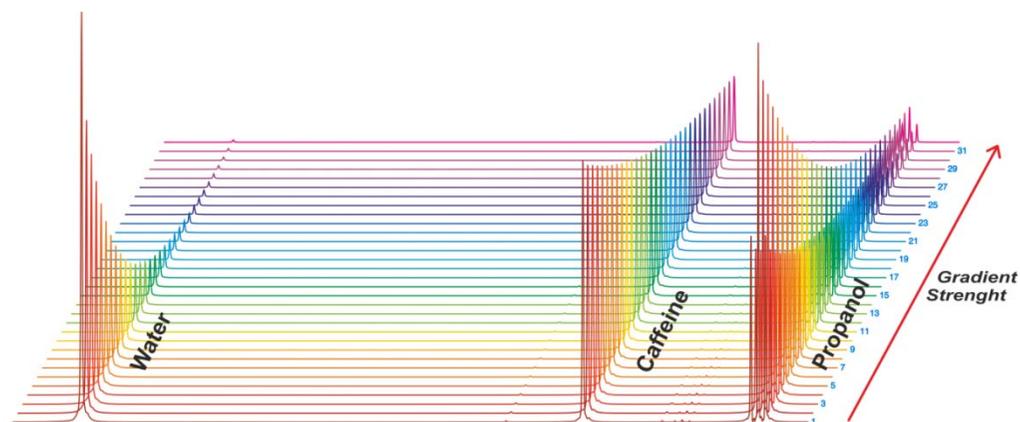


Difusión en RMN

Una herramienta crucial para el análisis de mezclas



Laura Castañar Acedo

NMR Methodology group
The University of Manchester, UK

Reunión de RMN Experimental - Hidalgo, México, 2018

I - Introducción:

Análisis de mezclas por RMN

Fundamentos de difusión en RMN

Experimento básico de difusión

II – Aspectos prácticos

Experimentos de difusión

Adquisición de los datos

Análisis de los datos

III – Limitaciones-soluciones

Solapamiento de señales

Convección

Mismo coeficiente de difusión

IV – Software

GNAT

MAGNATE

I - Introducción:

Análisis de mezclas por RMN

Fundamentos de difusión en RMN

Experimento básico de difusión

II – Aspectos prácticos

Experimentos de difusión

Adquisición de los datos

Análisis de los datos

III – Limitaciones-soluciones

Solapamiento de señales

Convección

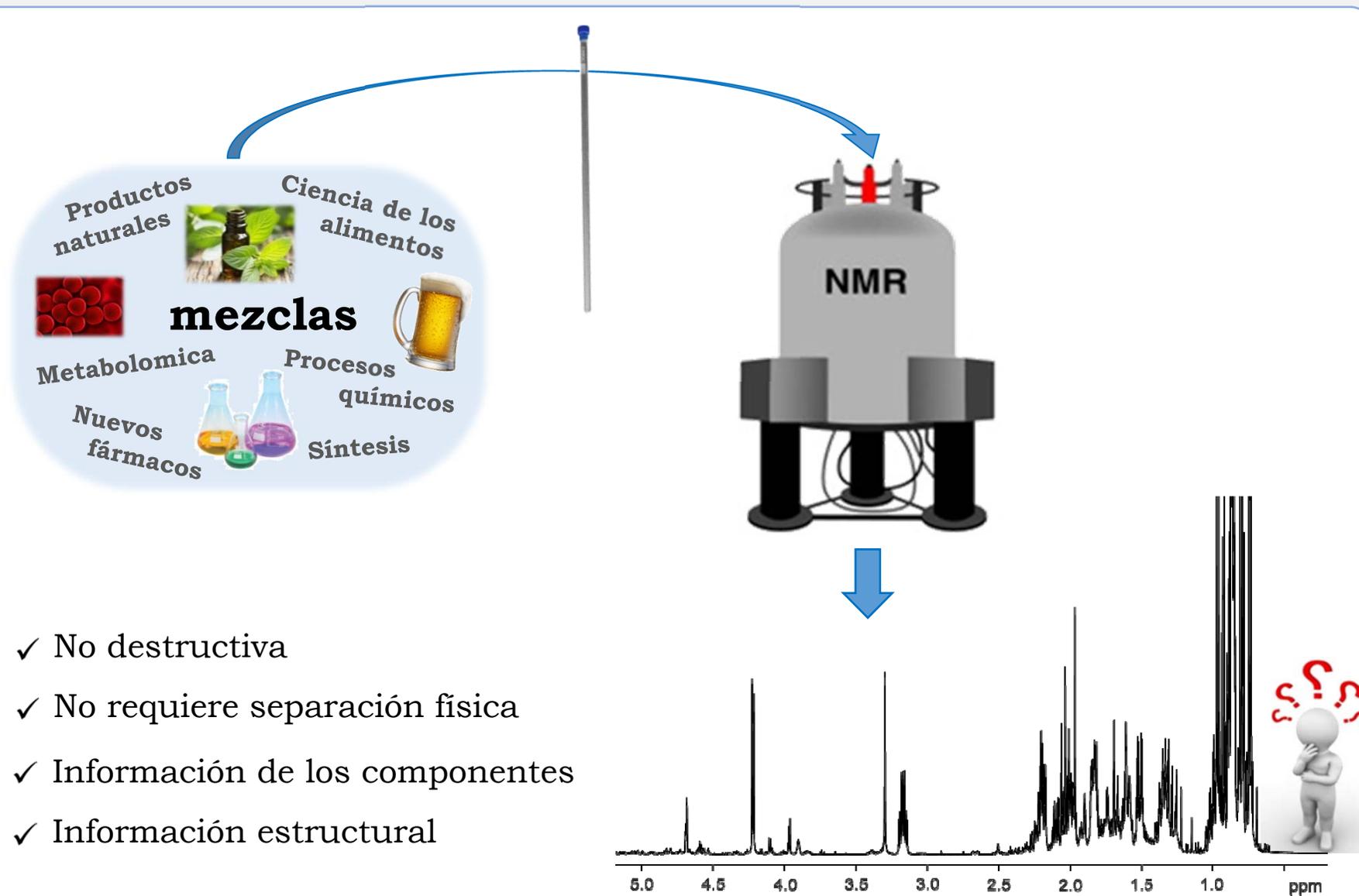
Mismo coeficiente de difusión

IV – Software

GNAT

MAGNATE

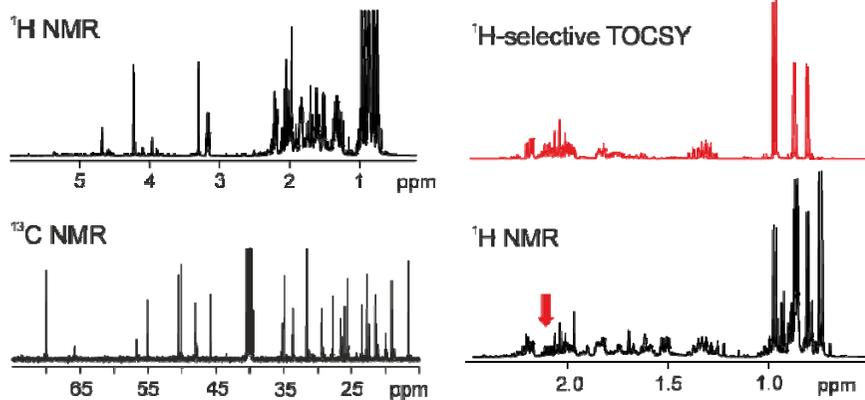
¿Por qué usar RMN para el análisis de mezclas?



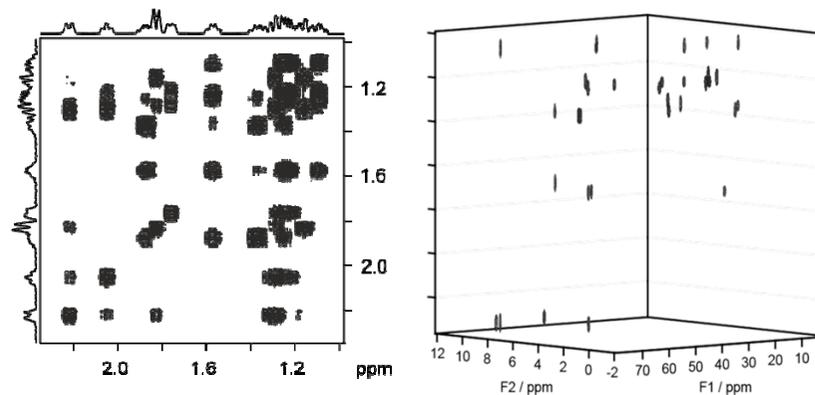
- ✓ No destructiva
- ✓ No requiere separación física
- ✓ Información de los componentes
- ✓ Información estructural

