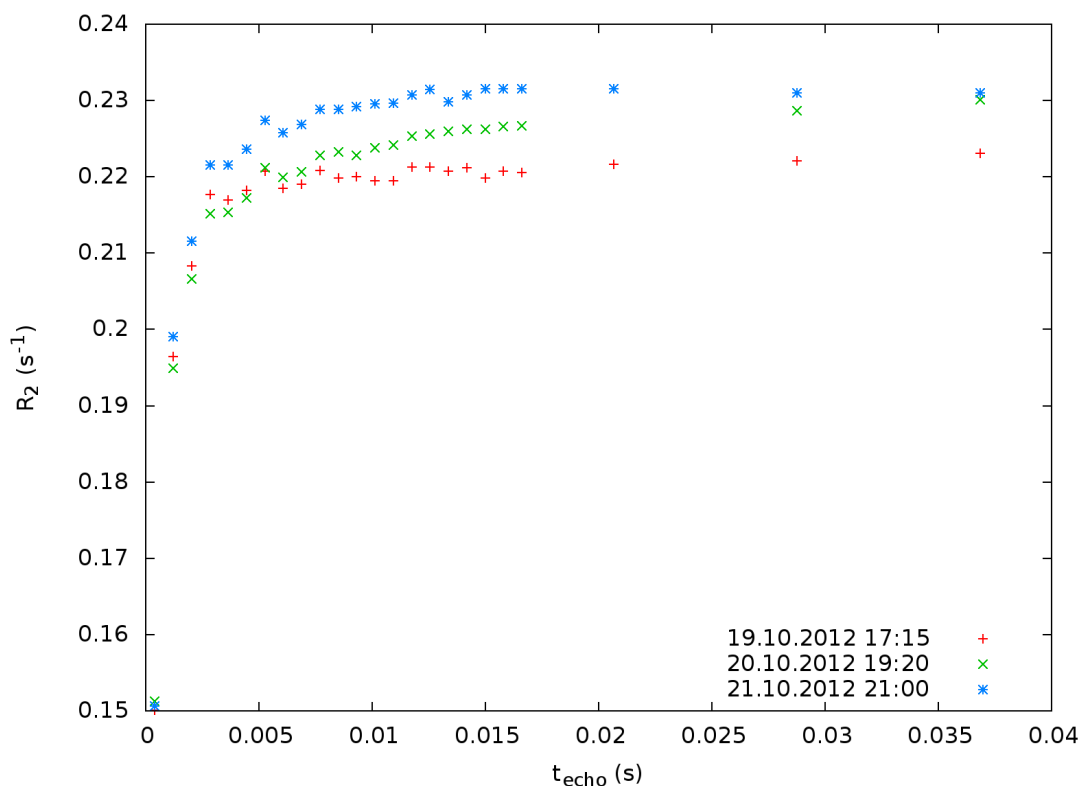
Dále by se mohl do vzorku přes netěsnící ventilek dostávat  $\text{CO}_2$ , na jehož koncentraci závisí pH vzorku, které může mít vliv na rovnováhu chemických dějů ve vzorku. Proto byl vyroben nový stejný vzorek ve skleněném kapilárním insertu, který byl po odplynění 5-ti cykly FPT zataven. Tento vzorek pak byl stejným způsobem se stejnými parametry jak v předchozím případě změřen TXI sondou. Datum a čas začátku měření jednotlivé série je opět uveden v legendě. Výsledek je zobrazen v grafu 4.3.

Spin-mřížková relaxační rychlost i zde vyšla ve všech třech měřeních v rámci chyby stejně:  $R_1 = (0,09271 \pm 0,00016) s^{-1}$ ,  $R_1 = (0,09266 \pm 0,00014) s^{-1}$ ,

$R_1 = (0,09291 \pm 0,00022) s^{-1}$ . Drobnou odlišnost od hodnot z předchozího měření lze vysvětlit nepatrně rozdílnou zbytkovou koncentrací rozpuštěného kyslíku v jednotlivých vzorcích.

Z grafu 4.3 je jednak vidět, že se celá závislost opět systematicky posouvá nahoru. Toto svědčí o tom, že postupný nárůst koncentrace  $\text{CO}_2$  a s tím spojený pokles pH není zdrojem problému se stabilitou vzorku a nebo alespoň není jediným zdrojem

tohoto problému. Dále srovnáním naměřených dat v grafu 4.3 a v grafu 4.2 vidíme, že závislosti naměřené v grafu 4.3 leží pod body naměřenými v grafu 4.2. Toto lze však vysvětlit rozdílnou dobou mezi přípravou a změřením jednotlivých vzorků.

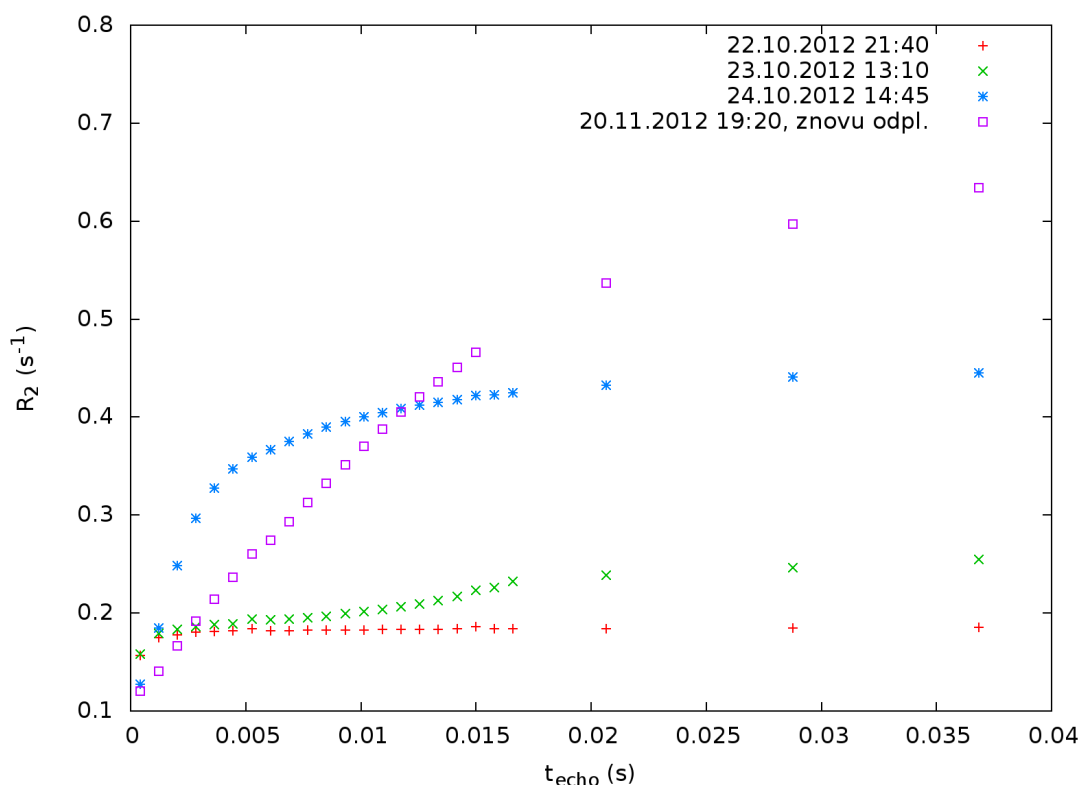


Graf 4.3: Závislost  $R_2$  na  $t_{\text{echo}}$  pro vzorek 20,08 %  $\text{H}_2\text{O}$  ve skleněném kapilárním insertu, 5-krát FPT, zatavený. V legendě jsou uvedena data a časy začátku měření jednotlivých sérií.

Dalším vlivem, který by mohl způsobovat nestabilitu vzorku, může být uvolňování iontů ze skla kapilárního insertu. Proto byl připraven další vzorek 20,08 %  $\text{H}_2\text{O}$ , který byl umístěn do 5 mm křemenné kyvety. Tento vzorek byl z důvodu většího rizika prasknutí kyvety při mrazení odplyněn jen třemi cykly FPT. Po odplynění byl uzavřen teflonovým ventilkem, neboť křemenné sklo má vysokou teplotu tání (1610 °C [37]) a vzorek nelze snadno zatavit. Takto připravený vzorek byl poté opět třikrát po sobě změřen se stejnými parametry jako v předchozích případech, pouze pro zkrácení celkové doby měření byl počet skenů snížen na 2. Délka měření jednoho bodu je tedy asi 23 minut. Dále byl tento vzorek přibližně po měsíci znovu odplyněn a změřen TXI sondou. Výsledek všech měření je zobrazen v grafu 4.4. Spin-mřížková relaxační rychlost změřená v první sérii byla:  $R_1 = (0,09555 \pm 0,00028) s^{-1}$ . V dalších



měřeních vyšla v rámci chyby stejně.



Graf 4.4: Závislost  $R_2$  na  $t_{\text{echo}}$  pro vzorek 20,08 %  $\text{H}_2\text{O}$  v 5 mm křemenné kyvetě, 3-krát FPT, uzavřený teflonovým ventilkem. V legendě jsou uvedena data a časy začátku měření jednotlivých sérií.

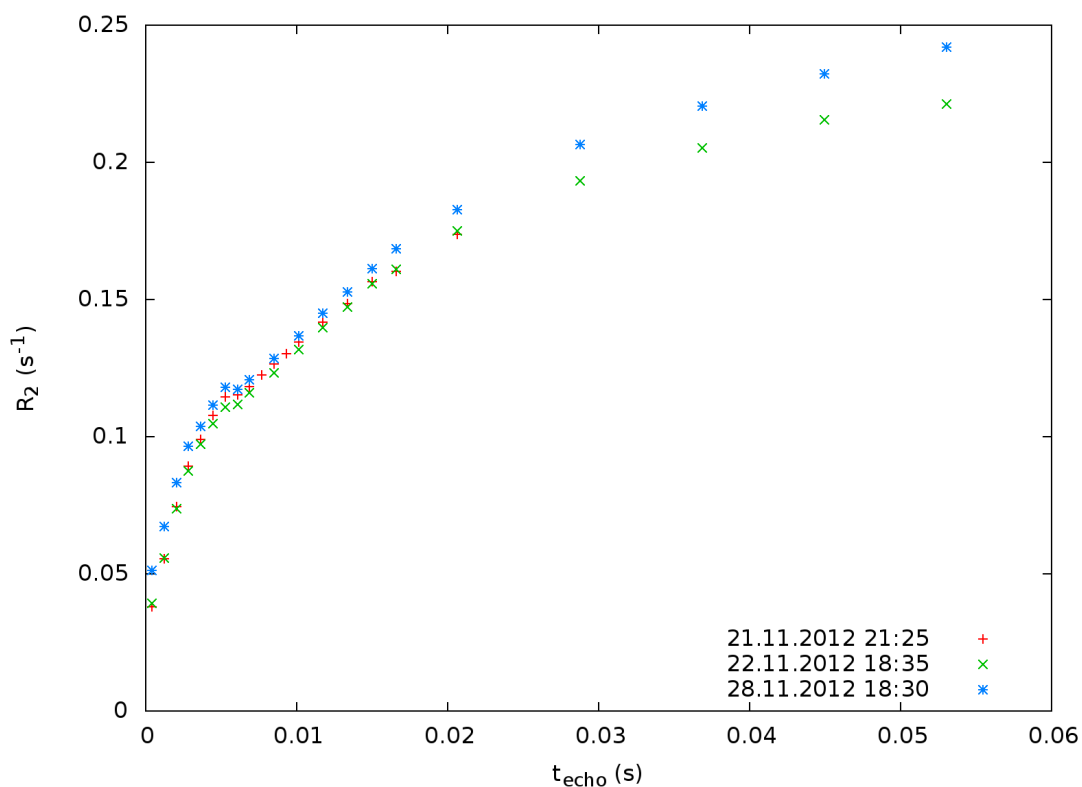
Z grafu 4.4 je opět vidět, že se celá závislost systematicky posouvá nahoru a to dokonce mnohem rychleji než v předchozích případech. Z tohoto je patrné, že samotné uvolňování iontů ze skla není jedinou příčinou nestability vzorku, protože z křemenných kyvet by se žádné ionty uvolňovat neměly, neboť tyto kyvety jsou vyrobeny z velmi čistého křemíku. U tohoto měření ale na druhou stranu nemusí být zaručeno, že do vzorku nepronikají plyny, neboť tento vzorek není zataven, ale pouze uzavřen teflonovým ventilkem. Takto lze vysvětlit i větší rychlost pozorovaného systematického posunu, neboť teflonový ventilek při nasazování na křemennou kyvetu klade menší odpor než při nasazování na skleněný insert a tedy může na křemenných kyvetách méně těsnit. Zajímavé ovšem je, že výsledek po měsíci (fialové čtverečky v grafu 4.4), kdy byl vzorek znovu odplyněn, nevyšel stejně jako první měření. Toto nasvědčuje tomu, že pronikání plynů do vzorku není jedinou příčinou nestability

vzorku a pravděpodobně se do vzorku přece jen dostaly nějaké nečistoty ze skla kyvety.

