

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**H₂O-D₂O KARIŞIMININ T₁-T₂ DURULMALARININ SICAKLIĞA
BAĞLI OLARAK 400 MHz NMR İLE İNCELENMESİ**

Çiğdem AYDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

(FİZİK ANABİLİM DALI)

DİYARBAKIR

EYLÜL – 2007

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DIYARBAKIR

Çiğdem AYDEMİR tarafından yapılan "H₂O-D₂O karışımının T1-T2 durulmalarının sıcaklığa bağlı olarak 400 MHz NMR ile incelenmesi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Fizik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Başkan : Prof. Dr.	Ali YILMAZ
Üye : Doç. Dr.	Yılmaz TURGUT
Üye : Yrd.Doç.Dr.	M. Zafer KÖYLÜ (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi : 06 / 09 / 2007

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

/ / 2007

Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ
(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Çalıőmam boyunca beni yönlendiren ve tezimin her aőamasında benden yardımlarını esirgemeyen Danıőmanım Yrd. Doç. Dr. M. Zafer KÖYLÜ'ye teşekkür ederim. Ayrıca, görüş ve engin deneyimlerini benden esirgemeyen Fizik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ali YILMAZ'a teşekkür ederim. Bana yardımcı olan, destek veren bölüm hocalarım ve arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
AMAÇ	iv
ÖZET	v
SUMMARY	vi
BÖLÜM 1. GİRİŞ	1
BÖLÜM 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	2
BÖLÜM 3. TEORİ	8
3.1. Manyetik Rezonansın Gelişimi	8
3.2. Basit Rezonans Kuramı	11
3.3. Spin Durulması	13
3.4. T₁ Spin-Örgü Durulması	13
3.5. T₂ Spin-Spin Durulması	15
3.6. Durulma Mekanizmaları ve Türleri	16
3.6.1. Dipolar Durulma Mekanizması	16
3.6.2. Paramanyetik İyonun Neden Olduğu Durulma	17
3.6.3. Spin Dönmesi İle Oluşan Durulma	17
3.6.4. Kuadropolar Durulma	18
BÖLÜM 4. MATERYAL VE METOT	19
4.1 Örneğin Hazırlanması	19
4.2 Spin -Örgü Durulma Zamanı (T₁) Ölçümleri	19

4.3. Aktivasyon Enerjisi (E_a) ve İlgili Zamanı (τ_0, τ_c) nın Hesaplanması İçin $1/T_1$ ve $1/T_2$ Durulma Oranlarının Düzenlenmesi.....	19
4.4. NMR Spektrometresi.....	20
BÖLÜM 5. BULGULAR.....	23
BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
KAYNAKLAR.....	39
TABLO LİSTESİ.....	42
ŞEKİL LİSTESİ.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	44

AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, D₂O çözeltilisindeki residual suyun T₁-T₂ durulmalarının sıcaklığa bağlı olarak 400 MHz NMR ile incelenmesidir. D₂O ortamındaki residual suyun altı değişik sıcaklıktaki proton rölaksasyon zamanlarını ölçerek, H-D-O molekülünün aktivasyon enerjisini ve ilgi zamanını hesaplamaktır. Bu bilgilerden hareketle de çözeltideki proton rölaksasyon durulma mekanizmasını açıklamaktır.

ÖZET

Bu çalışmada, H₂O-D₂O karışımının 400 MHz NMR ile çeşitli sıcaklıklarda T₁-T₂ durulmaları incelendi. D₂O ortamında değişik sıcaklıklarda rölaksasyon durulmalarına bağlı olarak, H-D-O molekülünün τ ilgi zamanı hesaplandı.

Kimyasal moleküllerin NMR incelemelerinde D₂O'nun çözücü olarak kullanıldığı gayet iyi bilinmektedir. Aynı şekilde birçok biyolojik molekül, özellikle protein ve enzimler D₂O ortamında incelenmektedir.

Bu çalışmada kullanılan D₂O (99.9%) Sigma Firmasından satın alındı.

Ölçüm için, D₂O' dan 1 mL alınarak 5 mm çapındaki NMR tüpüne kondu. Ortamdaki oksijeni yok etmek için NMR tüpü vakumlanarak ağzı kapatıldı. Daha sonra farklı sıcaklıklarda (22, 27, 32, 37, 42, 47 °C) T₁ ölçümleri yapıldı. İkinci aşamada, üç sıcaklık için (22, 27, 32 °C) T₂ ölçümleri yapıldı. T₁ ve T₂ ölçümleri 400 MHz de çalışan Avance FT-NMR spektrometresi kullanılarak yapıldı.

Her bir T sıcaklık değişiminde, nümunenin sıcaklığının kararlı hale gelmesi için 15 dakika beklendi. Her bir sıcaklık ölçümü 1,5-2 saat sürdü. Her sıcaklığa ait manyetizasyon bozunumunun üstel olduğu gözlemlendi.

SUMMARY

In this study, T_1 - T_2 relaxation times of H_2O - D_2O mixture are investigated at various temperatures with 400 MHz NMR. Depend on the relaxation times the correlation time of

H-D-O molecule is computed at various temperatures in D_2O .

It's well known that D_2O is a good solvent in investigation of chemical molecules with NMR. Likewise lots of biological molecules especially proteins and enzymes are investigated in D_2O .

D_2O (99.9%) which is used in this study is bought from Sigma.

1 mL taked from D_2O and put in NMR tube with 5 mm diameter for NMR measurement. NMR tube is degassed three times by freze-thaw method and sealed for measurement. And then T_1 is measured at different temperatures (22, 27, 32, 37, 42, 47 °C). At second time, T_2 is measured for three temperatures (22, 27, 32 °C). T_1 and T_2 measurements is carried out on a Avance FT-NMR spectrometer that works at 400 MHz.

15 minutes are waited for coming stable status of sample temperature in every temperature change. It's takes 1,5-2 hour each one of temperature measurements. It is observed that the megnetisation deterioration of each one of the temperature is exponansial.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kimyasal moleküllerin NMR incelemelerinde D₂O'nun çözücü olarak kullanıldığı gayet iyi bilinmektedir. Aynı şekilde birçok biyolojik molekül, özellikle protein ve enzimler D₂O ortamında incelenmektedir (1-5). Bunun nedeni ortamdaki suyun etkisini azaltmak ve proteine bağlı suyun etkisini çoğaltmaktır.

Protein incelemelerinde D₂O su ile beraber hem serbest fazda bulunmakta, hem de proteine bağlı olarak bulunmaktadır ve HDO molekülü bu iki çevre arasında gidip gelmektedir. Bu nedenle, HDO durulmasının incelenmesi D₂O'nun çözücü olarak kullanıldığı protein-enzim çözeltilerindeki ve diğer çözeltilerdeki rölaksasyon mekanizmasının anlaşılması için öncül deneylerdir. Yani, D₂O'daki protein rölaksasyonunun bilinmesi kimyasal değiş-tokuş formülüne giren parametrelerin hesaplarını kolaylaştırmakta ve bu nedenle protein ve enzimlerin durulmasının incelenmesine katkıda bulunmaktadır.

Literatürde suyun rölaksasyonu oldukça incelenmiştir (1-5). Ancak, H₂O-D₂O'nun rölaksasyonu tam olarak incelenmemiştir. Bu hususu dikkate alarak D₂O ortamındaki residual suyun 400 MHz NMR ile incelenmesi bu çalışma ile amaçlanmıştır ve sıcaklık incelemeleri yapılarak HDO molekülünün aktivasyon enerjileri (E_a) ve τ ilgi zamanları hesaplanmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Roose P., Van Craen J. Ve Eisendrath H. : Kolladial süspansiyonlardaki proton-spin örgü durulması, değişik seviyelerdeki izotopik seyreltmelerde geniş kapsamlı bir larmour frekansı vermiştir. Düşük manyetik alanlarda genişlemenin dağılımı döteryum üzerinde lineer olmayan bir yol izler. Önceleri bunun nedeninin silika yüzeyindeki koruyucu alanlarda konumlanmış hidrojenlerin yavaş geçişlerindeki izotopik parçalanma etkilerinin olduğu düşünülüyordu. Ama bu çözücüde kolaylıkla ulaşılabilir proton alanlarının olmasını gerektirir. Teorik spin durulma modelin multifaz sistemlerdeki izotop seyreltme etkileri üzerinde kompoze edilmiş çok miktardaki yavaş genişleyen hacim spinleri ve oksit ara yüzeyinde spinin çevresiyle girdiği karşılıklı dipolar girişimler için önerilir. Yayılmanın genişliği farklı sayıdaki lorentzialite güç spektrasındaki pozisyon üstü durumlar üzerinden ele alınır (6).

R.M.F. Streffer ve arkadaşları: D₂O ve H₂O ara yüzeyindeki nötron yansiyabilirliği oda sıcaklığında araştırılmış ve hatırı sayılır bir düzeyde olduğu görülmüştür. Deneysel analiz sonuçları şunu göstermiştir.

1-Yansıma davranışları $R(\varnothing)$ için $\varnothing \leq \varnothing_c$ (\varnothing_c = toplam yansımadaki dalga kenar sayısı) geleneksel teoriyi doğrular.

2-Karışımlar geleneksel beklentilerin üstünde yansıma gösterir. \varnothing' daki momentum transferleri \varnothing_c dekinden daha fazladır. İkinci sonuç yeni bir bilimsel olgu doğurmuştur. Daha önceki D₂O ve H₂O çözeltilerinden yola çıkılarak oluşturulan hipotezlerin aksine izotopik konsantrasyonların homojenliği sorgulanabilir (7).

Okada R., Matsukawa S. Ve Watanabe T.: Suyun ve sulu çözeltideki pulluan katılma polimerinin protonun dinamik özellikleri yüzünden H1-NMR ve DSC deki T₂ zamanları buz fazından analiz edilmiştir. Pulluan D₂O çözeltisinde H₂O protonlarının uzun katılma polimerinin daha kısa T₂ zamanları verdiği görülmüştür. Ayrıca, pulluan sulu çözeltilerde hidratlı ve boş su arasında hızlı değişimler olduğu ispatlandı. -11 C de donmuş fazda, donmuş su kristalindeki protonlar (T₂ ~17 ms), devingen su (T₂ > 17 ms) ve polimer

katılmasındaki inert kararsız protonlar ($T_2 \sim 0.1$ ms), katı echo eğilim dizisi kullanılarak \pm ID eğrilerine ayrıldı. Sıcaklığın artışı ile inert kararsız protonlar farklı eğilimler gösterdiler. 0°C ' den yüksek sıcaklıklarda inert kararsız protonlar Car-Percell-Meiboom-Gill methodu ile ayrı olarak fark edilirler. Kararsız protonlar su protonları ile hızlı kimyasal değişimlere girerler. Bu bulgular, su içindeki katkılı polimerazyonun aşırı esneklik gösterdiğine işaret eder (8).

Sherry A.D., Edward R. Ve Darnall W.: D_2O ve H_2O karışımındaki su protonlarının durulmasını incelemek için direkt bir metod kullanılmıştır. %10 H_2O -%90 D_2O karışımında saf suyun durulma zamanı 2.7 saniyeden 9.0 saniyeye artar. Bu artış bize paramanyetik iyonlar yüzünden gerçekleşen durulma oranlarını direkt olarak ölçme imkanı tanır. Sığır serumunda bulunan manganezin bağlayıcı parametreleri bu metodla ölçülmüş ve daha önceki eğrisel metodlarla elde edilen sonuçlarla birebir uyduğu gözlemlenmiştir (9).

Gültekin D.H., Gore J.C. : Nükleer manyetizasyon ve genişleme oranlarının sıcaklığa bağımlılığı, sıcaklık miktarının NMR sinyalleri üzerine etkilerinin teorik ve deneysel olarak saptanması ile yeniden incelenmiştir. NMR şekillerinin sıcaklığa bağımlılığını incelerken nükleer magnetizasyon dengesinin ve genişleme zamanlarının her birinin sıcaklık değişimlerinden nasıl etkilendiği dikkate alınmalıdır. Boltzman dağılımının her madde ve sıcaklıktaki etkisi sebebiyle, nükleer magnetizasyon dengesinin birleşik sıcaklığa bağımlılığı, sıcaklık (T), eko zamanı (T_g), tekrarlanma zamanı (TR) ve durulma zamanları (T_1) T ve (T_2) T ye bağlı olarak negatif, pozitif veya zayıf olabilir. Sonuç olarak, NMR sinyali sıcaklığa bağlı bir katsayı üzerinden artabilir, azalabilir veya sabit kalabilir. Nükleer termal katsayıları, hazırlanmış spin eko reçeteleri ve çeşitli maddelerin deneysel verilerinin dizilimleri ile hazırlanmıştır (10).

Duplan J.C., Mahi L. Ve Brunet J.L.: D_2O , H_2O ve HOD arasındaki dengenin NMR daki analizi, HOD spektrumunun gözlenmesindeki zorluk nedeniyle hilelidir. Bu problemler esasen kimyasal değişim etkileri yüzünden gerçekleşir. Bu nedenle çok az NMR metodu bu dengeyi çalışmak için önerilir. Denge sabiti K nın eklentiler kullanılmadan direkt ölçümü, dengenin doğasını bozabilir. Deneysel data, yeniden oluşturma programı tarafından, H-O-D çizgisinin H_2O çizgisi kadar iyi gözlemlendiği sonuç spektrumunu verecek yeni

sinyallere dönüştürülür. Bu katsayılara karşılık gelen alanlar ölçülür ve denge sabiti K sabiti hesaplanır. $298\text{ K} = 3.86 (\pm) 0.01$ olarak bulundu, ki bu değer diğer ölçümlerle teorik hesaplamalarla çok iyi bir şekilde örtüşür (11).

