



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta



Nightingale

Aineenvaihduntatuotteiden automaattinen kvantitointi virttsasta

Lassi Raivonen

Kemia (Lääkekehityksen kemia)

Pro gradu -tutkielma

Laajuus: 20 op

Ohjaajat:

Pasi Soininen

Pasi Virta

28.12.2021

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on

tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Tiivistelmä

Pro gradu -tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijät: Lassi Raivonen

Otsikko: Aineenvaihduntatuotteiden automaattinen kvantitointi virtsata

Ohjaajat: Pasi Soininen, Pasi Virta

Sivumäärä: 51 sivua + liite 1 sivu

Päivämäärä: 28.12.2021

Aineenvaihduntatuotteet kertovat paljon yksilön terveydentilasta ja niiden avulla on mahdollista tehdä riskiarvioita yksilöstä, kunhan populaatiotason vertailuarvot ovat tunnettuja.

Aineenvaihduntatuotteiden laaja mittaaminen on usein työlästä, epätarkkaa sekä kallista, joten korkean suorituskyvyn omaaville automaattisille menetelmille on tarvetta. Automaattisen ydinmagneettiseen resonanssiin (NMR) perustuvan kvantitointimenetelmän kehittäminen vaatii hyvää teoreettista fysiikan ja matematiikan tuntemusta. Sen teoria on kuitenkin monimutkaista ja vaatii hyvää fysiikan ja matematiikan tuntemusta. Sitä pystytään onneksi havainnollistamaan riittävällä tasolla vektorimallilla. Vektorimallissa ytimien käyttäytymistä havainnollistetaan kokonaismagnetisaatiovektorilla.

Tutkielmassa on tarkasteltu ydinmagneettisen resonanssin teoriaa energiatasoista vektorimalliin ja pyritty havainnollistamaan kvalitatiivisella tasolla mitä magneetin sisällä tapahtuu. Nykyään NMR-laitteet ovat erittäin monimutkaisia ja sisältävät suuren määrän erilaista teknologiaa. Tutkielman viimeisessä osassa on havainnollistettu yleisellä tasolla, että mistä nykyaikaiset NMR-laitteet koostuvat.

Tutkielman kokeellisessa osuudessa identifioitiin virtsasta aineenvaihduntatuotteita, joista PERCH:in avulla kerättiin sijainti- ja intensiteetti-informaatiota. Tätä dataa käytettiin kehittämään yhdessä Nightingale Health Ltd:n muiden työntekijöiden kanssa automaattinen malli, jolla pystytään mittaamaan aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksia virtsasta korkealla suorituskyvyllä.

Avainsanat: NMR, metabolomiikka, aineenvaihduntatuotteet, virtsa

Lyhenteet

NMR	Ydinmagneettinen resonanssi
TSP	Trimetyylisilyliipropaanihappo
TMS	Tetrametyylisilaani
DSS	Natriumtrimetyylisilyliipropaanisulfonaatti
ppm	Miljoonasosa
NOESY	Ytimen Overhauser spektroskopia
COSY	Korrelaati-spektroskopia
TOCSY	Kokonaiskorrelaati-spektroskopia
HSQC	Heteroytimien yksöiskvanttikohärenssi
HMBC	Heteroytimien monikvanttikohärenssi
JRES	J-kytkentäerotteinen spektroskopia
WATERGATE	Gradienttiviritteinen vesisupressio

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	1
Lyhenteet	2
1 Johdanto	5
1.1 Ydinmagneettisen resonanssin historia	5
2 NMR teoria	7
2.1 Energiatasot ydinmagneettisessa resonanssissa.....	9
2.2 Kvanttimekaniikan perusteet	10
2.2.1 Aaltoyhtälö.....	10
2.2.2 Operaattorit	10
2.2.3 Ominaisfunktio.....	11
2.2.4 Hamiltonin operaattori ja kiertomomentti	11
2.2.5 \hat{I}_z :n ominaisarvot ja -funktiot	12
2.2.6 Yhden spinin Hamiltonin operaattorin ominaisarvot.....	13
2.3 Yhden spinin systeemi.....	13
2.3.1 Energiatasot	13
2.3.2 Larmorin kulmataajuus	14
2.3.3 Energioiden kirjoittaminen taajuusyksiköinä	15
2.3.4 Hamiltonin energiayksikkö taajuuksina	16
2.4 Kahden spinin systeemi.....	16
2.4.1 Kahden kytkeytyneen ytimen energiatasot	17
2.4.2 Kahden spinin välinen skalaarikytkentä	18
2.4.3 Kahden kytkeytyneen spinin spektri.....	19
2.4.4 Monikvanttisiirtymä.....	20
2.5 Kolme spiniä	21
3 Vektorimalli	22
3.1 Kokonaismagnetisaatiovektori	22
3.1.1 Spin ylös ja spin alas.....	23
3.1.2 Koordinaatisto	23
3.1.3 Magnetisaation tasapainotila.....	24
3.2 Larmorin prekessio	24
3.3 Detektio	25
3.4 Pulssit	26
3.4.1 Pyörivä kehys	26

3.4.2	Larmorin prekessio pyörivässä kehyksessä	28
3.4.3	Efektiiivinen kenttä.....	29
3.4.4	Efektiiivinen kenttä taajuusyksikössä	30
3.5	Resonanssipulssit	30
3.5.1	Kova pulssi.....	31
3.6	Pulssi-mittaus-menetelmä.....	32
3.6.1	Vapaan vaimenemisen signaali	32
3.6.2	Fourier-muunnos	34
4	NMR-laitteen anatomia.....	35
4.1	Magneetti.....	35
4.2	Shimmit	36
4.3	Lukko.....	37
4.4	Mittapää	37
4.5	Lähetin.....	38
4.6	Vastaanotin	39
4.6.1	Signaalin muuntaminen digitaaliseksi.....	39
4.6.2	Bittimäärä.....	40
4.6.3	Näytteenottonopeus.....	40
4.6.4	Signaalin taajuuden pienentäminen	41
4.7	Kvadratuurimittaus	41
5	Kokeellinen osuus.....	43
5.1	Materiaalit ja menetelmät	43
5.2	Tulokset ja päätelmät	46
Viitteet.....		48
Liitteet.....		49

1 Johdanto

1.1 Ydinmagneettisen resonanssin historia

Hypoteesi elektronien perustavanlaatuisesta pyörimismäärästä, eli spinistä, muodostui jo 1920-luvulla, kun Wolfgang Pauli postuloi elektronilla olevan ei-klassisesti käyttäytyviä piilotasoja.¹ Useammat tutkimukset, joista ehkä tärkeimpänä Stern-Gerlach koe, osoittivat ajatuksen oikeaksi. Vuosikymmenen puoleen väliin tultaessa oli kehittynyt käsitys, että ainakin joillain ytimillä olisi myös spin.

1936 Gorther työryhmineen yritti mitata ydinspinejä litiumfluoridista (SiF) ja kaliumin alumiinisulfaattista ($KAl(SO_4)_2$) siinä kuitenkaan onnistumatta.^{2,3} 1939 Rabi työryhmineen onnistui ensimmäisen kerran mittaamaan ydinmagneettisen resonanssin ampumalla vetymolekyylejä magneettikentän läpi altistaen ne samalla radioaaltosäteilylle.⁴

Ydinmagneettisen resonanssin ymmärtäminen eteni harppauksittain, kun kaksi työryhmää eri yliopistoista alkoivat tutkimaan aihetta. Yksi työryhmistä koostui Felix Blochista, William Hansenista ja Martin Packardista Stanfordin yliopistossa⁵ ja toinen Edward Purcellista, Henry Torreyestä ja Robert Poundista Harvardin yliopistossa⁶. Kummatkin työryhmät julkaisivat ensimmäiset tutkimuksensa ydinmagneettisesta resonanssista toisistaan tietämättä samana vuonna. Bloch työryhmineen mittasi hyvin nykyistä menetelmää muistuttavalla tavalla protonispektrin vedestä.⁵ Purcell työryhmineen havaitsivat parafiinivahan absorboivan radioaaltosäteilyä.⁶ Heidän tekemät löydökset olivat niin tärkeitä, että professorit Bloch ja Purcell saivat vuonna 1952 Nobelin palkinnon fysiikasta.

Teorian ja laitteiden kehityksen alkuvaiheessa käytettiin niin kutsuttua jatkuvan aallon menetelmää, jossa näytettä viritettiin jatkuvalla ja tasaisella radioaaltosäteilyllä ja magneettikentän voimakkuutta vaihdeltiin. Vuonna 1949 Bloch postuloi vaihtoehtoisen menetelmän, jossa magneettikentän voimakkuus pidetään vakiona ja jatkuvan radioaallon sijaan käytetään lyhyttä radioaaltopulssia.⁷ Samana vuonna Hahn onnistui mittaamaan tällä menetelmällä vapaasti vaimenevan signaalin.⁸ Hahn myös onnistui näyttämään pulssi-kaiku-mittauksella, että pulsseja sarjoittamalla voidaan systeemistä saada enemmän informaatiota. Laitteiden parannusten myötä huomattiin myös, että ytimen kemiallinen ympäristö vaikuttaa sen sijaintiin spektrillä.⁹⁻¹¹ Pulssipohjainen mittaaminen, pulssien sarjoitus ja parempi ymmärrys kemiallisen ympäristön vaikutuksesta signaalin siirtymiin loivat pohjan modernille NMR-spektroskopiaalle.

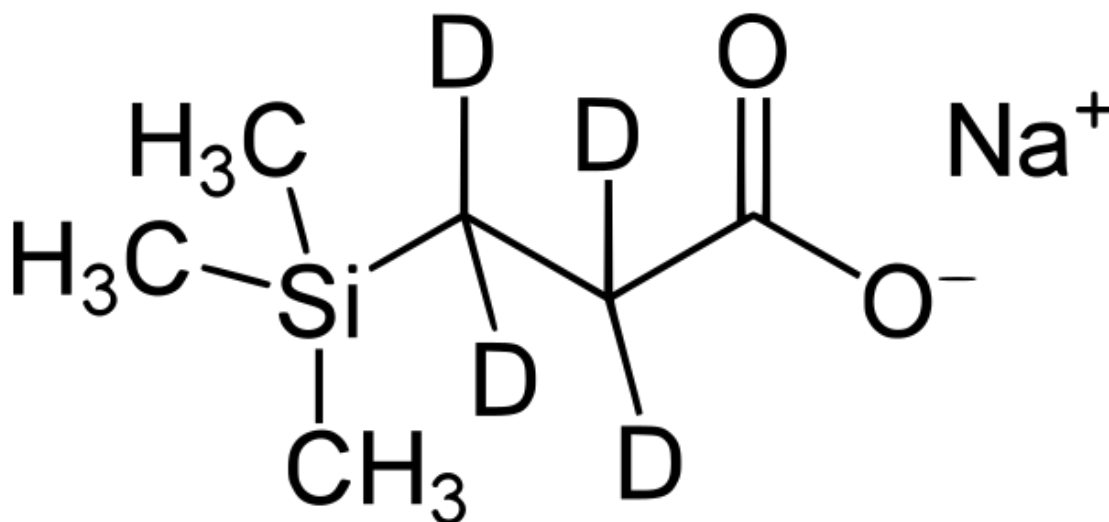
Ensimmäinen kaupallinen NMR-laite tuli markkinoille 1952.¹² Se oli Varianin HR-30 ja sen magneettikentän voimakkuus oli 0,7 Teslaa. Laitteiden kehittyminen oli nopeaa ja kaksi vuotta myöhemmin rakennettiin ensimmäinen 9,4 Teslan laite.¹³

Vuonna 1961 julkaistu teos ”The principles of nuclear magnetism”¹⁴ ja 1963 julkaistu teos ”Principles of magnetic resonance”¹⁵ toimivat suurina virstanpylväinä ydinmagneettisen resonanssiin liittyvässä kirjallisuudessa ja nykyteoria pohjautuu vahvasti näihin kahteen teokseen.

2 NMR teoria

Tässä tutkielmassa tarkastellaan vain ^1H -ytimiä, eli niin kutsuttuja $\text{spin}-\frac{1}{2}$ ytimiä, joilla ei ole yhtä komplekseja interaktioita toistensa kanssa kuin muita spin -lukuja omaavilla ytimillä. Tämän tutkielman tarkoitus ei olekaan antaa täydellistä kuvaa ydinmagneettisen resonanssin teoriasta, vaan auttaa ymmärtämään kvalitatiivisella tasolla mihin menetelmä perustuu. Tutkielmassa on pyritty esittämään yhtälöt tavalla, joka on monelle maisterivaiheen kemianopiskelijalle tuttu kvanttimekaniikan kursseilta.

NMR-signaalit pääosin esiintyvät 10–800 MHz taajuuksilla eli niiden aallonpituudet ovat välillä 30 m – 40 cm. Tällä taajuusvälillä toimivat muun muassa myös radio sekä



Kuva 1 Deuteroidun TSP:n rakenne. Deuteriumytimet eivät näy vedyn ^1H -spektrissä.

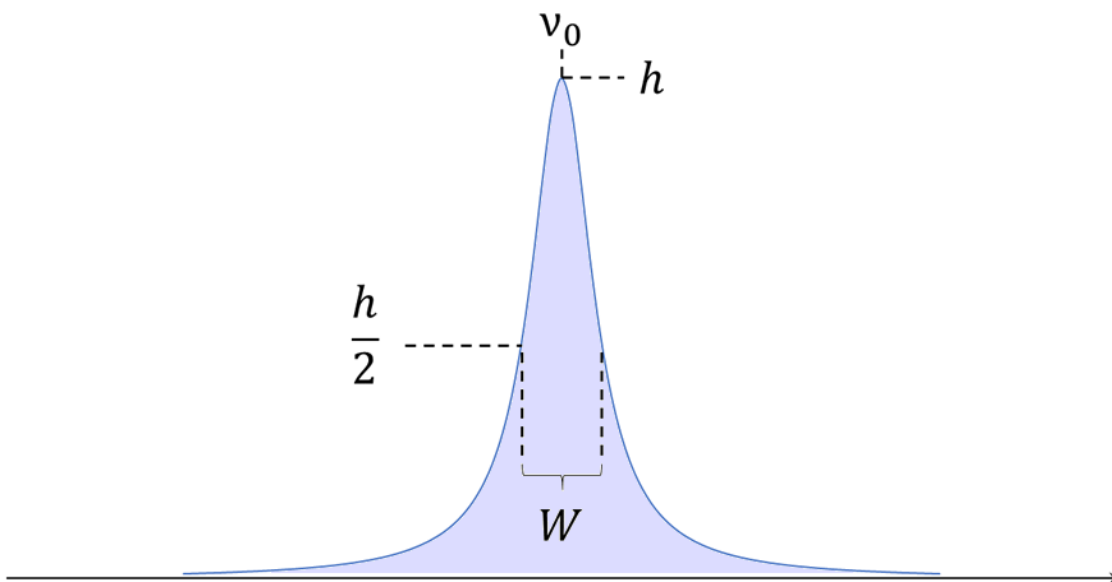
matkapuhelimet, ja vanhemmissa huonommin suojatuissa NMR-laitteissa saattoi nähdä interferenssiä esimerkiksi juuri radiolähetyksistä.

Ytimien signaalit ovat suoraan verrannollisia NMR-laitteen magneettikentän vahvuuteen. Se aiheuttaa ongelmia, kun kahden eri vahvuisen laitteen välisiä tuloksia halutaan vertailla. Samalle ytimelle tulee kaksi eri tulosta. Tätä varten on kehitetty suhteellinen asteikko, jolla voidaan korjata signaalin sijainti magneettikentän voimakkuuden suhteen. Siirtymät annetaan miljoonasosa-asteikolla (ppm, engl. parts per million) jotta siirtymien vertailu olisi yksinkertaisempaa. Suhteellinen ppm-asteikko voidaan esittää halutun signaalin ja yleisesti valitun referenssisignaalin välisenä erona:

$$\delta(\text{ppm}) = 10^6 * \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad (1)$$

Missä ν_{ref} on referenssisignaalin taajuus ja ν on tutkittavan signaalin taajuus. Jos absoluuttisella asteikolla referenssisignaalin taajuus on 500.0005 MHz ja tutkittavan signaalin taajuus on 500.001 MHz ja ne sijoitetaan kaavaan 1, niin suhteellisella ppm-asteikolla referenssisignaali tulisi kohtaan 0 ppm ja tutkittava signaali kohtaan 1 ppm. Kuten huomataan, siirtymien vertailu suhteellisella ppm-asteikolla kuvaa siirtymien eroa havainnollisemmin kuin taajuuksia käytettäessä, eikä suhteellista asteikkoa käytettäessä ole olennaista ilmaista, missä kentässä mittausta on suoritettu. Yksi yleisesti käytetty referenssiyhdiste on trimetyylisilylipropionihappo (TSP)¹⁶, jonka hiili- ja vetysiirtymät ovat määritelmällisesti 0. TSP:n rakennekaavio on esitetty kuvassa 1. Muita yleisesti hyväksytyjä referenssiyhdisteitä ovat tetrametyylisilaani (TMS) sekä trimetyylisilylipropaanisulfonaatin natriumsuola (DSS). Näytteeseen lisättävien referenssiyhdisteiden lisäksi voidaan käyttää joko laitevalmistajan omaa sisäistä referenssitaajuutta, joka toimii usein riittävällä tarkkuudella, tai harvinaisempaa NMR-magneetin sisälle laitettavaa laitetta, joka tuottaa vakiotaajuisia signaalia.

NMR-signaalilla on viisi yleisesti käytettyä ominaisuutta: sijainti spektrillä ν_0 , korkeus h , korkeus puolessa välissä spektriä $\frac{h}{2}$, puoliviivanleveys W ja pinta-ala. (Kuva 2). Tärkeimmät näistä ovat sijainti spektrillä, puoliviivaleveys ja pinta-ala. Puoliviivaleveyttä käytetään muun muassa magneettikentän homogeenisuuden arviointiin, mitä pienempi puoliviivanleveys, sitä parempi homogeenisyys.