Závěrem předchozích experimentů tedy je, že příčiny nestability vzorku byly pravděpodobně dvě. Jednak uvolňování nečistot ze skla a jednak pronikání plynů do vzorku. Pro ověření této hypotézy byl připraven vzorek 0,1 % H<sub>2</sub>O. Tento vzorek byl umístěn do 5 mm křemenné kyvety, která byla před tím přibližně jeden den naložená v 65 % kyselině dusičné s cílem odstranění případných volných iontů z povrchu skla kyvety. Po naložení v kyselině dusičné byla tato kyveta důkladně vymyta (10-krát destilovanou vodou a po té 5-krát deionizovanou vodou) a vysušena horkovzdušnou sušičkou při teplotě 140 °C. Tento vzorek byl odplyněn třemi cykly FPT a uzavřen teflonovým ventilkem, přičemž byl vybrán ventilek, který při nasazování kladl největší odpor. Poslední FPT cyklus byl proveden 21.11.2012 v 18:00. Takto připravený vzorek byl změřen BBO sondou s nastavenou teplotou na 292 K – BBO sonda byla k tomuto měření použita z důvodů podezření na poruchu TXI sondy, proto byla také snížena koncentrace vzorku na 0,1 % H<sub>2</sub>O pro odstranění vlivu radiačního dampingu. Nevýhodou použití BBO sondy je, že na ní nebyla provedena teplotní kalibrace při použití sekvence CPMG vyrovnávající zahřívání vzorku a tedy neznáme přesně skutečnou teplotu vzorku. Pro účel tohoto experimentu to však není podstatné. Výsledek měření je zobrazen v grafu 4.5 a parametry tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 4.4. V legendě jsou opět uvedeny začátky měření jednotlivých sérií. Délka měření jednoho bodu je asi 40 minut.

parametr	hodnota	pozn.
průtok dusíku	800 l/h	
délka $\pi/2$ -pulsu	19 $\mu$ s	tvrdý puls
délka $\pi/2$ -pulsu	395 $\mu$ s	gaussovský puls
D20 <sub>min</sub>	5 $\mu$ s	
počet D1 pulsů	493827	D1 = 200 s
počet skenů	1	

Tabulka 4.4: Parametry měření dat v grafu 4.5.



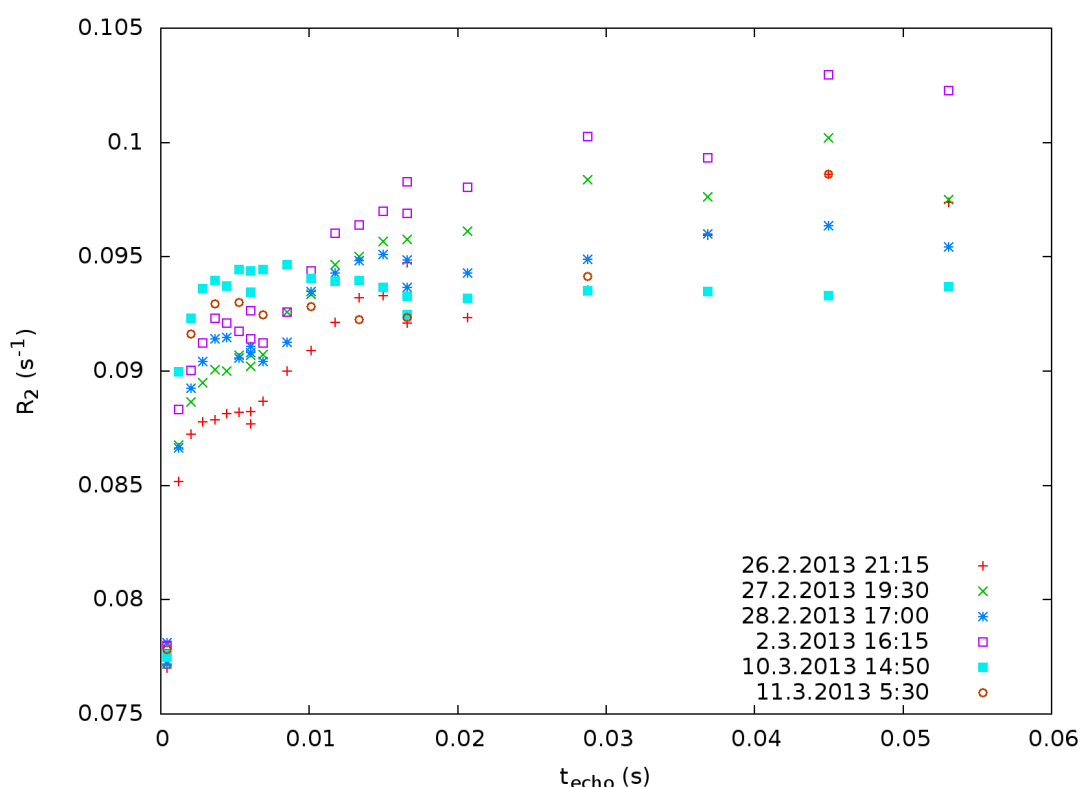
Graf 4.5: Závislost  $R_2$  na  $t_{\text{echo}}$  pro vzorek 0,1 %  $\text{H}_2\text{O}$  v 5 mm křemenné kyvetě, 3-krát FPT, uzavřený teflonovým ventilkem. V legendě jsou uvedena data a časy začátku měření jednotlivých sérií.

Z grafu 4.5 je vidět, že první dvě měření (červené a zelené) vyšla téměř stejné. Systematicky posunuto je až třetí (modré) měření, které bylo provedeno 6 dní po druhém měření a pravděpodobně se za tuto dobu do vzorku dostal oxid uhličitý.

Toto chování opět potvrzuje hypotézu, že příčinou nestability vzorku je uvolnění iontů z povrchu skla a pronikání plynů do vzorku – ionty z povrchu skla byly odstraněny kyselinou dusičnou a zpočátku byly plyny ze vzorku odstraněny.

Pro odstranění těchto vlivů byly zakoupeny 4 mm křemenné kyvety, které jsou ve své horní části vybaveny přechodem ke standardnímu sklu a tedy je možné je zatavit. Tyto kyvety byly opět více než jeden den naloženy do 65 % kyseliny dusičné a poté důkladně vymyty (10-krát destilovanou vodou a 5-krát deionizovanou vodou) a vysušeny horkovzdušnou sušičkou při 140 °C. Do takto ošetřených kyvet byl připraven vzorek 2,20 %  $\text{H}_2\text{O}$  z ampulkové  $\text{D}_2\text{O}$ . Tento vzorek byl odplyněn 5-ti cykly FPT a po posledním cyklu byl zataven. Poslední cyklus FPT byl proveden 26.2.2013 v 18:10. Výsledek měření je zobrazen v grafu 4.6, parametry tohoto měření jsou uve-

deny v tabulce 4.5, měření bylo provedeno na TXI sondě.



Graf 4.6: Závislost  $R_2$  na  $t_{\text{echo}}$  pro vzorek 2,20 %  $\text{H}_2\text{O}$  v 4 mm křemenné kyvetě s přechodem k obyčejnému sklu, 5-krát FPT, zatavený. V legendě jsou uvedena data a časy začátku měření jednotlivých sérií.

parametr	hodnota	pozn.
$T_{\text{skut}}$	297,6 K	
průtok dusíku	800 l/h	
délka $\pi/2$ -pulsu	20,2 $\mu\text{s}$	tvrdý puls
délka $\pi$ -pulsu	395 $\mu\text{s}$	gaussovský puls
$D20_{\text{min}}$	5 $\mu\text{s}$	
počet D1 pulsů	419753	D1 = 170 s
počet skenů	1	

Tabulka 4.5: Parametry měření dat v grafu 4.6.

Z grafu 4.6 je vidět, že chyba měření  $R_2$  pro jednotlivé echo-časy je na takto připraveném vzorku náhodná a žádný systematický posun celé závislosti už zde patrný není. Také došlo ke snížení maximálních  $R_2$  zhruba na polovinu hodnot z předchozích měření. Závěrem tedy je, že problém se stabilitou vzorku odstraní použitím 4 mm křemenných kyvet s přechodem k normálnímu sklu, přičemž tyto kyvety je třeba

před měřením naložit do 65 % kyseliny dusičné a důkladně vymýt a vysušit. Vzorek je po odplynění třeba zatavit.

## 4.2. Chemická výměna

### 4.2.1. Výsledky měření

Výsledné měření chemické výměny (závislosti  $R_2$  na echo-čase) bylo provedeno na vzorku 2,20 %  $H_2O$ , který byl odplyněn 5-ti cykly FPT a zataven v 4 mm křemeno-skleněné kyvetě. K měření byla použita TXI sonda. Měření byla provedena při třech teplotách: 281,3 K, 289,6 K a 297,6 K. Parametry jednotlivých měření jsou uvedeny v následujících tabulkách.

parametr	hodnota	pozn.
$T_{skut}$	281,3 K	
průtok dusíku	800 l/h	
délka $\pi/2$ -pulsu	19,8 $\mu s$	tvrdý puls
délka $\pi$ -pulsu	395 $\mu s$	gaussovský puls
$D20_{min}$	5 $\mu s$	
počet D1 pulsů	259259	D1 = 105 s
počet skenů	1	

Tabulka 4.6: Parametry měření při teplotě 281,3 K.

parametr	hodnota	pozn.
$T_{skut}$	289,6 K	
průtok dusíku	800 l/h	
délka $\pi/2$ -pulsu	20,2 $\mu s$	tvrdý puls
délka $\pi$ -pulsu	395 $\mu s$	gaussovský puls
$D20_{min}$	5 $\mu s$	
počet D1 pulsů	345679	D1 = 140 s
počet skenů	1	

Tabulka 4.7: Parametry měření při teplotě 289,6 K.

parametr	hodnota	pozn.
$T_{skut}$	297,6 K	
průtok dusíku	800 l/h	
délka $\pi/2$ -pulsu	20,2 $\mu s$	tvrdý puls
délka $\pi$ -pulsu	395 $\mu s$	gaussovský puls
$D20_{min}$	5 $\mu s$	
počet D1 pulsů	419753	D1 = 170 s
počet skenů	1	

Tabulka 4.8: Parametry měření při teplotě 297,6 K.

Naměřené závislosti spin-spinové relaxační rychlosti jsou vykresleny v grafech 4.7 až 4.9. Jak je vidět z grafu 4.7, tak naměřené závislosti nelze nafitovat vztahem (1.50) – modrý fit v grafu 4.7. Je tedy nutné uvažovat nejméně dva současně probíhající procesy chemické výměny. Proto je naměřená data třeba fitovat vztahem (1.51). Jak je vidět z grafů 4.7-4.9, tak fit závislostí (1.51) již dobře vystihuje naměřená data. Hodnota  $R_2^{nonex}$  byla při těchto fitech zafixována a položena rovna hodnotě  $R_1$ , neboť převládajícím mechanismem relaxace ve vodě mimo chemickou výměnu je dipól-dipólová interakce a za těchto podmínek platí  $R_2 = R_1$ . Získané parametry chemických výměn pro jednotlivé teploty jsou uvedeny v tabulce 4.9. V této tabulce jsou také uvedeny naměřené hodnoty  $R_1$ . A v tabulce 4.10 jsou uvedeny korelační matice jednotlivých fitů.