R. I. Cukier ve arkadaşı : Katıların transferine doğru yönelen proton reaksiyon transferlerinin teorisini belirttiler. Bu teori, ‘ Nagaoka ‘ nın deneysel verisini yorumlamada kullanılmıştır. Nagaoka NMR T_1 ölçümlerini kullanarak dikarboksil asitlerin proton transfer oranlarını ölçmüşlerdir. Deneyler, büyük bir sıcaklık aralığı üzerinde yürümüştür. Proton transfer oranları düşük sıcaklık oranı düşülerek ve yüksek sıcaklıkta harekete geçirilerek belirtildi. Katının akustik fonon bağlanması ile modüle etmek ve eşit alanlar arasında tünelleme ile meydana gelen proton hareketlerini varsaydılar. Geçiş oranı lokalize alanlar arasında şiddetli pertürbasyon oluşu ‘ altın kurallar ’ ile tanıtılmıştır. Buradaki potansiyel yüzey ilgileri gösteriyor ki, potansiyel kuyu başka bir alanda çıkmıştır ve yüksek sıcaklıktaki deneyler için, bu yüksek sıcaklıkta uyarılmış çiftlerin aktivasyon enerjileri gözlenmiştir. Böylece, akustik bağlanma modelleri enerji transferleri için çok küçük yeniden düzenlemelere öncülük etmiştir. Nükleer ortamdaki serbestlik derecesi yüksek sıcaklıklarda bile tünellenmiştir. Böylece tünellenmenin oranı başka seviyelerin çiftleri arasında sadece çok zayıf bile olsa sıcaklığa bağlı olabileceğini buldular. Proton ve hidrojen atom transfer reaksiyonlarının şekli kimyasal reaksiyon sınıfında önemlidir. Karboksilli asitlerin NMR T_1 deneylerinin direkt olarak yorumlanması için proton transferine başvuruldu. Bu çalışma aynı zamanda görsel spektroskopide ve elastik olmayan nitrojenle de çalışılmıştır. Lokalize alanlar arasında proton transfer oranının hemen hemen sıcaklıktan bağımsız olduğunu belirttiler (12).

A. Van-Quynh ve arkadaşları: Sıvı-kristal dendrimer şeklinde süper moleküllerde dinamiğin ^1H proton nükleer manyetik rölaksasyonla elde edilen ilk sonuçlarını belirtiyor. ^1H spin-örgü relaksasyon proton zamanı (T_1) dağılımları, düşük ve yüksek frekans aralıklarında dendritik segmentlerin toplu hareketleri ve bölgesel yönelmesi ile ilgili iki mekanizma kullanarak açıkladılar. T_1 değerleri 2.3 MHz civarında bir düşüş gösterir, bu ^1H ve azotun çekirdek spinleri arasındaki karşı durulmadan kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir. Düşük frekans aralığında kolonlu ve tabakalaşmış fazların dinamiklerinde önemli farklılıklar gözlemlendi. Bunlar, mezofaza bağlı olarak kolon ve tabaka dalgalarını elastik

deformasyonu bakımından tartışmışlar. Bu çalışmada dendritik çekirdeklerin hem bölgesel hem de toplu hareketlerinin mezojenik birimlerinin dinamiklerini etkilediğini bulmuşlar. Odaksal noktadan uzaklık ve molekül ağırlığının bir fonksiyonu olarak zincir hareketliliği ile ilgili bir görüş edinebilmek için saf PAMAM çözeltisindeki zincir dinamikleri için ^{13}C ve ^2D NMR durulmalarını çalıştılar. Süper moleküllerin oldukça kompleks yapısına rağmen onların çevresinde dentritik çekirdeklerin yumuşaklığı mezojenik birimlerin korelasyonsuz bireysel hareketler yapmasına izin verir, öyle ki belli bir kapsamda birbirinden bağımsız hareket edebildiklerini belirttiler (13).

L.Echegoyen ve arkadaşları: Organik moleküllerin dinamik özelliklerini incelemek için boyuna durulma zamanı T_1 in şu anda kullanılan en iyi yöntem olduğunu belirtmişlerdir. ^{13}C T_1 ölçümlerini, Ligand'ın yapısal özellikleri, bağlanma sabitleri ve crown eter türevlerinin moleküler dinamikleri hakkında yararlı bilgiler elde etmek için başarılı bir şekilde kullanmışlardır (14).

Jianhui Zhong ve arkadaşları: Su protonlarının T_1 durulma zamanlarını, farklı statik manyetik alanlarda ve %5 lik protein çözeltilerinde ölçmüşlerdir. Döteryumlu örneklerin T_1 ölçümleri de 2 ile 7 T arasındaki alanlarda gerçekleştirmişlerdir. Döteryumlu örneklerin ölçümlerini, dönel ilgi zamanlarını tahmin etmek için kullanmışlardır. Proton T_1 çalışmalarından çözücü ve çözünen protonların arasındaki çapraz rölaksasyon oranı ve örneklerdeki paramanyetik safsızlıkların katkısını elde etmişlerdir. Protein çözeltileri üzerinde yapılan ölçümlerden elde edilen verileri incelemeleri sonucunda, protein protonları, bulk su protonları ve su protonları olmak üzere üç farklı proton durulma özellikli üç fazın olduğunu kabul etmiş ve göz önüne almışlardır. Hidratlı su ve protein molekülleri arasındaki çapraz rölaksasyon etkisinin önemli rol oynadığını fakat rezonans alanı artışlarına göre önemli şekilde azaldığını göstermişlerdir (15).

Yang S.Kang ve arkadaşları: Proton NMR görüntüleme için kontrast madde olarak kullanılan paramagnetik iyonların etkilerini değiştiren bazı faktörleri çalışmışlardır. İyon içeren sulu bir çözeltinin rölaksasyon oranının manyetik momentle güvenilir bir şekilde tahmin edilemeyeceği gösterilmiştir. Proton rölaksasyon oranı artış faktörü kullanılarak bağlanma yerleri sayısı ve bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. İyonlar büyük moleküllerle

kompleks halindeyken dominant korelasyon zamanı ile artan proton rölaksasyon oranı artış faktörünün güvenilir sonuçlar verebileceği gösterilmiştir. Proton rölaksasyon oranı artış faktörünün sırasıyla pH ve bağlanma rekabeti gibi bazı faktörlerle değişebileceği belirtilmiştir. Mangan için, metal bağlanma derecesini hesaplamakta hassas olan T_1 / T_2 oranının yararlı bir parametre olduğu belirlenmiştir. Paramagnetik rölaksasyon yükselmesinin biyolojik dokudaki özellikleri, kan içinde var olan maddeler ve mangan kullanılarak bir dizi deneyde gösterilmiştir (16).

Bruce G.Jenkins ve arkadaşları: Yapılan bu çalışmada proton rölaksasyon oranı artış faktörünün çözelti protonlarına etkisi kullanılarak, potansiyel kan hücrelerinin ve hepatobiliary paramagnetik demir (III) kontrast ajanlarının, rac- ve meso-Fe (5-Br-EHPG)⁻ (demir (III) N, N-ethylenebis[(5-bromo-2-hydroxyphenyl) glycinate])ve Fe (5-Br-HBED)⁻ (demir (III) N, N-bis- (5 bromo-2 hydroxyphenyl) ethylenediaminediacetic acid), Human Serum Albümin'e (HSA) bağlanması çalışılmıştır. Bu şelatların HSA'ya değişik yerlerde, farklı değerlere sahip bağlanma sabitleriyle sıkıca bağlandığı gözlenmiştir. Su proton rölaksasyon oranları paramagnetik bileşenlerinin beklenen proton rölaksasyon oranı artışı, protein bağlı kontrast ajanların rotasyonel korelasyon zamanındaki artıştan meydana gelirken, HSA'dan dolayı su relaksasyonunun diamagnetik bileşenleri içinde bağlanma sonuçları ilginç bir şekilde azalma içinde olduğu gözlenmiştir. Bu proton rölaksasyon oranı artışlarının şelatların proteinlere nereden ve nasıl bağlandığına bağlı olarak değişebildiği gözlenmiştir. Sıcaklığın değişmesi, şelatların yakınlığına bağlı olarak değişebildiği gözlenmiştir. Sıcaklığın değişmesi, şelatların yakınlığına bağlı olarak birinci ve ikinci türden bağlanma yerleri olduğu sonucunu vermiştir (17).

Albert S.Mildvan ve Mildred Cohn: Yaptıkları çalışmada,bağlı manganın, su protonlarının nükleer magnetik rölaksasyon oranı uzunluğuna etkisinin yeni bir fiziksel parametresini NMR pulsu ile ölçmüşlerdir. Bu parametrelerin değerleri, bağlı manganın proton rölaksasyon oranının aynı konsantrasyondaki serbest manganinkine oranı olan ϵ_b (enhancement) teriminde ifade edilmiştir. Böylece, gözlenen proton rölaksasyon oranı artış değerleri, bağlanma yerlerinin sayısını tayin etmede ve bovine serum albümine Mn^{2+} nin bağlanma sabitini belirlemede kullanılmıştır. Ayrıca proteindeki yapısal değişimin sebebi

ile ϵ_b de meydana gelen değişimi anlatmak için proton rölaksasyon oranı artış değerleri kullanılmıştır (18).

Danek A. Ve Bryant R.G.: Katıların manyetik rölaksasyonu kreatinle karıştırılabilir ve sınırlı hızlarda çift kutup sırası kaybolabilir. Dokularda moleküler ve döngüsel dinamikler suyun göreceli yüksek konsantrasyonundan dolayı önemli seviyede farklı olabilir. Doku için manyetik modeller gibi hizmet eden ve ıslak protein sistemlerindeki çift kutup rölaksasyon hızlarını ölçmek için modifiye edilmiş bir Jeneer-Broekaert sıklığını uyguladılar. Liofize ve kuru serum albüminin çift kutup rölaksasyon zamanı T_{10} , 1 ms civarında gözlenmiş olup, önceki raporlarla tutarlı olduğunu görmüşlerdir. Döteryum oksit ile sulandırıldığında çift kutup rölaksasyon zamanları 10 mikro saniyeler civarında ölçülmüştür. Paramagnetik merkezler, proteinlere katıldığında Jeneer-Broekaert yansıma-bozulma zamanları, transvers magnetizasyonunun bozulma sırası olmuştur. Örneğin, 10 μ s veya daha az sırası. Sulandırılmış ya da paramagnetik sistemlerde çift kutup rölaksasyon zamanları magnetizasyon transfer deneylerinin kantitatif analizlerinde katılmaya gereksinimi çok kısadır (19).

BÖLÜM 3

TEORİ

3.1. Manyetik Rezonansın Gelişimi

Manyetik rezonans, manyetik momenti sıfırdan farklı olan maddelerle elektromanyetik enerjinin etkileşmesinden kaynaklanan bir olaydır.

NMR tekniği, 1945'te birbirinden bağımsız olarak Stanford'da Bloch, Hansen ve Packard ile Harvard'da Purcell, Purrey ve Pound tarafından bulunmuştur. Başlangıçta sadece çekirdeklerin manyetik momentlerini saptamak için kullanılan NMR olayının kimyasal uygulamaları, 1950'de bir manyetik alana konulan örnek tarafından soğurulan ışımının kesin frekansının çekirdeklerin kimyasal çevrelerine bağlı olduğu gösterildiği zaman başlanılmıştır.

Rezonans deyimini dış bir etkenin, manyetik sistemin doğal frekansı ile uyum içinde olduğunu belirlemek üzere kullanılmaktadır. Dış etken de Larmor dönü hareketi ile uyum içinde olacak şekilde bir frekansa sahip mikrodalga veya radyo frekans enerjisidir.

Sözü edilen manyetik moment, sıfırdan farklı çekirdek spinleri ile uyuşan nükleer momenttir. Yani, NMR çekirdek spinleri sıfırdan farklı olan çekirdekleri inceler. Bunun yanında rezonans, oldukça ayrıntılı ve başka yollarla elde edilemeyen tipte manyetik bilgi toplanmasını da mümkün kılar (20).

Manyetik rezonansın ilk uygulamaları çekirdek fiziği, katıhal fiziği ve kimyasal fizik alanlarında olmuştur. Daha sonraları, düşük sıcaklıklar fiziği, biyofizik ve jeofizikte önemli uygulama alanları bulmuştur. Nükleer Manyetik Rezonans'ın Bloch tarafından kuramsal olarak ileri sürüldüğü 1946 yılını izleyen yıllarda deneysel olarak uygulamaya geçmiş ve organik bileşiklerin yapısı ve dinamik hareketleri üstüne çok başarılı sonuçlar vermiştir. NMR spektroskopisinin çok karmaşık bileşiklerin yapısal özelliklerini incelemeye gösterdiği bu başarısı onu daha sonraki yıllarda biyolojik sistemlerin incelenmesine yöneltmiştir.

Böylece, başlangıçta fizik ve kimya gibi temel bilimlerde spektroskopik inceleme kolaylığı sağlayan manyetik rezonans, bugün tıpta klinik amaçlı çalışmalarda kullanılabilen bir araç olma yolundadır. Gerçekte, manyetik rezonansın öteki spektroskopik yöntemlerde bulunmayan durulma süreçleri gibi bir kavrama sahip olması ona normal doku ile hastalıklı dokuyu birbirinden ayırt etme özelliği kazandırmaktadır. 1960' lı

yıllarda bu amaçla yapılan durulma zamanları ölçümleri, normal doku ile kanserli dokuları birbirinden ayırt etmede son derece başarılı sonuçlar vermiştir (21).

Boyuna ve enine durulma zamanları (T_1 ve T_2), organik moleküllerin dinamik özelliklerini incelemek için kullanılan yöntemlerden birisidir.

NMR spektroskopisi yalnız moleküllerin yapılarının incelenmesinde uygulanan bir yöntem değildir. Aynı zamanda, molekül içerisinde mevcut olan dinamik dengelerin araştırılmasında, bu olayların doğrudan gözlenmesinde ve belirlenmesinde de uygulanan bir yöntemdir.

Bir sistemin NMR spektrumu farklı sıcaklıklarda kaydedilir ve gözlenen değişimler analiz edilerek yorumlanır.

NMR, kuvvetli bir manyetik alan içine yerleştirilen atomik çekirdeklerin, karakteristik bir frekansta ışınım soğurmalarına dayanmaktadır.

Manyetik rezonans, açısal momentumu ve manyetik momenti olan sistemlerde gözlenebilir.

NMR, kütle ve yüklerine ek olarak spin ve manyetik moment özelliğine sahip atomik çekirdeklerde gözlenir. Bu özelliklerinden dolayı; çekirdekler kendi eksenleri etrafında dönen küçük magnetler şeklinde davranırlar. NMR spinleri $\frac{1}{2}$ olan çekirdeklerde gözlenebilir.

NMR,

Kimyada;

- Kristal yapısı, polimerler, sıvı kristallerde,

Fizikte;

- Yoğun maddedeki molekül hareketini incelemede,

Biyolojide;

- Uyuşturucunun etkisi ve zarlarla ilgili araştırmalarda,

Tıpta;

- Çekirdek manyetik rezonans çalışmalarında,

Jeolojide;

- Madenler, petrol kayaları, kömür ile ilgili çalışmalarda,

Endüstride;

- Kimya ve gıda endüstrisinde zararsız ve hızlı kalite kontrol amaçlı analitik ölçmeler, polimerlerde polimerizasyon hızı, margarinler ve yağ viskozitesinde, hidrokarbonlarda H^+ içeriği saptaması, çikolatalarda nem, süttozları, yağ ve katı faz miktarının bulunmasında, kullanılmaktadır.