Métodos de RMN para el análisis de mezclas

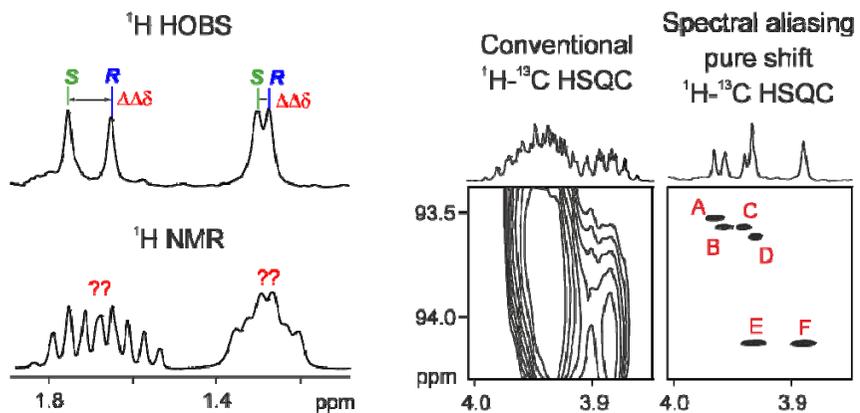
Experimentos 1D



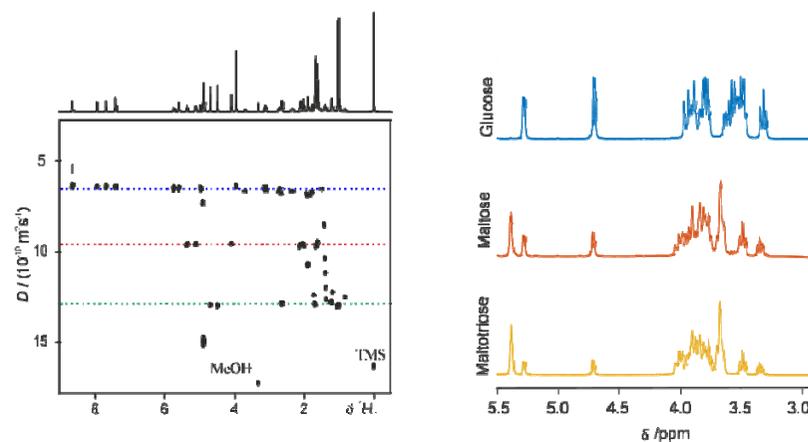
Experimentos nD



Experimentos pure shift

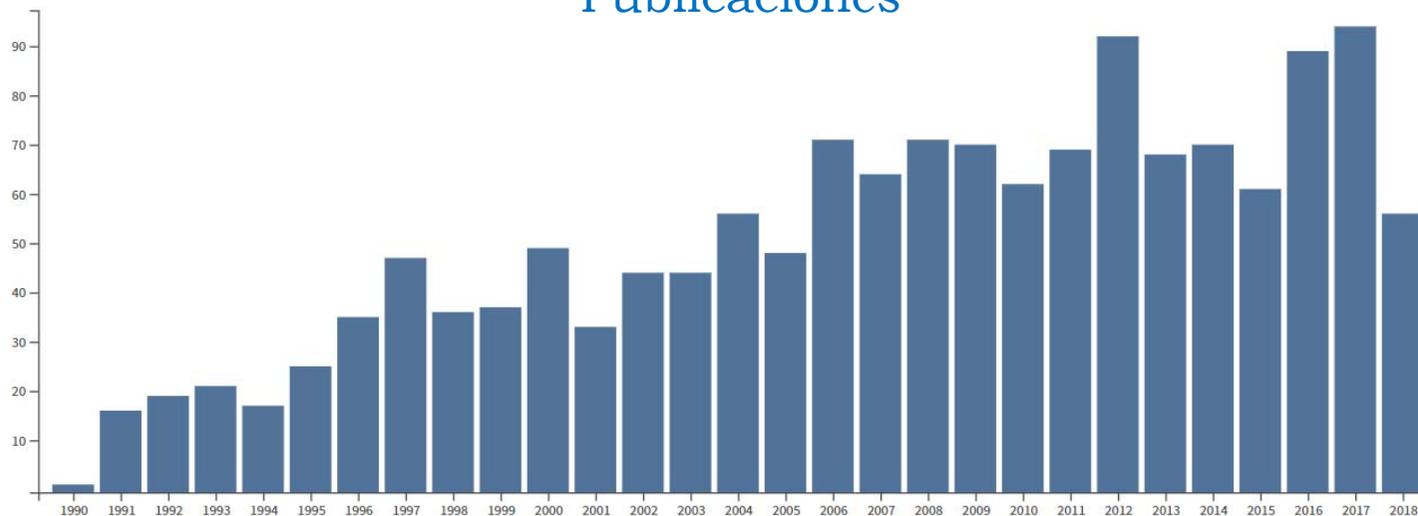


Experimentos de difusión

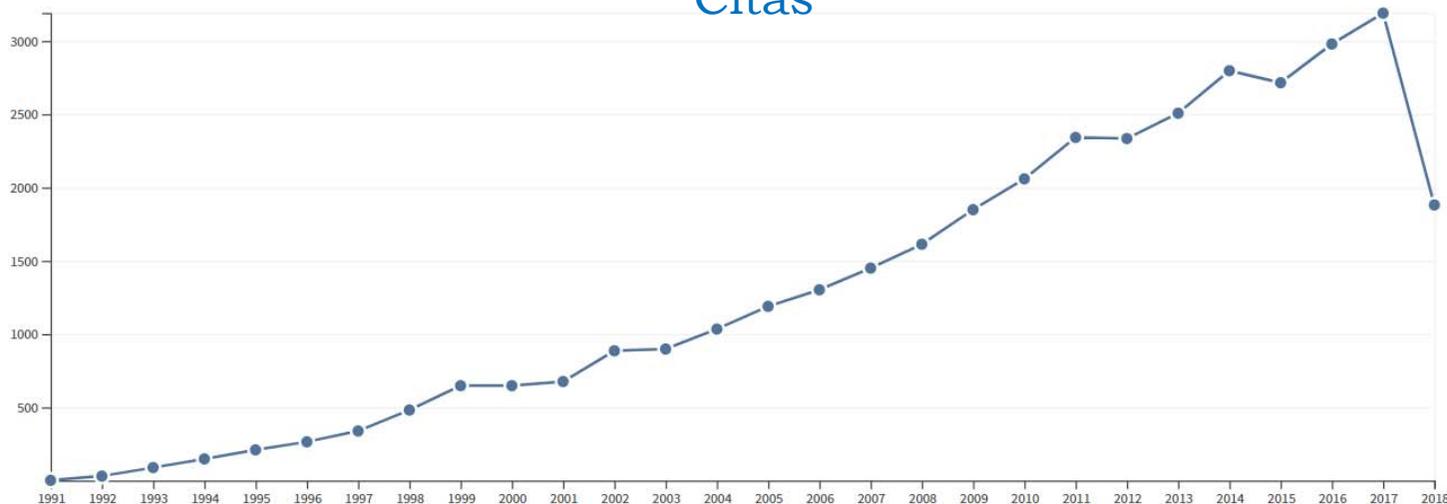


Difusión en RMN para el estudio de mezclas

Publicaciones



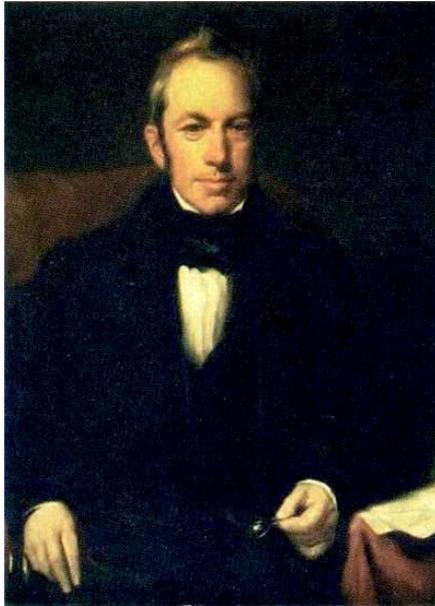
Citas



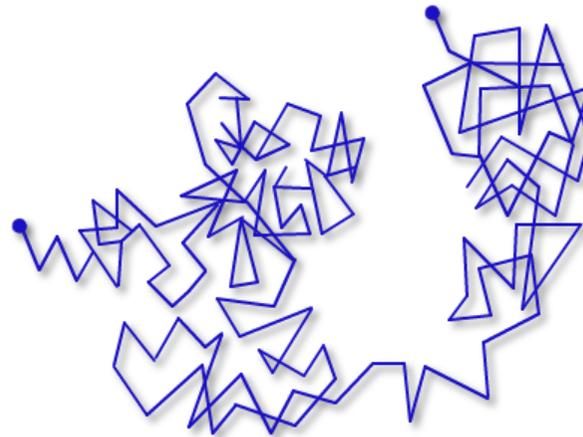
Fundamentos de la difusión

Difusión molecular traslacional

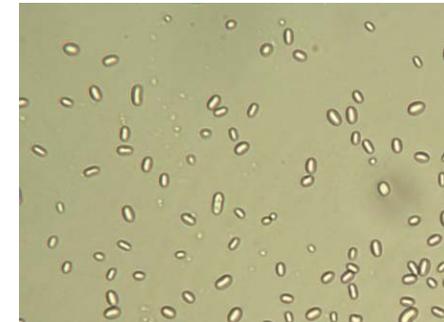
Movimiento Browniano



Robert Brown
(1773-1858)



Movimiento aleatorio de las partículas en estado líquido debido a las colisiones entre todas las partículas presentes en el medio



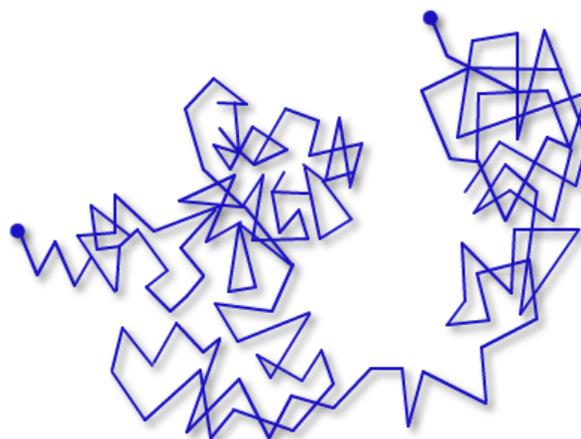
La difusión traslacional es debida al movimiento Browniano de la moléculas en disolución en ausencia de fuerzas externas (como gradientes de concentración o campos eléctricos)

Difusión molecular traslacional

Movimiento Browniano



Robert Brown
(1773-1858)



Movimiento aleatorio de las partículas en estado líquido debido a las colisiones entre todas las partículas presentes en el medio

$$\langle r_{xyz} \rangle_{t \rightarrow \infty} = 0$$

$$Z_{rms} = \sqrt{6Dt}$$

Coeficiente de auto-difusión

El coeficiente de auto-difusión molecular traslacional describe cuanto se ha movido una molécula en un medio específico durante un intervalo de tiempo