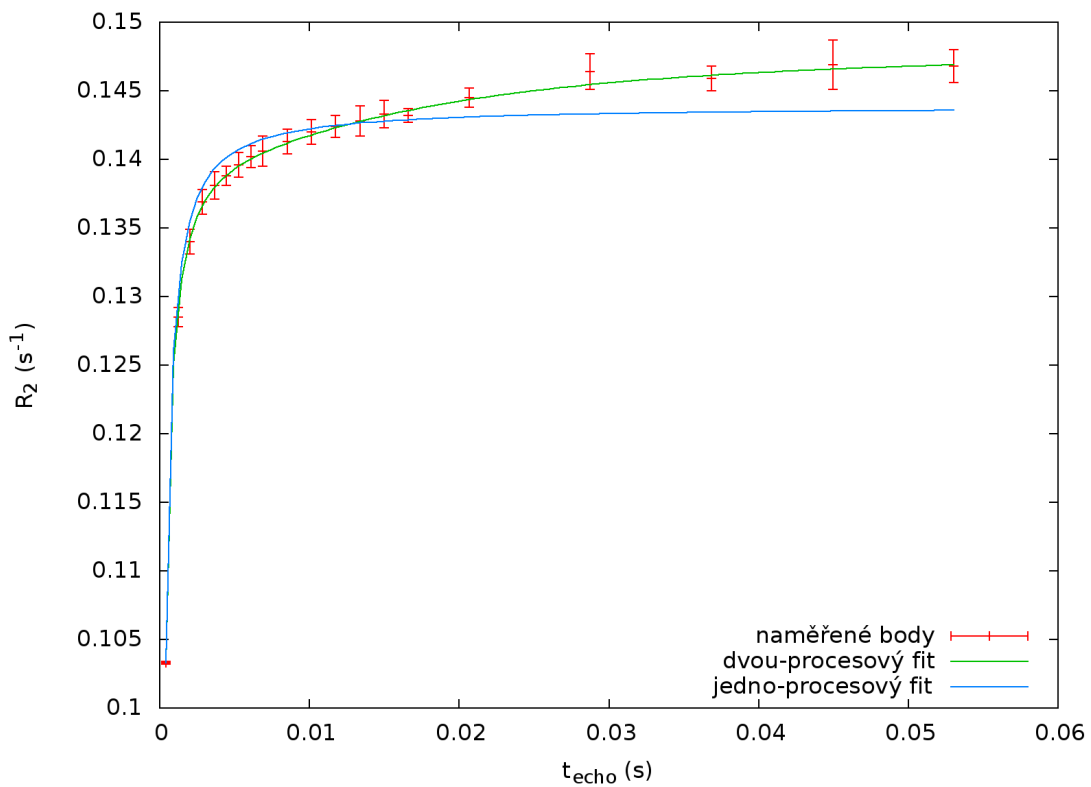
T (K)	$R_1$ (s <sup>-1</sup> )	$\Phi_1$ (rad <sup>2</sup> s <sup>-2</sup> )	$k^{ex}_1$ (s <sup>-1</sup> )	$\Phi_2$ (rad <sup>2</sup> s <sup>-2</sup> )	$k^{ex}_2$ (s <sup>-1</sup> )
281,3	0,04825 ± 0,00004	1102 ± 2	11734 ± 34	1,10 ± 0,09	168 ± 19
289,6	0,03642 ± 0,00006	1174 ± 15	14720 ± 210	0,55 ± 0,08	122 ± 26
297,6	0,02880 ± 0,00028	1363 ± 20	21530 ± 410	1,37 ± 0,20	208 ± 35

Tabulka 4.9: Naměřené hodnoty  $R_1$  a parametry chemických výměn.

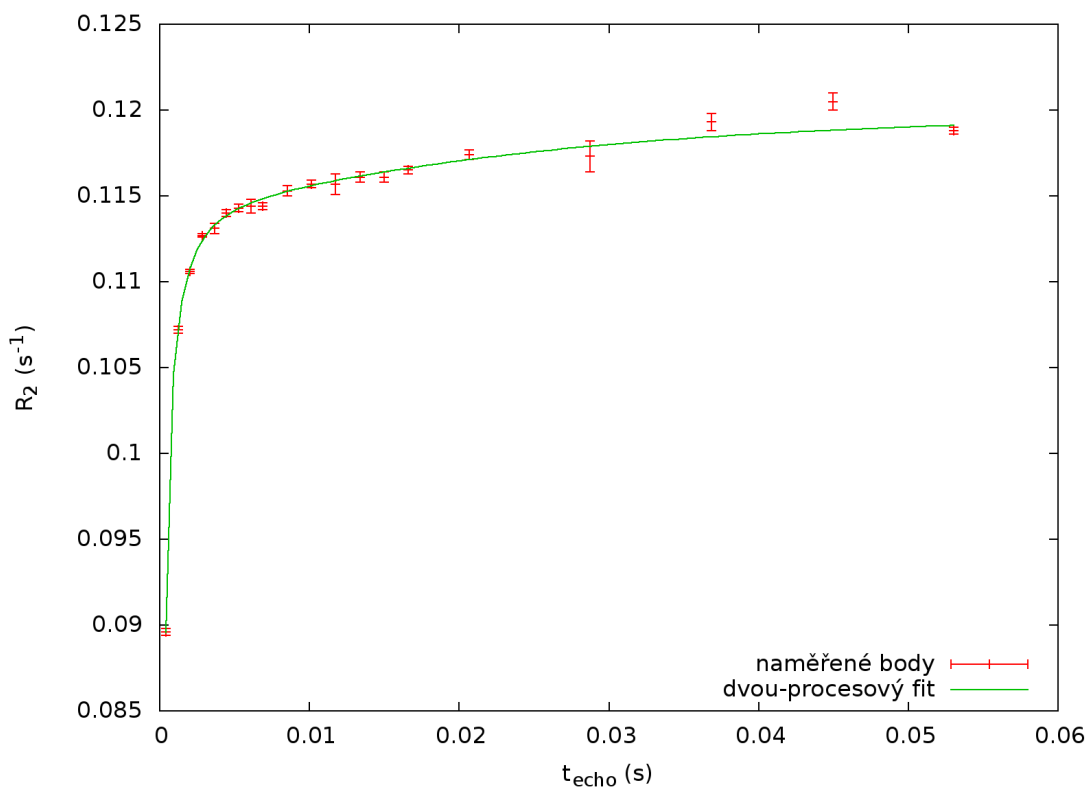
*Pozn.:  $R_1$  byla při jednotlivých teplotách změřena několikrát (při teplotě 297,6 K pětkrát, při ostatních teplotách třikrát). V tabulce je uveden aritmetický průměr a chyba průměru. Chyby uvedené u ostatních parametrů jsou chyby fitů.*

	T = 281,3 K				T = 289,6 K				T = 297,6 K			
	$\Phi_1$	$k^{ex}_1$	$\Phi_2$	$k^{ex}_2$	$\Phi_1$	$k^{ex}_1$	$\Phi_2$	$k^{ex}_2$	$\Phi_1$	$k^{ex}_1$	$\Phi_2$	$k^{ex}_2$
$\Phi_1$	1,000				1,000				1,000			
$k^{ex}_1$	0,903	1,000			0,995	1,000			0,991	1,000		
$\Phi_2$	0,598	0,815	1,000		0,364	0,425	1,000		0,778	0,837	1,000	
$k^{ex}_2$	0,432	0,594	0,744	1,000	0,247	0,295	0,752	1,000	0,598	0,645	0,790	1,000

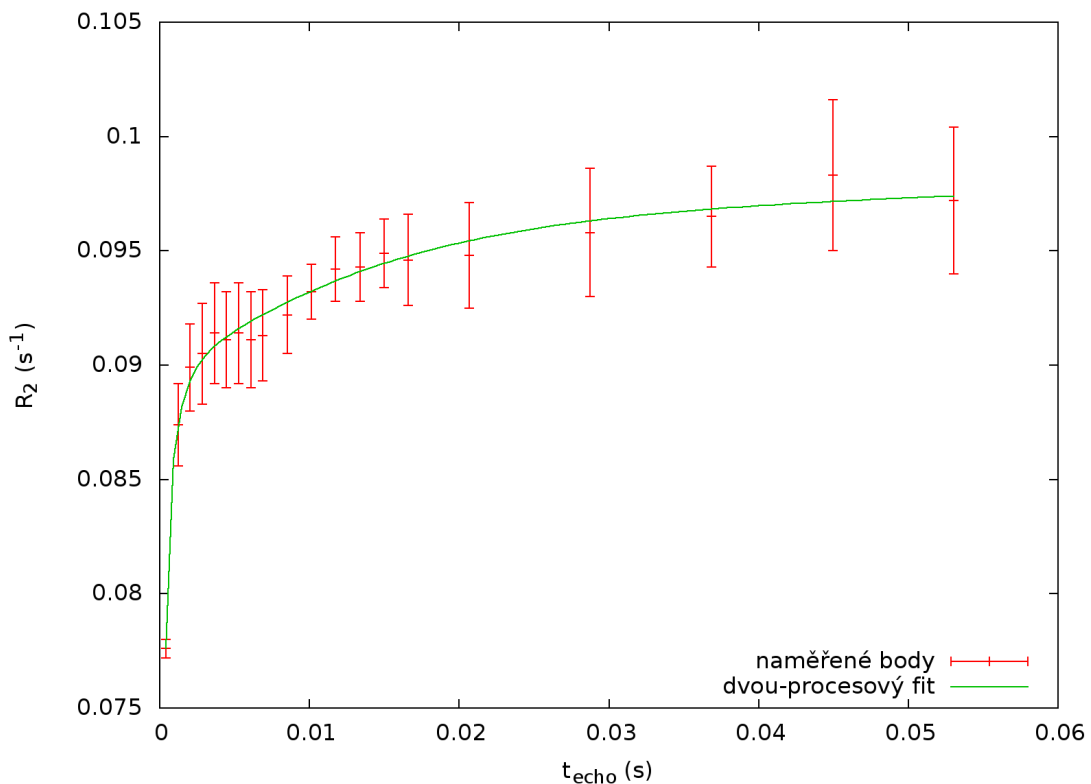
Tabulka 4.10: Korelační matice pro jednotlivé fity.



Graf 4.7: Závislost  $R_2$  na  $t_{\text{echo}}$  pro vzorek 2,20 % H<sub>2</sub>O při teplotě 281,3 K.



Graf 4.8: Závislost  $R_2$  na  $t_{\text{echo}}$  pro vzorek 2,20 % H<sub>2</sub>O při teplotě 289,6 K.