Kuva 2 NMR-signaalin tunnusluvut

NMR-spektreissä signaalin pinta-ala on suoraan verrannollinen signaalin aiheuttaman yhdisteen pitoisuuteen. Jos signaalin pinta-ala kaksinkertaistuu, niin yhdisteen pitoisuus näytteessä kaksinkertaistuu. Tämä ominaisuus tekee NMR-spektroskopiasta erinomaisen esimerkiksi aineenvaihduntatuotteiden tutkimiseen.

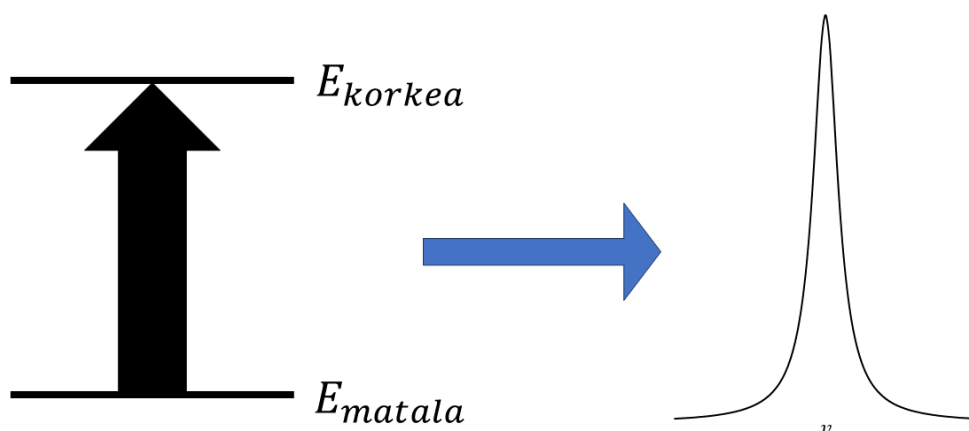
2.1 Energiatasot ydinmagneettisessa resonanssissa

Energia on kvantittunutta eli se voi saada vain diskreettejä arvoja. Systemi, kuten molekyyli, ydin tai elektroni voi absorboida vain tietyn, kvantittuneen, määrän energiaa. Tämä energian määrä on matalamman energiatason E_{matala} ja korkeamman energiatason E_{korkea} välinen energiaero ΔE :

$$\Delta E = E_{korkea} - E_{matala} = h\nu \quad (2)$$

missä h on Planckin vakio ν absorpoituneen fotonin taajuus. Energian yksikkö on Joule. Tätä on havainnollistettu kuvassa 3. Spektroskopiassa usein mitattavat signaalit johtuvat siirtymistä tasojen välillä, esimerkiksi valoon perustuvat menetelmät mittaavat kuinka paljon jokin aine absorboi mitäkin aallonpituutta.

Energiatasomalli ei täysin selitä NMR:ssä nähtäviä signaaleja, sillä se olettaa, että molekyylit ovat jollain tietyllä tasolla, esimerkiksi virittyneessä tilassa tai perustilassa. Toisin kuin klassisessa mekaniikassa, niin kvanttimekaniikassa systeemit ovat superpositiotilassa ja niiden mittaaminen aiheuttaa molekyylin siirtymään johonkin sallittuun tilaan. Yksinkertaisetkin NMR-mittaukset käyttävät näitä superpositiotiloja hyödykseen. Energiatasojen avulla voidaan kuitenkin ymmärtää monia käsitteitä NMR:n teoriassa ja se onkin hyvä työkalu, esimerkiksi yksinkertaisissa NMR-spektreissä nähtävien signaalien ennustaminen onnistuu energiatasomallilla.



Kuva 3 Spektroskopia energiatasomallilla. Systemi nousee korkeammalle energiatasolle, kun fotoni absorboituu synnyttäen signaalin spektriin.

2.2 Kvanttimekaniikan perusteet

2.2.1 Aaltoyhtälö

Aaltoyhtälö on tärkeä osa NMR:n teoriaa ja se sisältää kaiken informaation kyseisen systeemin tilasta. Esimerkkinä elektronin aaltoyhtälö:

$$\Psi(r) = e^{-ar} \quad (3)$$

Missä r on elektronin ja ytimen välinen etäisyys ja a on tunnettu vakio. Aaltoyhtälöstä voidaan saada tietoa esimerkiksi hiukkasen paikasta ja sen energiasta.

2.2.2 Operaattorit

Ydinmagneettisen resonanssin teoriassa tärkeässä osassa ovat myös operaattorit. Operaattorit ovat asioita, jotka tekevät funktiolle tai luvulle jotain, toisin sanoen operaattori operoi funktiota.

$$\text{Operaattori} \rightarrow \text{funktio} = \text{uusi funktio} \quad (4)$$

Tarkastellaan esimerkkinä derivointia:

$$\frac{d}{dx} \sin(x) = \cos(x) \quad (5)$$

Yhtälössä 4 derivaatta on operaattori, joka operoi funktiota $\sin(x)$ ja tulokseksi saadaan $\cos(x)$. Operaattorit voivat olla binäärisiä kuten kerto- ja jakolasku tai unitaarisia kuten derivointi ja integrointi. Binäärinen operaattori operoi kahta operanttia, eli lukua tai funktiota, ja tuottaa niille ominaisen yhteisen tuloksen. Unitaariset operaattorit operoivat vain yhtä operanttia kuten esimerkiksi yhtä lukua tai funktiota. Yksi tärkeä operaattorien ja operanttien ominaisuus on kommutointi. Jos operaattori kommutoi operanttien kanssa, niin tulos ei vaihdu, vaikka operanttien paikkaa vaihtaisi. Kertolasku on esimerkiksi kaikille operanteille kommutatiivinen operaattori. Ei ole väliä lasketaanko 2×3 vai 3×2 , sillä tulos on kummassakin tapauksessa sama. Ydinmagneettisen resonanssin teorian kannalta kommutointi tulee usein esiin tilanteissa, joissa yksi operaattori operoi kahta eri aaltoyhtälöä. Monesti näissä tapauksissa operaattori vaikuttaa vain esimerkiksi aaltoyhtälöihin, joilla on x -komponentti. Tällöin aaltofunktiot, jotka eivät sisällä x -komponenttia, voidaan siirtää tarkastelun ulkopuolelle, sillä operaattori ei vaikuta niihin. Operaattorit voivat edustaa erilaisia mitattavia ominaisuuksia. Esimerkiksi jos aaltofunktiota operoidaan energian operaattorilla, saadaan vastaukseksi tilan energia.

2.2.3 Ominaisfunktio

Jotkut funktiot eivät muutu, kun niitä operoidaan tietyillä operaattoreilla. Tällöin sanotaan kyseisen funktion olevan operaattorin ominaisyhtälö. Esimerkiksi yhtälö e^{Ax} on operaattorin derivaatta ominaisyhtälö:

$$\frac{d}{dx} e^{Ax} = A \times e^{Ax} \quad (6)$$

Kun yhtälössä 6 derivointioperaattori $\frac{d}{dx}$ operoi funktiota e^{Ax} , tulokseksi saadaan funktio, joka on vain kerrottu vakiolla A . Eli funktio e^{Ax} on operaattorin $\frac{d}{dx}$ ominaisfunktio ja A on ominaisarvo.

Jos aaltoyhtälö on mitattavan suureen operaattorin ominaisyhtälö, operointi tuottaa aina operaattorin ominaisarvon ja alkuperäisen aaltoyhtälön. Tämä ominaisarvo kuvaa mitattavan ominaisuuden suuruutta.

2.2.4 Hamiltonin operaattori ja kiertomomentti

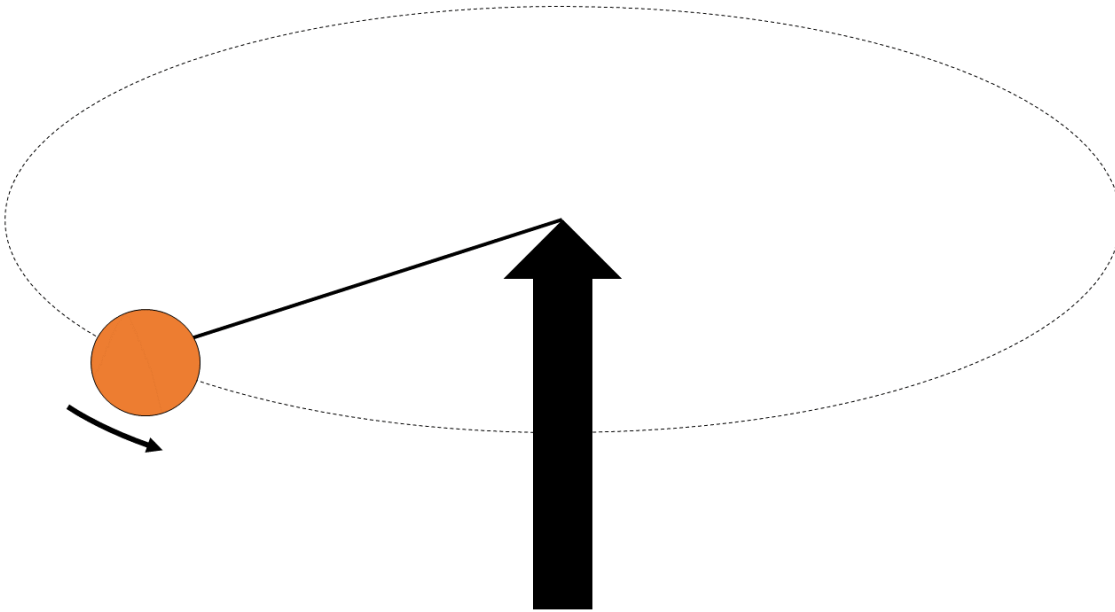
Aikaisemmin mainittu energian operaattori on niin tärkeä osa kvanttimekaniikan teoriaa, että sille on annettu oma nimi: Hamiltonin operaattori. B_0 voimakkuuden omaavassa magneettikentässä olevan ytimen spinin z-akselin suuntaisen komponentin Hamiltonin operaattori \hat{H} on muotoa:

$$\hat{H}_{1\text{spin}} = -\gamma B_0 \hat{I}_z \quad (7)$$

Jossa γ on magnetogyriininen suhde, B_0 on magneettikentän voimakkuus ja \hat{I}_z on operaattori, joka kuvaa ydinspinin pyörimismäärän z-komponenttia. Magnetogyriininen suhde on ytimen magneettimomentin suhde sen pyörimismäärään. Se kuvaa nopeutta millä partikkeli prekessoi tietyn voimakkuisessa magneettikentässä ja se on partikkelin perustavanlaatuisuus ominaisuus. Magnetogyriinisen suhteen SI yksikkö on $\text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$, mutta NMR:ssä usein käytetään myös muotoa MHz T^{-1} . ^1H -ytimien magnetogyriininen suhde on $42,58 \text{ MHz T}^{-1}$.

Osalla ytimistä on luontainen ydinspinin pyörimismäärä, joka on klassista pyörimismäärää muistuttava suure ja sitä on havainnollistettu kuvassa 4. Kuten pallon, joka on sidottu tikun päähän ja joka kiertää tikkua ympäri, pyörimismäärä on vektorisuure, niin myös ydinspinin pyörimismäärä on vektorisuure. Sillä on siis suunta ja suuruus. Toisin kuin klassisessa mekaniikassa, ytimet eivät pyöri minkään ympäri, vaan suure on perustavanlaatuisuus kuten massa tai varaus. \hat{I}_z kuvastaa tämän ominaisuuden z-akselin suuntaisen komponentin suuruutta ja juuri tällä z-akselin suuntaisella

komponentilla on vuorovaikutuksia ulkoisen magneettikentän kanssa. Ydinmagneettista resonanssia pystytään havaitsemaan vain ytimistä, joilla on ydinspinin pyörimismäärä.



Kuva 4 Ydinspinin pyörimismäärä toimii kuin klassinen pyörimismäärä, sillä on suunta ja suuruus.

2.2.5 \hat{I}_z :n ominaisarvot ja -funktiot

Pyörimismäärämomenttioperaattorit kuten \hat{I}_z ja niiden ominaisfunktiot ja -arvot ovat tärkeitä työkaluja ydinmagneettisen resonanssin teoriassa ja niihin törmätään usein. \hat{I}_z :n ominaisarvojen määrä riippuu ytimen spinluvusta, joka määräytyy ydinspinin liikemääräkvanttiluvun, tai lyhyemmin spinkvanttiluvun, I mukaan. Spinkvanttiluku voi olla 0, kokoluku tai puoliluku. Operaattorilla \hat{I}_z on tällöin $2I+1$ ominaisfunktiota ja ominaisarvoa. Näitä ominaisfunktioita kuvataan kvanttinumeroilla m ja se voi ainoastaan saada arvoja, jotka ovat yhden päässä toisistaan. Tässä työssä tarkastellaan vain spin-1/2 ytimiä ja niille m :n arvot ovat -1/2 ja +1/2 ja ominaisyhtälöt ovat $\Psi_{-\frac{1}{2}}$ ja $\Psi_{\frac{1}{2}}$. Spin-1/2 ytimien ominaisarvoyhtälöt ovat esitetty kaavassa 8:

$$\hat{I}_z \Psi_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} \hbar \Psi_{\frac{1}{2}}, \quad \hat{I}_z \Psi_{-\frac{1}{2}} = -\frac{1}{2} \hbar \Psi_{-\frac{1}{2}} \quad (8)$$

Tästä nähdään, että ominaisyhtälöllä $\Psi_{\frac{1}{2}}$ on ominaisarvo $\frac{1}{2} \hbar$ ja ominaisyhtälöllä $\Psi_{-\frac{1}{2}}$ on ominaisarvo $-\frac{1}{2} \hbar$.

Kaavan 8 yhtälöt voidaan myös kirjoittaa yleiseen muotoon

$$\hat{I}_z \Psi_m = m \hbar \Psi_m \quad (9)$$

missä m on $\pm \frac{1}{2}$. NMR:ssä ei ole tarpeellista tietää tarkkaan mikä ominaisfunktio on, joten sitä ei avata vaan se ilmaistaan aina muodossa Ψ_m .

2.2.6 Yhden spinin Hamiltonin operaattorin ominaisarvot

$\Psi_{\frac{1}{2}}$ ja $\Psi_{-\frac{1}{2}}$ ovat myös ominaisfunktioita yhden spinin Hamiltonin operaattorille, sillä yhden spinin Hamiltonin operaattori ja \hat{I}_z eroavat vain vakiolla $-\gamma B_0$. Osoitetaan, että $\Psi_{\frac{1}{2}}$ on $\hat{H}_{1\text{ spin}}$ ominaisfunktio:

$$\hat{H}_{1\text{ spin}} \Psi_{\frac{1}{2}} = -\gamma B_0 \left[\hat{I}_z \Psi_{\frac{1}{2}} \right] = -\gamma B_0 \left[\frac{1}{2} \hbar \Psi_{\frac{1}{2}} \right] = -\frac{1}{2} \hbar \gamma B_0 \hat{I}_z \Psi_{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

Kaavasta 7 saadaan $\hat{H}_{1\text{ spin}} \Psi_{\frac{1}{2}} = -\gamma B_0$. Toisesta vaiheesta kolmanteen on käytetty kaavaa 8 $\hat{I}_z \Psi_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} \hbar \Psi_{\frac{1}{2}}$. Viimeisessä vaiheessa on vain järjestelty yhtälöä uudestaan. Tästä nähdään, että kun yhden spinin Hamiltonin operaattori operoi funktiota $\Psi_{\frac{1}{2}}$ saadaan tulokseksi funktio $\Psi_{\frac{1}{2}}$ kerrottuna vakiolla $-\frac{1}{2} \hbar \gamma B_0$. Näin ollen $\Psi_{\frac{1}{2}}$ on $\hat{H}_{1\text{ spin}}$ ominaisfunktio.

2.3 Yhden spinin systeemi

2.3.1 Energiatasot

Spin $\frac{1}{2}$ -ytimellä on kaksi mahdollista energiatasoa

$$E_m = m \hbar \gamma B_0, \quad m = \pm \frac{1}{2} \quad (11)$$

B_0 magneettikentän voimakkuus ilmaistaan usein Tesloissa ja magnetogyriin suhde ilmaistaan yksikössä $\text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$, jolloin energian yksiköksi tulee Joule.

Yleensä positiivista kvanttilukua $m = \frac{1}{2}$ merkataan α -kirjaimella ja sen tilan sanotaan olevan "spin ylös". Negatiivista kvanttilukua $m = -\frac{1}{2}$ merkataan β -kirjaimella ja sen sanotaan olevan "spin alas". Spin ylös ja spin alas -tilojen energiat voidaan ilmaista kaavoilla:

$$E_\alpha = -\frac{1}{2} \hbar \gamma B_0 \quad (12)$$

$$E_\beta = \frac{1}{2} \hbar \gamma B_0 \quad (13)$$

Kvanttimekaniikan valintasäännön mukaan sallitut siirtymät ovat niitä, joissa yhden spinin m -luku vaihtuu yhdellä. Siirtymä β -tilasta α -tilaan:

$$\Delta m_{\beta \rightarrow \alpha} = \frac{1}{2} - \left(-\frac{1}{2}\right) = 1 \quad (14)$$

Kvanttiluku vaihtuu yhdellä, joten siirtymä on sallittu. Siirtymä α -tilasta β -tilaan on myös sallittu, sillä kvanttiluvun muutos on -1 .

Se, kumpi tila on matalaenergisempi, riippuu magnetogyrisestä suhteesta. ^1H vedylle suhde on positiivinen, jolloin spin ylös $-$ tila on pienempienerginen. Vedylle sallitun siirtymän energia α -tilasta β -tilaan on:

$$\Delta E_{\alpha \rightarrow \beta} = E_{\beta} - E_{\alpha} = \frac{1}{2} \hbar \gamma B_0 - \left(-\frac{1}{2} \hbar \gamma B_0\right) = \hbar \gamma B_0 \quad (15)$$

Tätä kaavaa käyttäen voidaan laskea, että mihin kohtaan spinin tuottama signaali muodostuu. Aikaisemmin mainittiin, että signaali tulee siihen kohtaan spektriä, millä energian absorptio tapahtuu. Fotonin, jonka taajuus on ν , energia on $h\nu$. Jakamalla aikaisemmin saatu siirtymän muutosenergia h :lla, saadaan signaalin taajuus:

$$\nu_{\alpha \rightarrow \beta} = \frac{\Delta E_{\alpha \rightarrow \beta}}{h} = \frac{\hbar \gamma B_0}{h} = \frac{\hbar \gamma B_0}{2\pi \hbar} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (16)$$

Signaali tulisi siis tässä tapauksessa taajuudelle $\frac{\gamma B_0}{2\pi}$ Hz.