Coeficiente de (auto)difusión traslacional

Stokes-Einstein



George G. Stokes
(1819-1903)

$$D = \frac{kT}{f} \quad f = 6\pi\eta r$$

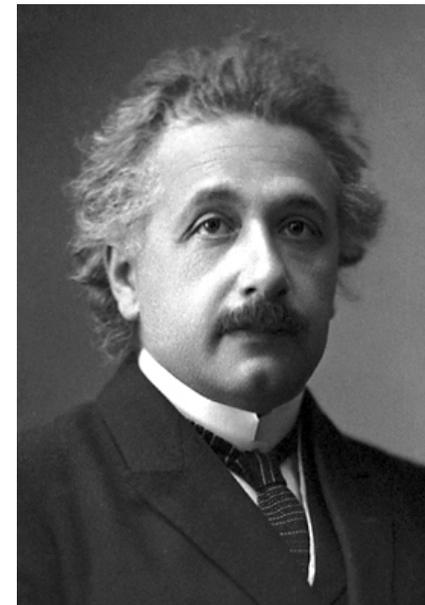
k : Constante de Boltzman

T : Temperatura

f : Coeficiente de fricción

η : Viscosidad del medio

r : Radio de la esfera



Albert Einstein
(1879-1955)

Aproximación:

Disolución homogénea

Tamaño disolvente \ll soluto

Partícula esférica

Coeficiente de (auto)difusión traslacional

Stokes-Einstein

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

k : Constante de Boltzman

T : Temperatura

η : Viscosidad del medio

r : Radio de la esfera

Mayor
difusión



Menor
difusión

La difusión depende:

- Tamaño y forma del soluto $\uparrow r \Rightarrow \downarrow D$
- Temperatura $\uparrow T \Rightarrow \uparrow D$
- Viscosidad del disolvente $\uparrow \eta \Rightarrow \downarrow D$

Tamaño y forma del soluto

Stokes-Einstein

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_h}$$

El radio hidrodinámico, r_h

Radio efectivo de una partícula esférica

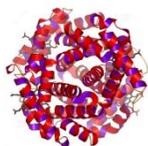
$$r_h = \sqrt[3]{\frac{3M\bar{v}}{4\pi N}}$$

M : Peso molecular

\bar{v} : Volumen específico parcial

N : Número de Avogadro

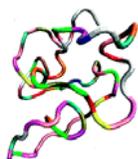
Difusión – Radio hidrodinámico – Peso molecular