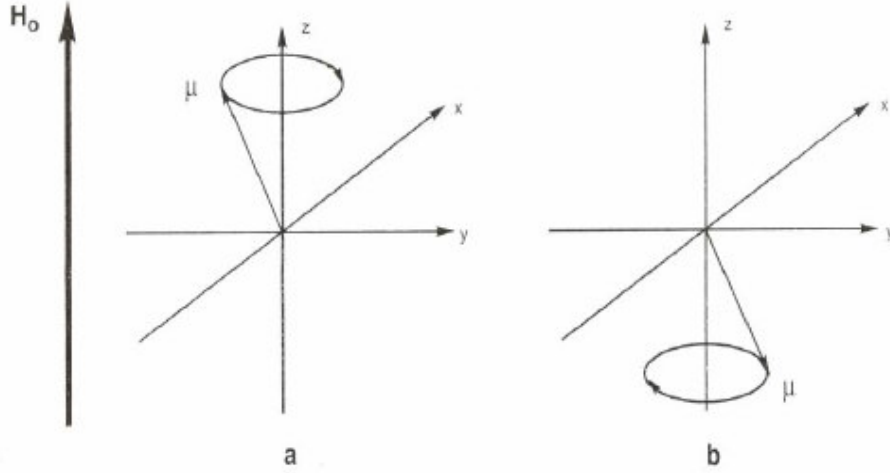
NMR spektroskopisi yalnızca çekirdek spinleri sıfırdan farklı olan manyetik sistemleri inceler.

Rezonans deyimi bir manyetik sistemin doğal frekansı ile uyum durumunda olduğumuzu ifade eder. Bu frekans, özel bir halde, statik bir manyetik alan içinde bir manyetik momentin yapmış olduğu jiroskopik presesyon hareketinin frekansına karşılık gelir (22).

3.2. Basit Rezonans Kuramı

Bir spinin H gibi bir manyetik alan içine yerleştirildiği anda ortaya çıkan etkileşim enerjisi;

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \text{ dir.} \quad (\vec{H} = H_0 \cos \theta) \quad (3.1)$$



Şekil 3.1. Bir $\vec{\mu}$ nükleer manyetik momentinin \vec{H}_0 alanı etrafındaki presesyon hareketi

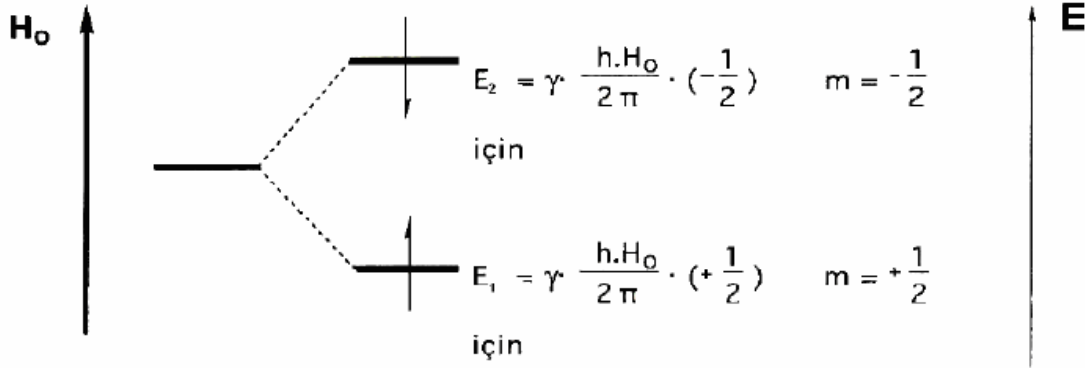
$$H = (\gamma \vec{I}) \cdot (H_0 \vec{k}) = \gamma H_0 I_z \quad (3.2)$$

Bu Hamiltoniyen operatörünün öz değerleri, I_z nin özdeğerlerinin $(\gamma \hbar H_0)$ katlarıdır. Buradan, sistem için mümkün olan enerji değerleri

$$E = -\gamma \hbar H_{0m} \quad (m=I, I-1, \dots, -I) \quad (3.3)$$

olacaktır.

Spini $3/2$ olan ^{11}B çekirdeğinin bir dış manyetik alandaki enerji düzeyleri şekil 1.1 de görülmektedir. Burada m 'nin alacağı değerler $2I+1$, yani dört tanedir, $m \rightarrow +3/2, +1/2, -1/2, -3/2$. Bu enerji seviyeleri arasındaki uzaklık $\gamma \hbar H_0$ dir ve hep eş aralıktır.



Şekil 3.2 Protonun manyetik alanda yönlenmesi ve farklı enerji seviyelerinin gösterilişi

NMR’da uygun frekansta, elektromanyetik enerji ile bu enerji düzeyleri arasındaki rezonans geçişleri oluşturulur. Sadece kesikli enerji düzeyleri arasındaki geçişler $\hbar\omega_0$ veya bunun katları kadar kuantum enerjisinin soğurulması veya yayınlanmasına karşılık gelir. Genellikle sadece ardı ardına enerji düzeyleri arasında geçişler olur. Ardı ardına geçişlerle ilgili geçiş kuralı $\Delta m = \pm 1$ dir. Rezonans düzeyleri arasındaki,

$$\Delta E = -\gamma \hbar H_0 \quad (3.4)$$

enerji farkına eşit ω_0 frekansında radyo frekans ışınlanması yapılarak elde edilir. Bu durumda,

$$h\omega_0 = \Delta E = -\gamma \hbar H_0 \quad (3.5)$$

eşitliğinden rezonans şartı,

$$|\omega_0| = \gamma H_0 \quad (3.6)$$

elde edilir. Rezonans frekansı ile manyetik alan arasındaki bağıntıyı veren bu eşitlik NMR’ın temel eşitliğidir ve Larmor eşitliği olarak bilinir.

Görüldüğü gibi, rezonans şartı sadece ilgili çekirdeğe ve alanın büyüklüğüne bağlıdır. Rezonans şartında \hbar Planck Sabiti yer almadığı için bu sonuç klasik bir rezonans olayı olarak düşünülebilir (23).

3.3. Spin Durulması

Elimizde bulunan bir örneği dış bir manyetik alana koyduğumuzda bir müddet sonra termal denge kurulacaktır. Spin sistemine rezonans frekansında alan uygulandığında enerji düzeyleri arasında geçişler oluşacağından, Boltzman dağılımı bozulur. Rezonansta başlangıçta yukarı doğru olan geçişler aşağı doğru olan geçişlerden fazla olduğundan bir müddet sonra her iki düzeydeki çekirdek sayısının eşit olmasını bekleriz.

Bu durumda soğurulan net enerji sıfırdır ve manyetik rezonans geçişleri olduğu halde bunlar algılanmaz. Bu olay NMR'da doyma olarak adlandırılır. NMR'ın gözlenebilmesi doymaya zıt yönde bir mekanizmaya bağlıdır. Durulma olarak adlandırılan bu mekanizma spinlerin soğurdukları enerjiyi örgü adı verilen çevreye aktararak yüksek enerjili anti-paralel düşük enerjili paralel yönelimine geçmelerini içerir.

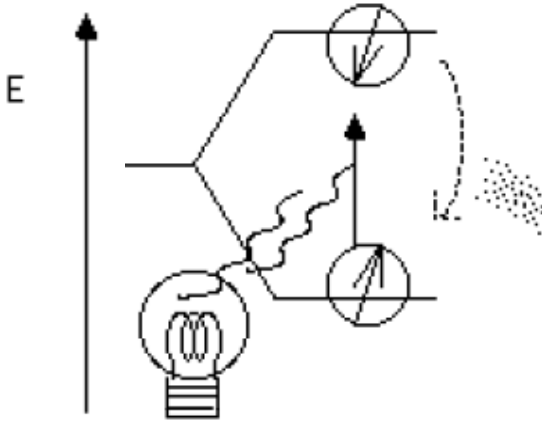
Boltzmann dağılımının tekrar kurulması dönme ve titreşim enerji düzeylerinin durulmasına neden olan moleküler çarpışmalar gibi kısa sürede olmayıp zaman alır. Eğer ardı ardına NMR deneyleri yapıyorsak ve bu deneyler arasındaki tekrarlama zamanı çok kısa ise çekirdeklerin denge durumuna dönmesi için yeterli süre olmayacağından azalan spin sayısı farkı nedeni ile enerji soğurması dolayısıyla sinyal şiddeti düşük olacaktır (24).

3.4. T_1 Spin-Örgü Durulması

T_1 ya da spin-örgü durulma zamanı, spinlerin aldıkları enerjiyi çevrelerinde örgüye aktarmaları için geçen süreyi gösterir.

Bu durulma manyetik alan doğrultusundaki durulmayı gösterdiği için boyuna durulma olarak bilinir.

Yalıtılmış spin sistemi dış etkenden enerji soğurduğu zaman spin sisteminin sıcaklığı başlangıçtaki sıcaklığa göre artar. Yani, başlangıçta örgü ile ortak bir T_0 sıcaklığında olan spin sistemi dış etkenden enerji soğurarak yeni bir T_S sıcaklığına ulaşır. Belli bir süre sonra $T_S \gg T_0$ olacağı için düzeyler arasında spin topluluğu farkı sifıra yaklaşır ve manyetik rezonans durur.



Şekil 3.3. Soğurulma ve spin-örgü durulması

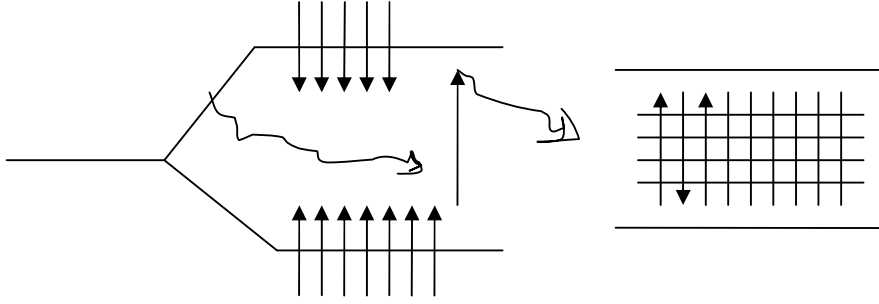
N tane spin aynı çevreye sahip ve bu çevrenin etkisi ile spinler, z yönünde H_n alanını görmekte olup, bu ise bu spinlerin W_n frekansı ile dönmesini sağlamaktadır. 1'den n'e kadar değişen spin gruplarımız olduğunu varsayarsak, aynı şekilde hareket edeceğini öngördüğümüz her bir spin grubu için ayrı bir enerji seviyesi oluşacaktır.

Bu çiftler bir araya getirildiğinde, üst enerji seviyesi genişliyor. Bu seviyeler arasındaki geçişten elde edilen sinyal de genişleyecektir. Bu durulumaya, dipolar durulma adı verilir.

Spin sistemi ile örgü arasında bir ısısal etkileşme olduğunu varsayalım. Bu durumda spin sisteminden örgü sistemine doğru bir ısı akışı doğar. Spin sistemi enerji kaybeder. Kaybettiği bu enerji,

$$\frac{dE}{dT} = k_1 k (T_s - T_0) \quad (3.7)$$

ile belirlenir. k_1 'in 1/sn biriminde olması, onun $1/T_1$ şeklinde yazılabileceğini gösterir. Böylece, elde edilen T_1 spin-örgü durulma zamanı olarak tanımlanabilir ve spin sistemi ile örgü sistemi arasındaki ısı iletimini olayının bir ölçüsüdür. Spin sisteminden örgü sistemine ısı akışı $T_s = T_0$ oluncaya değin sürer ve bu durum gerçekleştiği anda toplam ısısal denge kurulmuş olur.



Şekil 3.4. Spin-örgü sisteminin ısısal etkileşimi

Şekil 3.4 de görüldüğü gibi, daha ayrıntılı anlatmak gerekirse, aşağıdaki spinlerin sayısı her zaman yukarıdakilerden fazladır. Aşağıdaki bir spine $h\nu$ enerjisi verilerek, spinin yukarı çıkması sağlanıyor. Yukarıdaki spin 10^{-8} sn. beklemeden sonra enerjisini örgü sistemine vererek tekrar aşağı iner. O spin aşağı inerken örgüdeki spin yukarı çıkar, işte bu olay için geçen süre $1/T_1$ olarak tanımlanır. Bu olay $T_S=T_0$ oluncaya kadar tersinir bir şekilde devam eder. Bu aşağı iniş çıkışlar sistemin bir örgü şeklini almasının nedenidir (25).

3.5. T_2 Spin-Spin Durulması

T_2 ya da spin-spin durulma zamanı, spinlerin rezonans halinde iken aldıkları enerjii birbirine göre değişik fazlarda veya koharent (birbirine bağlı olmayan) fazlarda presesyon yapan spinlere aktararak denge durumuna dönmeleri için geçen süreyi gösterir.

Bir önceki bölümde yalıtılmış bir spin sistemindeki enerji soğurmasını ve spin sisteminin örgü ile etkileşimini inceledik. Bir spin sistemi içindeki spinlerin kendi aralarındaki etkileşiminden söz etmedik, oysa bir spin sistemi içindeki spinler çeşitli şekillerde birbiri ile etkileşirler. Bu tür etkileşmelere genel olarak spin-spin etkileşmesi denir. Bu etkileşmelerden en yalın olanı spinler arasındaki manyetik dipol etkileşmesidir. Manyetik dipol etkileşmesi; bir spin sistemi içindeki spinlerden örneğin bir tanesinin manyetik momentinin öteki spinlerin oluşturduğu manyetik alanla etkileşmesidir. Etkileşme sonucu oluşan bu manyetik alana “yerel manyetik alan” denir ve bu alan komşu spinlerin yapı içindeki manyetik kuantum sayılarına ve sözü edilen spine olan uzaklıklarına bağlıdır. Kuvvetli bir H_0 dış manyetik alan içine konmuş bir manyetik sistemde, aralarında r uzaklığı bulunan A ve B gibi iki spini ele alalım. Spinlerin manyetik momentleri μ_A ve μ_B olsun.

Spinler, μ_A ve μ_B manyetik moment vektörleri uygulanan manyetik alan etrafında frekansı Larmor Frekansı'na eşit olan bir presesyon hareketi yaparlar (25).

Spin-spin etkileşmesinin bir spin sistemi üzerindeki toplam etkisi şöyledir; H_0 dış manyetik alanının etrafında aynı Larmor Frekansı'nda presesyon hareketi yaparlar.