2.3.2 Larmorin kulmataajuus

Larmorin prekessiolla tarkoitetaan ytimen magneettisen momentin pyörimistä ulkoisen magneettikentän ympäri. Pyörimisliikkeen voidaan ajatella toimivan samoin tavoin kuin hyrrän, joka on vähän vinossa. Se, millä nopeudella magneettinen momentti pyörii ulkoisen magneettikentän ympäri, riippuu ytimen magnetogyrisestä suhteesta ja ulkoisen magneettikentän voimakkuudesta. Larmorin kulmataajuus yhdelle spinille:

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \text{ (rad s}^{-1}\text{)} \quad (17)$$

tai

$$\nu_0 = -\frac{\gamma B_0}{2\pi} \text{ (Hz)} \quad (18)$$

Larmorin kulmataajuudessa esiintyvä miinusmerkki helpottaa laskelmia vektorimallissa. Kun tarkastellaan spinin Larmorin kulmataajuutta Hertseissä ja aikaisemmin saatua tulosta signaalin sijainnista huomataan, että ne näyttävät hyvin samalta. Ainut ero on Larmorin kulmataajuuden edessä oleva miinusmerkki. Yhdelle spinille tulee siis signaali spektriin kodalle, joka vastaa negatiivista Larmorin kulmataajuutta:

$$\nu_{\alpha \rightarrow \beta} = -\nu_0 \quad (19)$$

Tästä nähdään myös jo tiedetty ominaisuus, eli taajuus ja näin ollen signaalin sijainti ovat riippuvainen magneettikentän voimakkuudesta.

Ytimen kemiallinen ympäristö vaikuttaa Larmorin kulmataajuuteen ja saman isotoopin ytimillä on erilaisissa yhdisteissä hieman eri kulmataajuus. Tämän vuoksi samojen ytimien signaalit, esimerkiksi ^1H -ytimet, tulevat eri yhdisteissä hieman eri paikkaan spektriä ja se mahdollistaa signaalien tunnistamisen.

Kemiallisen ympäristön vaikutus Larmorin kulmataajuuteen voidaan ottaa huomioon:

$$\omega_0 = -\gamma(1 + 10^{-6} \times \delta)B_0 \text{ (rad s}^{-1}\text{)} \quad (20)$$

$$\nu_0 = -\frac{\gamma(1 + 10^{-6} \times \delta)B_0}{2\pi} \text{ (Hz)} \quad (21)$$

missä δ on kemiallinen siirtymä ppm-yksikössä.

2.3.3 Energioiden kirjoittaminen taajuusyksiköinä

Jotta yhtälöjen käsittely olisi intuitiivisempaa ja tulokset yksinkertaisempia, voidaan energiaerot muuttaa taajuusmuotoisiksi. Joulesta Hertsiksi muuntaminen tapahtuu jakamalla plankin vakiolla h ja jouleista rads^{-1} jakamalla \hbar . Energia on

$$E_m = -\frac{m\gamma B_0}{2\pi} \text{ (rad s}^{-1}\text{)} \quad (22)$$

$$E_m = -m\gamma B_0 \text{ (Hz)} \quad (23)$$

Nämä yhtälöt voidaan yksinkertaistaa käyttämällä Larmorin kulmataajuutta. Tällöin ne muuttuvat muotoon

$$E_m = m\nu_0 \quad (24)$$

$$E_m = m\omega_0 \quad (25)$$

Nyt voidaan kirjoittaa tasojen energiat taajuusmuodossa

$$E_\alpha = \frac{1}{2}\nu_0 \quad (26)$$

$$E_\beta = -\frac{1}{2}\nu_0 \quad (27)$$

Ja tasojen välisen siirtymän energia muodossa

$$\nu_{\alpha \rightarrow \beta} = E_\beta - E_\alpha = -\frac{1}{2}\nu_0 - \frac{1}{2}\nu_0 = -\nu_0 \quad (28)$$

Kuten huomataan, niin saadaan sama tulos kuin aikaisemmin. Energioiden kirjoittaminen taajuuksina vain yksinkertaistaa jatkokäsittelyä.

2.3.4 Hamiltonin energiayksikkö taajuuksina

Laskujen helpottamiseksi olisi hyvä saada myös Hamiltonin operaattori tuottamaan ominaisyhtälöiden ominaisarvot taajuusyksikköisenä. Tämä voidaan saavuttaa ikään kuin tiputtamalla \hbar pois, sillä jakamalla energian yksikkö Joule redusoidulla Planckin vakiolla \hbar , saadaan yksiköksi $rad\ s^{-1}$. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi jättämällä \hbar pois myös operaattorin \hat{I}_z ominaisarvosta.

$$\hat{I}_z \Psi_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} \Psi_{\frac{1}{2}}, \quad \hat{I}_z \Psi_{-\frac{1}{2}} = -\frac{1}{2} \Psi_{-\frac{1}{2}} \quad (29)$$

\hat{I}_z :n ominaisarvot ilmaistaan toisin sanoen siis yksikössä \hbar .

Yhden spinin Hamiltonin operaattori oli kaavan 7 mukaan

$$\hat{H}_{1\ spin} = -\gamma B_0 \hat{I}_z$$

Osoitetaan, että $\Psi_{\frac{1}{2}}$ on myös taajuusmuodossa Hamiltonin yhtälön ominaisfunktio kuten tehtiin kaavassa 10:

$$\hat{H}_{1\ spin} \Psi_{\frac{1}{2}} = -\gamma B_0 \hat{I}_z \Psi_{\frac{1}{2}} = -\frac{1}{2} \gamma B_0 \Psi_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} \omega_0 \Psi_{\frac{1}{2}} \quad (30)$$

Kun Hamiltonin operaattori operoi aaltoyhtälöä $\Psi_{\frac{1}{2}}$, tulee tulokseksi sama yhtälö, joka on kerrottu vain vakiolla $\frac{1}{2} \gamma B_0$. Ominaisarvo on siis $-\frac{1}{2} \gamma B_0$ ja Larmorin kulmataajuuden avulla ilmaistuna $\frac{1}{2} \omega_0$. Samalla tavalla voidaan osoittaa $\Psi_{-\frac{1}{2}}$ olevan ominaisfunktio arvolla $-\frac{1}{2} \omega_0$

Larmorin kulmataajuuden määritelmää voidaan myös käyttää apuna kirjoittaessa yhden spinin Hamiltonin operaattoria:

$$\hat{H}_{1\ spin} = \omega_0 \hat{I}_z \quad (rad\ s^{-1}) \quad (31)$$

$$\hat{H}_{1\ spin} = \nu_0 \hat{I}_z \quad (Hz) \quad (32)$$

2.4 Kahden spinin systeemi

Kytkeytymättömien ytimien systeemit ovat hyvin yksinkertaisia ja niiden spektreihin tulee yhdet signaalit eli singletit ytimien Larmorin kulmataajuuksien kohdalle. Kun ytimet ovat kytkeytyneenä toisiinsa niin ne vaikuttavat toistensa signaaleihin. Tällöin spektreistä tulee merkittävästi monimutkaisempia ja singlettien sijaan spektrissä havaitaan useamman signaalin multipletteja. Kahden tai useamman ytimen välisiä kytkentöjä kutsutaan skalaari- eli J-kytkennöiksi ja ne toimivat kemiallisten sidosten välillä. Jokainen kytkentä puolittaa signaalin kahteen eri signaaliin, jotka ovat puolet

alkuperäisen signaalin koosta ja kytkennälle ominaisen kytkentävakion päässä toisistaan. Kahden kytkeytyneen spinin spektri on siis kaksi kahden signaalin multippelittia eli dublettia, toinen yhden spinin Larmorin kulmataajuuden kohdalle ja toinen toisen spinin Larmorin kulmataajuuden kohdalle.

2.4.1 Kahden kytkeytyneen ytimen energiatasot

Kahden kytkeytymättömän spinin Hamiltonin operaattori voidaan muodostaa lisäämällä yhden ytimen ominaisytälön kaavaan toisen ytimen termi:

$$\hat{H}_{2 \text{ spiniä, ei kytkentää}} = \nu_{0,1} \hat{I}_{1z} + \nu_{0,2} \hat{I}_{2z} \quad (33)$$

\hat{I}_{1z} on ensimmäisen spinin kiertoliikemomentin z-komponentin operaattori ja \hat{I}_{2z} on toisen spinin. Samalla tavalla $\nu_{0,1}$ on ensimmäisen spinin Larmorin kulmataajuus ja $\nu_{0,2}$ toisen spinin. Jokaiselle spinille tarvitaan oma operaattori, sillä niiden interaktiot magneettikentän ja toisten spinien kanssa voivat olla eri suuruksia. Spinien välinen kytkentä otetaan myöhemmin huomioon.

Ominaisfunktioit ovat \hat{I}_z :n ominaisfunktioiden tuloja kummallekin spinille. Ytimen \hat{I}_{1z} ja \hat{I}_{2z} ominaisfunktioit ovat täten

$$\hat{I}_{1z} \Psi_{\alpha,1} = \frac{1}{2} \Psi_{\alpha,1} \quad (34)$$

$$\hat{I}_{1z} \Psi_{\beta,1} = -\frac{1}{2} \Psi_{\beta,1} \quad (35)$$

$$\hat{I}_{2z} \Psi_{\alpha,2} = \frac{1}{2} \Psi_{\alpha,2} \quad (36)$$

$$\hat{I}_{2z} \Psi_{\beta,2} = -\frac{1}{2} \Psi_{\beta,2} \quad (37)$$

Osoitetaan, että $\Psi_{\alpha,1} \Psi_{\beta,2}$ on ominaisfunktioita kahden spinin Hamiltonin operaattorille $\hat{H}_{2 \text{ spiniä, ei kytkentää}}$

$$\begin{aligned} \hat{H}_{2 \text{ spin,ei kytkentää}} \Psi_{\alpha,1} \Psi_{\beta,2} &= (\nu_{0,1} \hat{I}_{1z} \nu_{0,2} \hat{I}_{2z}) \Psi_{\alpha,1} \Psi_{\beta,2} \\ &= \nu_{0,1} \hat{I}_{1z} \Psi_{\alpha,1} \Psi_{\beta,2} + \nu_{0,2} \hat{I}_{2z} \Psi_{\alpha,1} \Psi_{\beta,2} = \nu_{0,1} [\hat{I}_{1z} \Psi_{\alpha,1}] \Psi_{\beta,2} + \nu_{0,2} [\hat{I}_{2z} \Psi_{\beta,2}] \Psi_{\alpha,1} \end{aligned} \quad (38)$$

Operaattorin paikanvaihdos ei aina ole sallittua, mutta tässä tapauksessa $\Psi_{\alpha,1}$ operoi vain spiniä 1, joten \hat{I}_{2z} on muuttumaton sen suhteen. Kuten on aikaisemmin osoitettu $\hat{I}_{1z} \Psi_{\alpha,1}$ tuottaa vastaukseksi $\frac{1}{2} \Psi_{\alpha,1}$ ja $\hat{I}_{2z} \Psi_{\beta,2}$ tuottaa vastaukseksi $-\frac{1}{2} \Psi_{\beta,2}$. Tällöin yhtälö voidaan kirjoittaa muotoon

$$\left(\frac{1}{2} \nu_{0,1} - \frac{1}{2} \nu_{0,2} \right) \Psi_{\alpha,1} \Psi_{\beta,2} \quad (39)$$

Jossa $\left(\frac{1}{2}v_{0,1} - \frac{1}{2}v_{0,2}\right)$ on yhtälön ominaisarvo ja $\Psi_{\alpha,1}\Psi_{\beta,2}$ ominaisfunktio. $\Psi_{\alpha,1}\Psi_{\beta,2}$ on siis kahden kytkeyttömän spinin Hamiltonin ominaisyhtälön ominaisfunktio. Sama voidaan osoittaa kolmelle muullekin taajuudelle, $\Psi_{\alpha,1}\Psi_{\alpha,2}$, $\Psi_{\beta,1}\Psi_{\alpha,2}$ ja $\Psi_{\beta,1}\Psi_{\beta,2}$. Tulos voidaan kirjoittaa yleiseen muotoon

$$E_{m_1,m_2} = m_1v_{0,1} + m_2v_{0,2} \text{ (Hz)} \quad (40)$$

2.4.2 Kahden spinin välinen skalaarikytkentä

Kahden spinin välinen kytkentä voidaan ottaa huomioon lisäämällä yksi termi Hamiltonin operaattoriin:

$$\hat{H}_{2 \text{ spin}} = v_{0,1}\hat{I}_{1z} + v_{0,2}\hat{I}_{2z} + J_{12}\hat{I}_{1z}\hat{I}_{2z} \quad (41)$$

$J_{12}\hat{I}_{1z}\hat{I}_{2z}$ on kytkentätermi ja J_{12} on spinien 1 ja 2 välinen skalaarikytkentä hertseissä. Edellisessä osassa esitetyt kahden spinin aaltoyhtälöt ovat edelleen Hamiltonin operaattorin ominaisyhtälöitä, mutta ominaisarvo vaihtuu. Esimerkiksi spinien $\alpha\beta$ tilaa kuvaava yhtälö on kytkentätermin ominaisyhtälö:

$$\begin{aligned} J_{12}\hat{I}_{1z}\hat{I}_{2z}\Psi_{\alpha,1}\Psi_{\beta,2} &= J_{12}[\hat{I}_{1z}\Psi_{\alpha,1}][\hat{I}_{2z}\Psi_{\beta,2}] \\ &= J_{12}\left[\frac{1}{2}\Psi_{\alpha,1}\right]\left[-\frac{1}{2}\Psi_{\beta,2}\right] = -\frac{1}{4}J_{12}\Psi_{\alpha,1}\Psi_{\beta,2} \end{aligned} \quad (42)$$

Näin ollen $\Psi_{\alpha,1}\Psi_{\beta,2}$ on Hamiltonin operaattorin ominaisyhtälö ja ominaisarvo on $-\frac{1}{4}J_{12}$. Aikaisemmin näytettiin, että $\Psi_{\alpha,1}\Psi_{\beta,2}$ on myös kahden ensimmäisen termin ominaisyhtälö, joten näin ollen se on myös koko funktion ominaisyhtälö ja lopullinen ominaisarvo on yksittäisten ominaisarvojen summa:

$$\frac{1}{2}v_{0,1} - \frac{1}{2}v_{0,2} - \frac{1}{4}J_{12} \quad (43)$$

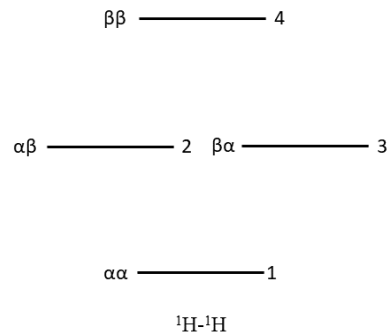
Tulos yleisesti:

$$E_{m_1,m_2} = m_1v_{0,1} + m_2v_{0,2} + m_1m_2J_{12} \text{ (Hz)} \quad (44)$$

Jos kytketyneet ytimet ovat samoja, esimerkiksi kummatkin ovat protoneita, puhutaan homoydinspinsysteemistä, jolloin voidaan yksinkertaistaa

$$v_{0,1} \approx v_{0,2} \quad (45)$$

Tällöin tilojen $\alpha\beta$ ja $\beta\alpha$ energiatasot lähellä ylimmän ja alimman energiataason keskiarvoa.



Kuva 5 $^1\text{H}-^1\text{H}$ systeemin energiatasot. Taso 1 on matalaenergisin ja kuvaa tilannetta missä kummatkin spinit ovat magneettikentän suuntaisia, tasot 2 ja 3 ovat energioiltaan lähes samoja ja niissä toinen spin on magneettikentän suuntainen ja toinen vastakkaisuuntainen. Taso 4 on korkeaenergisin ja kuvaa tilannetta missä kummatkin spinit ovat vastakkaisuuntaiset magneettikenttään nähden.

2.4.3 Kahden kytkeytyneen spinin spektri

Sallitut siirtymät kahdelle spinille samat kuin yhdelle, eli kvanttiluku m voi muuttua vain yhdellä. Tämä tarkoittaa sitä, että vain toisen spinin kvanttiluku voi muuttua kerralla. Sallitut siirtymät ovat energiatasojen 1 ja 2, 3 ja 4, 1 ja 3 sekä 2 ja 4 välillä. Kuvassa 5 on hahmoteltu energiatasoja ja siinä näkyy niiden numerointi.

Siirtymistä johtuvien signaalien taajuudet voidaan laskea jokaiselle signaalille erikseen, esimerkiksi siirtymälle 1- \rightarrow 2:

$$\begin{aligned} \nu_{1\rightarrow 2} &= E_2 - E_1 \\ &= \frac{1}{2}\nu_{0,1} - \frac{1}{2}\nu_{0,2} - \frac{1}{4}J_{12} - \left(\frac{1}{2}\nu_{0,1} + \frac{1}{2}\nu_{0,2} + \frac{1}{4}J_{12} \right) = -\nu_{0,2} - \frac{1}{2}J_{12} \end{aligned} \quad (46)$$

Samalla tavalla voidaan laskea muille siirtymille energiat:

$$\nu_{3\rightarrow 4} = -\nu_{0,2} + \frac{1}{2}J_{12} \quad (47)$$

$$\nu_{1\rightarrow 3} = -\nu_{0,1} - \frac{1}{2}J_{12} \quad (48)$$

$$\nu_{2\rightarrow 4} = -\nu_{0,1} + \frac{1}{2}J_{12} \quad (49)$$

Jokainen sallittu siirtymä vastaa tilannetta missä yksi spin vaihtaa tilaa. Esimerkiksi siirtymässä tasolta 2 tasolle 4 ensimmäinen spin on α -tilassa ja toinen β -tilassa. Kun siirtymä tapahtuu, ensimmäinen spin vaihtuu β -tilaan ja näin ollen spinit ovat kummatkin korkeaenergisemmässä tilassa. Aikaisemmin mainittiin, että spektriin tulee signaali, kun energian absorptio tapahtuu eli kun spin siirtyy yhdestä tilasta toiseen. Tässä tapauksessa yksi spektrin signaaleista johtuu siirtymästä 2->4.