Moléculas de geometría esféricas

$$r_h \propto \sqrt[3]{M}$$

$$D \propto \frac{1}{\sqrt[3]{M}}$$



Moléculas de geometría plana aleatoria

$$r_h \propto \sqrt{M}$$

$$D \propto \frac{1}{\sqrt{M}}$$



Molécula lineares rígidas

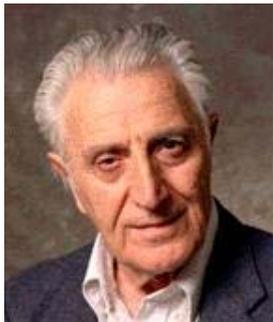
$$r_h \propto M$$

$$D \propto \frac{1}{M}$$

Experimento básico de difusión

Eco de espín

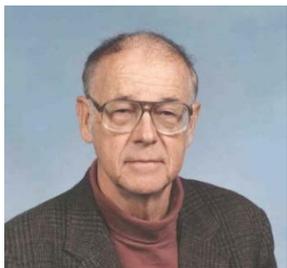
Los primeros experimentos



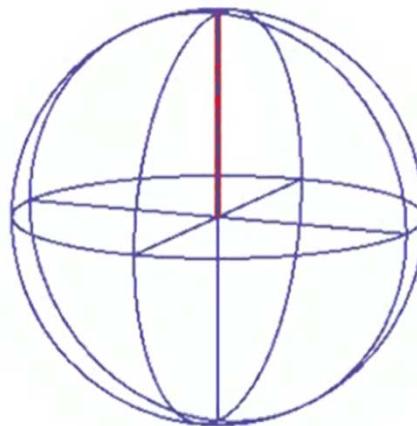
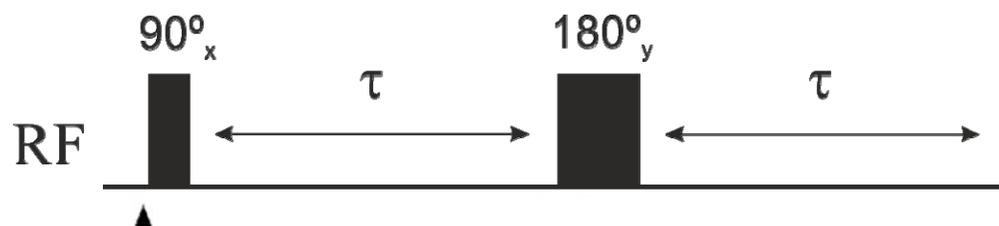
Erwin L. Hahn
(1921-2016)



Edward M. Purcell
(1912-1997)

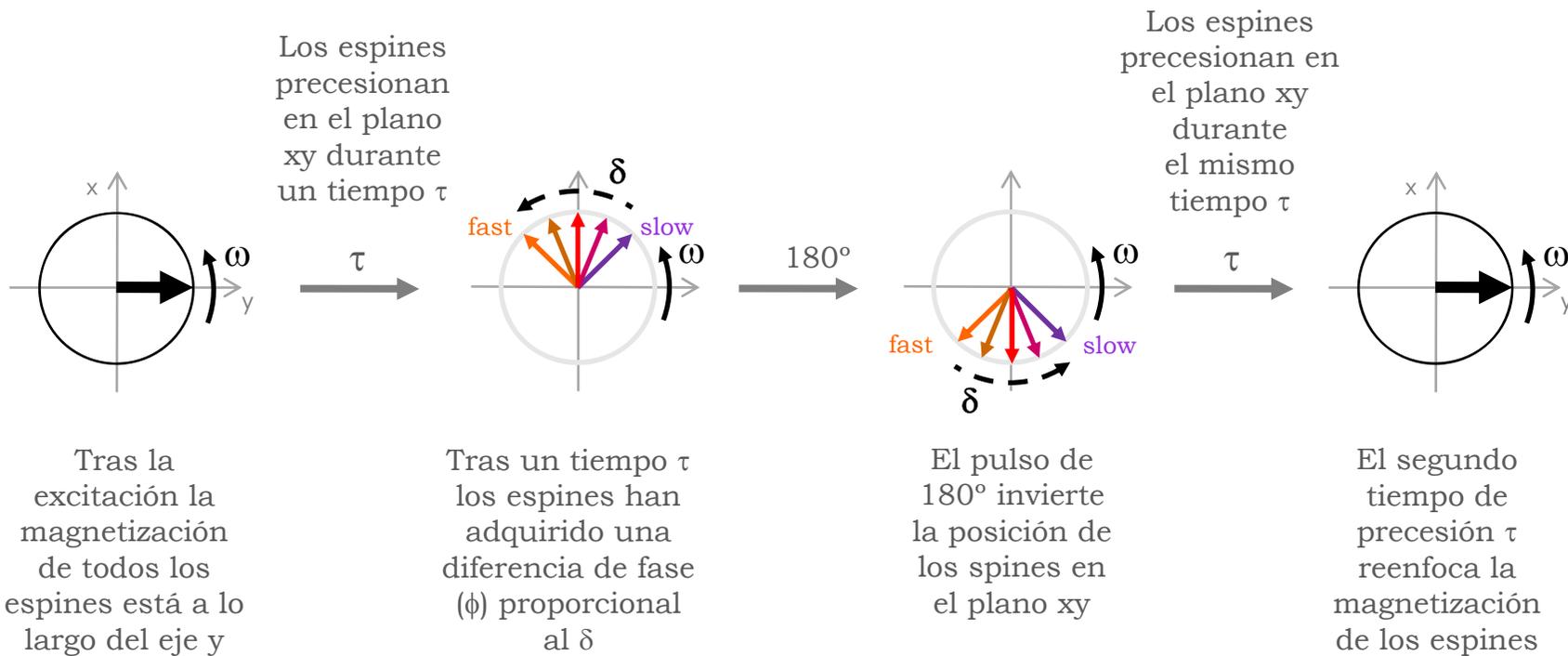
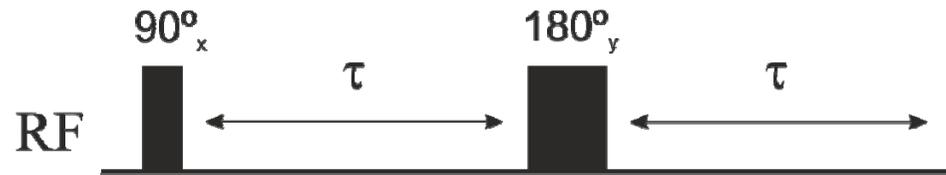