Spin-spin etkileşmesi ile oluşan yerel manyetik alanın H_0 manyetik alanı ile vektörel olarak toplanması ve bu alanın spinden spine değişmesi sonucu spin sistemindeki spinlerden her biri ötekilerden oldukça farklı bir manyetik alan etkisinde kalır. Bu sayede, spinlerden her biri farklı frekanslarda presesyon hareketi yapacakları için bir süre sonra aralarındaki fazlalık kaybolur. Spinler arasındaki aynı fazlalık durumunun kaybolması için geçen bu süreye tanım olarak “spin-spin durulma zamanı” veya “enine durulma zamanı” adı verilir ve T_2 ile gösterilir. Eğer, $\Delta\omega$ spinlerin presesyon frekanslarındaki dağılıma ise, T_2 spin-spin durulma zamanı,

$$T_2 \approx \frac{1}{\Delta\omega} \approx \frac{1}{\gamma\Delta H_0} \quad (3.8)$$

ΔH_0 = yerel manyetik alandaki dağılım

γ = jromanyetik oran

3.6. Durulma Mekanizmaları ve Türleri

Durulma, geçişe uğrayan spinin bulunduğu yerde kurulan pertürbasyon alanı yolu ile olur. Türlerini inceleyelim.

3.6.1. Dipolar Durulma Mekanizması

Eğer, uyarılmış (rezonans olmuş) bir çekirdek, manyetik momente sahip başka bir çekirdeğe doğrudan bağlı ise, bu çekirdeğin çok etkin bir şekilde durulma olasılığı ortaya çıkar. Bir protonun doğrudan bağlı ^{13}C çekirdeğini örnek olarak ele alalım. ^{13}C ve ^1H çekirdeklerini atom merkezlerinde lokalize olmuş iki dipol olarak düşünebiliriz.

Protonun çevresinde bulunan manyetik alan ^{13}C çekirdeği üzerine az da olsa bir etki yapacaktır. Protonun manyetik momentinin (μ_H) ^{13}C çekirdeği üzerine olan etkisi, $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$

bağının, spektrometrenin dış manyetik alanı ile yapmış olduğu açıya bağlı olacaktır. Proton tarafından ^{13}C çekirdeği etrafında oluşturulan manyetik alan,

$$H_{DD} = \frac{\mu H^3 \cos^2 \Phi - 1}{r^3} \quad (3.9)$$

formülü ile ifade edilir (26).

Çözelti içerisinde moleküller çeşitli yönlerde hareket ettiğinden, θ açısı değişecek, dolayısıyla manyetik alan H_{DD} de sürekli değişecektir. Durulma, çekirdek etrafında salınan elektrik veya manyetik alanların frekansı ile çekirdeğin Larmor Frekansı eşit olduğu zaman meydana gelecektir.

Spinlerden biri proton diğeri elektron spini ise bu tür etkileşmeye paramanyetik etkileşim, durulmaya da paramanyetik durulma denir (27).

3.6.2. Paramanyetik İyonun Neden Olduğu Durulma

Dipolar karakterdedir ve benzer spinlerin dipolar etkileşmesi yoluyla meydana gelen durulmadan çok şiddetlidir. Protonun durulmasına yol açan yerel alan dalgalanması iki türlü meydana gelebilir.

a) Elektronun proton ihtiva eden kompleksten birleşip ayrılması, çekirdeğin bulunduğu yerde zamanla değişen bir alan kurabilir. Elektronun kompleksteki yaşam süresi τ_h ilgi zamanını karakterize eder. Bu süreye değiş tokuş zamanı da denir.

b) Elektron spinin yön değiştirmesi protonun bulunduğu yerde değişen bir alan kurulmasına yol açar. Bu durumda protonun bulunduğu yerdeki yerel alan değişimini karakterize eden zaman T_{2S} dir (28).

3.6.3. Spin Dönmesi İle Oluşan Durulma (Spin Rotation)

Çekirdeğin bulunduğu konumda çekirdek ihtiva eden molekülün dönmesinden oluşan manyetik alan ile çekirdek manyetik momentinin etkileşimine spin dönme etkileşmesi denir. Bu etkileşimde molekül döndüğü zaman, rasgele bir yönelmeden diğeri bir yönelmeye sıçrar. Bu bir dipolar etkileşme türü değildir. Daha açık olarak, çekirdeğin bulunduğu yerde

dalgalandan ve çekirdeğin durulmasına yol açan yerel alan, molekül içindeki elektron dağılımından ileri gelen molekül manyetik momentinin hareketi ile oluşturulur. Örnek olarak, molekül içindeki elektronun dönmesini verebiliriz.

3.6.4. Kuadropolar Durulma

I spin değeri $1/2$ den büyük olan çekirdeklerin elektrik alan gradyenti ile etkileşmesinden kuadropolar durulma ortaya çıkar. Elektrik alan gradyenti dalgalandan molekül hareket yoluyla modüle edilir. Bu tip çekirdekleri ihtiva eden moleküllerin yük dağılımı küresel değildir. Dolayısıyla bunların kuadropolar manyetik momentleri vardır. Elektrik alan gradyenti ile etkileşen de bu manyetik momenttir (7).

BÖLÜM 4

MATERYAL VE METOT

4.1. Örneğin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan D₂O (99.9%) Sigma Firması'ndan satın alındı.

Ölçüm için, D₂O dan 1 ml alınarak 5 mm çapındaki NMR tüpüne kondu. Ortamdaki oksijeni yok etmek için NMR tüpü üç kere vakumlanarak ağzı kapatıldı. Daha sonra farklı sıcaklıklarda (22, 27, 32, 37, 42, 47 °C) T₁ ölçümleri yapıldı. İkinci aşamada, üç sıcaklık için (22, 27, 32 °C) T₂ ölçümleri yapıldı.

4.2. Spin-Örgü Durulma Zamanı (T₁) Ölçümleri

T₁ ve T₂ ölçümleri 400 MHz de çalışan Avance FT-NMR spektrometresi kullanılarak yapıldı. T₁ Ölçümler (180-τ-90) puls adımları kullanılarak, geri dönüşüm (Inversion Recovery) tekniği ile gerçekleştirildi. T₂ ölçümleri ise CPMG tekniği ile yapıldı. τ gecikme değerleri, T₁ için 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 22, 25 sn arasında, T₂ için ise 100 ms ile 3000 ms arasında değiştirildi. Puls tekrarlama süresi 60-85 sn arasında sıcaklık arttıkça artırılarak alındı. Her bir T sıcaklığında ölçümler yapılırken, örneğin sıcaklığının kararlı hale gelmesi için 15 dakika beklendi. Her bir sıcaklık ölçümü 1,5-2 saat sürdü. Her sıcaklığa ait manyetizasyon bozunumunun üstel olduğu gözlemlendi.

4.3. Aktivasyon Enerjisi (E_a) ve İlgili Zamanı (τ₀, τ_c) nın Hesaplanması İçin 1/T₁ ve 1/T₂

Durulma Oranlarının Düzenlenmesi

Hesaplamalarda, benzer spinlerin dipolar etkileşmesi için bulunan 3.51 denklemi kullanıldı. Solomon-Bloembergen tarafından türetilen bu denklem,

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_D^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{r^6} \left[\frac{\tau_c}{1 + (\omega_D - \omega_H) \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_D^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_D + \omega_H)^2 \tau_c^2} \right] \quad (4.1)$$

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_D^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{20r^6} x \left[4\tau_c + \frac{\tau_c}{1 + (\omega_D - \omega_H) \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_D^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + \omega_D^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_D + \omega_H)^2 \tau_c^2} \right] \quad (4.2)$$

olarak yazılır. Burada, γ_H protonun jromanyetik oran sabiti, γ_D döteronun jromanyetik oran sabiti, r , proton-proton çekirdekler arası uzaklık, ω_H proton larmor açısai frekansı, ω_D döteron larmor açısai frekansı ve τ_c ilgi zamanıdır. τ_c ilgi zamanı

$$\tau_c = \tau_0 \exp(E_a / RT) \quad (4.3)$$

şeklinde Arrhenius denklemi ile verilir. Burada, E_a , moleküler hareketler için aktivasyon enerjisi, R gaz sabiti ve T sıcaklıktır.

$\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$ olduğu aşırı daralma durumunda, Denk. 4.1 aşağıdaki gibi düzenlenir.

$$\frac{1}{T_1} = A \exp(E_a / RT) \quad \text{veya} \quad \ln T_1 = \ln \frac{1}{A} - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (4.4)$$

$$\text{Burada, } A = \left(\frac{\mu_o}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_D^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{r^6} \text{ dır.} \quad (4.5)$$

Bu durumda, $\ln T_1$, $1/T$ 'ye doğrusal olarak bağlıdır ve eğim eksidir.

4.4. NMR Spektrometresi

NMR spektrometreleri temel olarak dört ana bölümden oluşur.

1. Kutup uçları arasında yüksek derecede homojen manyetik alan içeren mıknatıs
2. Çok kararlı bir radyo frekans vericisi
3. Radyo frekans alıcısı
4. Kaydedici(monitör)

NMR spektrometrelerinde ışınlama kaynağı, radyo frekans vericisidir. NMR spektrometrelerini diğer spektrometrelerden ayıran en önemli kısım güçlü manyetik alanlarıdır. Manyetik alan şiddeti düşük olan cihazlar (1-2 Tesla) permanent doğal mıknatıs veya elektromıknatıs içerirler. Süper iletken mıknatıs içerenlerin gücü 20 Teslaya kadar çıkmaktadır. Bu cihazlar sürekli olarak sıvı helyum ve dıştan sıvı azot ile soğutulur. Cihaz kurulduktan sonra, kullanım ömrünü dolduruncaya kadar sürekli olarak mıknatısın sıvı

helyum sıcaklığında (4K) tutulması gerekir. Genel olarak her altı ayda veya yılda bir, cihaza sıvı helyum yüklemek gerekir. Sıvı helyumun uzun süre muhafaza edilmesi için her hafta cihaza sıvı azot yüklemek gerekmektedir.

Ölçülecek olan numune 18 cm boyunda ve 0.5 cm çapında bir tüpe yerleştirildikten sonra, mıknatısın oluşturduğu manyetik alan içine getirilir ve manyetik alanda var olan inhomojenliğin elimine edilebilmesi için tüp, ölçüm esnasında sürekli olarak döndürülür. Ayrıca, her ölçümden önce, shim bobinleri aracılığı ile manyetik alanın homojenliği kontrol edilir. Doğal ve elektromıknatıslarda alan sık sık değişirken, süper iletken mıknatıslarda alan, çok daha karardır. FT-NMR spektrometrelerinde, cihazın manyetik alan bölgesindeki kısmı yaklaşık olarak oda sıcaklığına odaklanır. FT-NMR spektrometrelerinde bir numuneden birden fazla ölçüm yapıldığı için alanın kararlı olması gerekir. Bu nedenle alan önce kilitlenir. Böylece kararlılığı sağlanmış olur (26).



Şekil 4.1. 400 MHz AVANCE-NMR cihazı

BÖLÜM 5

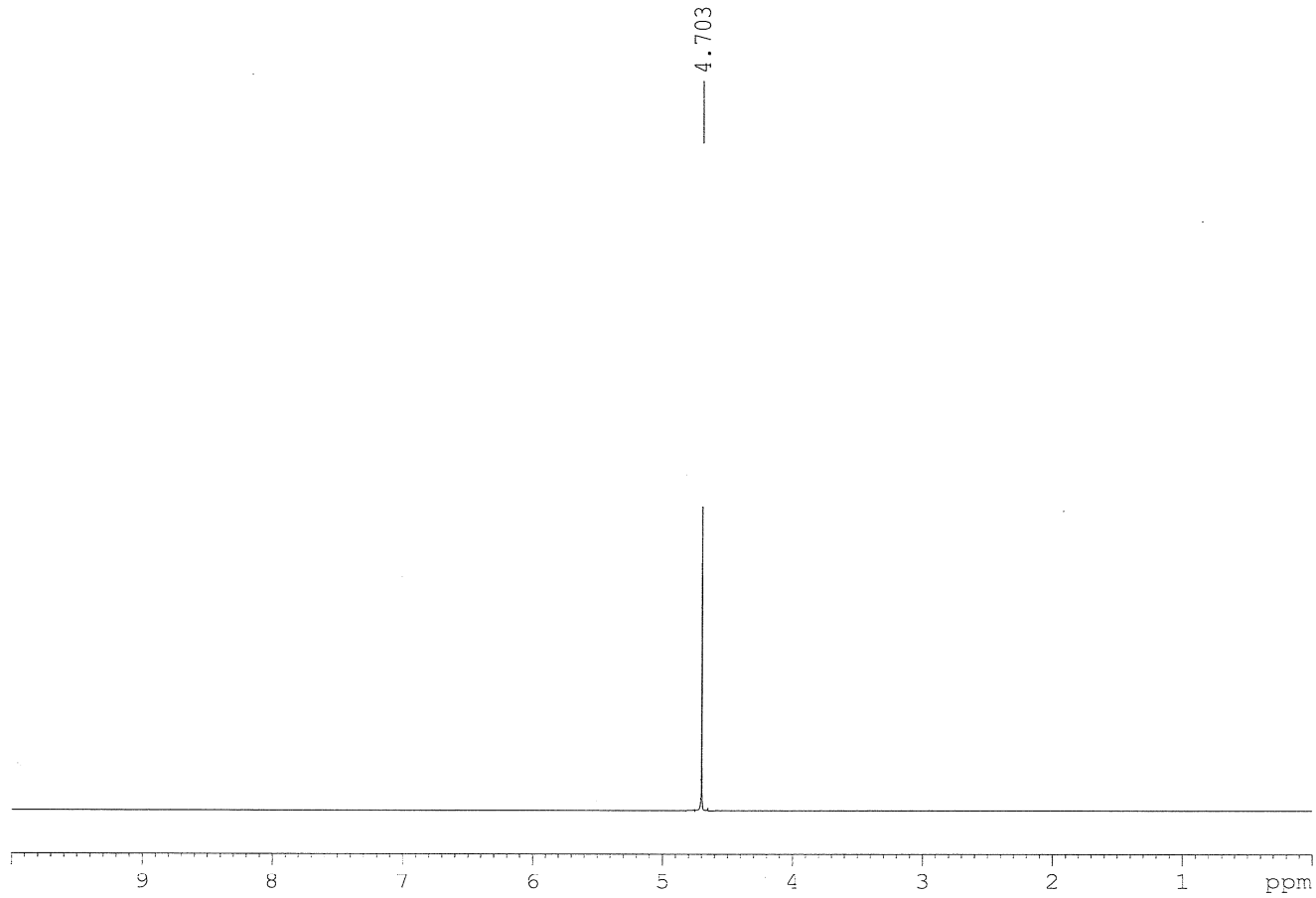
BULGULAR

Çalışmada kullandığımız D₂O'nun spektrumu şekil 5.1'de gösterilmiştir. Bu spektrumun farklı sıcaklıklardaki ölçümlerinden elde edilen T₁, T₂ ve T₂'ye ait serbest bozunum sinyalleri (FİD) şekil 5.2-5.12'de gösterilmiştir.