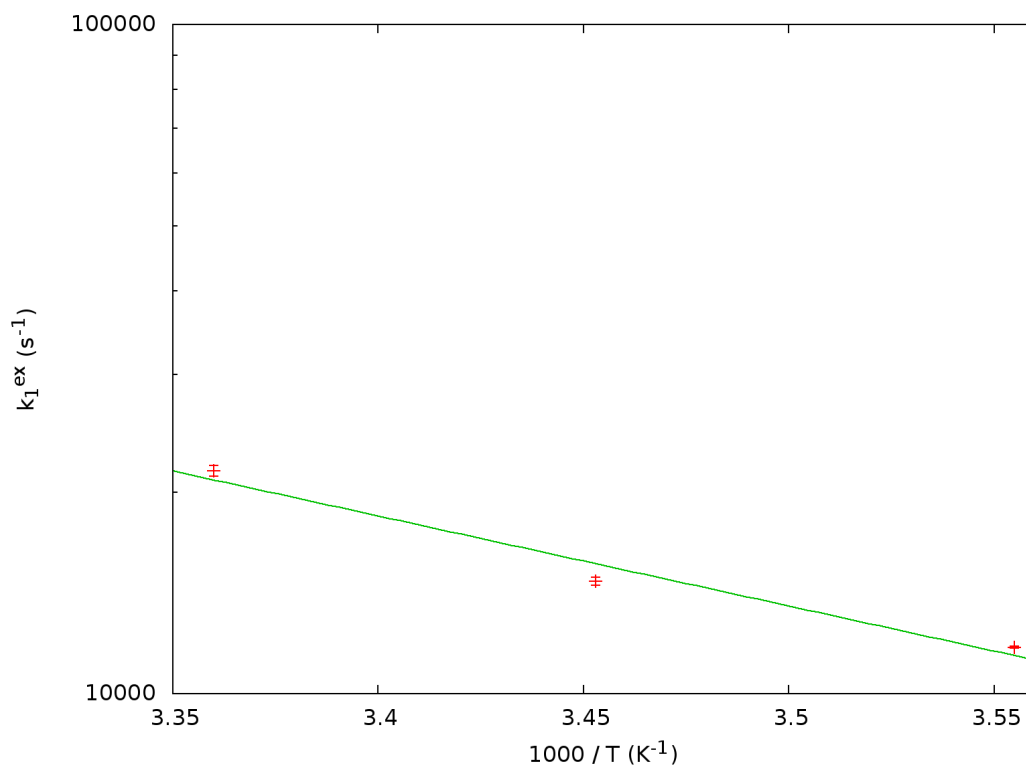


Graf 4.9: Závislost  $R_2$  na  $t_{\text{echo}}$  pro vzorek 2,20 %  $\text{H}_2\text{O}$  při teplotě 297,6 K.

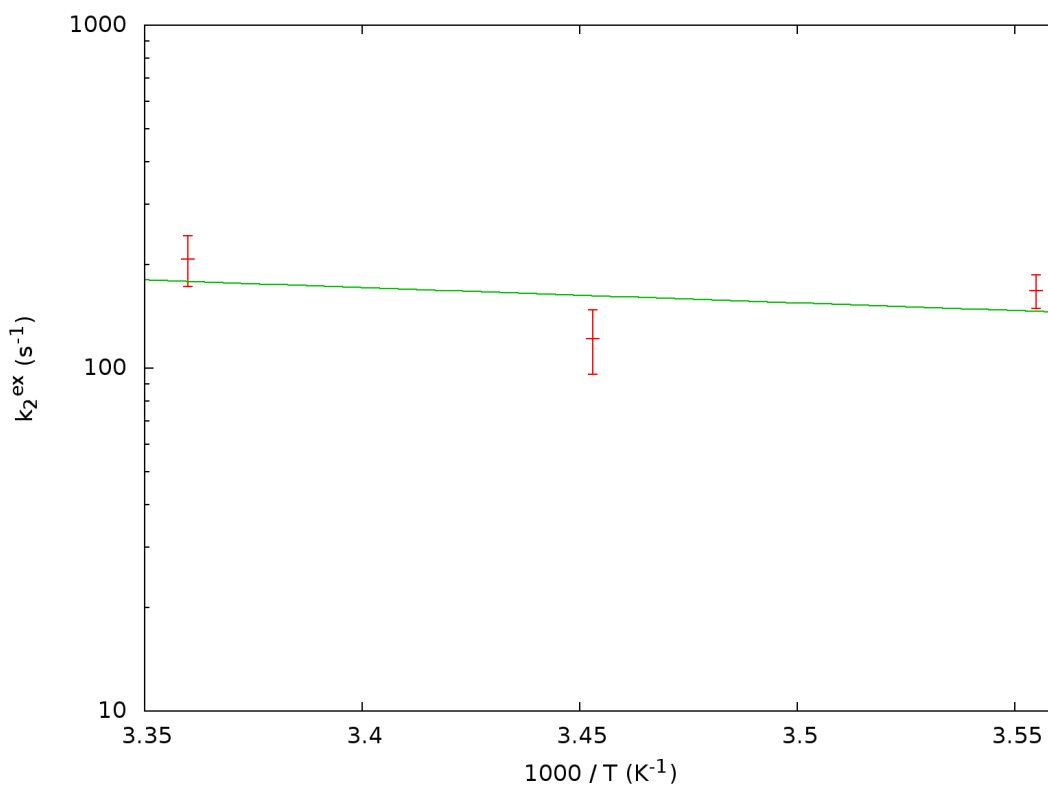
*Pozn.: Každý bod v grafech 4.7 až 4.9 byl změřen několikrát (v grafu 4.9 pětkrát, v ostatních grafech třikrát). V grafech 4.7 až 4.9 jsou zakresleny aritmetické průměry s chybami aritmetického průměru. Jednotlivé fity byly zváženy těmito chybami.*

Dále v grafech 4.10 a 4.11 jsou vyneseny Arrheniovy závislosti rychlosti chemické výměny na teplotě pro jednotlivé procesy.





Graf 4.10: Arrheniova závislost rychlosti chemické výměny pro první proces.



Graf 4.11: Arrheniova závislost rychlosti chemické výměny pro druhý proces.

#### 4.2.2. Diskuse

Z naměřených dat je zřejmé, že v měřeném vzorku probíhají dva procesy chemické výměny. Pro zjednodušení je budeme nazývat „rychlý“ a „pomalý“, ale oba jsou ve škále  $^1\text{H}$  chemických posunů v oblasti limitu rychlé výměny.

Parametry rychlého procesu lze z naměřených dat určit s dobrou přesností a získané parametry se chovají dle očekávání – jak je vidět z grafu 4.10 tak rychlostní konstanty  $k_1^{\text{ex}}$  s teplotou arheniovsky rostou. Z tabulky 4.9 je vidět, že s parametry pomalého procesu je to odlišné. Naměřená rychlostní konstanta při prostřední měřené teplotě vychází menší než rychlostní konstanty při obou krajních teplotách a z grafu 4.11 je vidět, že tato hodnota neleží na Arrheniově křivce. Podobně i hodnota parametru  $\Phi_2$  při prostřední měřené teplotě vychází nižší než hodnota parametru  $\Phi_2$  při ostatních teplotách, zatímco parametr  $\Phi_1$  s teplotou roste. Parametry pomalého procesu jsou tedy zatíženy poměrně velkou chybou. To je dáno tím, že se tento proces projevuje až ve vyšších echo-časech (zhruba v oblasti 0,01-0,06 s), kde, jak je vidět z grafů 4.7-4.9, experimentální body byly měřeny s malou hustotou (v oblasti od 0,02 do 0,06 s je pouze 5 experimentálních bodů). Dále je třeba uvážit, že absolutní velikost příspěvku ( $\Phi_2/k_2^{\text{ex}}$ ) od tohoto procesu k spin-spinové relaxační rychlosti je velmi malá - přibližně  $0,0065 \text{ s}^{-1}$ . K přesnějšímu určení parametrů pomalého procesu by bylo nutné měřit více bodů s delšími echo-časy a zlepšit jejich přesnost. Zdrojem nepřesnosti měření bodů s delšími echo-časy mohou být off-rezonanční pulsy v použité sekvenci CPMG vyrovnávající zahřívání vzorku, neboť těchto off-rezonančních pulsů je v dlouhých echo-časech mnoho a i tyto pulsy mohou nepatrně působit na magnetizaci. K odstranění tohoto problému by mohlo pomoci střídání fází off-rezonančních pulsů tak, aby se účinek dvou po sobě jdoucích off-rezonančních pulsů vyrušil. Z důvodu nedostatku času, který byl způsoben výše popsány komplikacemi s přípravou vzorků, toto ale v této práci nebylo provedeno. Z naměřených dat nicméně lze říci, že ve vzorku pozorujeme dva procesy – jeden o rychlosti řádově 10000 Hz a druhý o rychlosti řádově 100 Hz.

Ačkoliv z naměřených dat na jednom vzorku při třech teplotách nelze přesně objasnit podstatu jednotlivých procesů, můžeme zde navrhnout několik možných interpretací.

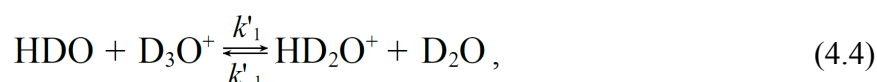
### a) Přeskoky protonů mezi molekulami HDO, HD<sub>2</sub>O<sup>+</sup> a OH<sup>-</sup>

První možnou interpretací naměřených dat jsou přeskoky protonů mezi molekulami HDO, HD<sub>2</sub>O<sup>+</sup> a OH<sup>-</sup>. Při podrobnějším rozboru této interpretace budeme pracovat v rámci dvou-procesového modelu popsaného v kapitole 1.5.4, přičemž cílem bude určit rozdíl rezonančních frekvencí jader ve stavu A a B a jader ve stavu A a C ze vztahů (1.82) a (1.83), kde jako stav A označíme vodíky v molekulách HDO, jako stav B vodíky v molekulách HD<sub>2</sub>O<sup>+</sup> a jako stav C vodíky v molekulách OH<sup>-</sup>. Tedy budeme pracovat s modelem, který je z NMR hlediska popsán rovnicí



kde  $k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}$  jsou rychlostní konstanty jednotlivých reakcí prvního řádu.

Z chemického hlediska lze tyto dva procesy popsat chemickými rovnicemi



kde  $k'_1, k'_{-1}, k'_2, k'_{-2}$  jsou rychlostní konstanty jednotlivých reakcí druhého řádu.

Souvislost těchto rychlostních konstant s rychlostními konstantami reakcí prvního řádu podle (4.3) je následující: z (4.3) a (4.4) plyne

$$\frac{d[\text{HD}_2\text{O}^+]}{dt} = k_1[\text{HDO}] - k_{-1}[\text{HD}_2\text{O}^+], \quad (4.6)$$

$$\frac{d[\text{HD}_2\text{O}^+]}{dt} = k'_1[\text{HDO}][\text{D}_3\text{O}^+] - k'_{-1}[\text{HD}_2\text{O}^+][\text{D}_2\text{O}]. \quad (4.7)$$

Porovnáním těchto dvou rovnic dostaneme

$$k_1 = k'_1[\text{D}_3\text{O}^+], \quad (4.8)$$

$$k_{-1} = k'_{-1}[\text{D}_2\text{O}]. \quad (4.9)$$

A analogickým postupem lze odvodit

$$k_2 = k'_2[\text{OD}^-], \quad (4.10)$$

$$k_{-2} = k'_{-2} [D_2O]. \quad (4.11)$$

Dále pro účel rozboru této interpretace budeme potřebovat vypočíst populace jednotlivých stavů. K tomu nejprve vypočteme molární koncentrace 100% H<sub>2</sub>O a 100% D<sub>2</sub>O

$$[H_2O]_{100\%} = \frac{\rho_{H_2O}}{M_{H_2O}} = 55,3 \text{ mol l}^{-1}, \quad (4.12)$$

$$[D_2O]_{100\%} = \frac{\rho_{D_2O}}{M_{D_2O}} = 55,3 \text{ mol l}^{-1}, \quad (4.13)$$

kde  $\rho_{H_2O}$ ,  $\rho_{D_2O}$ ,  $M_{H_2O}$ ,  $M_{D_2O}$  jsou hustoty a molekulové hmotnosti lehké a těžké vody, které při teplotě 25° C podle [37] jsou  $\rho_{H_2O} = 0,997 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\rho_{D_2O} = 1,107 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $M_{H_2O} = 18,0153 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $M_{D_2O} = 20,0276 \text{ g mol}^{-1}$ .