Herman L. Carr
(1924-2008)



Eco de espín

Reenfoque de la magnetización



Eco de espín



Erwin L. Hahn
(1921-2016)

PHYSICAL REVIEW VOLUME 80, NUMBER 4 NOVEMBER 15, 1950

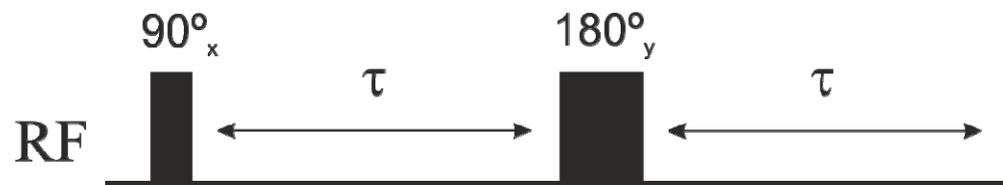
Spin Echoes*†

E. L. HAHN‡
Physics Department, University of Illinois, Urbana, Illinois
 (Received May 22, 1950)

V. CONCLUDING REMARKS

Simple principles of the free nuclear induction technique have been described and tested, principally with proton and fluorine (F^{19}) signals in liquids. Data which is made available by this technique is to be presented later in more systematic detail. The echo technique appears to be highly suitable as a fast and stable method in searching for unknown resonances. Intense pulses of H_1 provide a broad spectrum of frequencies. This makes possible the observation of free induction signals far from exact resonance. Echo signals have proved useful for the measurement of relaxation times under conditions where interference effects (microphonics, thermal drifts, oscillator noise) encountered in conventional resonance methods are avoided. The self-diffusion effect in liquids of low viscosity offers a means of measuring relative values of the self-diffusion coefficient D , a quantity which is very difficult to measure by ordinary methods. It is of technical interest to consider the possibility of applying echo patterns as a type of memory device.

“...The self-diffusion effect in liquids of low viscosity offers a means of measuring relative values of the self-diffusion coefficient, D ...”

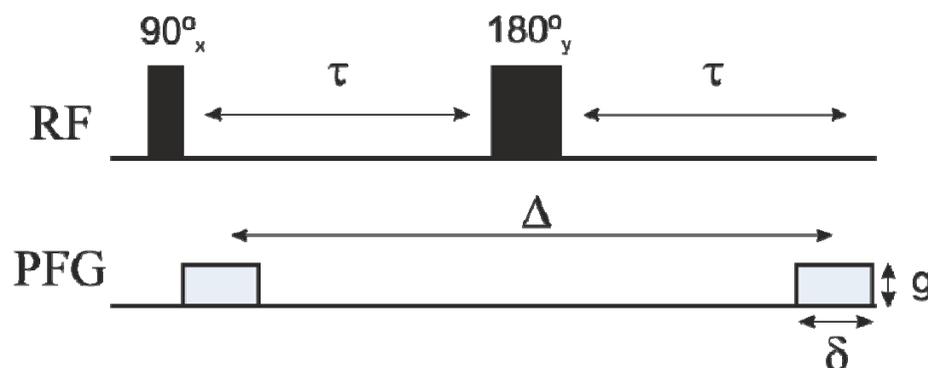


Eco de espín con gradientes

Stejskal-Tanner



Edward O. Stejskal



John E. Tanner

En presencia de un gradiente de campo magnético, la difusión de las moléculas durante Δ hace que los espines pierdan la coherencia de la fase

$$I = I_0 e^{-\left(\frac{2\tau}{T_2}\right)} e^{-(D\gamma^2\delta^2g^2\Delta)}$$