Değişik sıcaklıklardaki ölçümlerden elde edilen T₁ ve T₂ durulma zamanları değerleri Tablo 1 de verilmiştir. Tablo 1'deki T₁ verilerinden, ln T₁'in, 1/T sıcaklığına göre değişimi şekil 5.13 de gösterildi. Şekillerden de görüldüğü gibi ln T₁, 1/T ile doğru orantılı ve doğru eksi eğime sahiptir.

Şekil 5.13 de hesaplanan aktivasyon enerjisi (E_a) ve ilgi zamanları (τ_c, τ₀) Tablo 2 de verilmiştir.

D2O.p



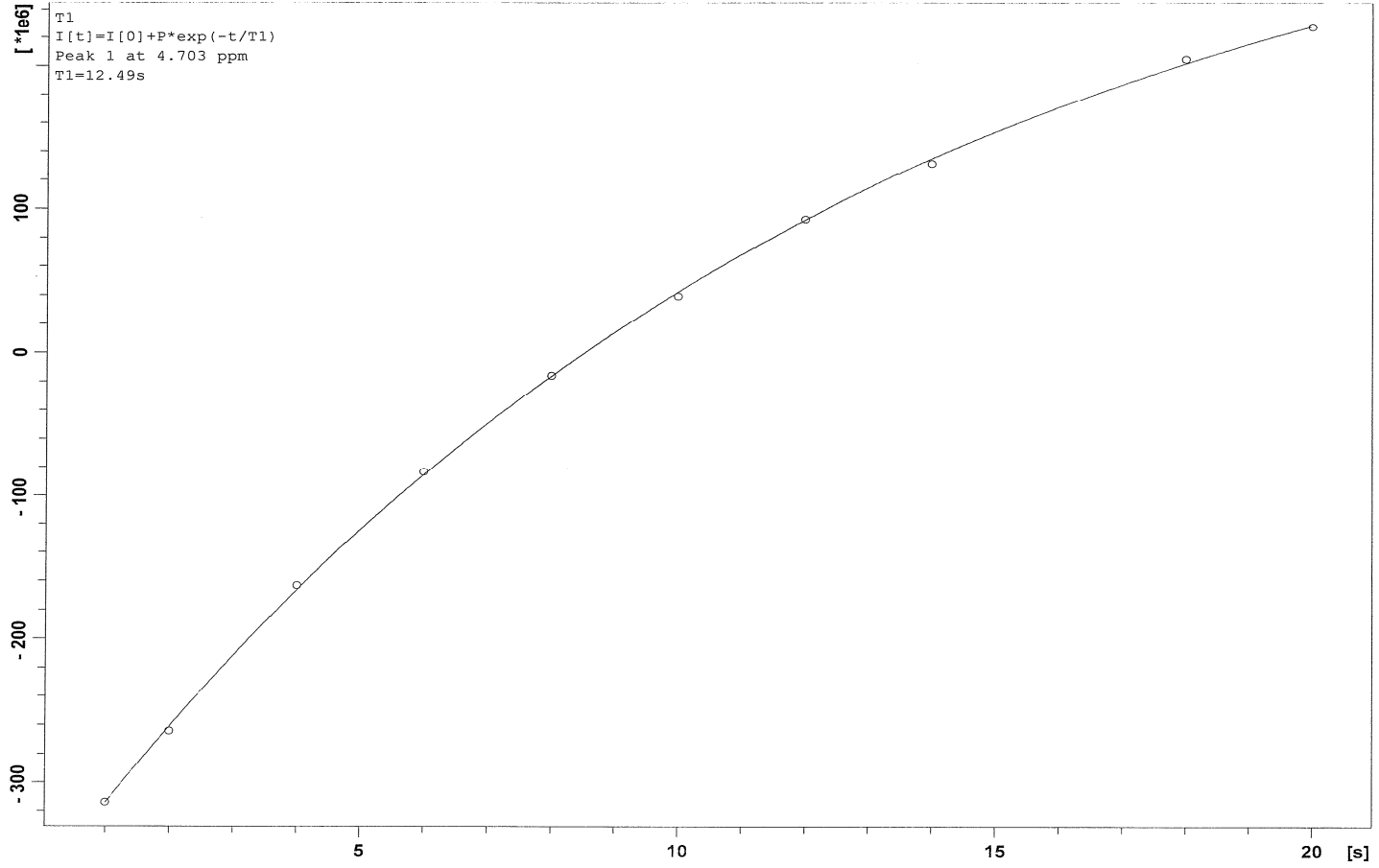
```
Current Data Parameters
NAME      Cigdem-D2O.p
EXPNO    2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20070721
Time     10.10
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBI 1H/
PULPROG  zg30
TD       65536
SOLVENT  D2O
NS       16
DS       2
SWH      8278.146 Hz
FIDRES   0.126314 Hz
AQ       3.9584243 sec
RG       90.5
DW       60.400 usec
DE       8.00 usec
TE       295.1 K
D1       1.0000000 sec
TDO      1

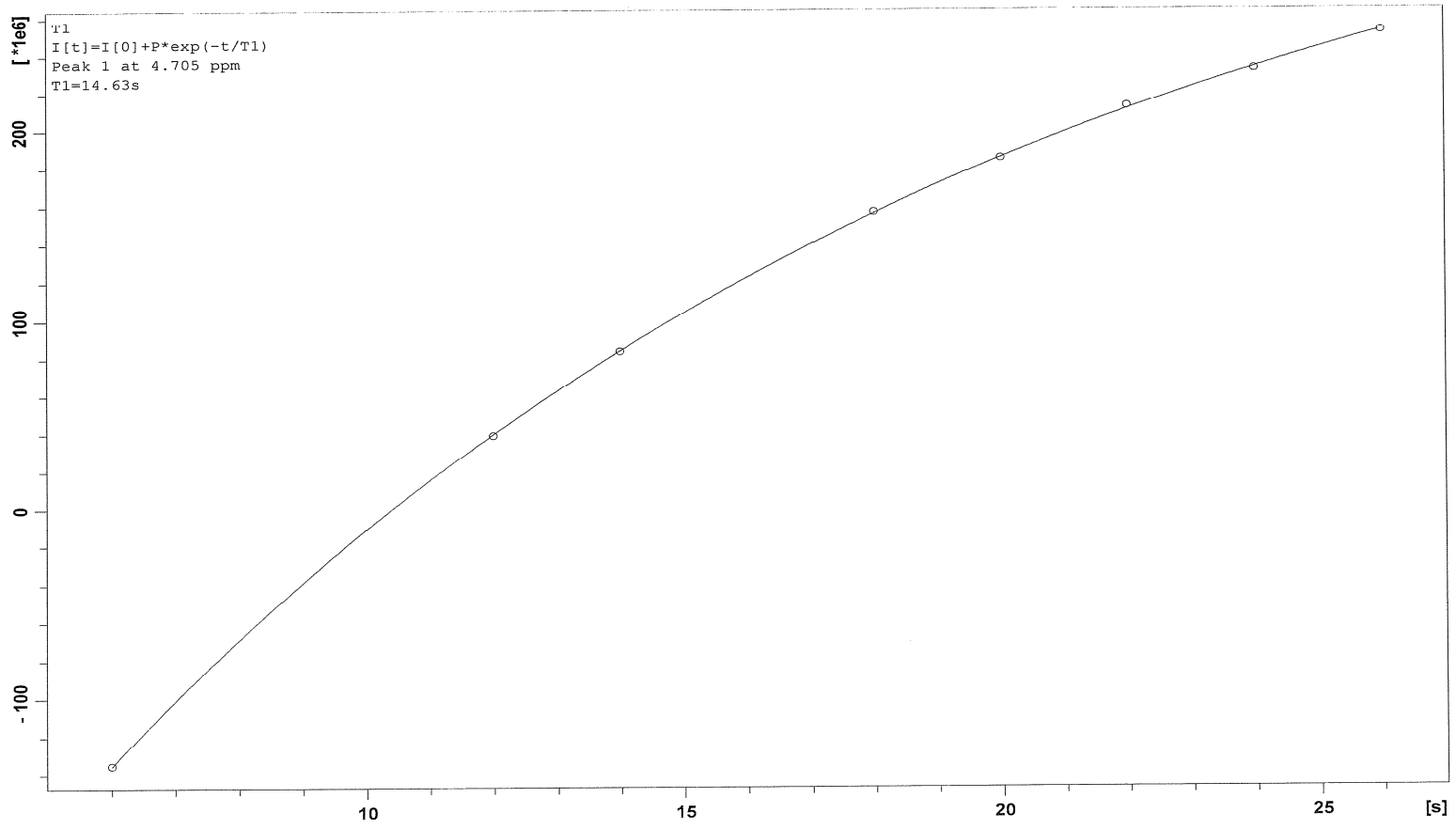
===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P1       9.75 usec
PL1     5.00 dB
SFO1    400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       400.1300000 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.30 Hz
GB       0
PC       1.00
```

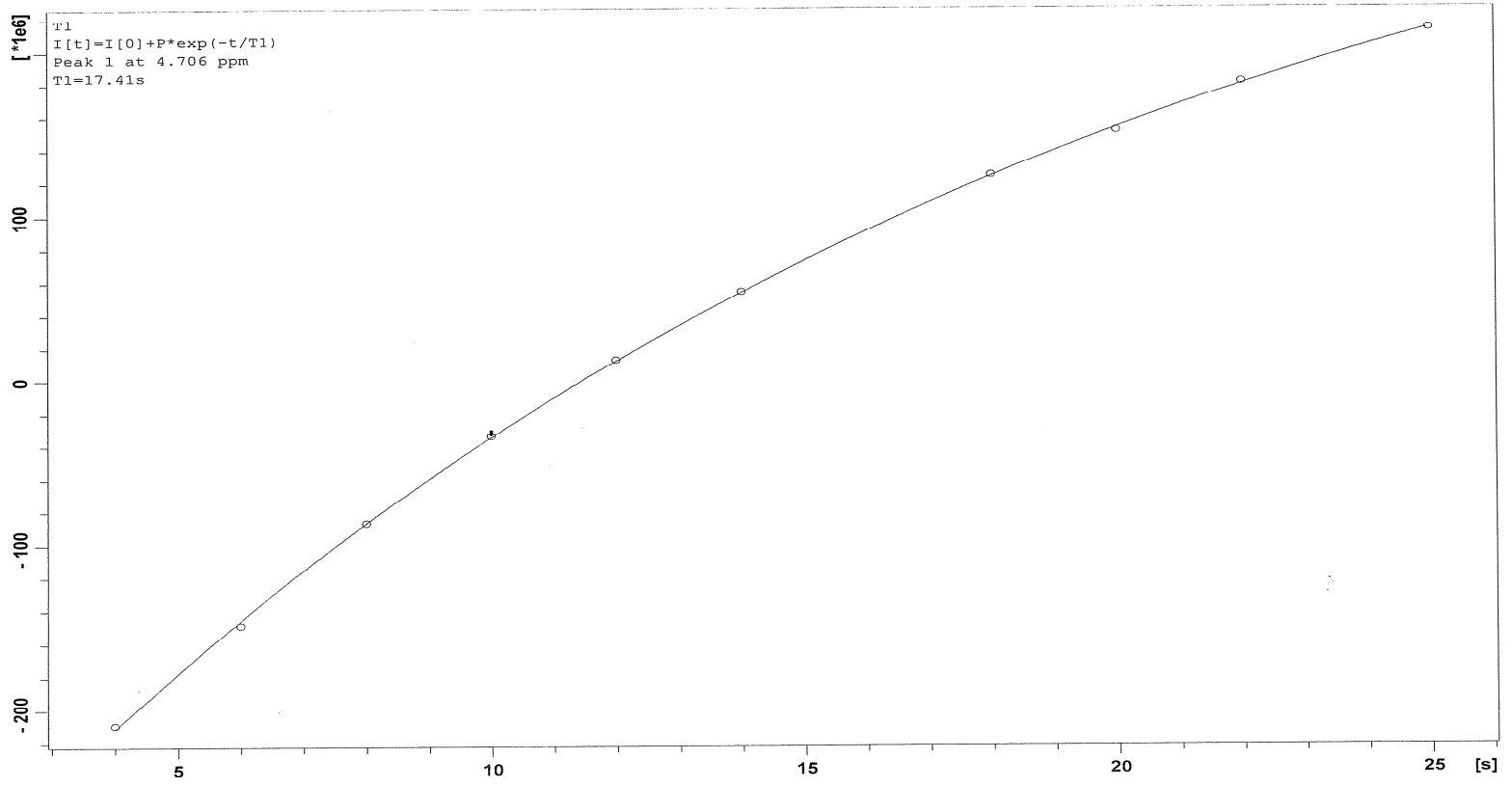
Şekil 5.1. D₂O'daki residual su sinyali spektrumu.