Dále objemová koncentrace H<sub>2</sub>O v měřeném vzorku je 2,2% a tedy počáteční molární zlomek H<sub>2</sub>O ve vzorku je roven

$$x_0 = \frac{0,022 [H_2O]_{100\%}}{0,022 [H_2O]_{100\%} + (1 - 0,022) [D_2O]_{100\%}} = 0,022. \quad (4.14)$$

A podle (1.4) – (1.6) jsou molární zlomky molekul H<sub>2</sub>O, HDO a D<sub>2</sub>O ve vzorku rovny

$$x_{H_2O} = 0,0005, \quad (4.15)$$

$$x_{HDO} = 0,0430, \quad (4.16)$$

$$x_{D_2O} = 0,9565. \quad (4.17)$$

Z těchto výsledků nyní můžeme určit molární koncentrace H<sub>2</sub>O, HDO a D<sub>2</sub>O ve vzorku

$$[H_2O] = x_{H_2O} (0,022 [H_2O]_{100\%} + (1 - 0,022) [D_2O]_{100\%}) = 0,03 \text{ mol l}^{-1}, \quad (4.18)$$

$$[HDO] = x_{HDO} (0,022 [H_2O]_{100\%} + (1 - 0,022) [D_2O]_{100\%}) = 2,38 \text{ mol l}^{-1}, \quad (4.19)$$

$$[D_2O] = x_{D_2O} (0,022 [H_2O]_{100\%} + (1 - 0,022) [D_2O]_{100\%}) = 52,9 \text{ mol l}^{-1}. \quad (4.20)$$

Dále budeme potřebovat určit molární koncentrace molekul  $HD_2O^+$  a  $OH^-$ . K tomu provedeme několik zjednodušujících předpokladů. Jednak zanedbáme přítomnost molekul  $H_2O$ . A dále budeme předpokládat, že platí následující rovnice

$$[D_3O^+] + [HD_2O^+] = 10^{-pD} \text{ mol l}^{-1}, \quad (4.21)$$

$$[OD^-] + [OH^-] = 10^{-(pK-pD)} \text{ mol l}^{-1}, \quad (4.22)$$

$$\frac{[HD_2O^+]}{[D_3O^+]} = \frac{[HDO]}{[D_2O]}, \quad (4.23)$$

$$\frac{[OH^-]}{[OD^-]} = \frac{[HDO]}{[D_2O]}, \quad (4.24)$$

kde  $pD$ , je záporně vzatý dekadický logaritmus koncentrace iontů  $D_3O^+$  v čisté  $D_2O$  a  $pK$  je záporně vzatý dekadický logaritmus součinu koncentrací iontů  $D_3O^+$  a  $OD^-$  v čisté  $D_2O$ . Podle [37] platí  $pD=7,43$ ,  $pK=14,86$ . Vyřešením této soustavy dostaneme

$$[HD_2O^+] = 1,6 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}, \quad (4.25)$$

$$[D_3O^+] = 3,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}. \quad (4.26)$$

$$[OH^-] = 1,6 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}, \quad (4.27)$$

$$[OD^-] = 3,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}. \quad (4.28)$$

A nyní můžeme konečně vypočítat populace jednotlivých stavů

$$p_A = \frac{[HDO]}{[HDO] + [HD_2O^+] + [OH^-]} = 0,999999998, \quad (4.29)$$

$$p_B = \frac{[HD_2O^+]}{[HDO] + [HD_2O^+] + [OH^-]} = 7 \cdot 10^{-10}, \quad (4.30)$$

$$p_C = \frac{[OH^-]}{[HDO] + [HD_2O^+] + [OH^-]} = 7 \cdot 10^{-10}. \quad (4.31)$$

A nyní, když máme spočteny populace jednotlivých stavů, můžeme ze vztahů (1.82)

a (1.83) vypočítat hodnoty kvadrátu rozdílů úhlových rezonančních frekvencí jader ve stavech A a B a ve stavech A a C, přičemž za  $k_1$  a  $k_2$  dosadíme ze vztahů (1.79) a (1.80) a potřebné hodnoty  $k_{ex}$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  a  $B$  určíme z naměřených dat v tabulce 4.9 podle vztahů (1.67), (1.69), (1.70) a (1.71). Získané výsledky a jejich chyby, které byly určeny Monte Carlo simulací, jsou uvedeny v tabulce 4.11. V této tabulce jsou také uvedeny hodnoty rychlostních konstant  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  a  $k_{-2}$  reakcí prvního řádu (4.3), pro které platí vztahy (1.79), (1.74), (1.80) a (1.75), a z nich vypočtené rychlostní konstanty  $k'_1$ ,  $k'_{-1}$ ,  $k'_2$ ,  $k'_{-2}$  reakcí druhého řádu (4.4) a (4.5) pro které platí vztahy (4.8)-(4.11).

T (K)	281,3	289,6	297,6
$(\Delta\omega_{AB})^2$ (rad <sup>2</sup> s <sup>-2</sup> )	$(1,64 \pm 0,04) \cdot 10^{12}$	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{12}$	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{12}$
$(\Delta\omega_{AC})^2$ (rad <sup>2</sup> s <sup>-2</sup> )	$(-2 \pm 5) \cdot 10^9$	$(-1 \pm 4) \cdot 10^9$	$(-2 \pm 2) \cdot 10^9$
$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$(7,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(10 \pm 1) \cdot 10^{-6}$	$(14 \pm 1) \cdot 10^{-6}$
$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> )	$(1,17 \pm 0,05) \cdot 10^4$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^4$
$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	$(1 \pm 2) \cdot 10^{-7}$	$(1 \pm 2) \cdot 10^{-7}$	$(1 \pm 1) \cdot 10^{-7}$
$k_{-2}$ (s <sup>-1</sup> )	$(2 \pm 3) \cdot 10^2$	$(1 \pm 4) \cdot 10^2$	$(2 \pm 2) \cdot 10^2$
$k'_1$ (l mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	222 ± 9	280 ± 30	400 ± 40
$k'_{-1}$ (l mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	222 ± 9	280 ± 30	400 ± 40
$k'_2$ (l mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3 ± 6	2 ± 7	4 ± 4
$k'_{-2}$ (l mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3 ± 6	2 ± 7	4 ± 4

Tabulka 4.11: Vypočtené hodnoty kvadrátů rozdílů úhlových rezonančních frekvencí v jednotlivých stavech a rychlostních konstant příslušných reakcí prvního a druhého řádu.

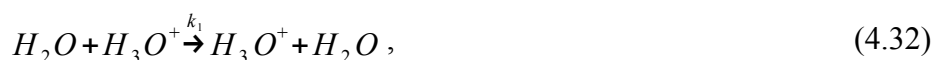
*Pozn.: Ze vztahů (1.82), (1.83), (1.79) a (1.80) plyne, že bychom pro kvadráty rozdílů úhlových rezonančních frekvencí v jednotlivých stavech měli dostat celkem 4 různá řešení. V kapitole 1.1.4 jsme ale uvedli, že pohyblivost iontů H<sup>+</sup> ve vodě je větší než pohyblivost iontů OH<sup>-</sup>. Tedy lze předpokládat, že  $k'_1 > k'_2$  a počet řešení se tímto sníží na 2. A dále díky tomu, že populace stavů B a C jsou vůči populaci stavu A zanedbatelné, výraz pod odmocninou v (1.82) vychází roven nule, čímž se počet řešení zredukuje na jedno.*

Z tabulky 4.11 je vidět, že pro všechny teploty vychází kvadrát rozdílu úhlových rezonančních frekvencí mezi stavy A a C (tedy mezi HDO a OH<sup>-</sup>) záporně. Z fyzikálního hlediska je to samozřejmě nesmysl, nicméně chyba tohoto kvadrátu je značně velká (až 400 %), což je pravděpodobně důsledek vysokých korelací mezi jednotlivými parametry fitu jak je vidět z tabulky 4.10. Tato záporná hodnota by mohla být způsobena i nesprávně zvolenou hodnotou pD, neboť ve vzorku může být přítomno zbytkové množství rozpuštěného oxidu uhličitého, který snižuje pD. V rámci měření dat pro tuto práci bylo také provedeno měření pH lehké vody, ze kterého vyplynulo, že pH lehké vody po odplynění metodou freeze-pump-thaw je stále přibližně o 0,7 nižší než neutrální pH. Zopakujeme-li tedy celý předchozí výpočet s pD=6,7 dostaneme při teplotě 281,3 K  $(\Delta\omega_{AB})^2=(3,05\pm 0,07)\cdot 10^{11} \text{ rad}^2 \text{ s}^{-2}$  a  $(\Delta\omega_{AC})^2=(-1\pm 3)\cdot 10^{10} \text{ rad}^2 \text{ s}^{-2}$  a podobný výsledek dostaneme i pro další teploty. Tedy oprava pD nevede k zisku fyzikálně smysluplného řešení. Závěrem tedy je, že díky vysoké korelaci naměřených parametrů nejsme schopni platnost výše popsaného modelu potvrdit ani vyvrátit. Pro to bychom potřebovali přesněji naměřená data.

V souvislosti s přeskoky protonů mezi molekulami HDO, HD<sub>2</sub>O<sup>+</sup> a OH<sup>-</sup> zde můžeme uvést i jiný model, který navrhl S. Meiboom v roce 1961 v práci [5].

S. Meiboom v [5] měřil parametry chemické výměny v čisté H<sub>2</sub>O v závislosti na pH, ale použil k tomu jinou NMR techniku, než která je použita v této diplomové práci, která však poskytuje stejné výsledky. Na rozdíl od našich výsledků v práci [5] pozorovali pouze jeden proces chemické výměny, jehož rychlost je srovnatelná s naším rychlým procesem.

S. Meiboom ve své práci navrhl zajímavou interpretaci naměřených výsledků, kdy se má jednat o proces přeskoků vodíků mezi molekulami H<sub>2</sub><sup>16</sup>O a H<sub>2</sub><sup>17</sup>O, přičemž rozdíl rezonančních frekvencí v jednotlivých stavech je dán J-couplingem od izotopu kyslíku <sup>17</sup>O, jehož přirozené zastoupení je 0,037 % [37]. A k těmto přeskokům podle S. Meibooma dochází právě v důsledku reakcí



V rámci tohoto modelu pro naměřenou závislost rychlosti chemické výměny na pH

(respektive na molární koncentraci iontů  $H^+$ ) odvodil rovnici

$$k_{ex} = \frac{1}{3} k_1 [H^+] + \frac{1}{2} k_2 \frac{K_w}{[H^+]}, \quad (4.34)$$

kde

$$K_w = [H^+][OH^-] \approx 10^{-14} \text{ mol}^2 \text{ l}^{-2}. \quad (4.35)$$

A fitem do naměřených dat určil

$$k_1 = (10,6 \pm 4,0) \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}, \quad (4.36)$$

$$k_2 = (3,8 \pm 1,5) \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}, \quad (4.37)$$

při teplotě 25° C.

Dále také určil velikost J-couplingu od  $^{17}\text{O}$

$$J_{OH} = (92 \pm 15) \text{ Hz}. \quad (4.38)$$

Zanedbáme-li přítomnost molekul  $\text{H}_2\text{O}$  v našem vzorku, pak populace stavu A, za který zvolíme vodík v molekule  $\text{HD}^{17}\text{O}$ , a stavu B, za který zvolíme vodík v molekule  $\text{HD}^{16}\text{O}$  jsou:

$$p_A = 0,00037, \quad (4.39)$$

$$p_B = 0,99963. \quad (4.40)$$

Předpokládáme-li dále, že pokud bychom „vypnuli“ druhý proces chemické výměny, pak bychom naměřili stejné hodnoty parametrů  $\Phi_1$  jako v tabulce 4.9, přičemž z (1.50) pak máme  $\Phi_1 = p_A p_B (\Delta \omega_{AB})^2$ , pak s použitím (4.39), (4.40) a hodnot z tabulky 4.9 dostaneme pro jednotlivé teploty následující frekvenční rozdíly rezonančních frekvencí mezi stavy A a B (jedná se skutečně o frekvenční rozdíly, nikoliv o úhlové frekvenční rozdíly)

$$\Delta f_{AB}^{281,3K} = (274,7 \pm 0,2) \text{ Hz}, \quad (4.41)$$

$$\Delta f_{AB}^{289,6K} = (284 \pm 2) \text{ Hz}, \quad (4.42)$$

$$\Delta f_{AB}^{297,6K} = (306 \pm 2) \text{ Hz}. \quad (4.43)$$

Uvedené chyby byly přeneseny z chyb fitu jednotlivých parametrů  $\Phi_1$  uvedených v



tabulce 4.9.