I_0 : Intensidad de la señal en ausencia del eco de spin

2τ : Tiempo total del eco

T_2 : Constante de relajación transversal

D : Constante de difusión

γ : Constante giromagnética

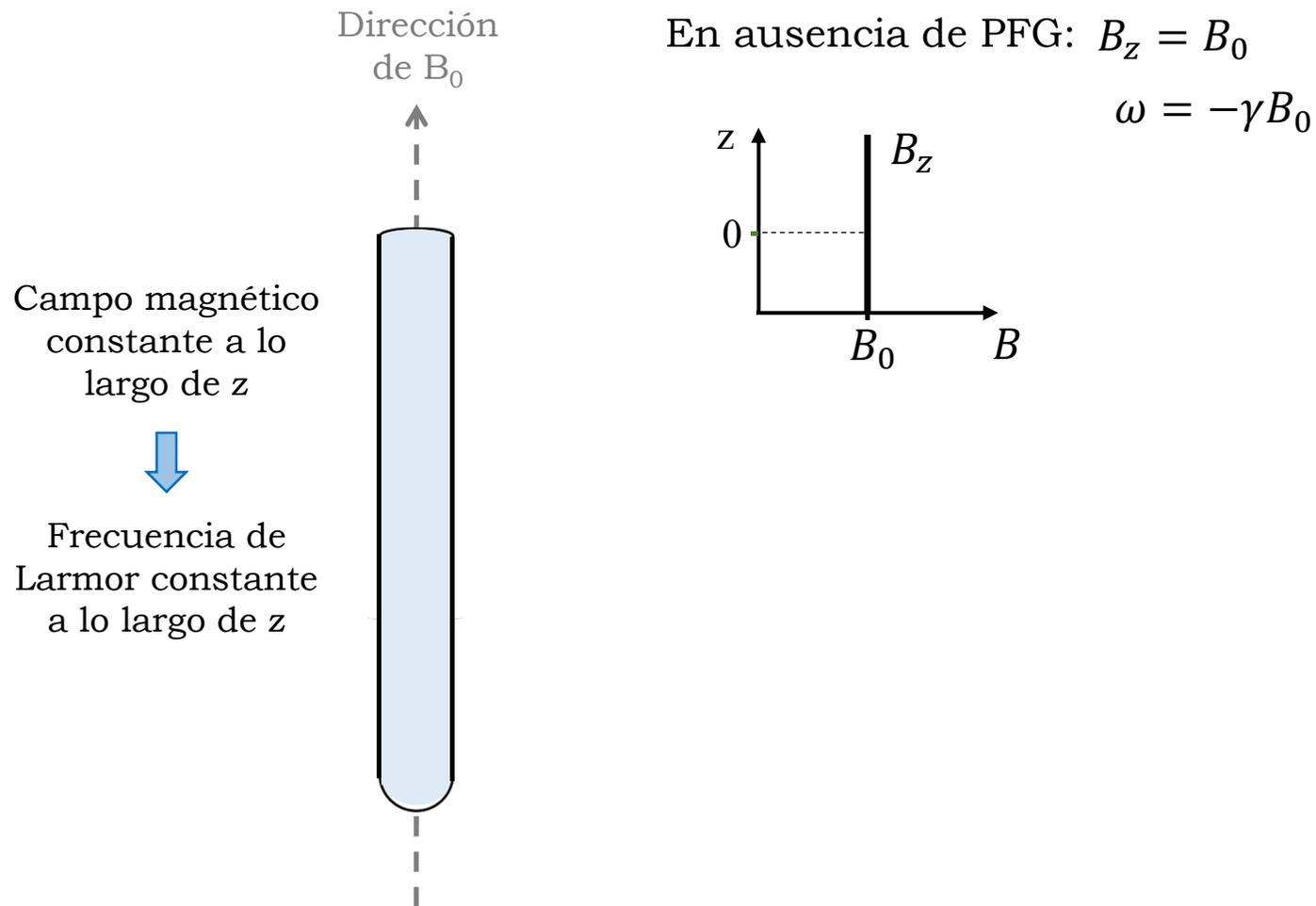
δ : Duración del gradiente

g : Fuerza del gradiente

Δ : Tiempo de difusión

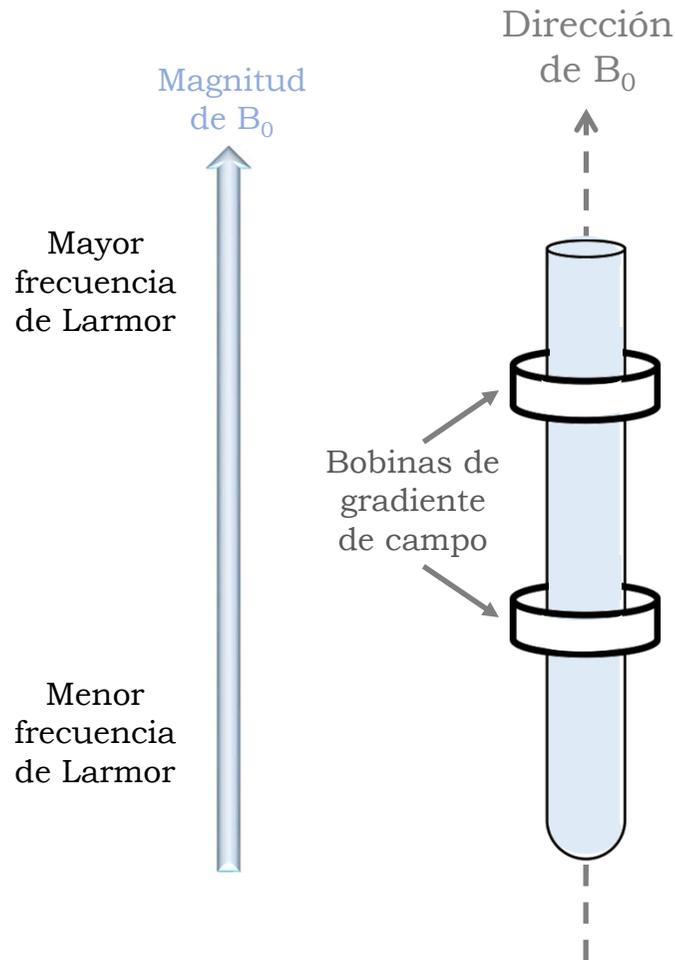
Eco de espín con gradientes

Gradientes de campo magnético (PFG)



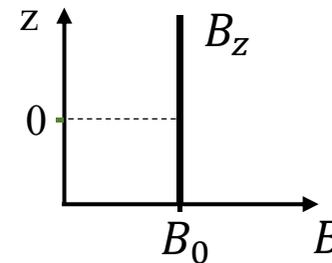
Eco de espín con gradientes

Gradientes de campo magnético (PFG)