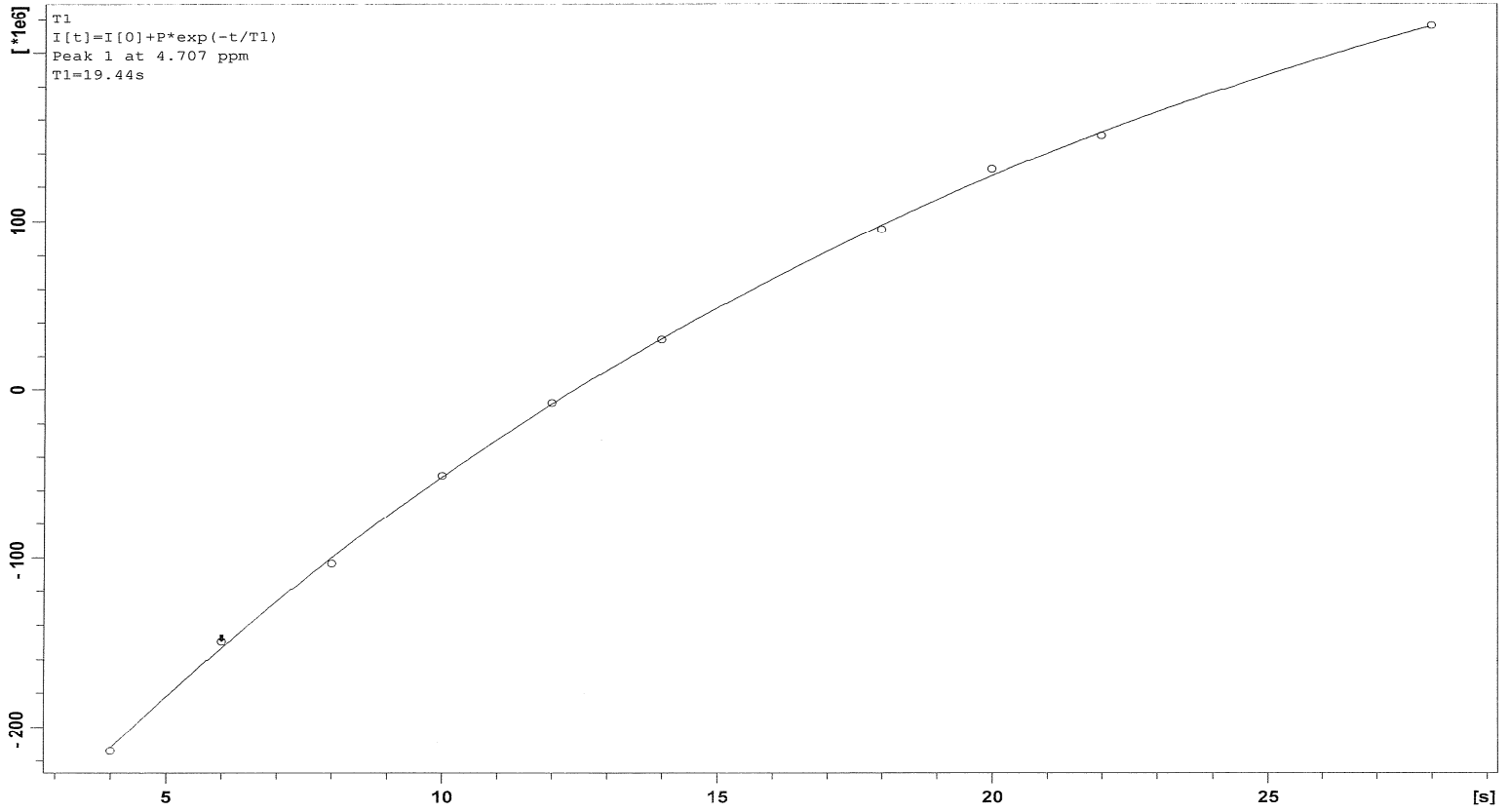
Şekil 5.2. HDO nun 22 °C sıcaklıktaki T₁ spektrumu.



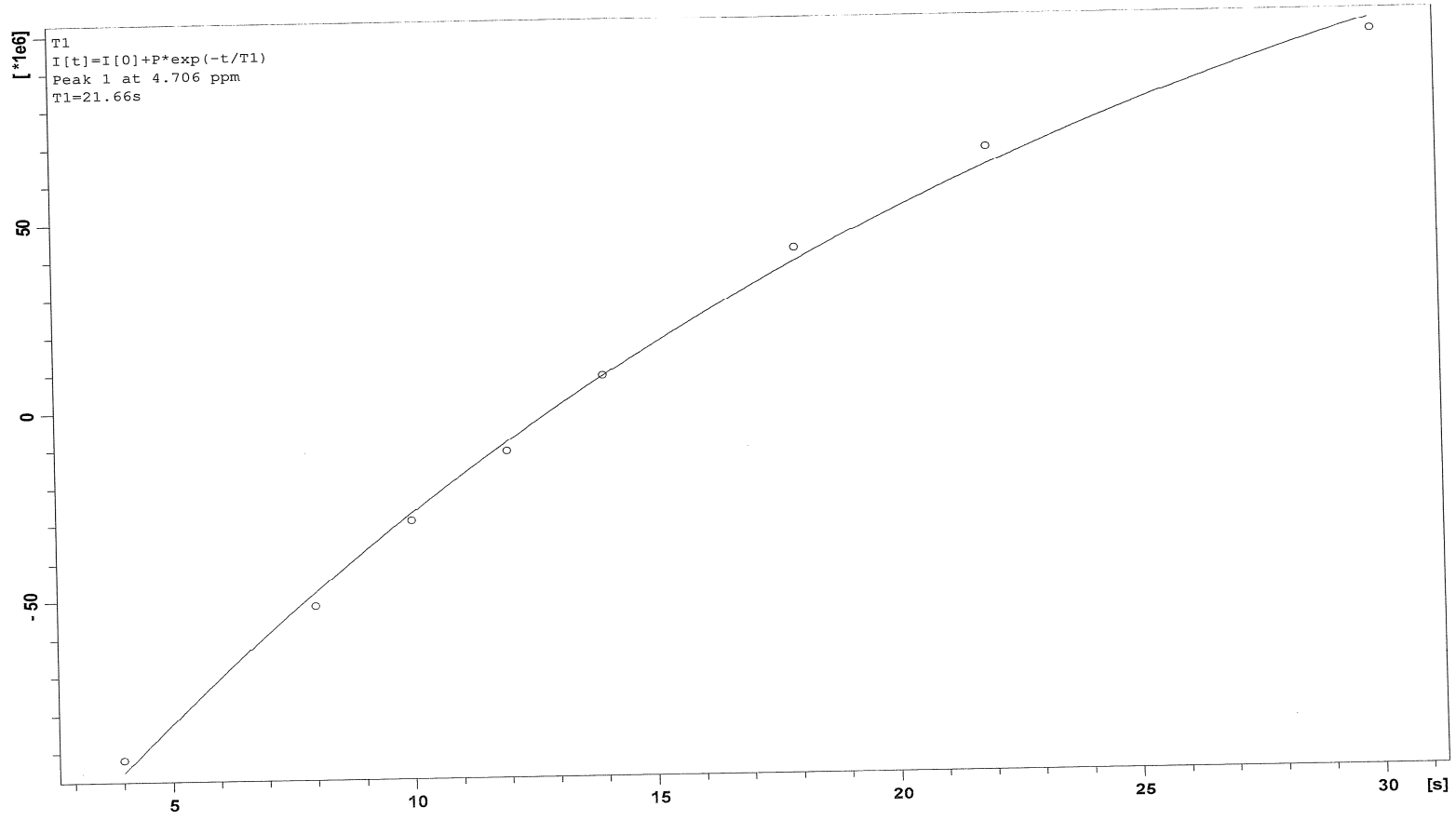
Şekil 5.3. HDO nun 32 °C sıcaklıktaki T_1 spektrumu.



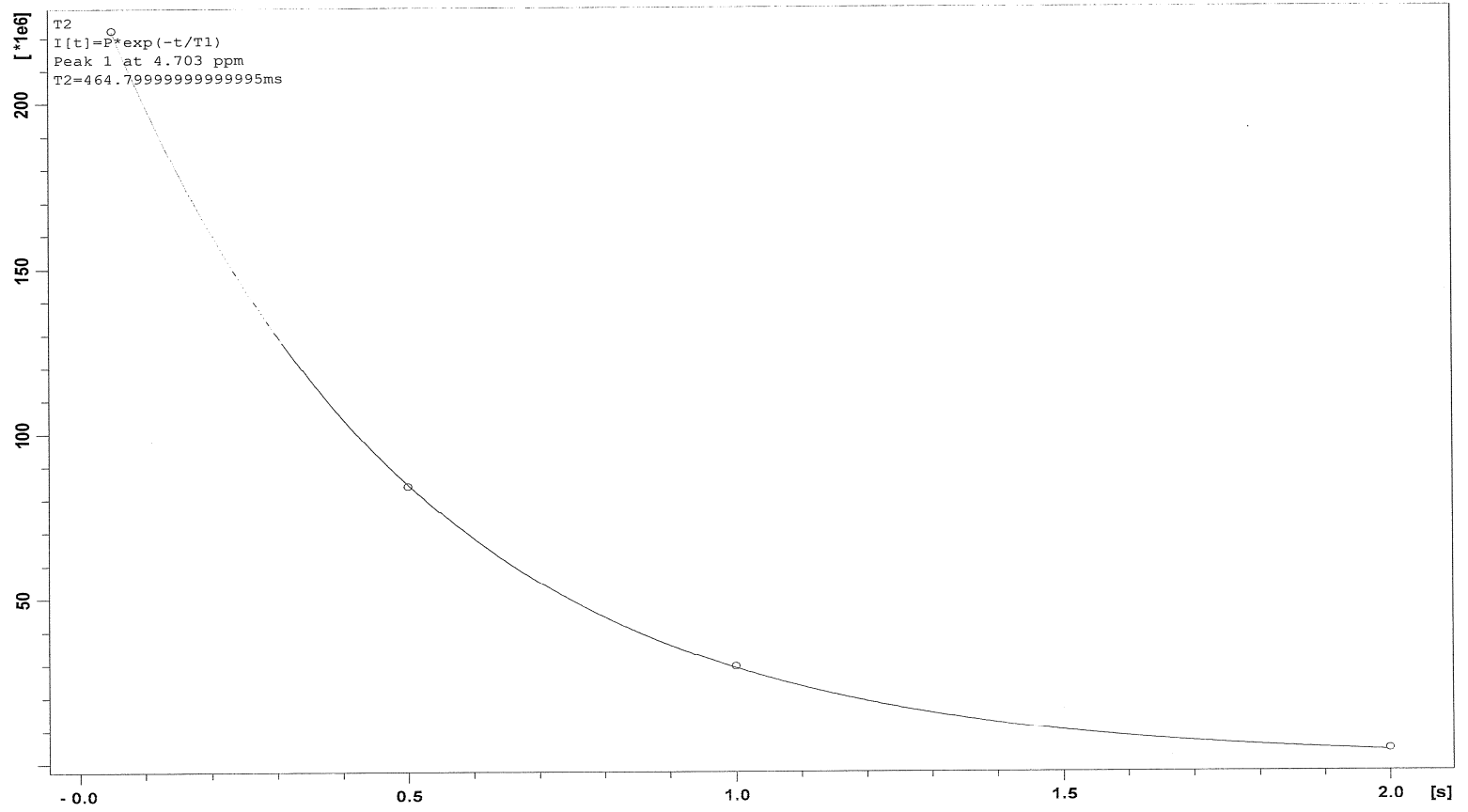
Şekil 5.4. HDO nun 37 °C sıcaklıktaki T₁ spektrumu.



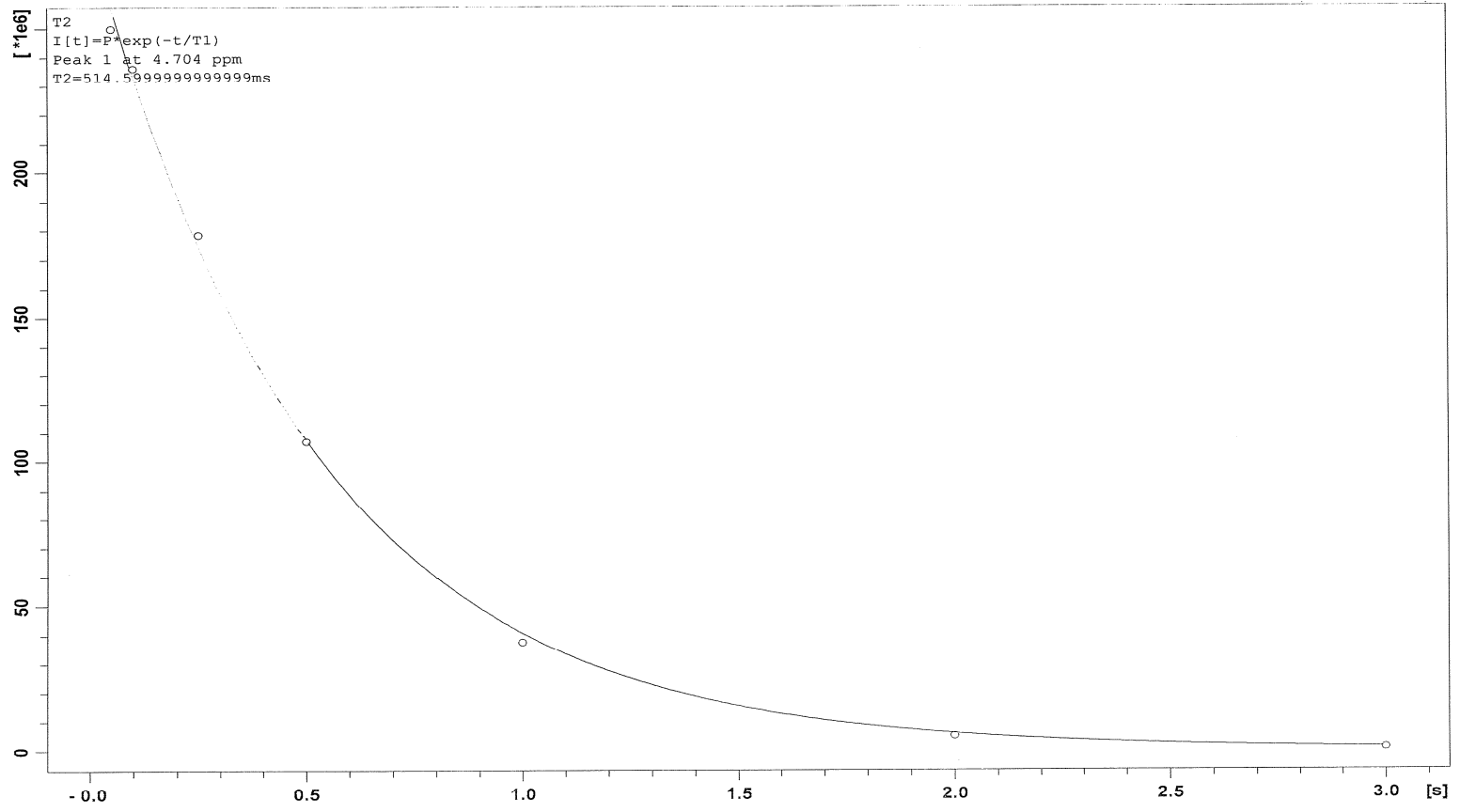
Şekil 5.5. HDO nun 42 °C sıcaklıktaki T₁ spektrumu.