Vidíme, že všechny hodnoty (4.41)-(4.43) vycházejí větší než vzdálenost rezonanční čáry  $\text{HD}^{16}\text{O}$  a nejvzdálenější čáry symetrického hexupletu  $\text{HD}^{17}\text{O}$ , jehož střed leží v místě čáry  $\text{HD}^{16}\text{O}$ , která z Meiboomem změřené hodnoty (4.38) vychází 230 Hz ( $46+92+92$ ). Toto je ovšem v rozporu s představou, že bychom měli naměřit rozdíl rezonančních frekvencí, který by byl roven váženému průměru vzdáleností čar hexupletu  $\text{HD}^{17}\text{O}$  od čáry  $\text{HD}^{16}\text{O}$ , kde vahami jsou intenzity jednotlivých čar.

Dále v našich měřeních pozorujeme rychlost rychlého procesu v řádu 10000 Hz, čemuž by podle (4.34) odpovídalo pH v oblasti okolo 5,5 což je i přes možnou přítomnost oxidu uhličitého příliš málo, neboť měření pH vody po odplynění metodou freeze-pump-thaw ukázalo, že pH takto odplyněného vzorku je minimálně 6,3.

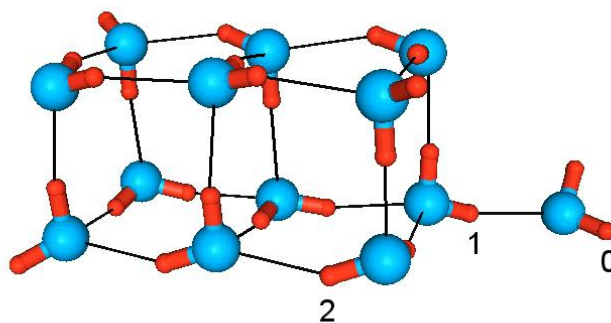
Tedy můžeme konstatovat, že naše data nejsou v souladu s interpretací S. Meibooma a tedy tato interpretace pravděpodobně není správná. Pro úplné potvrzení neplatnosti této interpretace by však bylo potřeba měřit na více spektrometrech s rozdílnou rezonanční frekvencí. Pokud by tato interpretace platila, pak by v tomto případě hodnoty  $\Phi_1$  vyšly stejně, neboť frekvenční rozdíl daný J-couplingem je na všech spektrometrech stejný, kdežto frekvenční rozdíl daný rozdílem chemických posunů je závislý na velikosti rezonanční frekvence spektrometru.

A na závěr ještě uvedme, že pokud by platila interpretace podle S. Meibooma, pak by zůstala nezodpovězena otázka co způsobuje druhý pozorovaný proces chemické výměny.

## **b) Molekulární clustery**

Další možná interpretace naměřených dat souvisí s molekulárními clustery a tedy s vodíkovými vazbami. Při rozboru této interpretace budeme opět postupovat v rámci dvou-procesového modelu popsaného v kapitole 1.5.4. Pro identifikaci tří stavů s rozdílným chemickým posunem, které pro tento model potřebujeme, se podíváme na obrázek 4.5. Na tomto obrázku je zobrazen ilustrační příklad jedné z mnoha struktur vodních molekulárních clusterů vypočtené ab-initio metodami v The Cambridge Energy Landscape Database [11]. Vidíme, že zcela obecně se ve vodních clusterech mohou vodíky vyskytovat ve třech stavech. Prvním možností je stav, kdy se daný vodík neúčastní žádné vodíkové vazby. Tento stav je na obrázku 4.5 označen jako stav

0. Druhou možností je stav, kdy se vodík účastní vodíkové vazby s kyslíkem, který je akceptorem jedné vodíkové vazby. Tento stav je na obrázku 4.5 označen jako stav 1. A konečně třetí možností je stav, kdy se vodík účastní vodíkové vazby s kyslíkem, který je akceptorem dvou vodíkových vazeb. Tento stav je na obrázku 4.5 označen jako stav 2.



Obr. 4.5: Ilustrační příklad vodního molekulárního clusteru převzaty z [11].

Na obrázku jsou vyznačeny 3 možné stavy vodíku:

Stav 0 – vodík, který netvoří vodíkovou vazbu.

Stav 1 – vodík, který tvoří vodíkovou vazbu s kyslíkem, který je akceptorem jedné vodíkové vazby.

Stav 2 – vodík, který tvoří vodíkovou vazbu s kyslíkem, který je akceptorem dvou vodíkových vazeb.

Z kvantově-chemických výpočtů v [38] plyne, že rozdíl chemického posunu mezi stavy 0 a 1 je přibližně 3 ppm, mezi stavy 0 a 2 přibližně 5 ppm a mezi stavy 1 a 2 přibližně 2 ppm. Na 500 MHz spektrometru těmito hodnotám odpovídají následující rozdíly rozdíly úhlových rezonančních frekvencí v jednotlivých stavech

$$\Delta \omega_{01} \approx 9400 \text{ rad s}^{-1}, \quad (4.44)$$

$$\Delta \omega_{02} \approx 15700 \text{ rad s}^{-1}, \quad (4.45)$$

$$\Delta \omega_{12} \approx 6300 \text{ rad s}^{-1}. \quad (4.46)$$

Dále potřebujeme popsané stavy 0, 1 a 2 ztotožnit se stavy A, B a C dvou-procesového modelu chemické výměny. Toto lze provést následujícími šesti způsoby:

1) stav  $A = \text{stav } 0$ , stav  $B = \text{stav } 1$ , stav  $C = \text{stav } 2$

Takto nastavený model nám říká, že tvoří-li daný vodík vodíkovou vazbu s kyslíkem, který je akceptorem dvou vodíkových vazeb, tak se může do stavu, kdy tvoří vodíkovou vazbu s kyslíkem, který je akceptorem jedné vodíkové vazby, dostat tak, že nejprve dojde k rozpadu vodíkové vazby s kyslíkem, který je akceptorem dvou vodíkových vazeb, čímž se přechodně dostane do stavu, ve kterém netvoří vodíkovou vazbu a následně dojde k vytvoření vodíkové vazby s kyslíkem, který je akceptorem jedné vodíkové vazby. Obdobně probíhá i cesta od stavu 1 ke stavu 2. Rychlost přechodu od stavu 0 ke stavu 1 a zpět je daná rychlostními konstantami  $k_1$  a  $k_{-1}$  a přechod mezi stavy 0 a 2 popisují konstanty  $k_2$  a  $k_{-2}$ . A pro rozdíly úhlových rezonančních frekvencí máme  $\Delta \omega_{AB} = \Delta \omega_{01}$ ,  $\Delta \omega_{AC} = \Delta \omega_{02}$  a  $\Delta \omega_{BC} = \Delta \omega_{12}$ , kde hodnoty  $\Delta \omega_{01}$ ,  $\Delta \omega_{02}$  a  $\Delta \omega_{12}$  jsou dány (4.44)-(4.46).

2) stav  $A = \text{stav } 0$ , stav  $B = \text{stav } 2$ , stav  $C = \text{stav } 1$

Takovýto model je analogický modelu 1) s tím rozdílem, že došlo k záměně stavů 1 a 2 ve stavech B a C. Tedy přechod mezi stavy 0 a 1 je popsán rychlostními konstantami  $k_2$  a  $k_{-2}$  a přechod mezi stavy 0 a 2 je popsán rychlostními konstantami  $k_1$  a  $k_{-1}$ . Pro rozdíly úhlových rezonančních frekvencí zde máme  $\Delta \omega_{AB} = \Delta \omega_{02}$ ,  $\Delta \omega_{AC} = \Delta \omega_{01}$  a  $\Delta \omega_{BC} = \Delta \omega_{12}$ .

3) stav  $A = \text{stav } 1$ , stav  $B = \text{stav } 0$ , stav  $C = \text{stav } 2$

Tento model říká, že přechod vodíku ze stavu 2 do stavu 0 probíhá přes stav 1. Přičemž ze stavu 2 do stavu 1 se sledovaný vodík může dostat tak, že dojde k rozpadu vodíkové vazby s druhým vodíkem, který tvoří vazbu s kyslíkem, který je akceptorem dvou vodíkových vazeb. Cesta od stavu 0 ke stavu 2 probíhá analogicky. V tomto modelu tedy konstanty  $k_1$  a  $k_{-1}$  popisují přechod mezi stavy 0 a 1 a konstanty  $k_2$  a  $k_{-2}$  popisují přechod mezi stavy 1 a 2. Frekvenční rozdíly zde jsou  $\Delta \omega_{AB} = \Delta \omega_{01}$ ,  $\Delta \omega_{AC} = \Delta \omega_{12}$  a  $\Delta \omega_{BC} = \Delta \omega_{02}$ .

4) stav  $A = \text{stav } 1$ , stav  $B = \text{stav } 2$ , stav  $C = \text{stav } 0$

Zde došlo opět pouze k záměně stavů 0 a 2 ve stavech B a C. Tedy konstanty  $k_1$  a  $k_{-1}$  popisují přechod mezi stavy 1 a 2 a konstanty  $k_2$  a  $k_{-2}$  popisují přechod mezi stavy 0 a 1. A frekvenční rozdíly zde jsou  $\Delta \omega_{AB} = \Delta \omega_{12}$ ,  $\Delta \omega_{AC} = \Delta \omega_{01}$  a  $\Delta \omega_{BC} = \Delta \omega_{02}$ .

5) stav  $A = \text{stav } 2$ , stav  $B = \text{stav } 0$ , stav  $C = \text{stav } 1$

Tento model předpokládá, že cesta od stavu 1 ke stavu 0 probíhá přes mezistav 2, přičemž cesta od stavu 1 ke stavu 2 probíhá tak, že se na kyslík, který je akceptorem jedné vodíkové vazby s naším sledovaným vodíkem, naváže vodíkovou vazbou další vodík z další molekuly vody. Analogicky probíhá cesta od stavu 0 ke stavu 1. Konstanty  $k_1$  a  $k_{-1}$  zde popisují přechod mezi stavy 0 a 2 a konstanty  $k_2$  a  $k_{-2}$  popisují přechod mezi stavy 1 a 2. A frekvenční rozdíly zde jsou  $\Delta \omega_{AB} = \Delta \omega_{02}$ ,  $\Delta \omega_{AC} = \Delta \omega_{12}$  a  $\Delta \omega_{BC} = \Delta \omega_{01}$ .

6) stav  $A = \text{stav } 2$ , stav  $B = \text{stav } 1$ , stav  $C = \text{stav } 0$

A tento poslední model je opět analogií modelu 5) se záměnou stavů 0 a 1 ve stavech B a C. Konstanty  $k_1$  a  $k_{-1}$  zde popisují přechod mezi stavy 1 a 2 a konstanty  $k_2$  a  $k_{-2}$  popisují přechod mezi stavy 0 a 2. A frekvenční rozdíly zde jsou  $\Delta \omega_{AB} = \Delta \omega_{12}$ ,  $\Delta \omega_{AC} = \Delta \omega_{02}$  a  $\Delta \omega_{BC} = \Delta \omega_{01}$ .

Vyřešíme-li numericky soustavu rovnic (1.59), (1.60) a (1.92) (kde  $k_1$  a  $k_2$  je dáno (1.79) a (1.80)), do které dosadíme známé hodnoty rozdílů úhlových rezonančních frekvencí v jednotlivých stavech uvedené u jednotlivých modelů výše, a hodnoty  $k_{ex}$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  a  $B$  vypočtené z naměřených dat v tabulce 4.9 podle vztahů (1.67), (1.69), (1.70) a (1.71), dostaneme pro všech 6 modelů několik řešení, která však mají mnoho společného. Jednak vždy vychází jeden ze stavů A, B a C značně populován oproti ostatním dvěma stavům. Vyřadíme-li z těchto řešení ta, ve kterých je značně populován stav kdy vodík netvoří žádnou vazbu, neboť je známo, že síť vodíkových vazeb ve vodě je velmi hustá a tedy vysoká populace stavu 0 je nepravděpodobná, tak počet řešení pro každý model snížíme. Dále tato řešení mají společné to, že vždy jedna z populací vychází nefyzikálně záporně a některé ze čtyř rychlostních konstant  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  a  $k_{-2}$  vycházejí také záporně. Toto je, jak už bylo diskutováno v předchozím textu, důsledkem velkých korelací mezi naměřenými parametry chemických výměn. Jelikož parametry prvního (rychlého) procesu máme změřeny s dobrou přesností a korelace se projevuje v nepřesnosti měření parametrů druhého (pomalého) procesu, můžeme tohoto využít a z nalezených řešení vybrat ta, kde vychází záporně populace stavu C a z rychlostních konstant vychází záporně  $k_2$  nebo  $k_{-2}$ .