Kuten aikaisemmin näytettiin, kahden spinin systeemillä on neljä eri sallittua siirtymää, jotka kaikki tuottavat signaalin spektriin. Tarkastelemalla laskettuja energioita huomataan, että kaksi signaalia ovat puolikkaan kytkentävakion päässä ensimmäisen ytimen Larmorin kulmataajuudesta ja kaksi puolikkaan kytkentävakion päässä toisen ytimen Larmorin kulmataajuudesta.

Kytkevävakio voi olla joko positiivinen tai negatiivinen. Spektri näyttää kummassakin tapauksessa samalta, mutta signaalit tuottavat siirtymät vaihtuvat. Toisin sanoen signaali, joka muodostuu positiivisen kytkentävakion tapauksessa siirtymästä 1->2 muodostuu negatiivisen kytkentävakion tapauksessa siirtymästä 3->4. Tämä voidaan havainnollistaa myös laskemalla. Aikaisemmin laskettiin siirtymän 1->2 energia:

$$v_{1 \rightarrow 2} = -v_{0,2} - \frac{1}{2}J_{12} \quad (50)$$

Lasketaan siirtymän 3->4 energia tapauksessa, jossa kytkentävakio on negatiivinen:

$$\begin{aligned} v_{3 \rightarrow 4} &= E_2 - E_1 \\ &= -\frac{1}{2}v_{0,1} - \frac{1}{2}v_{0,2} + \frac{1}{4}(-J_{12}) - \left(-\frac{1}{2}v_{0,1} + \frac{1}{2}v_{0,2} - \frac{1}{4}(-J_{12}) \right) = -v_{0,2} - \frac{1}{2}J_{12} \end{aligned} \quad (51)$$

Siirtymälle saadaan sama tulos kuin positiivisen kytkentävakion tapauksessa siirtymälle 1->2.

2.4.4 Monikvanttisiirtymä

Kahden spinin systeemille on myös kaksi siirtymää, jotka eivät ole sallittuja valintasäännön mukaan. Nämä siirtymät ovat 1->4 ja 2->3 ja niissä kummankin spinin tila vaihtuu. Ne eivät ole havaittavissa yksinkertaisessa spektrissä, mutta niin kutsutuissa 2D-mittauksissa ne voidaan havaita. Siirtymää tasojen 1 ja 4 välillä kutsutaan kaksoiskvanttisiirtymäksi ja siirtymää tasojen 2 ja 3 välillä kutsutaan nollakvanttisiirtymäksi.

2.5 Kolme spiniä

Mitä enemmän kytkettyneitä spinejä systeemissä on, sitä monimutkaisemmaksi asiat menevät. Yhden kytkentävakioiden sijaan Hamiltonin operaattoriin tulee kolme kytkentävakiota:

$$\hat{H}_{3 \text{ spin}} = v_{0,1}\hat{I}_{1z} + v_{0,2}\hat{I}_{2z} + v_{0,3}\hat{I}_{3z} + J_{12}\hat{I}_{1z}\hat{I}_{2z} + J_{13}\hat{I}_{1z}\hat{I}_{3z} + J_{23}\hat{I}_{2z}\hat{I}_{3z} \quad (52)$$

Jossa $J_{12}\hat{I}_{1z}\hat{I}_{2z}$ on ensimmäisen ja toisen spinin kytkentätermi, $J_{13}\hat{I}_{1z}\hat{I}_{3z}$ ensimmäisen ja kolmannen spinin kytkentätermi ja $J_{23}\hat{I}_{2z}\hat{I}_{3z}$ toisen ja kolmannen spinin kytkentätermi.

Kolmen spinin Hamiltonin operaattorin ominaisfunktiot ovat $\hat{I}_{z:n}$, $\Psi_{\alpha:n}$ ja $\Psi_{\beta:n}$ ominaisfunktioiden tuloja ja niitä on yhteensä kahdeksan erialista, esimerkiksi $\Psi_{\alpha,1}\Psi_{\alpha,2}\Psi_{\beta,3}$. Ominaisfunktioiden ominaisarvot eli tilojen energiat voidaan kirjoittaa yleisesti muotoon

$$E_{m_1,m_2,m_3} = m_1v_{0,1} + m_2v_{0,2} + m_3v_{0,3} + m_1m_2J_{12} + m_1m_3J_{13} + m_2m_3J_{23} \quad (53)$$

Valintasäännön mukaan jokaiselle spinille on neljä sallittua siirtymää. Neljä siirtymää tarkoittaa sitä, että spektriin tulee neljä signaalia ja kun spinejä on kolme, spektri koostuu kolmesta neljän signaalin ryppästä.

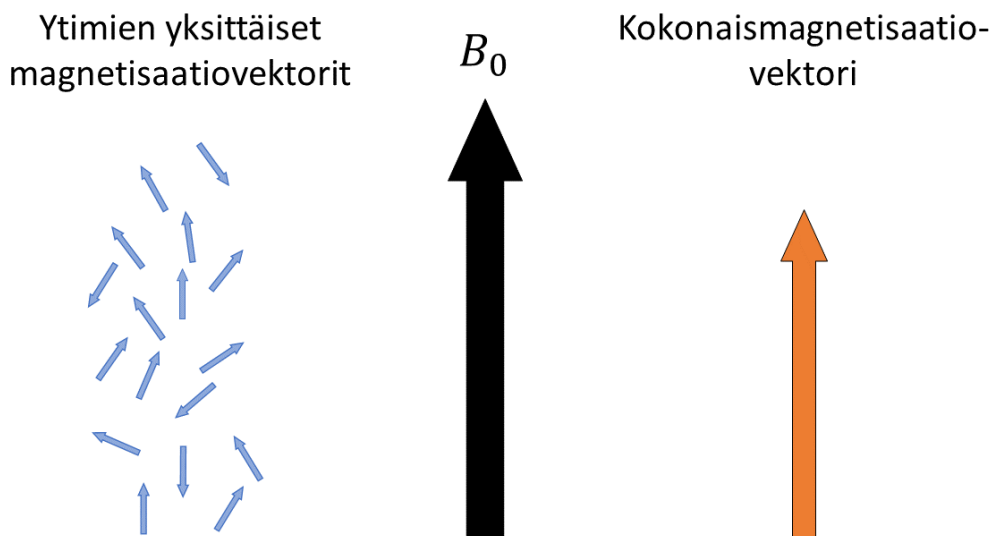
Kolmen spinin systeemillä on kuusi kaksoiskvanttisiirtymää, kuusi nollakvanttisiirtymää ja yksi kolmoiskvanttisiirtymä. Kolmen spinin systeemillä on myös siirtymiä, missä M vaihtuu yhdellä, mutta kaikkien spinien tilat muuttuvat. Näitä kutsutaan kombinaatioviivoiksi (engl. combination line) ja kuten monikvanttikytkenätkin, ne voidaan havaita 2D-spektreissä. Joissain tapauksissa kombinaatioviivat voidaan havaita 1D-spektrissä.

3 Vektorimalli

Energiatasot auttavat ymmärtämään miten signaalit muodostuvat, mutta ne eivät anna intuitiivista kuvaa mittausten toiminnasta. Vaikka kvanttimekaniikka antaakin kokonaisvaltaisen kuvan ydinmagneettisesta resonanssista, merkittävästi yksinkertaisempi vektoreihin perustuva malli usein riittää selittämään ymmärrettävämmiin mittaukseen liittyviä komponentteja, kuten radioaaltopulseja. Oikeasti vektorimalli pätee tarkasti kuitenkin vain spineihin, joilla ei ole kytkentää.

3.1 Kokonaismagnetisaatiovektori

Spinkiertomomenttiin liittyy ydinspinmagneettimomentti, jossa ytimellä on heikko magneettikenttä ympärillään ikään kuin se olisi äärettömän pieni magneetti. Kun ydin on magneettikentässä, ytimen magneettimomentin ja ulkoisen magneettikentän välillä on vuorovaikutus. Vuorovaikutuksen energia riippuu ytimen magnetogyrisestä suhteesta, eli magneettisen momentin kulmasta suhteessa ulkoiseen magneettikenttään.



Kuva 6 Spinit, ulkoinen magneettikenttä ja kokonaismagnetisaatiovektori.

Suurin energia saavutetaan, kun spinien magneettimomentti on vastakkaisessa suunnassa magneettikenttään nähden ja pienin energia kun magneettimomentti on samansuuntainen. Energiaerot ovat hyvin pieniä ja ilmanlämmöstä tuleva lämpöenergia on noin neljä kertaluokkaa suurempi kuin spinien tilojen välinen energia. Tämän vuoksi oikeasti vain pieni enemmistö spineistä on energeettisesti edullisemmassa tilassa ja NMR-signaali on heikko. Vaikka energiaero on hyvin pieni, näytteeseen syntyy ulkoisen magneettikentän suuntainen kokonaismagnetisaatio. Kokonaismagnetisaatiolla tarkoitetaan kaikkien

yksittäisten ytimien yksittäisten magneettikenttien yhteenlaskettua magneettikenttää. Jos systeemi koostuu kahdesta yhtä suuresta, mutta vastakkaissuuntaisesta magnetisaatiovektorista, niin tällöin bulkkimagnetisaatiovektorin suuruus olisi 0. Jos taas systeemi koostuu kahdesta samansuuntaisesta magnetisaatiovektorista, niin kokonaismagnetisaatio on kaksinkertainen ja saman suuntainen yksittäiseen magnetisaatiovektoriin nähden. Vektorimalli kuvaa juuri kokonaismagnetisaatiovektorin käyttäytymistä täysin klassisesti. Tilannetta on havainnollistettu kuvassa 6. Kun näyte laitetaan ulkoiseen magneettikenttään B_0 , ytimien yksittäiset spinit alkavat linjautua hieman magneettikentän suuntaisiksi. Kun kaikkien näiden spinien magneettikentät lasketaan yhteen, saadaan kokonaismagnetisaatiovektori, joka on ulkoisen magneettikentän suuntainen mutta merkittävästi pienempi. Magnetisaatiovektorikäsittely tuottaa saman tuloksen kuin kvanttimekaaninen käsittely kytkeytymättömälle spinille. NMR-signaalin vahvuuteen vaikuttavat myös muutkin asiat kuten ytimen magneettinen susceptibiliteetti ja luontainen NMR-aktiivisten isotooppien prosentuaalinen määrä. Esimerkiksi ^1H -ytimien luontainen esiintyvyys on 99,9 %, mutta hiilen NMR-aktiivisen ytimen, ^{13}C , luontainen esiintyvyys on vain 1,1 %. Tämän vuoksi Vedyn sanotaan olevan paljon herkempi, eli se tuottaa voimakkaamman signaalin.

3.1.1 Spin ylös ja spin alas

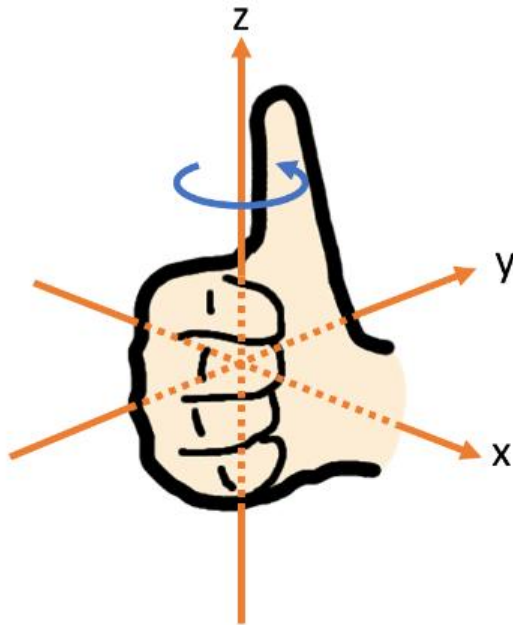
Vaikka spinejä kuvataan nuolilla ja puhutaan että spinit ovat ylös- ja alas-tilassa, niin tämä ei ole realistinen malli. Spinin ovat superpositiossa, eli ikään kuin kummassakin tai ei kummassakaan tilassa, ja magneettinen momentti voi olla mitä vaan minimi- ja maksimienergiatilan välillä.

3.1.2 Koordinaatisto

Kokonaismagnetisaatiota kuvataan vektorina kolmiulotteisessa koordinaatistossa, jossa z-akseli on ulkoisen magneettikentän suuntainen. Magnetisaation liikettä voidaan havainnollistaa oikean käden säännöllä, eli kun tarttuu z-akselista kiinni niin että peukalo osoittaa positiivisen z-akselin suuntaan, niin sormet kiertyvät z-akselilta katsottuna positiivisen liikkeen suuntaan. Toisin sanoen positiivinen liike kiertää x-akselilta y-akselin suuntaan. Tätä on havainnollistettu kuvassa 7

Samaa oikean käden sääntöä voidaan käyttää tutkimaan myös liikettä muiden akselien ympäri. Jos halutaan tietää, että mihin suuntaan positiivinen liike x-akselin ympäri pyörii,

niin kuvitellaan vain, että otetaan x-akselista kiinni. Tällöin positiivinen liike on y-akselilta z-akselin suuntaan.



Kuva 7 Oikean käden sääntö. Jos halutaan selvittää positiivisen liikkeen suunta z-akselin ympäri, tarvitsee vain kuvitella ottavansa z-akselista kiinni, niin sormet kiertyvät positiivisen liikkeen suuntaan.

3.1.3 Magnetisaation tasapainotila

Ilman ulkoista magneettikenttää näytteessä ei ole kokonaismagnetisaatiota, sillä yksittäiset magneettiset momentit ovat satunnaisesti orientoituneita. Kun näyte laitetaan ulkoiseen magneettikenttään, esimerkiksi NMR-laitteeseen, tulee toisesta spin-tilasta energeettisesti edullisempi ja hetken päästä saavutetaan tasapainotila, jossa on pieni ulkoisen magneettikentän mukainen kokonaismagnetisaatio. Tätä prosessia, jossa magneettiset momentit palaavat tasapainotilaan, kutsutaan relaksaatioksi. Relaksaatioaika, eli aika mikä kuluu tasapainotilan saavuttamiseen, on ydin- ja yhdistekohtainen ja voi kestää jopa kymmeniä sekunteja. Tasapainotilassa kokonaismagnetisaatiovektori osoittaa positiivisen z-akselin suuntaan eli on linjassa ulkoisen magneettikentän kanssa.

3.2 Larmorin prekessio

Kun tasapainotila on saavutettu, niin magnetisaatiovektorilla on pysyvä koko ja suunta, jotka eivät muutu ajan funktiona. Jos tasapainotilaa häiritään ja magnetisaatiovektori saadaan käännettyä pois z-akselilta, magnetisaatiovektori alkaa kiertämään z-akselia vakiokulmassa β .

Tätä z-akselin ympäri pyörimistä, eli prekessiota voidaan kuvata kaavoilla

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \text{ (rads}^{-1}\text{)} \quad (54)$$

$$\nu_0 = -\frac{\gamma B_0}{2\pi} \text{ (Hz)} \quad (55)$$

jossa γ on magnetogyriininen suhde. Kiertotaajuus on siis Larmorin kulmataajuus, joka on tullut jo aikaisemmin esiin. Yhdelle spinille transiitio matalan ja korkean energian tilan välillä tapahtuu Larmorin kulmataajuudella, joka on sama taajuus millä magnetisaatiovektori prekessoi ulkoisen magneettikentän ympäri. Tätä kutsutaan Larmorin prekessioksi.

Ytimillä, joilla on positiivinen magnetogyriininen suhde, on negatiivinen Larmorin taajuus eli niiden magnetisaatiovektori prekessoi negatiiviseen suuntaan. Prekessiota havaitaan vain, kun magnetisaatiovektori on kulmassa ulkoiseen magneettikenttään nähden, eli pyörimistä ei havaita tasapainotilassa.

3.3 Detektio

NMR-mittauksessa mitataan prekessoivaa magnetisaatiota, ja vielä tarkemmin prekessoivan magnetisaation x- ja y-komponentteja. Mittaamista voidaan ajatella samalla tavalla kuin dynamon toimintaa. Näytteeseen muodostuva nettomagnetisaatio toimii kuin dynamon magneetti ja detektiokela toimii samalla tavalla kuin dynamon kela. Kun magneetti alkaa pyörimään dynamossa, se muodostaa sähkövirtaa kelaan, joka tuottaa lamppuun valoa. Niin myös NMR-mittauksessa pyörivä magnetisaatio tuottaa detektiokelaan sähkövirtaa. Sen sijaan, että sähkövirta käytettäisiin valon tuottamiseen, se mitataan.

Magnetisaatiovektori prekessoi kartion muotoisesti z-akselin ympäri. Tätä prekessiota voidaan havainnollistaa sekä x- että y-komponentein. Jos ajanhetkellä 0 x-komponentin osuus on $M_0 \sin\beta$, y-komponentin osuus on 0 ja pyörimisnopeus z-akselin ympäri on ω_0 , niin ajan t päästä x- ja y-komponenttien osuudet ovat:

$$M_x = M_0 \sin\beta \cos\omega_0 t \quad (56)$$

$$M_y = -M_0 \sin\beta \sin\omega_0 t \quad (57)$$

Tällaisesta oskillaatiosta tulisi spektri, jossa olisi yksi signaali taajuudella ω_0 . Mallissa, jossa vaimenemista ei oteta huomioon signaali olisi äärettömän kapea ja äärettömän korkea.