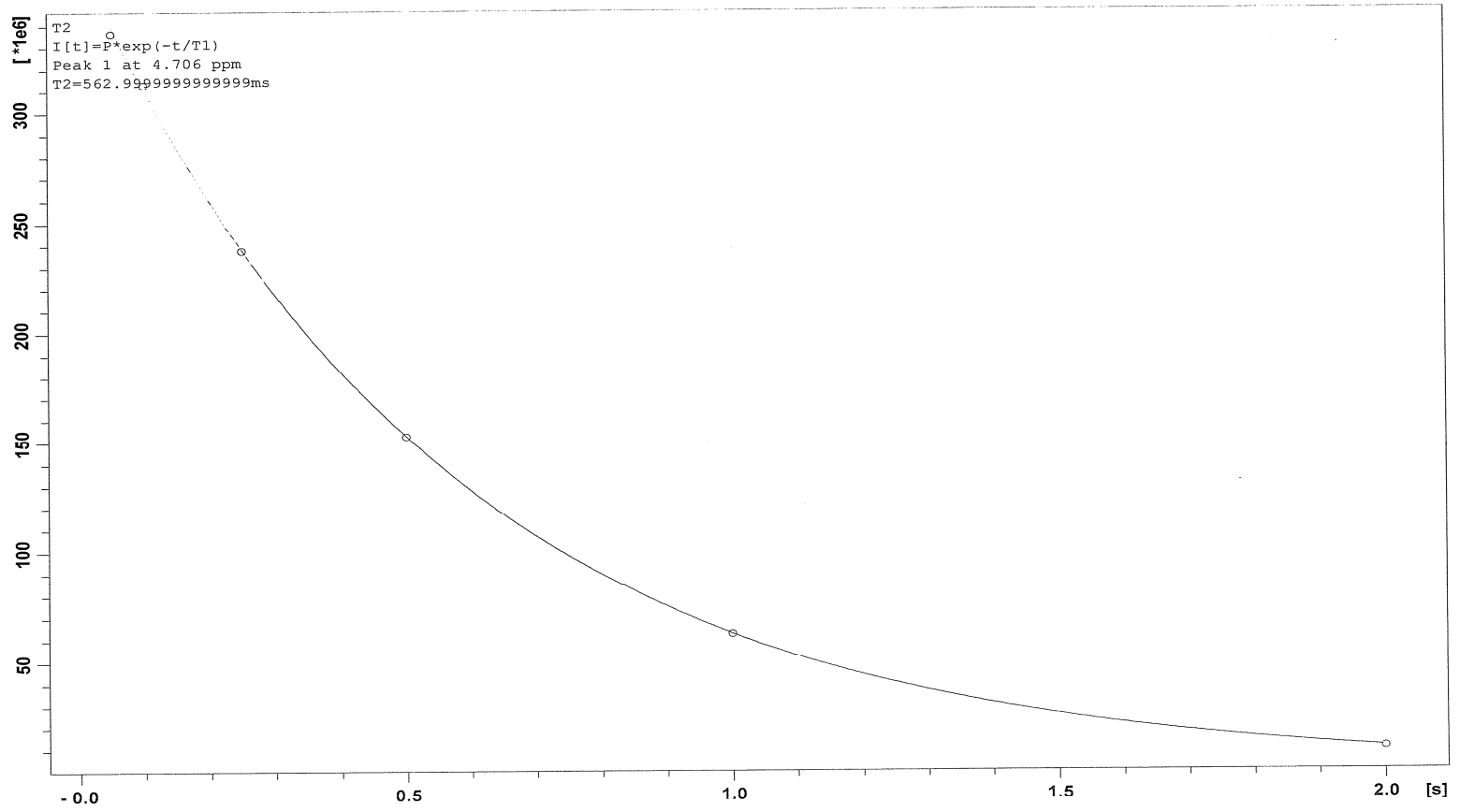
Şekil 5.6. HDO nun 47 °C sıcaklıktaki T₁ spektrumu.



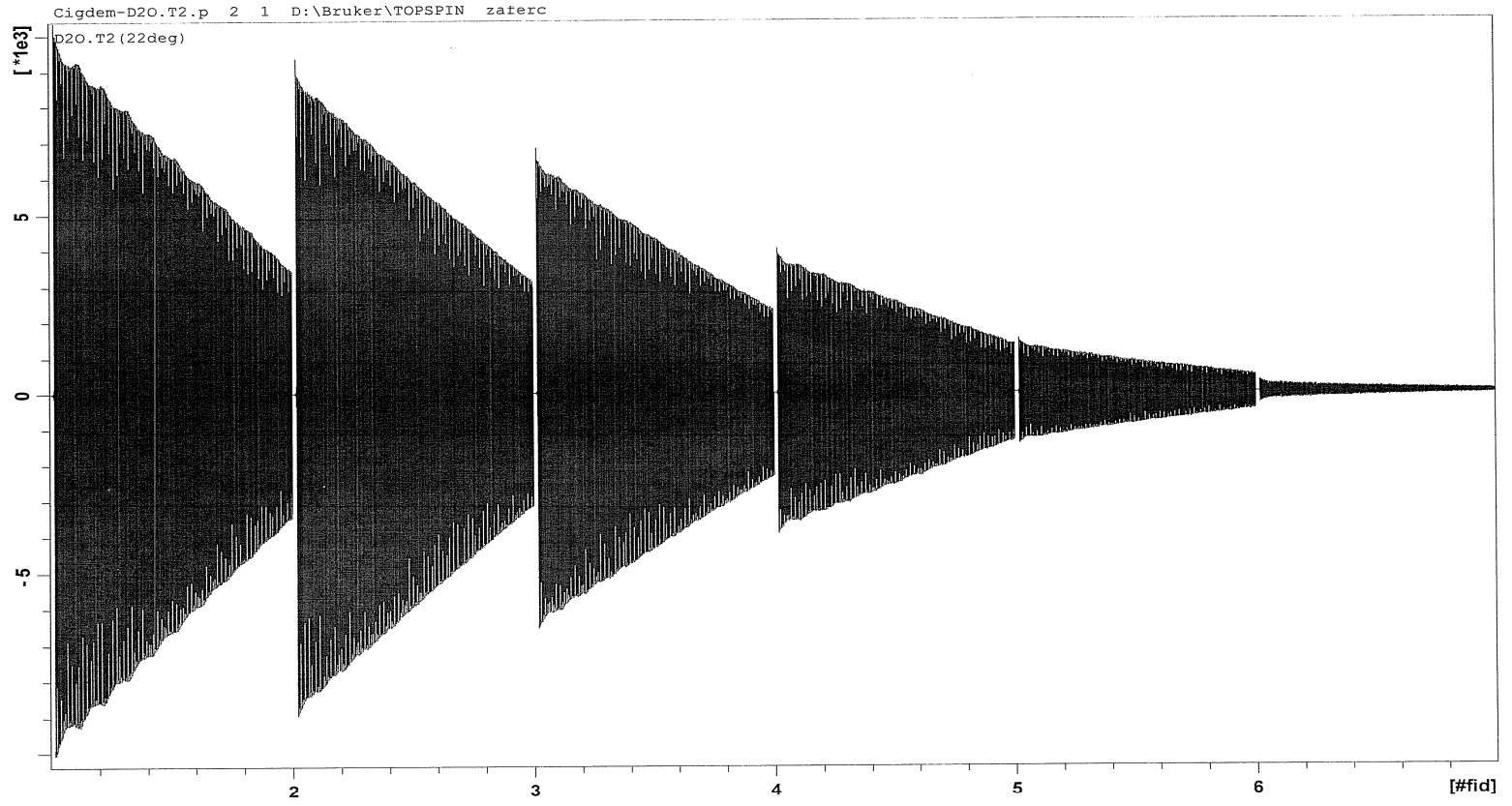
Şekil 5.7. HDO nun 22 °C sıcaklıktaki T₂ spektrumu.



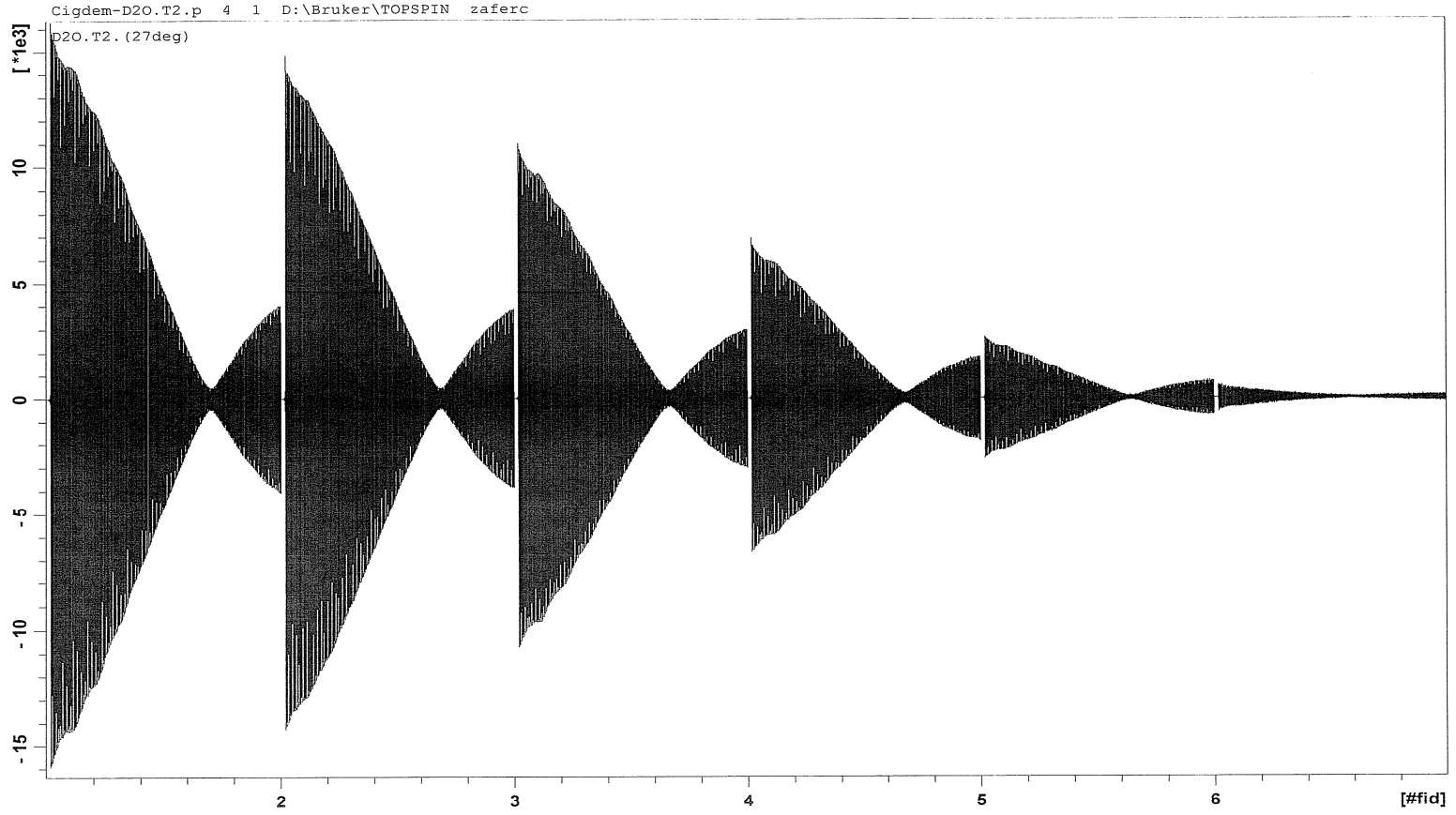
Şekil 5.8. HDO nun 27 °C sıcaklıktaki T₂ spektrumu.



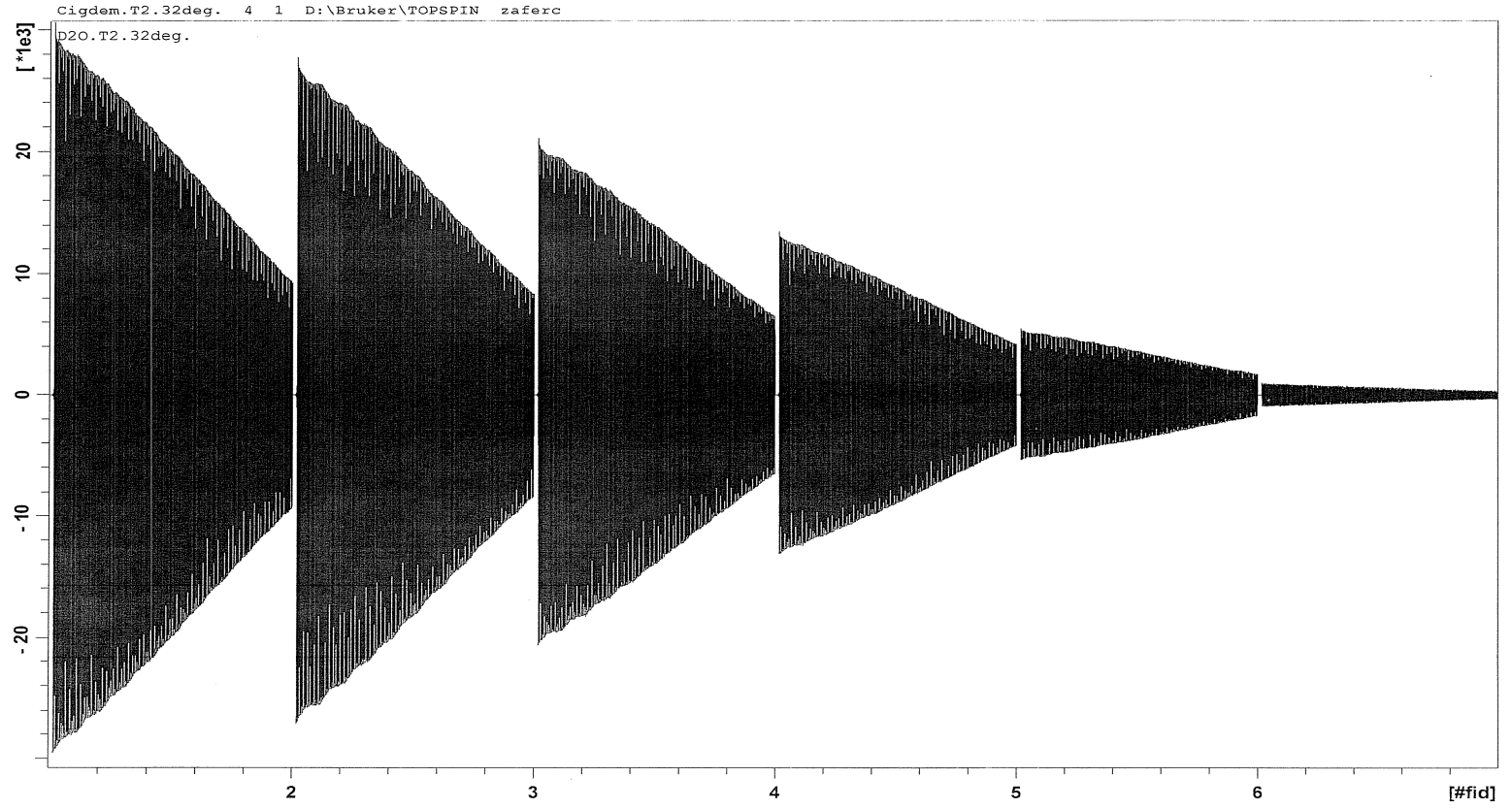
Şekil 5.9. HDO nun 32 °C sıcaklıktaki T₂ spektrumu.