Takto pro každý ze šesti výše uvedených modelů zredukujeme počet řešení na 1-2. Nemá příliš velký smysl zde uvádět všechna nalezená řešení pro každý ze šesti výše uvedených modelů, neboť všechna vykazují podobný charakter. Proto zde jako příklad uvedeme a rozebereme řešení získané s modelem 4), přičemž v tomto případě vychází dvě řešení. Tato řešení jsou uvedena v následující tabulce, ve které jsou uvedeny nalezené hodnoty populací a rychlostních konstant  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  a  $k_{-2}$ , které byly z nalezených populací a z naměřených hodnot vypočteny ze vztahů (1.79), (1.74), (1.80) a (1.75). Uvedené chyby byly získány Monte Carlo simulací.

První řešení						
	T = 281,3 K		T = 289,6 K		T = 297,6 K	
	střední hodnota	chyba	střední hodnota	chyba	střední hodnota	chyba
$P_A$	0,0000279	0,0000007	0,0000297	0,0000024	0,0000345	0,0000029
$P_B$	0,9999722	0,0000009	0,9999703	0,0000023	0,9999656	0,0000029
$P_C$	-0,0000001	0,0000010	-0,0000001	0,0000004	-0,0000001	0,0000002
$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	11700	500	14700	1600	21500	2200
$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> )	0,33	0,02	0,44	0,09	0,74	0,14
$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	-0,7	77,0	-0,2	13,0	-0,9	5,0
$k_{-2}$ (s <sup>-1</sup> )	200	300	100	400	200	200

Druhé řešení						
	T = 281,3 K		T = 289,6 K		T = 297,6 K	
	střední hodnota	chyba	střední hodnota	chyba	střední hodnota	chyba
$P_A$	0,9999721	0,0000007	0,9999703	0,0000024	0,9999655	0,0000029
$P_B$	0,0000279	0,0000007	0,0000297	0,0000024	0,0000345	0,0000029
$P_C$	-0,000000012	0,000000041	-0,000000006	0,000000031	-0,000000015	0,000000015
$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	0,33	0,02	0,44	0,09	0,74	0,14
$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> )	11700	500	14700	1600	21500	2200
$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	-0,000002	0,000102	-0,000001	0,000037	-0,000003	0,000021
$k_{-2}$ (s <sup>-1</sup> )	200	300	100	400	200	200

Tabulka 4.12: Populace a rychlostní konstanty nalezené při řešení soustavy rovnic (1.59), (1.60) a (1.92) v rámci modelu 4).

V modelu 4) je stav A ztotožněn se stavem 1, stav B se stavem 2 a stav C se stavem 0. Z výsledků z tabulky 4.12 je vidět, že vždy vychází jeden ze stavů 1 nebo 2 značně populován na úkor ostatních dvou stavů a stav 0 vychází vždy prakticky nepopulován. Dále je vidět, že populace nejvíce populovaného stavu s rostoucí teplotou klesá a roste populace druhého stavu z dvojice A a B, což je důsledek rostoucího tepelného pohybu, který snižuje stabilitu nejpobulovanějšího stavu a jeho populace klesá na úkor populace méně populovaného stavu. Potud lze říci, že jsme dostali smysluplný výsledek, který lze interpretovat tak, že ve vzorku existují clustery v

nichž jsou jednotlivé molekuly vody velmi hustě provázány vodíkovými vazbami a lze vyloučit přítomnost lineárních clusterů, neboť v nich by byly populace stavů 0 a 1 srovnatelné.

Otázkou jsou ale pozorované rychlostní konstanty. Jelikož podle [3,39] je doba života vodíkové vazby 1-20 ps, tak bychom měli pozorovat rychlostní konstanty chemické výměny v řádu  $10^{12}$  Hz, přičemž my pozorujeme rychlostní konstanty v řádu  $10^2$  Hz a  $10^5$  Hz. To je o mnoho méně než  $10^{12}$  Hz a tato interpretace naměřených dat tedy není v souladu s výsledkem [3,39] (technika měření závislosti  $R_2$  na echo-čase ani neumožňuje měřit takto rychlostní konstanty v  $10^{12}$  Hz). Jedinou možností by bylo, že nepozorujeme rozpad a tvorbu samotných vodíkových vazeb, ale pozorujeme rozpad a tvorbu clusterů, které by mohly mít delší dobu života než samotná vodíková vazba, neboť daná vodíková vazba může rychle rekombinovat, aniž by to cluster jako celek výrazně pocítil.

### c) Výměna mezi molekulami $H_2O$ a $HDO$

Poslední možnou interpretací je výměna vodíků mezi molekulami  $H_2O$  a  $HDO$ . Omezením této interpretace je to, že je pouze dvoustavová a jedno-procesová a tedy nemůže vysvětlit oba pozorované procesy chemické výměny. A při rozboru této interpretace budeme muset učinit předpoklad, že pokud bychom dokázali „vypnout“ jeden z procesů, tak bychom naměřili stejné parametry druhého „zapnutého“ procesu, jako parametry naměřené při zapnutých obou procesech. A tyto naměřené parametry budeme interpretovat v rámci dvoustavového jedno-procesového modelu popsaného v kapitole 1.5.4 rovnicí (1.50).

Touto interpretací tedy rozumíme děj, který lze popsat chemickou rovnicí



přičemž z hlediska NMR se jedná o proces



Molární koncentraci molekul  $H_2O$  a  $HDO$  ve vzorku jsme již vypočetli v rámci interpretace a), kde nám vyšlo

$$[H_2O] = 0,03 \text{ mol l}^{-1}, \quad (4.49)$$

$$[HDO]=2,38 \text{ mol l}^{-1} . \quad (4.50)$$

Označíme-li vodíky v molekulách  $H_2O$  jako stav A a vodíky v molekulách HDO jako stav B, pak pro populace těchto stavů máme

$$p_A = \frac{2[H_2O]}{2[H_2O]+[HDO]} = 0,02 , \quad (4.51)$$

$$p_B = \frac{[HDO]}{2[H_2O]+[HDO]} = 0,98 . \quad (4.52)$$

Dvojka před  $[H_2O]$  v (4.51) a (4.52) je proto, že v molekulách  $H_2O$  jsou dva vodíky. Uvážíme-li, že z měření vyšlo, že rychlý proces má parametr  $\Phi_1$  v závislosti na teplotě přibližně v rozsahu  $1100-1400 \text{ rad}^2 \text{ s}^{-2}$  a pomalý proces má parametr  $\Phi_2$  v závislosti na teplotě přibližně v rozsahu  $1,0-1,4 \text{ rad}^2 \text{ s}^{-2}$ , můžeme ze vztahu  $\Phi_{1,2} = p_A p_B \Delta \omega_{AB}$  s použitím (4.51) a (4.52) vyjádřit rozdíl chemických posunů vodíků v jednotlivých stavech (respektive vyjádřit rozdíl úhlových rezonančních frekvencí a ten potom přepočítat na rozdíl chemických posunů). Pro rychlý proces dostaneme

$$\Delta \sigma \sim 0,07 - 0,08 \text{ ppm} \quad (4.53)$$

a pro pomalý proces dostaneme

$$\Delta \sigma \sim 0,002 - 0,003 \text{ ppm} . \quad (4.54)$$

Na první pohled tato čísla vypadají rozumně, neboť nelze předpokládat, že přidání jednoho neutronu do jádra jednoho vodíku v molekule vody příliš pozmění elektronové okolí druhého vodíku a tím i jeho chemický posun. Dále uveďme, že podle [40] je při pokojové teplotě rozdíl chemických posunů vodíků v molekulách  $H_2O$  a HDO je přibližně  $0,03 \text{ ppm}$ . Srovnáním této hodnoty s (4.54) lze říci, že podstatou pozorovaného pomalého procesu nebude výměna mezi molekulami  $H_2O$  a HDO, neboť hodnota (4.54) je o řád menší než hodnota udaná v [40]. V případě rychlého procesu se hodnota (4.53) řádově shoduje s hodnotou z [40], nicméně je víc jak dvakrát větší a tedy výměna mezi molekulami  $H_2O$  a HDO pravděpodobně nebude podstatou ani pozorovaného rychlého procesu.

# Závěr

Hlavní výsledky a závěry této práce lze rozdělit do dvou částí.

První část této práce byla věnována vypracování metodiky přípravy vzorků a metodiky měření relaxačních dob směsí lehké a těžké vody. Co se týče metodiky přípravy vzorků byl učiněn závěr, že je nutné používat 4 mm křemenné kyvety, které jsou v horní části vybaveny přechodem k obyčejnému sklu, aby bylo možno vzorek po odplynění zatavit. Křemenné sklo je nezbytné z důvodů uvolňování iontů z obyčejného skla, které mají vliv na relaxační doby. A zatavení po odplynění je nutné kvůli zpětnému pronikání oxidu uhličitého a paramagnetického kyslíku do vzorku, neboť jejich přítomnost má vliv na naměřené relaxační doby. Dále v této části byly prostudovány komplikace provázející měření relaxačních dob směsí lehké a těžké vody a byly navrženy způsoby jejich odstranění. Jednak se jedná o problém s radiálním dampingem, který souvisí s velkou koncentrací vodíků ve vodě a s tím spojenou vysokou intenzitou signálu vody. Tento problém lze odstranit zejména použitím 8 mm sondy a zmenšením vzorku, případně kombinací s dalšími opatřeními (úpravy pulsní sekvence, snížení faktoru kvality sondy). Zmenšení vzorku lze dosáhnout použitím kapilárního insertu. Protože nejsou komerčně dostupné křemenné kyvety s přechodem do skla o menším průměru než 4 mm bylo v rámci této studie stanoveno omezení, že v těchto kyvetách lze měřit vzorky o koncentraci do 60%. Druhá komplikace souvisí se specifikou vzorků směsí lehké a těžké vody a to, že jejich relaxační doby jsou neobvykle dlouhé. To způsobuje významné zahřívání vzorků radiofrekvenčními pulsy při měření spin-spinové relaxační doby sekvencí CPMG. Pro eliminaci tohoto problému byla vyvinuta upravená sekvence CPMG dle obrázku 4.3, která toto zahřívání vyrovnává.

Druhá část této práce se věnuje samotnému měření relaxačních dob. V rámci této části byly naměřeny parametry chemické výměny ve vzorku o koncentraci 2,2 %  $\text{H}_2\text{O}$  při teplotách 281,3 K, 289,6 K a 297,6 K (naměřené výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.9). V následné diskusi byly rozebrány tři možné interpretace těchto naměřených dat. Jsou to a) přeskoky vodíků mezi molekulami  $\text{HD}_2\text{O}^+$ , HDO a  $\text{OH}^-$ , b) přeskoky vodíků mezi možnými stavy v molekulárních clusterech, což souvisí s rozpadem a opětovnou tvorbou vodíkových můstků a c) přeskoky vodíků mezi mole-



kulami  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{HDO}$ . Třetí možnost byla vyloučena z důvodů, že nevysvětluje dvou-procesový charakter naměřené chemické výměny a jedno-procesové přiblížení neposkytlo rozdíl chemického posunu mezi  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{HDO}$ , který by byl shodný s literaturou. Tedy jako nejpravděpodobnější zůstaly interpretace a) a b). Ovšem rozhodnout s jistotou o platnosti jedné a neplatnosti druhé z těchto interpretací z našich naměřených dat nelze, neboť i přes velké úsilí věnované metodice měření relaxačních dob, se nepovedlo změřit parametry druhého procesu s dostatečnou přesností pro interpretaci.