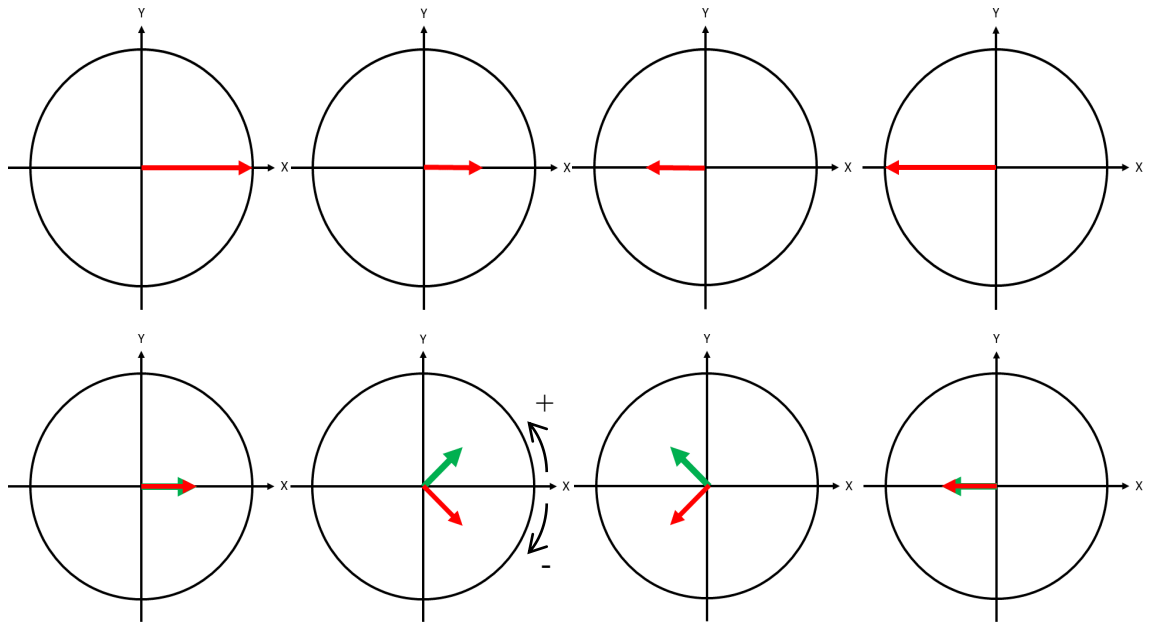
3.4 Pulssit

Kuten aikaisemmin mainittiin, mittauksessa havaitaan magnetisaatiovektorin xy -tason komponentti. Tasapainotilassa magnetisaatiovektori on ulkoisen magneettikentän suuntainen eli se on z -akselilla ja näin ollen x - ja y -komponentit ovat 0. Jotta jotain voitaisiin havaita, täytyy magnetisaatiovektori saada käännettyä xy -tasoon. Magneettikentän suunnan vaihtaminen z -akselin suunnasta xy -tasoon on käytännössä hyvin haastavaa, sillä riittävän vahvan magneettikentän saavuttamiseksi tarvitaan suprajohtava kestopagneetti. Ei ole siis mahdollista hetkellisesti laittaa z -akselin suuntaista B_0 magneettikenttää pois päältä ja laittaa xy -tasossa olevaa B_1 magneettikenttää päälle, mutta vastaavan kaltainen tilanne pystytään onneksi saavuttamaan radioaaltopulssien avulla. Jos annetaan sopivan vahvuinen ja sopivan pituinen xy -tason suuntainen radioaaltopulssi, joka oskilloi hyvin lähellä ytimien Larmorin kulmataajuutta ω_0 , se synnyttää ikään kuin juuri tällaisen xy -tason suuntaisen magneettikentän ja sillä saadaan käännettyä näytteen nettomagnetisaatiovektori xy -tasoon. Kun käytettävä pulssi oskilloi ytimien Larmorin kulmataajuudella, sanotaan sen olevan resonanssissa. Vaikka ulkoinen magneettikenttä B_0 on monta kertaluokkaa vahvempi kuin pulssin avulla syntyvä B_1 , pystyy B_1 silti kääntämään kokonaismagnetisaation xy -tasoon.

3.4.1 Pyörivä kehys

Detektiokela on usein suunniteltu niin, että se antaa x -akselin suuntaisia pulsseja, jotka muodostavat oskilloivan magneettikentän. Oskilloivalla magneettikentällä tarkoitetaan sitä, että ensin magneettikenttä on x -akselin suuntainen ja sen voimakkuus on $2B_1$, minkä jälkeen se alkaa pienenemään kohti origoa, kunnes sen voimakkuus on 0. Tämän jälkeen magneettikenttä alkaa voimistumaan negatiivisen akselin suuntaan, kunnes sen voimakkuus on $-2B_1$. Magneettikentän voimakkuus siis aaltoilee tasaisesti x -akselilla voimakkuuksien $2B_1$ ja $-2B_1$ välillä. Tätä voimakkuuden vaihtelun taajuutta merkataan $\omega_{\text{lähetin}}$ (rad s^{-1}), sillä lähettimestä tuleva pulssi aiheuttaa kyseisen oskilloivan magneettikentän.

Oskilloivan magneettikentän vaikutuksia voidaan havainnollistaa paremmin, jos se jaetaan kahteen eri suuntaan pyörivään osaan. Merkitään positiiviseen suuntaan, eli positiiviselta x -akselilta positiivisen y -akselin suuntaan, pyörivää liikettä B_1^+ ja negatiiviseen suuntaan, eli positiiviselta x -akselilta negatiivisen y -akselin suuntaan,



Kuva 8 Oskilloiva magneettikenttä kahdella eri esitystavalla. Ylempänä on esitetty yhden magnetisaatiovektorin malli, missä se oskilloi x-akselin suuntaisesti positiivisesta negatiiviseen. Alempana kahden magnetisaatiovektorin malli, missä kaksi yhtä suurta mutta vastakkaisuuntaista magnetisaatiovektoria pyörivät ympäri. Mallit tuottavat identtisen lopputuloksen, mutta kahden vektorin malli helpottaa jatkokäsittelyä.

pyörivää liikettä B_1^- . Ajan hetkellä 0 kummatkin osat ovat positiivisella x-akselilla ja niiden yhteenlaskettu voimakkuus on:

$$B_1 \text{ ajanhetkellä } 0 = B_1^+ + B_1^- = 2B_1 \quad (58)$$

Tulokseksi saadaan siis täysin sama kuin yhden oskilloivan magneettikentän mallilla. Magneettikentät lähtevät pyörimään eri suuntiin samalla nopeudella, ja kun ajan hetkellä t ne ovat pyörineet 90° on positiiviseen suuntaan pyörinyt osa positiivisella y-akselilla ja negatiiviseen suuntaan pyörinyt osa negatiivisella y-akselilla. Tällöin osittaiset magneettikentät kumoavat toisensa ja oskilloivan magnetisaation voimakkuus on 0, vastaten tilannetta, jossa yhden magnetisaatiovektorin mallissa oskillovia magneettikenttä on origossa. Kummankin osittaisen magneettikentän y-komponentin suuruus on aina yhtä suuri, mutta vastakkaismerkkinen, joten ne kumoavat toisensa ja vain yhteenlaskettu x-komponentti jää jäljelle. Kahden eri suuntaan kiertävän magneettikentän malli vastaa siis täysin oskilloivan magneettikentän mallia. Kumpikin malli on havainnollistettu kuvassa 8.

Ytimellä, jolla on positiivinen magnetogyriininen suhde, on negatiivinen kulmataajuus, eli se pyörii samaan suuntaan kuin oskillovia B_1^- magneettikenttä. Toiseen suuntaan pyörivällä B_1^+ magneettikentällä ei ole merkittäviä interaktioita magnetisaation kanssa ja se voidaan jättää huomiotta. Negatiivisen magnetogyriinisen suhteen omaavalla ytimellä on taas positiivinen kulmataajuus ja se pyörii oskilloivan B_1^+ magneettikentän suuntaisesti ja

vastakkaiseen suuntaan pyörivällä B_1^- magneettikentällä ei myöskään ole merkittäviä vuorovaikutuksia magnetisaation kanssa.

Laskujen helpottamiseksi voidaan siirtyä tarkastelemaan niin sanotusta laboratoriokehyksestä pyörivään kehykseen. Toisin sanoen tarkastelemme systeemiä tilanteessa, jossa koordinaatisto pyörii B_1^- suuntaisesti samalla nopeudella ja tällöin tarkastelussa näyttää siltä kuin B_1^- pysyisi paikallaan.

Siirtymistä laboratoriokehyksestä pyörivään kehykseen voidaan havainnollistaa esimerkillä, jossa vanhempi katsoo lastaan karusellissa hevosen päällä. Kun vanhempi seisoo kauempana karusellista ja tarkastelee lapsen liikettä, niin lapsi menee sekä karusellin mukana ympäri että ylös alas hevosen päällä. Jos aikuinen menee karuselliin mukaan tarkastelemaan lapsen liikettä, niin hän enää havaitsee vain hevosen ja lapsen ylösalaisen liikkeen. Näin liikkeen kompleksisuus vähenee.

Laboratoriokehysessä B_1^- pyörii xy-tasossa nopeudella $-\omega_{\text{lähetin}}$, mutta kun pyörivän kehyksen pyörimisnopeudeksi valitaan sama nopeus $-\omega_{\text{lähetin}}$, niin kehyksen sisällä B_1^- pystyy xy-tasossa paikallaan.

3.4.2 Larmorin prekessio pyörivässä kehyksessä

Vaikka Larmorin kulmataajuus on vakio vakio-olosuhteissa, niin pyörimisnopeus näyttää muuttuvan riippuen pyörivän kehyksen pyörimisnopeudesta. Jos pyörimisnopeudeksi valitaankin $-\omega_{\text{lähetin}}$ sijaan spinin Larmorin kulmataajuus, niin pyörivässä kehyksessä prekessio ikään kuin loppuu. Pyörimistä oikeasti tapahtuu Larmorin kulmataajuudella, mutta sitä tarkastellaan nyt eri tavalla.

Yleisellä tasolla voidaan kirjoittaa pyörivässä kehyksessä näennäinen Larmorin kulmataajuus muotoon

$$\omega_{\text{Näennäinen}} = \omega_0 - \omega_{\text{kehys}} = \Omega \quad (59)$$

missä ω_{kehys} on valittu pyörivän kehyksen taajuus. Näennäistä kulmataajuutta merkataan myös symbolilla Ω ja sitä kutsutaan poikkeamaksi (engl. offset). Larmorin kulmataajuus, eli se millä taajuudella magnetisaatio prekessoi magneettikentän B ympäri voitiin kuvata kaavalla 54

$$\omega_0 = -\gamma B$$

Näistä kahdesta ylemmästä kaavasta voidaan johtaa redusoidun magneettikentän ΔB (engl. reduced field) kaava

$$\Delta B = -\frac{\Omega}{\gamma} \quad (60)$$

Tästä nähdään, että pyörivästä kehyksestä tarkasteltuna näennäinen magneettikenttä voi olla paljon pienempi kuin laitteen magneettikenttä B_0 . Kuten aikaisemmin mainittiinkin, niin jos kehyksen pyörimisnopeudeksi valitaan ω_0 , niin näennäinen magneettikenttä on 0. Kun redusoidun magneettikentän voimakkuus alkaa vastaamaan radioaaltopulssin aiheuttamaa magneettikenttää B_1 , niin B_1 pystyy alkaa vaikuttamaan magnetisaation liikkeeseen, vaikka se onkin merkittävästi heikompi kuin B_0 .

3.4.3 Efektiivinen kenttä

Tähän mennessä pyörivässä kehyksessä muodostuu kaksi magneettikenttää, kun radioaaltopulssi annetaan. Ensimmäinen on x-akselin suuntainen radioaaltokenttä B_1 . Jos sen suuruus valitaan yhtä suureksi, mutta vastakkaismerkkiseksi kuin pyörivän kehyksen taajuus, siitä tulee staattinen. Toinen on redusoitu magneettikenttä ΔB . Koska lähtetimen taajuudeksi valittiin yhtä suureksi, mutta vastakkaismerkkiseksi kuin pyörivän kehyksen taajuus, niin kaavan 61 mukaan tällaisessa tapauksessa poikkeamaksi saadaan

$$\Omega = \omega_0 - \omega_{kehys} = \omega_0 - (-\omega_{\text{lähetin}}) = \omega_0 + \omega_{\text{lähetin}} \quad (61)$$

Vety-ytimillä on negatiivinen ω_0 o, joten jos $\omega_{\text{lähetin}}$ on lähellä Larmorin kulmataajuutta ω_0 , niin poikkeamasta tulee hyvin pieni.

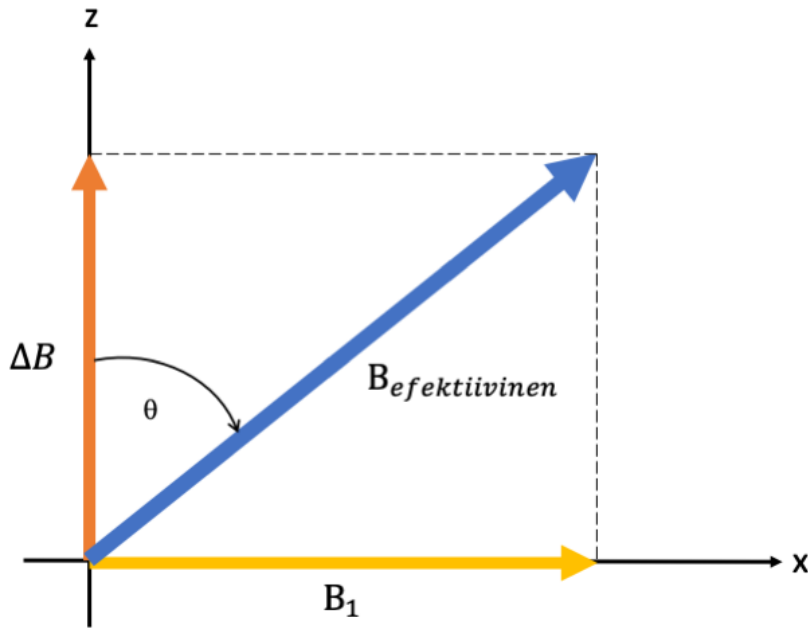
Pyörivässä kehyksessä redusoitu kenttä ja radioaaltopulssin tuottama B_1 kenttä yhteenlaskettuna tuottavat efektiivisen kentän $B_{\text{efektiivinen}}$. Kuvassa 9 on havainnollistettu efektiivistä kenttää ja sen suuruus saadaan yksinkertaisella trigonometrialla:

$$B_{\text{efektiivinen}} = \sqrt{B_1^2 + (\Delta B)^2} \quad (62)$$

Pyörivässä kehyksessä magnetisaatio pyörii efektiivisen kentän ympäri siinä missä laboratoriokehyksessä se pyörii B_0 kentän ympäri. Pyörimistaajuus efektiivisen kentän ympäri on myös riippuvainen efektiivisen kentän vahvuudesta:

$$\omega_{\text{efektiivinen}} = |\gamma| B_{\text{efektiivinen}} \quad (63)$$

missä $|\gamma|$ on magnetogyrisen suhteen itseisarvo. Kuvasta 9 nähdään, että kun ΔB on pieni, niin $B_{\text{efektiivinen}}$ siirtyy lähelle x-akselia, mikä onkin haluttu tulos. Tästä nähdään, että kun valitaan $\omega_{\text{lähetin}}$ lähelle ytimien Larmorin kulmataajuutta, B_0 :n vaikutus pystytään ikään kuin nollaamaan. Kaavasta 60 ja kuvasta 9 nähdään, että kun Ω on 0, niin ΔB :stä tulee 0 ja ainut vaikuttava magneettikenttä on enää B_1 .



Kuva 9 Efektiivinen magneettikenttä pyörivässä kehyksessä.

3.4.4 Efektiivinen kenttä taajuusyksikössä

Yleisesti tärkeä ominaisuus NMR:ssä on $\omega_{\text{efektiivinen}}$ ja sitä on hyödyllistä ajatella magneettikenttien voimakkuuksien sijaan prekessiotajuuksina. Edelliskappaleen kaavat saadaan helposti muutettua taajuusmuotoon. Taajuus ω_1 , millä magnetisaatio prekessoi B_1 kentän ympäri, saadaan kaavalla

$$\omega_1 = |\gamma|B_1 \quad (64)$$

Kaavasta 60 saadaan laskettua näennäinen Larmoin kulmataajuus Ω

$$\Omega = -\gamma\Delta B \quad (65)$$

Kun nämä sijoitetaan kaavaan 62, saadaan $\omega_{\text{efektiivinen}}$ taajuusyksikössä

$$\omega_{\text{efektiivinen}} = \sqrt{\omega_1^2 + \Omega^2} \quad (66)$$

Tilanne on täysin sama kuin kuvassa 9, mutta ΔB on vain korvattu Ω :lla, B_1 on korvattu ω_1 :lla ja $B_{\text{efektiivinen}}$ on korvattu $\omega_{\text{efektiivinen}}$:lla.

3.5 Resonanssipulssit

Kun lähettimen taajuus valitaan niin, että se on yhtä suuri kuin ytimien Larmorin kulmataajuus, sanotaan pulssin olevan resonanssissa. Tällöin Ω on 0, $\omega_{\text{efektiivinen}}$ on kokonaan xy-tasossa, sen pituus on ω_1 ja redusoidun kentän ja efektiivisen kentän välinen

kulma θ on 90° . Tämä on ideaalitilanne ja se ei usein vastaa todellisuutta, vaan tavallisesti magnetisaatio ei ole täysin xy-tasossa radioaaltokentän jäljiltä.

Pulssin kääntökulma β riippuu ajasta, jonka pulssi on päällä ja kun ω_1 taajuinen radioaaltokenttä pidetään päällä t_p ajan, niin kääntökulma on tällöin

$$\beta = \omega_1 t_p \quad (67)$$

Kääntökulma β tarkoittaa kulmaa, jonka verran pulssi kääntää kokonaismagnetisaatiota z-akselilta xy-tason suuntaan. Kaavasta nähdään, että muuttamalla aikaa, jonka radioaaltokenttä on päällä, pystytään muuttamaan kääntökulmaa. Yleisimmät kääntökulmat ovat $\pi/2$ eli 90° , ja π eli 180° .