Şekil 5.10. HDO nun 22 °C sıcaklıktaki T₂-FID spektrumu.



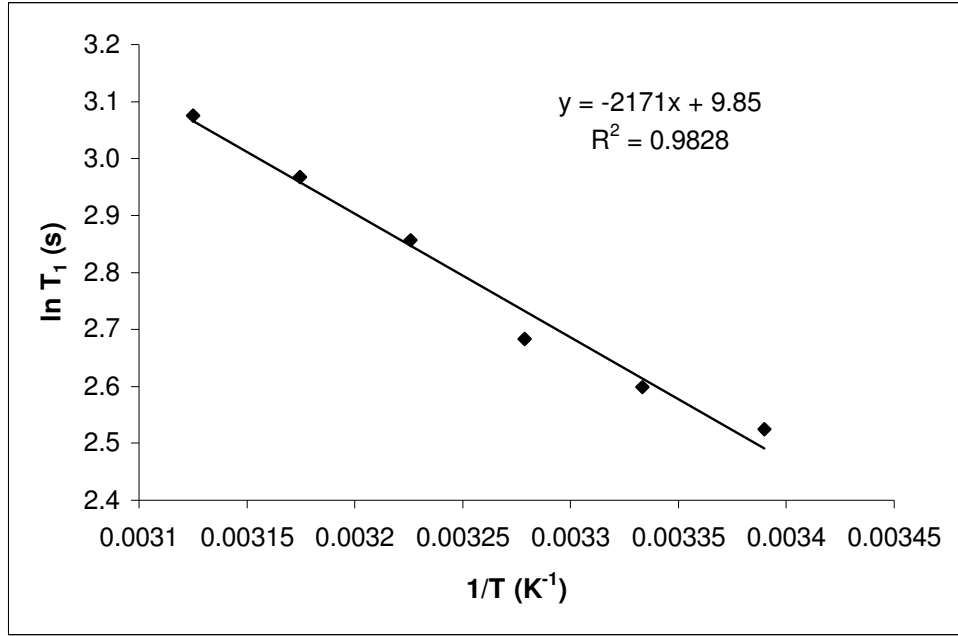
Şekil 5.11. HDO nun 27 °C sıcaklıktaki T₂-FID spektrumu.



Şekil 5.12. HDO nun 32 °C sıcaklıktaki T₂-FİD spektrumu.

Tablo 1. Şekil 5.1 deki ^1H -NMR spektrumundaki pik için T_1 ve T_2 durulma zamanlarının T sıcaklığına bağlı değerleri.

T (K)	T_1 (s)	T_2 (ms)
320	21.66	-
315	19.44	-
310	17.41	-
305	14.63	563
300	13.45	515
295	12.49	465



Şekil 5.13. $\ln T_1$ 'in $1/T$ sıcaklığına göre değişimini gösteren grafik.

Şekil 5.13 deki doğrunun denklemi aşağıdaki gibidir.

$$y = -2171x + 9.85 \quad R^2 = 0.9828$$

Tablo 2. Şekil 5.1 deki spektrum pikinin, şekil 5.13 den hesaplanan aktivasyon enerjisi (E_a) ve ilgi zamanları (τ_c , τ_0).

	Pik
E_a (kcal/mol)	4.31
τ_0 (s)	4.86×10^{-14}
τ_c (s)	6.78×10^{-11}

BÖLÜM 6

TARTIŞMA VE SONUÇ

Ölçülen T_1 şekillerinin tümü single üstel davranış sergilemektedir. Bu da tek tip bir T_1 rölaksasyonunun çözelti için geçerli olduğunun kanıtı olmaktadır. Aynı şekilde ölçülen T_2 şekilleri de exponansiyel bozunmaktadır. Yani, T_2 de tek tip bir rölaksasyon tarafından idare olunmaktadır. T_2 'nin FİD (serbest indüksiyon bozunumu) sinyalleri de bu görüşü desteklemektedir. Zaten H-D-O çözeltisinde ikinci bir rölaksasyonun devrede olması da beklenmemektedir.

H-D-O' daki proton-döteron dipolar etkileşmesini dikkate alarak ve formül 4.1'i kullanarak yaptığımız hesaplama τ_c için 6.78×10^{-11} değerini, aktivasyon enerjisi için de $E_a = 4.31$ kcal/mol değeri vermektedir. Bu değerler literatür ile uyumludur (6,7,8). τ_o in bu küçük değeri moleküler hareketin çok hızlı olduğunu ve $\omega^2 \tau^2 \ll 1$ aşırı daralma koşulunu sağladığını doğrulamaktadır. Bu sonuç, grafikteki lineer ilişki ile tutarlıdır. Aktivasyon enerjisi için bulunan değerlerde suyun rotasyonel hareketi için verilen aktivasyon enerjileri ile tutarlı görülmüştür (6,7,8).

D₂O çözeltisindeki artık suyun T_1 rölaksasyon zamanı 4.1 formülünden hesaplandıysa da bazı durumlarda bu formüle bir düzenlenme faktörünün eklendiği de bilinmektedir (29). Bu faktörün değeri küçük olduğu için sonuçlarımızı fazla etkilemeyecektir. Literatürle uyumlu olarak, H-D-O nun rölaksasyon oranı H₂O nun rölaksasyon oranından küçük bulunmuştur.

Diğer yandan H-D-O etkileşiminde quadrapol etkileşmelerin de devreye girdiğini biliyoruz. Yukarıdaki τ_c nin hesabında bu etkileşme dikkate alınmamıştır, ancak T_2 değerleri, T_1 değerlerinden oldukça kısa çıkmaktadır. Oysaki suyun bilinen rölaksasyon teorisine göre T_1, T_2 ye eşit olmalıdır. Ölçümlerimizdeki oransızlık, H-D-O nun T_2 durulma mekanizmasına quadrapolar etkisinin de katkıda bulunduğunun açık bir kanıtı olmaktadır. Böyle bir durumda ise ölçülen T_1 ve T_2 oranları bazı quadrapolar parametrelerin hesabı için manupile edilebilir.

Sonuç olarak D₂O ortamında ölçülen proton T_1 rölaksasyonu dipolar etkileşmeden kaynaklanıyor gözükürken, T_2 rölaksasyonuna quadrapol etkisinin de katkıda bulunduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. SEYMOUR, H. K., SCHILLINGER, E., 1968. Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion in Protein Solutions, IBM Watson Laboratory, Columbia University, New York, New York 10025.
2. GROSCHE, L., NOACK, F., 1976. NMR Relaxation Investigation Of Water Mobility In Aqueous Bovine Serum Albumin Solutions, Physikalisches Institut der Universitat Stuttgart, Teilinstitut 4, Pfaffenwaldring 57, D-7000 Stuttgart 80.
3. SEYMOUR, H. K., 1995. Classes of Hydration Sites at Protein-Water Interfaces: The Source of Contrast in Magnetic Resonance Imaging, Relaxometry Inc., Mahopac, New York 10541; and Department of Radiology, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Hanover, New Hampshire, 03755 USA.
4. VAN-QUYNH, A., WILLSON, S., BRYANT, R. G., 2003. Protein Reorientation and Bound Water Molecules Measured by ^1H Magnetic Spin-Lattice Relaxation, Chemistry Department, University of Virginia, Charlottesville, Virginia 22904-4319, USA.
5. HALLE, B., 2004. Protein Hydration Dynamics in Solution: a Critical Survey, Department of Biophysical Chemistry, Lund University, SE-22100 Lund, SWEDEN.
6. ROOSE, P., CRAEN, J.V., EISENDRATH, H., 1998. Proton spin-lattice relaxation of colloidal silica suspensions in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ mixtures. Mare, Physics Department, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050 Brussels, BELGIUM.
7. STREFFER, R. M. F., REDAH, T. A., BOWERS, J., STEITZ, R., 1999. Anomalous neutron reflectivity of $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ mixtures at the silicon/liquid interface I. N. Stranski Institut, Technische Universitat Berlin, Str. d. 17. Juni 112, D- 10623 Berlin, Germany.
8. OKADA, R. , MATSUKAWA, S., WATANABE, T., 2001. Hydration structure and dynamics in pullulan aqueous solution based on ^1H NMR relaxation time. Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, 4-5-7 Konan, Tokyo 108-8477, JAPAN.
9. SHERRY, A. D., BIRNBAUM, E. R., DARNALL, D. W. , 2004. The binding of manganese (II) to bovine serum albumin. Department of Chemistry, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico 88003, USA.

10. GULTEKIN, D. H., GORE, J., 2004. Temperature dependence of nuclear magnetization and relaxation. Yale University, New Haven, CT 06510, Vanderbilt University Institute of Imaging Science, Nashville, TN 37232, United States.
11. DUPLAN, J. C., 2005. NMR determination of the equilibrium constant for the liquid H₂O-D₂O mixture. Universite Claude Bernard Lyon I, Batiment OMEGA 1er Etage, 43 Boulevard du 11 November 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.
12. CUIKER, R. I., MORILLO, M., 1990. Theoretical analysis of nuclear magnetic resonance experiments on proton transfer in benzoic acid crystals, J. Chem. Phys. A., 93(4), 2364-2360.
13. VAN-QUYNH, A., FİLİP, D., CRUZ, C., SEBASTİAO, P. J., RIBEIRO, A. C., RUEFF, J., IZATT, R. M., SERRANO, J. L., 2005. NMR relaxation study of molecular dynamics in columnar and smetic phases of a PAMAM liquid-crystalline co-dendrimer, The European Physical Journal E, 18, 149-158
14. ECHEGOYEN LUIS, KAIFERANGEL, DURST, H., SCHULTZ ANN ROSE, DISHONG, M. D., GOLI, M., DEEPAND GOKEL, GEORGE, W., 1984. Dynamics of Crown Ether Cation Complexation Assessed by ¹³C NMR Relaxation Times, J.Am.Chem.Soc. 106, 5100-5103.
15. ZHONG, J., GORE, J. C. and ARMITAGE, I. M., 1990. Quantitative Studies of Hydrodynamic Effects and Cross-Relaxation in Protein Solutions and Tissues with Proton and Deuteron Longitudinal Relaxation Times, Magn. Reson. in Med. 13, 192-203.
16. KANG, Y. S., GORE, J. S., ARMITAGE, I. M., 1984. Studies of Factors Affecting The Design of NMR Contrast Agents Manganese in Blood as a Model System, Magn.Reson.in Med. 1, 396-409.
17. JENKINS, B. G., 1991. Site Specific Water Proton Relaxation Enhancement of Iron (III) Chelates Noncovalently Bound to Human Serum Albumin, Magn.Reson.in Med. 17, 164-178.
18. MILDVAN, A. S., COHN, M., 1963. Magnetic Resonans Studies of The Interaction of The Manganese Ion with Bovine Serum Albumin, Biochemistry, 2. 910.
19. DANEK, A. N., BRYANT, R. G., 1999. Decay of Dipolar Order in Diamagnetic and Paramagnetic Proteins and Protein Gels. Chemistry Department, University of Virginia, Charlottesville, VIRGINIA 22901.
20. APAYDIN, A., 1961. Magnetik Rezonans, Temel İlkeler, Çağdaş Fizik.

21. HENNEL, W. J. and KLINOWSKI, J., 1993. Çekirdek Manyetik Rezonansın Temelleri (Çeviren: Semiha BAHÇELİ), ANKARA.
22. SLİCHTER, C. P. , 1963. Principles of Manyetic Resonance, NEW YORK.
23. SLICHTER, C.P.1984. Magnetik Rezonansın Temel İlkeleri, (Çeviren:Fevzi KÖKSAL,Hüseyin YÜKSEL), ANKARA.
24. TABAK, F. 1994. NMR'ın Temelleri, H.Ü.Müh.Fak.
25. HORNAK J.P., 1997-1999. The Basic of NMR, Roechester Instute of Technology, New York, USA.
26. BALCI M., 2004. ODTÜ Yayıncılık.
27. RYOZO KİTAMARU, 1990. Nuclear Magnetic Resonance Princibles and Theory, NEW YORK.
28. M.ZAFER KÖYLÜ, 2004. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
29. KIIHNE S., BRYANT, R. G., 2000. Protein-Bound Water Molecule Counting by Resolution of ¹H Spin-Lattice Relaxation Mechanisms. Chemistry Department, University of Virginia, Charlottesville, Virginia 22901 USA.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Şekil 5.1 deki $^1\text{H-NMR}$ spektrumundaki pik için T_1 ve T_2 durulma zamanlarının T sıcaklığına bağlı değerleri.

Tablo 2. Şekil 5.1 deki spektrum pikinin, şekil 5.13 den hesaplanan aktivasyon enerjisi (E_a) ve ilgi zamanları (τ_c , τ_0).

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1. Bir $\vec{\mu}$ nükleer manyetik momentinin \vec{H}_0 alanı etrafındaki presesyon hareketi.

Şekil 3.2 Protonun manyetik alanda yönelmesi ve farklı enerji seviyelerinin gösterilişi.

Şekil 3.3. Soğurulma ve spin-örgü durulması.

Şekil 3.4. Spin-örgü sisteminin ısısal etkileşimi.

Şekil 4.1 400 MHz NMR Cihazı.

Şekil 5.1. D₂O'daki residual su sinyali spektrumu.

Şekil 5.2. HDO nun 22 °C sıcaklıktaki T₁ spektrumu.

Şekil 5.3. HDO nun 32 °C sıcaklıktaki T₁ spektrumu.

Şekil 5.4. HDO nun 37 °C sıcaklıktaki T₁ spektrumu.

Şekil 5.5. HDO nun 42 °C sıcaklıktaki T₁ spektrumu.

Şekil 5.6. HDO nun 47 °C sıcaklıktaki T₁ spektrumu.

Şekil 5.7. HDO nun 22 °C sıcaklıktaki T₂ spektrumu.

Şekil 5.8. HDO nun 27 °C sıcaklıktaki T₂ spektrumu.

Şekil 5.9. HDO nun 32 °C sıcaklıktaki T₂ spektrumu.

Şekil 5.10 HDO nun 22 °C sıcaklıktaki T₂-FİD spektrumu.

Şekil 5.11. HDO nun 27 °C sıcaklıktaki T₂-FİD spektrumu.

Şekil 5.12. HDO nun 32 °C sıcaklıktaki T₂-FİD spektrumu.

Şekil 5.13. ln T₁'in 1/T sıcaklığına göre değişimini gösteren grafik.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılı Diyarbakır doğumluyum. İlk, Orta ve Lise Öğrenimimi Diyarbakır'da tamamladıktan sonra, 2000 yılında Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'ne kayıt yaptırmaya hak kazandım. 2004 yılında aynı bölümden mezun olduktan hemen sonra Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimime başladım.