Výsledky této práce umožňují přidat do seznamu další anomálii vody, tentokrát z hlediska NMR spektroskopie. Velmi dlouhé relaxační doby umožňují stanovit technikou CPMG vedle sebe dva stavy, z nichž málo populovaný má velmi nízkou koncentraci dosahující jednotek, či desítek  $\text{nmol l}^{-1}$  a vysoko populovaný stav má koncentraci  $2,4 \text{ mol l}^{-1}$  a lze říci, že jsou pozorovány skrze populovaný stav. Detekční schopnost NMR spektroskopie běžnou technikou dosahuje řádově  $\mu\text{mol l}^{-1}$ .

# Seznam použité literatury

- [1] CHAPLIN, M. Water Structure and Science. [online]. [cit. 29.7.2013]. Dostupné z: <http://www.lsbu.ac.uk/water/index2.html>
- [2] LUDWIG, R. Water: From Clusters to the Bulk. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, **40** (10), 1808-1827.
- [3] KEUTSCH, F. N., SAYKALLY, R. J. Water clusters: Untangling the mysteries of the liquid, one molecule at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, **98** (19), 10533-10540.
- [4] ANDERSON, W. A., ARNOLD, J. T. Proton Relaxation Times in H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O Mixtures. *Phys. Rev.* 1956, **101** (2), 511-512.
- [5] MEIBOOM, S. Nuclear Magnetic Resonance Study of Proton Transfer in Water. *The Journal of Chemical Physics.* 1961, **34** (2), 375-388
- [6] CSÁSZÁR, A. G., CZAKÓ, G., FURTENBACHER, T., TENNYSON, J., SZALAY, V., SHIRIN, S. V., ZOBOV, N. F., POLYANSKY, O. L. On equilibrium structures of the water molecule. *J. Chem. Phys.* 2005, **122** (21), 214305.
- [7] ISAACS, E. D., SHUKLA, A., PLATZMAN, P. M., HAMANN, D. R., BARBIELLINI, B., TULK, C. A. Compton scattering evidence for covalency of the hydrogen bond in ice. *J. Phys. Chem. Solids.* 2000, **61** (3), 403-406
- [8] BARTHA, F., KAPUY, O., KOZMUTZA, C., ALSENOY, C. Van. Analysis of weakly bound structures: hydrogen bond and the electron density in a water dimer. *J. Mol. Struct. (Theochem).* 2003, **666-667**, 117-122.
- [9] LUDWIG, R. The effect of hydrogen bonding on the thermodynamic and spectroscopic properties of molecular clusters and liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002, **4** (22), 5481-5487.
- [10] MODIG, K., PFROMMER, B. G., HALLE, B. Temperature-dependent hydrogen-bond geometry in liquid water. *Phys. Rev. Lett.* 2003, **90** (7), 075502.
- [11] WALES, D. J., DOYE, J. P. K., DULLWEBER, A., HODGES, M. P., NAUMKIN, F. Y., CALVO, F., HERNÁNDEZ-ROJAS, J., MIDDLETON, T. F. The Cambridge Energy Landscape Database. [online]. [cit. 29.7.2013].

Dostupné z: <http://www-wales.ch.cam.ac.uk/CCD.html>

- [12] GEISSLER, P. L., DELLAGO, C., CHANDLER, D., HUTTER, J., PARRINELLO, M. Autoionization in liquid water. 2001, *Science*. **291**, 2121-2124.
- [13] YAGASAKI, T., IWAHASHI, K., SAITO, S., OHMINE, I. A theoretical study on anomalous temperature dependence of pK<sub>w</sub> of water. *J. Chem. Phys.* 2005, **122** (14), 144504.
- [14] AGMON, N. Mechanism of hydroxide mobility. *Chem. Phys. Lett.* 2000, **319** (3-4), 247-252.
- [15] AGMON, N. The Grotthuss mechanism. *Chem. Phys. Lett.* 1995, **244** (5-6), 456-462.
- [16] ŠUBR, M. *Spektrum Ramanova rozptylu HDO*. Praha, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Matematicko-fyzikální fakulta.
- [17] PROSER, V. a kol. *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia, 1989. ISBN 80-200-0059-3.
- [18] BLOEMBERGEN, N., PURCELL, E. M., POUND, R. V. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Phys. Rev.* 1948, **73** (7), 679-712
- [19] ABRAGAM, A. *The Principles of Nuclear Magnetism*. Oxford: Oxford University Press, 1961. ISBN 0-19-851236-8.
- [20] MCCONNELL, H. M. Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance. *The Journal of Chem. Phys.* 1957, **28** (3), 430-431.
- [21] KOWALEWSKI, J., MÄLER, L. *Nuclear Spin Relaxation in Liquids: Theory, Experiments, and Applications*, New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 0-7503-0964-4.
- [22] KORZHNEV, D. M., BILLETER, M., ARSENIIEV, A.S., OREKHOV, V. Y. NMR studies of Brownian tumbling and internal motions in proteins. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2001, **38** (3), 197-266.
- [23] GREY, M. J., WANG, Ch., PALMER, A. G. Disulfide Bond Isomerization in Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor: Multisite Chemical Exchange Quantified by CPMG Relaxation Dispersion and Chemical Shift Modeling. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, **125** (47), 14324-14335.

- [24] SLICHTER, C. P. *Principles of Magnetic Resonance*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1978. ISBN 3-540-50157-6.
- [25] BLOOM, S. Effects of Radiation Damping on Spin Dynamics. *Journal of Applied Physics*. 1957, **28** (7), 800-805.
- [26] ROURKE, D. E. Solutions and Linearization of the Nonlinear Dynamics of Radiation Damping. *Concepts in Magnetic Resonance*. 2002, **14** (2), 112-129.
- [27] MAO, Xi-an, GUO, Jian-xin, YE, Chao-hui. Radiation damping effects on spin-lattice relaxation time measurements. *Chemical Physics Letters*. 1994, **222** (5), 417-421.
- [28] MAO, Xi-an, GUO, Jian-xin, YE, Chao-hui. Radiation damping effects on transverse relaxation time measurements. *Chemical Physics Letters*. 1994, **227** (1-2), 65-68.
- [29] BARJAT, H., MATTIELLO, D. L., FREEMAN, R. Suppression of Radiation Damping in High-Resolution NMR. *Journal of Magnetic Resonance*. 1999, **136** (1), 114-117.
- [30] ANKLIN, C., RINDLISBACHER, M. OTTING, G., LAUKIEN, F. H. A Probehead with Switchable Quality Factor. Suppression of Radiation Damping. *Journal of Magnetic Resonance Series B*. 1995, **106** (2), 199-201.
- [31] ZHANG, S., GORENSTEIN, D. G. Suppression of Radiation Damping during Acquisition by Pulsed Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance Series A*. 1996, **118** (2), 291-294.
- [32] MAAS, W. E., LAUKIEN, F. H., CORY, D. G. Suppression of Radiation Damping by Q Switching during Acquisition. *Journal of Magnetic Resonance Series A*. 1995, **113** (2), 274-277.
- [33] Doc. RNDr. Jan Lang – osobní sdělení.
- [34] Internetové stránky firmy Wilmad-LabGlass. [online]. [cit. 29.7.2013]. Dostupné z: <http://www.wilmad-labglass.com>
- [35] GÜNTHER, H. *NMR Spectroscopy: Basic principles, concepts, and applications in chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. ISBN: 978-0-471-95201-5.
- [36] SEGELSTEIN, D. J. *The complex refractive index of water*. Kansas City, 1981. M. S. Thesis. University of Missouri-Kansas City.

- [37] HAYNES, W. M. *Handbook of Chemistry and Physics on DVD*, CRC Press, 2013. ISBN 978-1-4665-6422-0.
- [38] PARTHASARATHI, R., SUBRAMANIAN, V., SATHYAMURTHY, N. Electron Density Topography, NMR, and NBO Analysis of Water Clusters. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*. 2008, **38** (1), 18-27.
- [39] SKINNER, J. L., AUER, B. M., LIN, Y. Vibrational Line Shapes, Spectral Diffusion, and Hydrogen Bonding in Liquid Water. *Advances in Chemical Physics*. 2009, **142**, 59-103.
- [40] MAHI, L., DUPLAN, J. C. Measurement of small spin-spin splittings in the presence of chemical exchange: case of deuteriated water. *Journal of Magnetic Resonance*. 2003, **162** (2), 341-347.

# Seznam tabulek

Tabulka 4.1: Chemický posun 90 % H <sub>2</sub> O ( $\delta$ ) v závislosti na počtu ech (N) a počtu $\pi$ -pulsů v echo-čase (k).....	50
Tabulka 4.2: Parametry kalibračních měření.....	51
Tabulka 4.3: Parametry měření dat v grafu 4.2.....	55
Tabulka 4.4: Parametry měření dat v grafu 4.5.....	59
Tabulka 4.5: Parametry měření dat v grafu 4.6.....	61
Tabulka 4.6: Parametry měření při teplotě 281,3 K.....	62
Tabulka 4.7: Parametry měření při teplotě 289,6 K.....	62
Tabulka 4.8: Parametry měření při teplotě 297,6 K.....	62
Tabulka 4.9: Naměřené hodnoty R <sub>1</sub> a a parametry chemických výměn.....	63
Tabulka 4.10: Korelační matice pro jednotlivé fity.....	63
Tabulka 4.11: Vypočtené hodnoty kvadrátů rozdílů úhlových rezonančních frekvencí v jednotlivých stavech a rychlostních konstant příslušných reakcí prvního a druhého řádu.....	71
Tabulka 4.12: Populace a rychlostní konstanty nalezené při řešení soustavy rovnic (1.59), (1.60) a (1.92) v rámci modelu 4).....	78

# Seznam použitých zkratek

NMR – jaderná (nukleární) magnetická rezonance

SE – spinové echo

FID – signál volné precese („free induction decay“)

TMS – tetramethylsilan – NMR standard

FPT – metoda odplynění vzorků (freeze-pump-thaw)

CPMG – sekvence pro měření spin-spinové relaxační doby

# Přílohy

## Příloha 1: Pulzní program sekvence CPMG vyrovnávající teplotu pro $k=11$

```
;Topspin 1.3
;
;cpmg vyrovnavajici teplotu k=11 (off-rezonancni pulzy
;v echo-casu je treba zadavat rucne, nebot pouziti
;cyklu v cyklu vede k chybe)
;
; $CLASS=HighRes
; $DIM=2D
; $TYPE=
; $SUBTYPE=
; $COMMENT=

#include <Avance.incl>

"p2=p1*2"
"d11=100m"
"d21=p12/2"
"d22=d20/2"

define loopcounter d1pulsy
"d1pulsy=d1/(2*d20+2*d21)"

1 ze
2 20u pl12:f2
  20u pl1:f1
3 d20
  p12:sp2:f2 ph2
  d20
  lo to 3 times d1pulsy
  d20
  p1 ph1 ;;
4 d20 pl11:f1
  p12:sp2:f2 ph2
  d20
  d20
  p12:sp2:f2 ph2
  d20
  d20
  p12:sp2:f2 ph2
  d20
```



d20  
p12:sp2:f2 ph2  
d20  
d20  
p12:sp2:f2 ph2  
d20  
d20  
p12:sp1:f1 ph2 ;;  
d20  
d20  
p12:sp2:f2 ph2  
d20  
d20  
p12:sp2:f2 ph2  
d20  
d20  
p12:sp2:f2 ph2  
d20  
d20  
p12:sp2:f2 ph2  
d20  
d20  
p12:sp2:f2 ph2  
d20  
lo to 4 times c  
go=2 ph31  
d11 wr #0 if #0 ivc  
lo to 1 times td1  
exit

ph1=0 0 2 2 1 1 3 3  
ph2=1 3 1 3 0 2 0 2  
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3