NMR-laitteella pystytään antamaan eri suuntaisia pulsseja, joista yleisin on positiivisen x-akselin suuntainen pulssi. Pulssin suunta ja kääntökulma merkataan yleensä yhteen, esimerkiksi positiivisen x-akselin suuntainen 90°_x tai $90^\circ(x)$. Oikean käden sääntöä voidaan käyttää määrittämään kääntösuunta. Kun x-akselista otetaan kiinni niin, että peukku osoittaa positiivisen x-akselin suuntaan, niin muut sormet kiertyvät z-akselilta negatiivisen y-akselin suuntaan. Positiivinen x-akselin suuntaisen pulssi kääntää magnetisaatiota siis negatiivisen y-akselin suuntaan.

3.5.1 Kova pulssi

Ytimien Larmorin kulmataajuudet vaihtelevat hieman kemiallisen ympäristönsä vuoksi, jonka vuoksi ei voida valita pulssin taajuutta, joka olisi resonanssissa kaikkien ytimien kanssa. Tästä syystä NMR:ssä usein käytetään niin sanottuja kovia pulsseja, joiden ansiosta kaikki ytimet kokevat pulssin, joka on lähellä niiden resonanssitaajuutta. Tämä voidaan saavuttaa riittävän voimakkaalla radioaaltokentällä B_1 .

Kovien pulssien vaikutus voidaan havainnollistaa esimerkin avulla. Yleisimmät vedyn siirtymät tulevat spektriin alueelle 0–12 ppm ja lähetimen taajuus valitaan yleensä niin, että se on keskellä havaittavaa aluetta eli 6 ppm:n kohdalla. Jos käytössä on 500 MHz:n magneetti, niin lähetimen taajuus on tällöin 3000 Hz ja isoin ero havaittavien ytimien taajuuksissa on myös 3000 Hz. Muuttamalla se yksikköön $rad\ s^{-1}$ saadaan $\Omega = 1,88 \times 10^4 rad\ s^{-1}$.

Tavallisesti käytetyt 90° eli $\pi/2$ pulssipituudet ovat noin 10–14 μs mittaisia. Käyttämällä pulssipituutena 14 μs voidaan laskea kääntökulma ytimille, jotka ovat kauimpina keskikohdasta. Kaavaa 67 muokkaamalla saadaan laskettua kentän voimakkuus ω_1

$$\omega_1 = \frac{\beta}{t_p}$$

missä β on resonanssipulssin kääntökulma, eli $\pi/2$, ja sijoittamalla $\beta = \pi/2$ ja $t_p = 14 \times 10^{-6}$ saadaan

$$\omega_1 = \frac{\pi/2}{14 \times 10^{-6}} = 1,12 \times 10^5 \text{ rad s}^{-1}$$

Kun tiedetään kentän voimakkuus, voidaan laskea trigonometriaa käyttäen kääntökulma niille ytimille, joiden taajuus eroaa $1,88 \times 10^4 \text{ rad s}^{-1}$ resonanssissa olevien ytimien kanssa:

$$\tan \theta = \frac{\omega_1}{\Omega} = \frac{1,12 \times 10^5 \text{ rad s}^{-1}}{1,88 \times 10^4 \text{ rad s}^{-1}} = 5,96$$

Tällöin kääntökulmaksi tulee noin 80° . Ytimet, joiden Larmorin kulmataajuuksien ero on isoin lähettimen taajuuteen verrattuna kokevat silti 80° asteen pulssin. Tämä on monesti riittävä ja niiden voidaan olettaa käyttäytyvän kuin resonanssissa olevien ytimien.

3.6 Pulssi-mittaus-menetelmä

3.6.1 Vapaan vaimenemisen signaali

Yksinkertaisin NMR-mittaus koostuu kahdesta osasta: virittävästä pulssista pyörivän magnetisaation mittaamisesta. Ennen mittausta NMR-näyte laitetaan laitteen sisään, jonka jälkeen sinne muodostuu z-akselin suuntainen kokonaismagnetisaatio. Tämän jälkeen lähettimeiltä annettava kova pulssi kääntää magnetisaation xy-tasoon, jonka jälkeen se alkaa palaamaan takaisin tasapainotilaan prekessoiden z-akselin ympäri. Tätä pyörivää liikettä takaisin tasapainotilaan kutsutaan relaksaatioksi ja sen liikettä voidaan mallintaa kaavoilla

$$S_x = S_0 \cos \Omega t e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (68)$$

$$S_y = S_0 \sin \Omega t e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (69)$$

missä S_x on magnetisaation x-komponentin ja S_y y-komponentin suuruus ajanhetkellä t , ja kummatkin ovat riippuvaisia alkumagnetisaation S_0 koosta. Ωt on kulma, jossa magnetisaatio on ajanhetkellä t . T_2 kuvastaa signaalin ajasta riippuvaa heikkenemistä ja se johtuu usein pääasiassa relaksaatiosta. Kuten kaavoista 68 ja 69 nähdään, signaalin heikkeneminen on eksponentiaalista. Helppouden vuoksi x- ja y-komponenttien osuudet voidaan kirjoittaa yhteen yhtälöön, missä x-komponenttia kuvataan reaaliosalla ja y-komponenttia kuvataan imaginääriosalla.

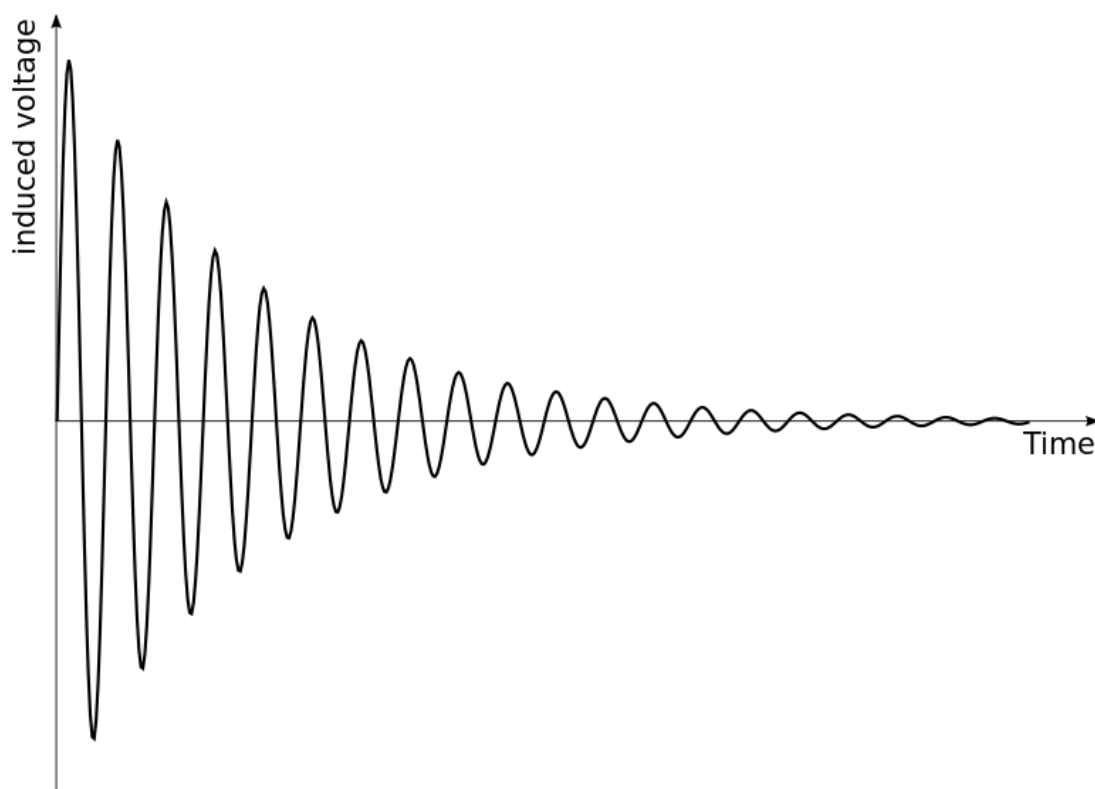
$$S(t) = S_x + iS_y = S_0 \cos \Omega t e^{\frac{-t}{T_2}} + i \left[S_0 \sin \Omega t e^{\frac{-t}{T_2}} \right]$$

$$= S_0 (\cos \Omega t + i \sin \Omega t) e^{\frac{-t}{T_2}} \quad (70)$$

Kun muistetaan, että $\cos \theta + i \sin \theta = e^{i\theta}$, voidaan kaava 70 kirjoittaa vielä yksinkertaisempaan muotoon

$$S(t) = S_0 e^{i\Omega t} e^{\frac{-t}{T_2}} \quad (71)$$

Kaavassa 71 on esitetty yhden ytimen aiheuttama signaali. Signaalia kutsutaan vapaan vaimenemisen signaaliksi ja se on esitetty graafisesti kuvassa 10.



Kuva 10 Vapaan vaimenemisen signaali. Kuvan tekijä GyroMagician. Kuva lainattu Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported-lisenssin mukaisesti.

Lähde: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Nmr_fid_good_shim_EN.svg

Kun ytimiä on useampi, aiheuttaa jokainen oman signaalinsa:

$$S(t) = S_0^{(1)} e^{i\Omega_1 t} e^{\frac{-t}{T_2^{(1)}}} + S_0^{(2)} e^{i\Omega_2 t} e^{\frac{-t}{T_2^{(2)}}} + \dots \quad (72)$$

missä jokaisella resonanssilla i on oma intensiteetti $S_0^{(i)}$, taajuus Ω_i ja vaimenemisvakio $T_2^{(i)}$. Vapaasti vaimenevia signaaleja voi yhdessä spektrissä olla muutamasta tuhanteen.

3.6.2 Fourier-muunnos

Vapaan vaimenemisen signaalista on ihmisen hyvin hankala saada informaatiota. Vapaan vaimenemisen signaalille tehdään niin sanottu Fourier-muunnos, jotta spektri saadaan helpommin ymmärrettävään muotoon.

Vapaan vaimenemisen signaali on niin sanotusti aikaulotteinen, eli mittaus on esitetty ajan funktiona. Fourier-muunnos muuntaa aikaulotteisen spektrin taajuusulotteiseksi, eli informaatio on esitettynä suhteessa taajuuteen. Yleisellä tasolla se voidaan esittää yksinkertaisesti muodossa

$$S(t) \xrightarrow{\text{Fourier-muunnos}} S(\omega) \quad (73)$$

Jokainen prekessoiva signaali tuottaa Fourier muunnoksen jälkeen spektriin signaalin kohdalle, joka vastaa pyörimisnopeutta. Yksinkertaisin tapaus on, kun tarkastellaan vain yhtälön 71 mukaista tapausta. Tällöin Fourier-muunnoksesta saadaan

$$S_0 e^{i\Omega t} e^{-\frac{t}{T_2}} \xrightarrow{\text{Fourier}} \frac{S_0 \frac{1}{T_2}}{\left(\frac{1}{T_2}\right)^2 + (\omega - \Omega)^2} + i \frac{S_0(\omega - \Omega)}{\left(\frac{1}{T_2}\right)^2 + (\omega - \Omega)^2} \quad (74)$$

jossa ensimmäinen osa on niin kutsuttu reaali-osa ja toinen imaginääriosa. Kuten nähdään niin yhtälö ei ole enää riippuvainen ajasta t vaan taajuudesta ω . Reaali-osan signaalimuoto on niin kutsuttu absorptiomuotoinen Lorentzin signaali (engl. absorption mode Lorentzian lineshape), joka on pääasiallinen signaalin muoto yksiulotteisessa NMR:ssä. Fourier-muunnokseen liittyy muitakin ominaisuuksia, eikä todellisen spektrin muuntaminen ole niin yksinkertaista kuin tässä on annettu ymmärtää.

4 NMR-laitteen anatomia

Spektrometri voidaan pilkkoa seuraaviin osiin:

- Suprajohtava magneetti, joka tuottaa voimakkaan, homogeenisen ja pysyvän magneettikentän
- Mittapään, joka sisältää kelan. Kelaä käytetään ytimien viritykseen ja NMR-signaalin mittaamiseen.
- Radioaaltohäetin, jonka avulla virittävät pulssit tuotetaan
- Herkkä radioaaltovastaanotin, joka pystyy vastaanottamaan ja vahvistamaan heikon signaalin
- Analogia-digitaalimuunnin, joka muuttaa analogisen NMR-signaalin digitaaliseen muotoon, joka voidaan tallentaa ja jota voidaan käsitellä tietokoneella
- Pulssiohjelmointilaitteisto, joka pystyy tuottamaan todella tarkkatehoisia ja -kestoisia radioaaltopulsseja.
- Tietokone, jolla ohjataan kaikkia spektrometrin osia ja jonne data tallennetaan

4.1 Magneetti

Moderneissa NMR-spektrometreissa käytetään suprajohtavia kestopagneetteja, jotka voivat tuottaa jopa 28 Teslan vahvuisen magneettikentän. Magneettina toimii kerälle kierretty lejeerinkilanka, joka on upotettu nestemäiseen heliumiin tämän kylmänä pitämiseksi. Noin kuuden Kelvinin lämpötilassa langasta tulee suprajohtava, jolloin resistanssi häviää täysin. Tällöin lankaan voidaan laittaa kiertämään suuri määrä sähkövirtaa, ilman että sitä häviää resistanssin takia lämmöksi. Niin kauan kuin lanka on jäähdytettynä, magneettikenttä pysyy yllä luoden kestopagneetin.

Nestemäinen helium on kallista, joten sen haihtumista halutaan hidastaa. Tämän vuoksi heliumsäiliö on ympäröity nestetyppisäiliöllä, joka vuorostaan on ympäröity tyhjiöllä. Näin saadaan minimoitua ympäristöstä tulevan lämmön määrä ja nesteheliumin haihtuminen. Laitteen keskellä kulkee sylinterin muotoinen aukko, jossa sijaitsevat mittapää ja mitattava näyte. Magneetti on suunniteltu niin, että vahvin magneettikenttä kohdistuu juuri näytteen kohdalle.

Metallilangat pysyvät vain tiettyyn sähkövirtamäärään asti suprajohtavina. Tavallinen kuparilanka ei pysyisi suprajohtavana niillä virtamäärillä, jota NMR-magneettiin tarvitaan, joten tämän vuoksi on kehitetty erilaisia lejeerinkejä, jotka pysyvät

korkeammilla sähkövirtamäärillä suprajohtavina. Yksi yleisimmistä NMR-magneeteissa käytetyistä lankaseoksista tehdään kuparista, tinasta ja niobiumista.

4.2 Shimmit

Spektrin tulkittavuus on sitä helpompaa, mitä kauempana signaalit ovat toisistaan ja mitä kapeampia ne ovat. Korkeamman magneettikentän omaavat laitteen ostaminen ei tosin ole usein mahdollista eikä edes taloudellisesti järkevää, joten on tärkeää pystyä vaikuttamaan mahdollisimman tehokkaasti signaalien puoliviivanleveyteen. Näytteet eroavat myös fysikaalisesti toisistaan, joten magneettikenttään on pystyttävä vaikuttamaan näytekohteisesti. Tämä onnistuu shimmiin avulla. Shimmit ovat pieniä eri asennoissa olevia keloja, joiden läpi kulkevaan sähkövirtaan voidaan vaikuttaa. Samalla tavalla kuten NMR-magneetissäkin, kelan läpi kulkeva sähkövirta tuottaa magneettikentän, jonka voimakkuus riippuu sähkövirran voimakkuudesta. Säättämällä eri shimmiin kelojen sähkövirtaa ja näin ollen magneettikenttiä, voidaan tuottaa hyvinkin tasalaatuinen magneettikenttä jokaiselle näytteelle.

Nykyisissä NMR-laitteissa voi olla monia kymmeniä shimmiin keloja, joista jokainen vaikuttaa hyvin spesifiin paikkaan näytillassa. Magneetit ovat kuitenkin niin stabiileja ja näytteistä johtuvat variaatiot niin pieniä, että usein pärjätään vain muutamien kelojen optimoinnilla.

Yleisesti shimmi tarkoittaa pientä välilevyä ja NMR:ssä shimmit ovat saaneet nimensä siitä, että ensimmäisissä NMR-laitteissa käytettiin pieniä metallilevyjä, joiden avulla magneettikentän suuntaa ja paikkaa voitiin muuttaa.¹⁷

NMR:ssä saavutettavien magneettikenttien homogeenisyyttä on vaikea käsittää. Pienille molekyyileille alle 1 Hz:n puoliviivanleveydet ovat hyvinkin yleisiä, mutta se ei vielä kerro monelle magneettikentästä mitään. Magneettikentän homogeenisyyttä pystyy demonstroimaan hyvin seuraavalla esimerkillä. Halutaan, että yhden protonin signaali mitattuna 500 MHz:n magneetilla tuottaa 1 Hz:n puoliviivanleveyden. Tällöin magneettikentän epähomogeenisuudesta johtuvan protoniytimien Larmorin kulmataajuuksien arvojen vaihteluväli pitää olla merkittävästi haluttua puoliviivanleveyttä pienempi, esimerkiksi kymmenesosa.

Larmorin kulmataajuus voidaan laskea kaavalla

$$\nu_0 = -\frac{1}{2\pi}\gamma B_0$$

Missä γ on protonin magnetogyriininen suhde, $2,67 \times 10^8 \text{ rad s}^{-1}$. Käyttämällä yllä olevaa kaavaa voidaan laskea suurin sallittu magneettikentän vahvuuden vaihteluväli, jolla kulmataajuuksien ero pysyy tarpeeksi pienenä.

$$\frac{0,1 \times 2\pi}{\gamma} = 2,4 \times 10^{-9} \text{ T}$$

Toisin sanoen magneettikentän vahvuuden sallittu vaihteluväli on karkeasti luokkaa 2×10^{-10} T. Laitteiden on siis pystyttävä hyvinkin tasalaatuisiin magneettikenttiin.

4.3 Lukko

Nykyisissä laitteissa magneetin tuottama magneettikenttä on erittäin stabiili ja lyhyissä mittauksissa sen ajelehtiminen (drift) on pientä. Tämä ajelehtiminen kuitenkin vaikuttaa riittävästi erityisesti pitkissä mittauksissa ja se pitää ottaa huomioon, jos halutaan hyvin kapeita viivanleveyksiä. Tämä magneettikentän ajelehtiminen otetaan huomioon kenttätaajuus-lukolla, joka on jatkuva itseään korjaava systeemi, jonka tarkoitus on pitää magneettikenttä vakiovahvuudessa.

Lukko mittaa deuterium- eli ^2H -signaalia, joka yleensä tulee käytettävästä deuteroidusta liuottimesta, esimerkiksi deuteroidusta vedestä D_2O tai deuteroidusta kloroformista CDCl_3 . Deuteriumia mitataan jatkuvan aallon menetelmällä (CW, continuous wave), eikä pulssimittausmenetelmällä, jota tavallisessa mittauksessa käytetään. NMR-laitteessa on shimmikeloihin verrattava lukkokela, jonka tehtävänä on ylläpitää homogeenistä magneettikenttäprofiilia ajan funktiona. Kun laite huomaa, että signaalin taajuus alkaa muuttumaan, automattinen järjestelmä muuttaa lukkokelassa kulkevaa virtaa niin, että deuteriumsignaali palaa takaisin samalle taajuudelle.

4.4 Mittapää

Mittapää on sylinterin muotoinen metallinen putki, joka on NMR-magneetin keskellä kulkevan sylinterin muotoisen aukon sisällä. Mittapäässä itsessään on tarkoitukseen soveltuva mittakelan keskellä sijaitseva kolo, jonka sisälle näyte asetetaan mittauksen ajaksi. Mittapäässä on myös paljon muuta elektroniikkaa sekä usein järjestelmä näytteen lämpötilan muuttamiseen.

Mittakela on rinnakkain kytketty kondensaattoriin ja tästä muodostuu niin sanottu viritetty (tuned) virtapiiri, jonka resonanssitaajuus riippuu kelan induktanssista ja

kondensaattorin kapasitanssista. Magneettikentästä riippuvaista signaalin voimakkuutta saadaan vahvistettua sillä, kun virtapiirin resonanssitaajuus on sama kuin mitattavien ytimien Larmorin kulmataajuus. Parhaan mahdollisen spektrin saamiseksi on näin ollen tärkeää virittää mittakelan virtapiiri vastaamaan mitattavien ytimien Larmorin kulmataajuutta. Tämä on käytännössä se mitä tehdään, kun puhutaan mittapään virittämisestä.

Mittapään virittämisen lisäksi usein se pitää myös täsmätä (match). Tällöin virtapiiriä optimoidaan niin, että virransiirto mittapään, lähettimen ja vastaanottimen välillä olisi parasta. Mittapään virittäminen usein vaikuttaa täsmäämiseen ja täsmääminen virittämiseen, joten optimaalisten tulosten saaminen voi vaatia kummankin vuoronperäistä muuttamista. Moderneissa laitteissa tämä nykyään tosin tapahtuu täysin automaattisesti.

Mittapää on myös suurin yksittäinen kohinan aiheuttaja mittauksessa. Käytännössä tämä on lämpökohinaa, joka tulee virtapiireissä käytettävien metallien elektroneista. Ainut tapa tämän vähentämiseksi on mittapään kylmentäminen ja nykyään markkinoilla onkin nestetyyppijäähdytteisiä mittapäitä, joiden signaali-kohinasuhde on merkittävästi huoneenlämpöisiä mittapäitä parempi.

4.5 Lähetin

Radioaaltohäetin on se osa spektrometria, joka pystyy luomaan virityspulssit. Häetin itse koostuu usein useammasta osasta: taajuussyntetisaattorista, joka pystyy luomaan tarvittavat pulssit, portista, jonka tehtävänä on päästää pulssi sopivan mittaisena läpi oikeaan aikaan ja heikentimestä sekä vahvistimesta, joiden tehtävänä on nimensä mukaisesti joko vahvistaa tai heikentää syntetisaattorilta tulevaa pulssia. Syntetisaattori luo säteilyvirraltaan matalia pulsseja ja niitä on vahvistettava miljoonakertaisiksi, jotta saadaan kovia epäselektiivisiä pulsseja. Vahvistaja toimii usein vakioteholla, ja jos halutaan heikompia selektiivisiä pulsseja, on syntetisaattorilta tulevaa signaalia heikennettävä sopivasti. Ennen vahvistinta oleva heikennin tekee juuri sen.

Mitä voimakkaampi pulssi annetaan, sitä paremmin se pystyy kääntämään nettomagnetisaatiovektoria ja näin ollen sitä lyhyempi 90 asteen pulssi on. Pulssin voimakkuudelle on kuitenkin rajansa, sillä jossain kohtaa siitä tulee niin voimakas, että se voi ionisoida ilmaa luoden valokaaren. Valokaari voi vahingoittaa mittapäätä ja se vaikuttaa nettomagnetisaatioon hyvin epätasaisesti.

NMR:ssä käytetään pulssien voimakkuuksien ilmaisuun desibelejä (dB). Mitä voimakkaampaa vaimennusta käytetään sitä heikompi pulssi. Esimerkiksi, jos halutaan puolittaa syntetisaattorilta tulevan signaalin voima, voidaan tarvittava heikennys laskea kaavalla

$$10 \times \log_{10} \frac{P_{ulos}}{P_{sisään}} = 10 \times \log_{10} \frac{1}{2} = -3.0 \quad (75)$$

Signaalin vahvuus puolittuu jokaista kolmea desibeliä kohti. Vaimennuksella -6.0 dB pulssin teho on siis enää neljäsosa.

4.6 Vastaanotin

Kuten aikaisemmin mainittiin, NMR-laitteessa oleva kela toimii sekä vahvojen pulssien lähettimenä että todella heikon NMR-signaalin mittaajana. Viritykseen käytettävien pulssien tehot voivat rikkoa vastaanottimen todella herkkiä virtapiirejä ja tämän vuoksi on tärkeää pitää huoli, siitä että vastaanottimelle ei kohdistu kovia pulseja. Tämä onnistuu haaroittimen avulla. Haaroitin toimii hyvin samalla tavalla kuin lähettimen vaihdin. Haaroittimia on monia erilaisia, mutta niiden jokaisen päätehtävänä on pitää huoli siitä, että kun laite antaa voimakkaita radioaaltopulseja, yhteys vastaanottimeen on katkaistu ja kun pulssien antaminen loppuu, yhteys vastaanottimelle palautetaan ja yhteys lähettimeen katkaistaan.

NMR-signaali on mikrovolttien vahvuinen ja se pitää vahvistaa ennen digitointia ja signaalin laadun varmistamiseksi se kannattaa tehdä mahdollisimman nopeasti. Usein hyvin lähellä NMR-magneettia löytyvä laatikko, esivahvistin, tekee tämän. Esivahvistin nimensä mukaisesti vahvistaa vastaanottimesta tulevaa signaalia. Heikko signaali on erityisen altis eri syistä aiheutuvalle kohinalle, joten esivahvistin on suunniteltava niin, että se tuottaa mahdollisimman vähän kohinaa.

4.6.1 Signaalin muuntaminen digitaalseksi

Jotta signaalia pystytään käsittelemään tietokoneella, on se muutettava analogisesta muodosta digitaaliseen eli binääriseen muotoon analogia-digitaalimuuntimella. NMR-laitteesta tulevan signaalin voimakkuus tallennetaan tietyllä intervallilla muistiin ja näin saadaan datapisteiden joukko, josta on mahdollista muodostaa NMR-signaali ja jota tietokone pystyy käsittelemään. Analogia-digitaalimuuntimella on kaksi tärkeää tunnuslukua, bittilukumäärä (bitrate) eli kuinka monta eri vaihtoehtoa signaalin voimakkuudella voi olla ja näytenopeus (sampling rate) eli kuinka usein signaalin voimakkuus mitataan.

4.6.2 Bittimäärä

NMR-signaali on jatkuva eli sillä on ääretön määrä arvoja, joten signaalin täydellinen digitointi olisi epäkäytännöllistä ja lähes mahdotonta. Tämä ei kuitenkaan haittaa, sillä jo merkittävän pienillä bittimäärillä saadaan edustavasti kuvattua signaalia. Muuntimen mahdollisten lukuarvojen määrää kuvataan bittiluvulla. Jos Muunnin on kaksibittinen, niin se tarkoittaa sitä, että jokainen mahdollinen luku koostuu kahdesta bitistä, toisin sanoen kaikki mahdolliset arvot ovat 00, 01, 10 ja 11. Kolmebittinen muunnin voi täten saada arvoja 000, 001, 010, 011, 100, 101, 110 ja 111. Mahdollisten lukujen määrä on siis 2^n , jossa on käytettävien bittien määrä. Yleisimmät NMR-spektrometreissä käytettävien muuntimien bittimäärät ovat väliltä 16–32, jolloin signaali digitalisoidaan $6,6 \times 10^4 - 4,3 \times 10^9$ bitin tarkkuudella. Digitalisointi aiheuttaa aina artefakteja, eli eri näköisiä häiriöitä, spektriin, ja mitä vähemmän pisteitä spektrin digitalisointiin käytetään niin sitä vahvempia nämä artefaktit ovat. Nykyisillä laitteilla ja korkeilla bittimäärillä tämä ei enää merkittävä ongelma.

4.6.3 Näytteenotonopeus

On tärkeää, että näytteenotonopeus on tarpeeksi iso. Jos signaali digitalisoidaan liian pienellä frekvenssillä, menetetään niin paljon informaatiota, että signaali vääristyy. Riittävä näytteenotonopeus riippuu korkeimmasta spektrissä havaittavasta taajuudesta, mikä halutaan mitata vääristymättömänä:

$$f_{max} = \frac{1}{2} \Delta \quad (76)$$

missä f_{max} on korkein mitattava taajuus ja delta on kahden datapisteen välinen aika. f_{max} :ia kutsutaan myös Nyquistin taajuudeksi. NMR:ssä yleisempää on miettiä asiaa toisin päin, eli mikä on kahden mittapisteen suurin mahdollinen väli, jotta taajuus f_{max} tulee mitattua riittävällä näytteenotonopeudella. Tämä saadaan laskettua kaavaa 76 muokkaamalla:

$$\Delta = \frac{1}{2f_{max}}$$

Jos positiivisia ja negatiivisia signaaleja ei olisi mahdollista erottaa, se käytännössä puolittaisi mahdollisten mitattavien taajuuksien määrän. Positiivisten ja negatiivisten signaalien erottaminen on onneksi mahdollista, joten todellinen mittaussväli, jolla riittävä näytteenotonopeus tapahtuu, on $-f_{max} - f_{max}$.

Kahden peräkkäisen mitattavan pisteen välinen aika (dwell time) pitää myös valita niin, ettei f_{max} :n ulkopuolelle jää signaaleja, sillä ne esittäytyvät spektrissä taittuneena (folding). Jos signaali on F taajuden verran isompi kuin f_{max} , niin tällöin se esiintyy spektrissä kohdassa %.

4.6.4 Signaalin taajuuden pienentäminen

Nyquistin taajuudesta voidaan havaita, että jos mitattavat signaalit ovat megahertsien luokkaa, niin signaaleja ei pystyisi nykyteknologialla digitalisoimaan riittävällä bittimäärällä. Tämä ongelma voidaan kiertää alentamalla mitattavan signaalin taajuutta. Usein suurimman ja pienimmän havaittavan signaalin taajuuksien väli on kymmeniä kilohertsejä, joten vähentämällä näiden keskiarvotaajuus kaikista mittauksen signaaleista saadaan NMR-signaaleille taajuuksiksi kilohertsejä megahertsien sijaan. Kiloherzisten digitointi isollakin bittimäärällä on helppoa nykyisellä teknologialla. Tätä valittua taajuutta kutsutaan vastaanottimen referenssitaajuudeksi (receiver reference frequency). NMR-laitteelta tuleva vaimea signaali ensin vahvistetaan esivahvistitussa, jonka jälkeen se syötetään taajuusekoittimeen (frequency mixer). Taajuusekoitin tuottaa kaksi signaalia; yhden, jossa NMR-signaaliin lisätään referenssitaajuus ja toisen, jossa NMR-signaalista vähennetään referenssitaajuus. Summataajuus voidaan suodattaa alipäästösuodattimen (low-pass filter) avulla niin, että analogia-digitaalimuuntimelle pääsee vain signaali, jolla on pienempi taajuus.

4.7 Kvadratuurimittaus

Laitella on mahdollista havaita prekessoivan magneettikentän x- ja y-komponentit, joita kumpaakin tarvitaan aikaulotteisen signaalin muodostukseen. Tämä kompleksi sekä x- että y-komponentin sisältävä signaali on se, joka Fourier-muunnetaan taajuusulotteiseksi spektriiksi. Jos tämä havaitseminen ei olisi mahdollista, ei pystyttäisi erottamaan vastaanottimen referenssisignaalin negatiivisella ja positiivisella puolella olevia signaaleja toisistaan.

Yhdellä detektiokelalla ei suoraan pystytä havaitsemaan magnetisaation eri komponentteja, ja tämän lisäksi toisen kelan lisääminen mittapähän ja kummankin kelan eristäminen toisistaan on erittäin vaikeaa. Ongelma pystytään ratkaisemaan niin, että yhden detektiokelan mittaama signaali syötetään kahteen eri taajuusekoittimeen, jotka kummatkin vähentävät mitatusta signaalista eri vaiheisen mutta samansuuruisen

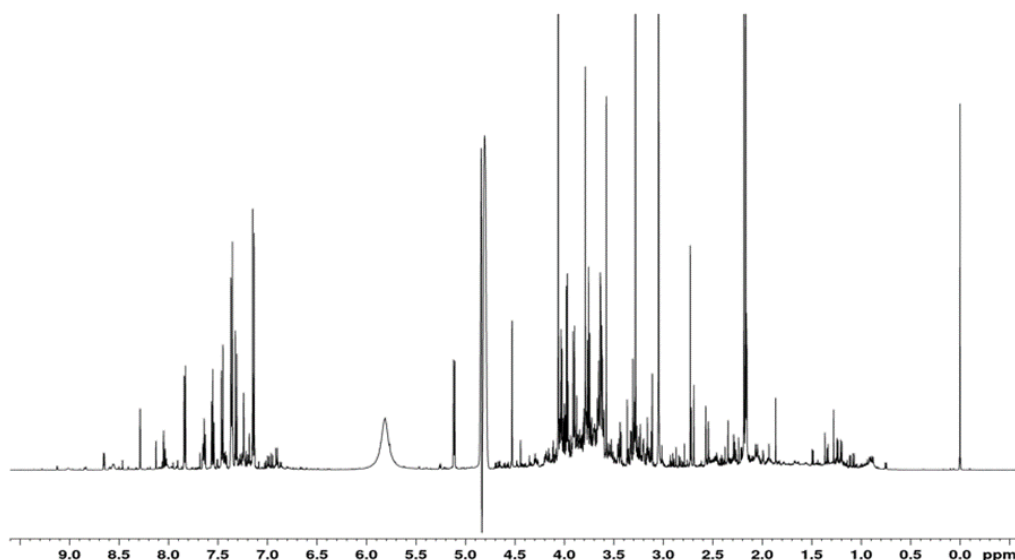
vastaanottimen referenssisignaalin. Näitä signaaleja kutsutaan reaalisignaaliksi ja imaginäärisignaaliksi, ja tätä menetelmää kutsutaan kvadratuurimittaukseksi.

5 Kokeellinen osuus

Kansantaudit, kuten sydän ja verisuonisairaudet, ovat usein monisyisiä ongelmia. Näiden aiheuttajana ei ole olemassa vain yhtä tiettyä taudinaiheuttajaa. Niitä ei pystytä myöskään usein ennustamaan tai diagnosoimaan vain yhtä aineenvaihduntatuotetta käyttäen, vaan tarvitaan kokonaisvaltaisempia tutkimuksia. Kansantautien kustannukset ovat merkittävät yhteiskunnalle niin hoitokustannuksissa kuin lyhentyneinä työurina. Tällaisten monisyisten tautien ennaltaehkäiseminen olisi sekä halvempaa että yksilön hyvinvoinnille parempaa. Ennaltaehkäiseminen vaatii kuitenkin riittävän määrän informaatiota niin yksilöstä kuin populaatiosta ja nyky menetelmillä sen hankkiminen on usein kallista, epätarkkaa ja hidasta. Tässä työssä pyrittiin kehittämään menetelmä, millä pystytään mittaamaan virtsasta kymmenien aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksia korkealla suoritusteholla

5.1 Materiaalit ja menetelmät

Menetelmäkehitystä varten kerättiin noin 200 aamuvirtsanäytettä vapaaehtoisilta luovuttajilta viiden kuukauden aikana. Aamuvirtsalla tarkoitetaan heräämisen jälkeen ensimmäisellä virtsauskeralla tulevaa virtsaa. Vapaaehtoisia oli suositeltu paastoamaan vähintään kahdeksan tuntia ennen virtsan keruuta, mutta se ei ollut pakollista. Aamuvirtsan lisäksi kerättiin muutamia näytteitä vähemmän konsentroitua päivän aikana tullutta virtsaa. Aamuvirtsa on konsentroidumpaa ja sitä käyttämällä saatiin suurempi pienmolekyylisen pitoisuuksien vaihteluväli. Päivän aikana tullut virtsa on merkittävästi laimeampaa, jolloin pienmolekyylisen pitoisuuksille saatiin myös matalia arvoja. Virtsa sentrifugoitiin, jaettiin neljään 1 ml:n osanäytteeseen ja säilöttiin 2 ml kryoputkissa -80°C pakastimessa myöhempää käyttöä varten. Näytteet otettiin sulamaan 4°C jääkaappiin päivä ennen näytteenvalmistusta.



Kuva 11 Virtsan NMR-spektri

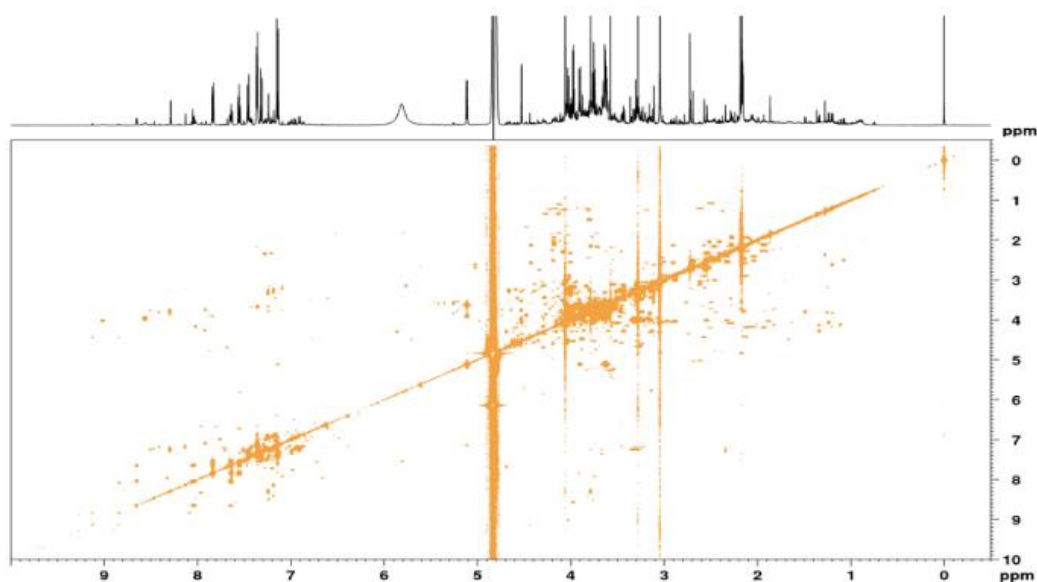
Lisäksi menetelmäkehitykseen käytettiin kohorttitutkimuksiin luovutettujen virtsanäytteiden NMR-spektrejä. Keräysajankohtaa ei ollut tiedossa näille näytteille.

Sulaneet näytteet sekoitettiin ensin hellästi käsin muutaman kerran ylösalaisin käännettäen, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin sakan tiivistämiseksi kryoputken pohjalle. Tämän jälkeen näytteistä valmistettiin mitattavat NMR-näytteet 5 mm NMR-putkiin automaattisella näytteenkäsittelijällä (Janus G3, PerkinElmer) pipetoimalla virtsaa ja 1,5 molaarista fosfaattipuskuria¹⁸ suhteessa 10:1. Fosfaattipuskuri (pH 7,4) valmistettiin sekoittamalla dikaliumvetyfosfaattia (K_2HPO_4) sekä sen emäsparina natriumdivetyfosfaattia ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) moolisuhteessa 4:1. Liuoksen tarkka pH mitattiin pH-mittarilla ja korjattiin vahvalla suolahapolla (HCl) ja natriumhydroksidilla (NaOH). Puskuriin lisättiin 0,1 massaprosenttia TSP:tä referenssiksi ja 2 mM natriumatsidia (NaN_3) bakteerikasvun estämiseksi.

Näytteet ajettiin Bruker Avance III HD 600 MHz spektrometrillä, jossa oli nestetyyppijäähdytteinen Prodigy-mittapää. Näytteet odottivat mittausta +6°C lämpötilassa näytteenvaihtajassa, josta ne siirrettiin temperoitumaan +25°C esilämmittimeen vähintään kymmeneksi minuutiksi ennen mittausta. Esilämmittimestä näytteet siirrettiin magneettiin mitattavaksi. Näytteet mitattiin *noesygppr1d*-pulssisarjalla ja spektrit käsiteltiin TopSpin 3.7 -ohjelmalla (Bruker Biospin).

Aineenvaihduntatuotteiden identifointiin käytettiin apuna virtsoista mitattuja COSY-, TOCSY-, HSQC-, HMBC- ja JRES-mittauksia. Spektrit käsiteltiin Topspin 3.7

ohjelmistolla. Tunnistuksen apuna käytettiin myös Chenomx NMR Suite 8.3 -ohjelmistopakettia (Chenomx Inc.) ja HMDB-tietokantaa. Tunnistukset varmistettiin lisäämällä virtsanäytteisiin puhtasaineita, jolloin puhtasaineesta johtuvien signaalien intensiteetti kasvoi ja signaalien sijainnista spektrissä saatiin varmuus. Puhtasaineiden puhtaus oli >98 % ja ne tilattiin Sigma-Aldrichilta.



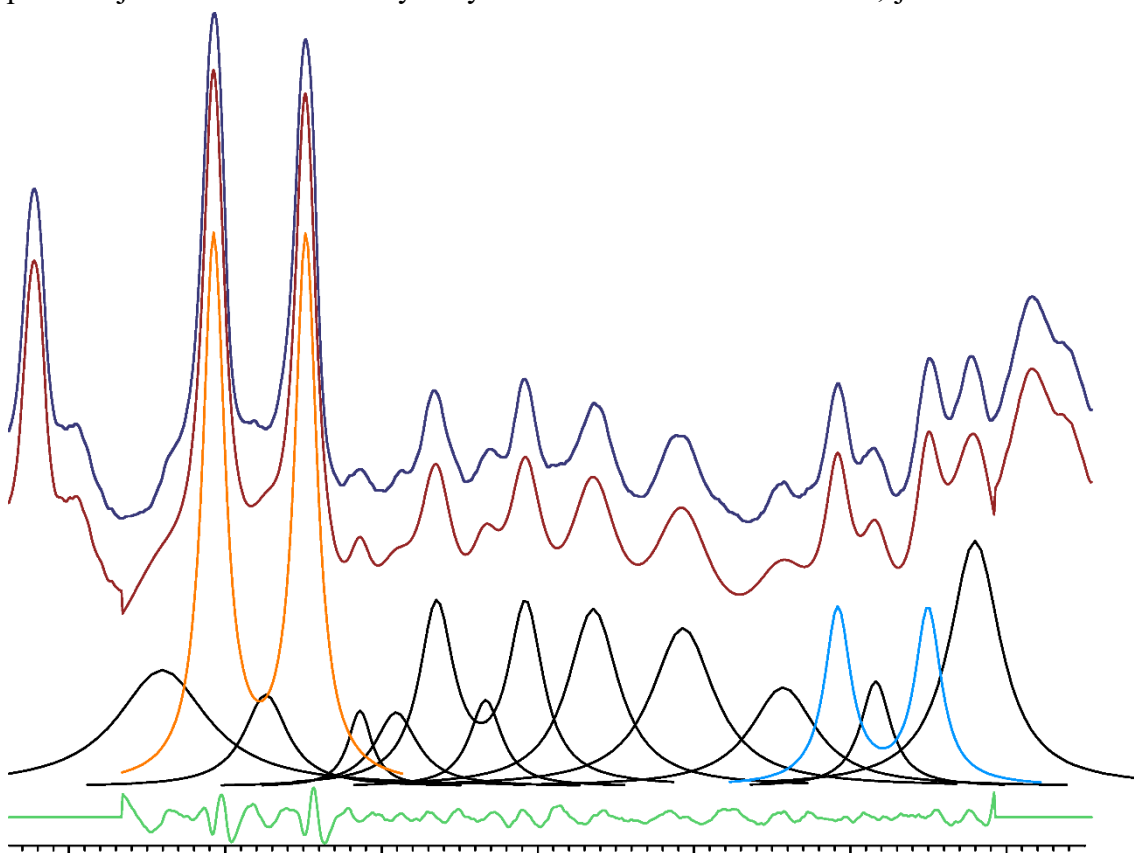
Kuva 12 Virtsan COSY-spektri.

Menetelmäkehitykseen tarvittavat tunnistettujen aineenvaihduntatuotteiden signaalit mallinnettiin PERCH-spektrinkäsittelyohjelmalla (PERCH Solutions Ltd.), jossa mallinnukseen käytettiin puhtasaineista tehtyjä spektrimalleja. Malleissa oli määritelty kytkentävakion suuruus, toisin sanoen signaalien etäisyys toisistaan, signaalien intensiteetit suhteessa toisiinsa ja signaalien leveydet suhteessa toisiinsa. Näillä parametreilla pystyttiin luomaan hyvin haluttujen aineenvaihduntatuotteiden signaalien muoto. Kuvassa 13 nähdään sovitukset kahdelle aineenvaihduntatuotteelle. Kuten nähdään, niin PERCH pystyy erinomaisesti mallintamaan haluttuja NMR-signaaleja hyvinkin vaikeistakin spektreistä.

PERCH antaa aineenvaihduntatuotteiden pinta-alat yksiköttömässä muodossa, jonka vuoksi tarvittiin muuntokertoimet, jotta voitiin selvittää aineenvaihduntatuotteiden pitoisuus. Muuntokertoimet määritettiin standardinlisäysmenetelmällä.

5.2 Tulokset ja päätelmät

Pulssisarjaksi valikoitunut *noesygppld* valittiin sen erinomaisen vesisuppression, optimoitavien parametrien vähyyden ja toimintavarmuuden perusteella. Pulssisarja suoriutui riittävästi niin konsentroidulle kuin laimeallekin virtsalle, eikä vesisupressio häirinnyt vesisignaalin lähellä olevien aineenvaihduntatuotteiden kvantitointia. Lisäksi pulssisarjan eri versiot ovat hyvin yleisiä NMR-metabolomiikassa, joten tulokset ovat



Kuva 13 Kahden eri aineenvaihduntatuotteen PERCH-sovitus. Violetti viiva on mitattu spektri, tumman punainen viiva on sovitettujen signaalien yhteenlaskettu spektri, mustalla viivalla piirretyt signaalit ovat sovitukseen käytettäviä signaaleja, joiden pinta-alaa ei haluta selvittää ja oranssilla sekä sinisellä piirretyt viivat ovat haluttujen aineenvaihduntatuotteiden signaaleja. Vihreä viiva kuvastaa sovitetun yhteenlasketun spektrin ja todellisen spektrin erotusta. Kuten vihreästä viivasta nähdään, sovitus on onnistunut ja jäljelle jää lähinnä kohinaa.

myös helposti vertailtavissa muihin tutkimuksiin.¹⁹ Kehitysvaiheessa tutkittiin muitakin vesisupressiomenetelmiä, muun muassa gradienttiviritykseen perustuvia WATERGATE-pulssisarjoja, mutta mikään ei tuottanut niin hyvää tulosta kuin pulssisarja *noesygppld*. WATERGATE-pulssisarjojen ominainen piirre on sekundääriset supressiokohdat, joiden etäisyys primäärisestä riippuu primäärisen supressioalueen leveydestä. Mitä kapeampi supressioalue on, sitä lähemmäksi sekundaariset supressioalueet tulevat. Näin ollen

riittävän kapealla primäärisellä supressioalueella sekundääriset supressioalueet vaimensivat aineenvaihduntatuotteiden signaaleja.

Fosfaattipuskuri valittiin sen voimakkaan puskurointikyvyn ansiosta. Tilavuussuhde 1:10 oli riittävä pienentämään virtsan luontaisen pH:n vaihtelun sellaiselle tasolle, että aineenvaihduntatuotteiden signaalien paikat olivat stabiileja. Muita puskureita ei testattu erikoistyön aikana, sillä ensimmäinen testattu puskuri oli riittävä.

Virtsasta tunnistettiin yhteensä 67 aineenvaihduntatuotetta, joista määritettiin pitoisuudet 54 aineenvaihduntatuotteelle ja joille kehitettiin automaattinen kvantitointimenetelmä. 13 poisjätetyn aineenvaihduntatuotteen pitoisuudet eri virtsanäytteissä olivat keskimäärin niin pienet, ettei kvantitointimenetelmää lähdetty kehittämään niille. Aineenvaihduntatuotteet, joille kvantitointimenetelmä kehitettiin, löytyvät liitteestä 1. Liitteessä kaksi on osan aineenvaihduntatuotteiden havaitut pitoisuudet menetelmäkehitykseen käytetyissä virtsanäytteissä. Kuten nähdään, niin monen aineenvaihduntatuotteen pitoisuuden vaihteluväli on erittäin suuri. Ydinmagneettisella resonanssilla on vaikea havaita hyvin pieniä pitoisuuksia tarkasti, joten nollopitoisuuksia ei ole ilmoitettu. Työssä onnistuttiin kehittämään menetelmä, jolla virtsan NMR-spektristä pystytään määrittämään 54 aineenvaihduntatuotteen pitoisuus automaattisesti ja toistettavasti.

Tällä menetelmällä tutkittiin isolla kohorttitutkimusella diabeettisen nefropatian vaikutusta virtsan metaboliitteihin.²⁰ Tutkimuksessa löydettiin kaiken kaikkiaan seitsemän aineenvaihduntatuotteen korreloivan taudin etenemisen kanssa. Tämän lisäksi havaittiin myös kuuden aminohapon ja pyroglutamaatin sekä makroalbuminurian välinen korrelaatio.

Viitteet

1. Pais, A. *Niels Bohr's Times*. (Clarendon Press, 1991).
2. Gorter, C. J. Negative result of an attempt to detect nuclear magnetic spins. *Physica* **3**, 995–998 (1936).
3. Gorter, C. J. & Broer, L. J. F. Negative result of an attempt to observe nuclear magnetic resonance in solids. *Physica* **9**, 591–596 (1942).
4. Rabi, I. I., Millman, S., Kusch, P. & Zacharias, J. R. The molecular beam resonance method for measuring nuclear magnetic moments the magnetic moments of Li63, Li73 and F199. *Physical Review* **55**, 526–535 (1939).
5. Bloch, F., Hansen, W. W. & Packard, M. Nuclear induction [5]. *Physical Review* vol. 69 127 (1946).
6. Purcell, E. M., Torrey, H. C. & Pound, R. V. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid [7]. *Physical Review* vol. 69 37–38 (1946).
7. Bloch, F. Nuclear induction. *Physical Review* **70**, 460–474 (1946).
8. Hahn, E. L. Spin echoes. *Physical Review* **80**, 580–594 (1950).
9. Arnold, J. T., Dharmatti, S. S. & Packard, M. E. Chemical effects on nuclear induction signals from organic compounds. *The Journal of Chemical Physics* vol. 19 507 (1951).
10. Proctor, W. G. & Yu, F. C. The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound [6]. *Physical Review* vol. 77 717 (1950).
11. Dickinson, W. C. Dependence of the F19 nuclear resonance position on chemical compound [32]. *Physical Review* vol. 77 736–737 (1950).
12. Lee, W. D., Drazen, J., Sharp, P. A. & Langer, R. S. *From X-rays to DNA: How Engineering Drives Biology*. (2013).
13. Andrew, E. R. Nuclear Magnetic Resonance. *J Am Chem Soc* **79**, 6577–6579 (1957).
14. Abragam, A. & Hebel, L. C. The Principles of Nuclear Magnetism. *American Journal of Physics* **29**, 860–861 (1961).
15. Slichter, C. P. *Principles of Magnetic Resonance*. vol. 1 (Harper & Row Publishers, 1963).
16. Pohl, L. & Eckle, M. Sodium 3-Trimethylsilyltetraduteriopropionate, a New Water-Soluble Standard for ¹H-NMR. *Angewandte Chemie International Edition in English* **8**, 381–381 (1969).
17. Anderson, W. A. Electrical current shims for correcting magnetic fields. *Review of Scientific Instruments* **32**, 241–250 (1961).
18. Xiao, C., Hao, F., Qin, X., Wang, Y. & Tang, H. An optimized buffer system for NMR-based urinary metabolomics with effective pH control, chemical shift consistency and dilution minimization †. (2009) doi:10.1039/b818802e.
19. Beckonert, O. *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* **2**, 2692–2703 (2007).
20. Mutter, S. *et al.* Urinary metabolite profiling and risk of progression of diabetic nephropathy in 2670 individuals with type 1 diabetes. *Diabetologia* **65**, 140–149 (2022).

Liitteet

Aminohapot	Haaraketjuiset aminohapot	Aromaattiset aminohapot	Kehon aineenvaihdunta
Alaniini	Isoleusiini	Tyrosiini	2-Furoyyliglysiini
Glutamiini	Leusiini	Tryptofaani	3-Metyylihistidiini
Glysiini	Valiini		Arabinoosi
Histidiini			Etanoli
Tauriini			HPPHA
Treoniini			Mannitoli
			Proliini betaiini
			Propyleeniglykoli
			Kiinihappo
			Sakkaroosi
			trans-Akonitaatti
			Ksantosiini
			Ksyloosi
Nestetasapaino	Glykolyysiin liittyvät metaboliitit	Ketoaineet	Mikrobiaineenvaihdunta
Kreatiini	cis-Akonitaatti	Asetaatti	3-Hydroksihippuraatti
	Sitruunahappo		Dimetyyliamiini
	Glukoosi		Trimetyyliamiini-N-oksidi
	Maitohappo		
Muut	Nikotiinihapon ja nikotiiniamidin aineenvaihdunta	Fenyylialaniinin aineenvaihdunta	Pyrimidiinin aineenvaihdunta
2-Hydroksi-isobutyraatti	1-Metyylinikotiiniamidi	Hippurihappo	3-Aminoisobutyryrihappo
3-Hydroksi-isobutyraatti	Trigonelliini		Urasili
3-Hydroksi-isovaleraatti			
4-Deoksierytronihappo			
4-Deoksitreoniinihappo			
4-Hydroksihippuraatti			
Allantoiini			
Kreatiini			
2-Aminoetanoli			
Formaatti			
Glykolihappo			
Hypoksantiini			
Indoksyylisulfaatti			

Liite 1 Aineenvaihduntatuotteet, joille automaattinen kvantiointi kehitettiin

Metaboliitti	Konsentraatio (µM)
1-Metyylinikotinamidi	9-286
2-Hydroksi-isobutyryihappo	12-172
3-Aminoisobutyryihappo	17-10256
3-Hydroksi-isobutyryihappo	14-256
3-hydroksi-isovaleriinihappo	24-1076
4-Hydroksihippurihappo	10-919
Alaniini	55-967
Betaiini	10-410
cis-Akoniittihappo	47-858
Deoksitreoniinihappo	68-1223
Dimetyyliamiini	54-1402
Formaati	28-841
Glysiini	243-5774
Hippuriinihappo	329-32447
Indoksyylisulfaattiinihappo	16-678
Kreatiiniini	1959-41639
Laktaatti	41-575
Leusiini	2-116
Pseudouridiini	75-986
Sitruunahappo	282-10256
Threoniini	1-29921
Trigonelliini	37-2677
Trimetyyliamiini-N-oksidi	65-7043
Tryptofaani	3-365
Uraasiili	2-429
Urea	3019-21127
Valiini	4-62

Liite 2 Osan aineenvaihduntatuotteiden pitoisuudet tutkituissa virtsanäytteissä