En ausencia de PFG: $B_z = B_0$

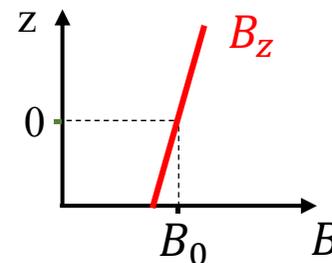
$$\omega = -\gamma B_0$$



Frecuencia de Larmor constante a lo largo de z

En presencia de PFG: $B_z = B_0 + zG_z$

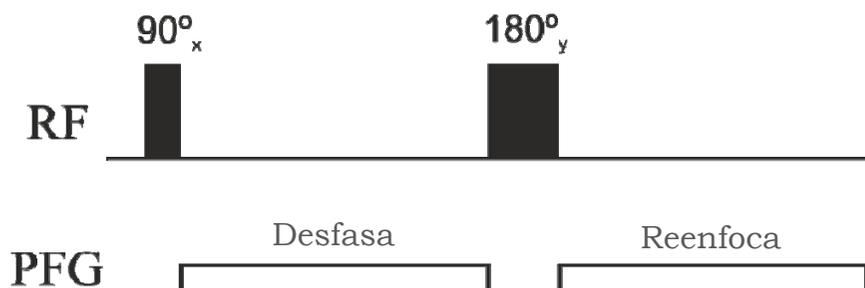
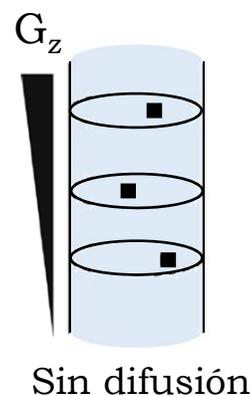
$$\omega = -\gamma(B_0 + zG_z)$$



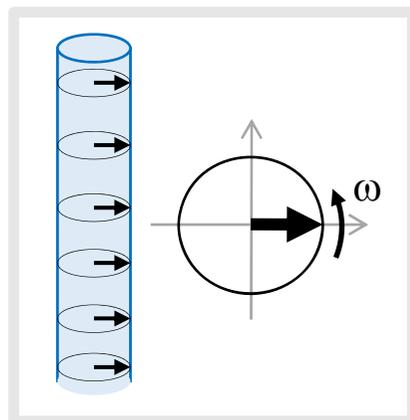
Frecuencia de Larmor varía linealmente a lo largo de z

Eco de espín con gradientes

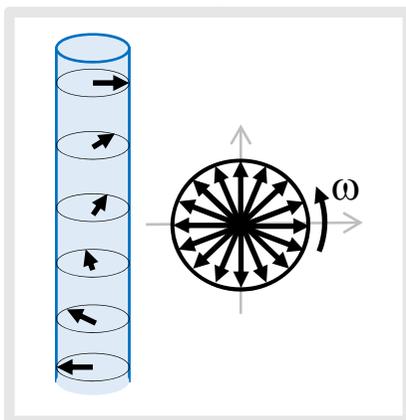
Eco de espín con gradientes de campo (PFGSE)



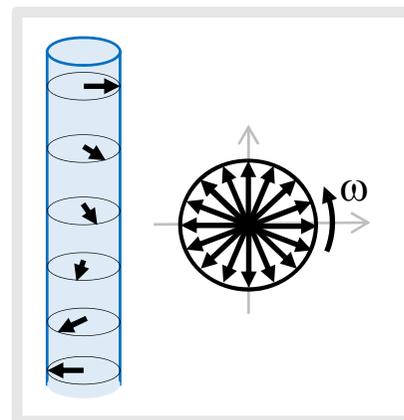
La pérdida de coherencia en M_x/M_y causada por la inhomogeneidad de B_0 al usar PFG es reversible



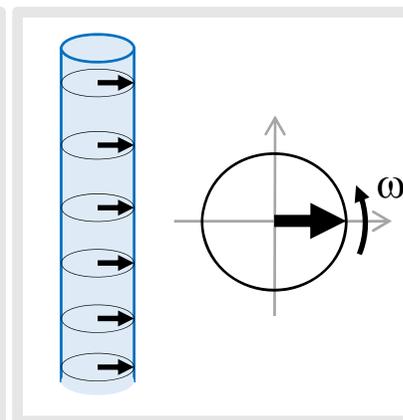
Tras la excitación de todos los espines está a lo largo del eje y



Cada espín precesiona con una frecuencia diferente dependiendo de su posición



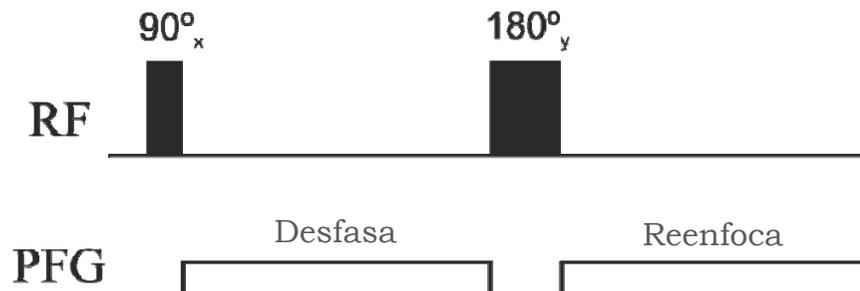
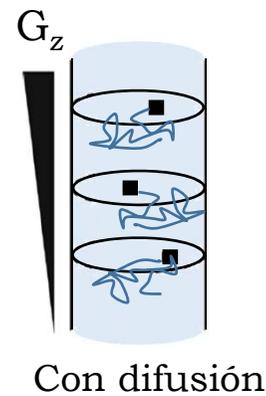
El pulso de 180° invierte todos los espines



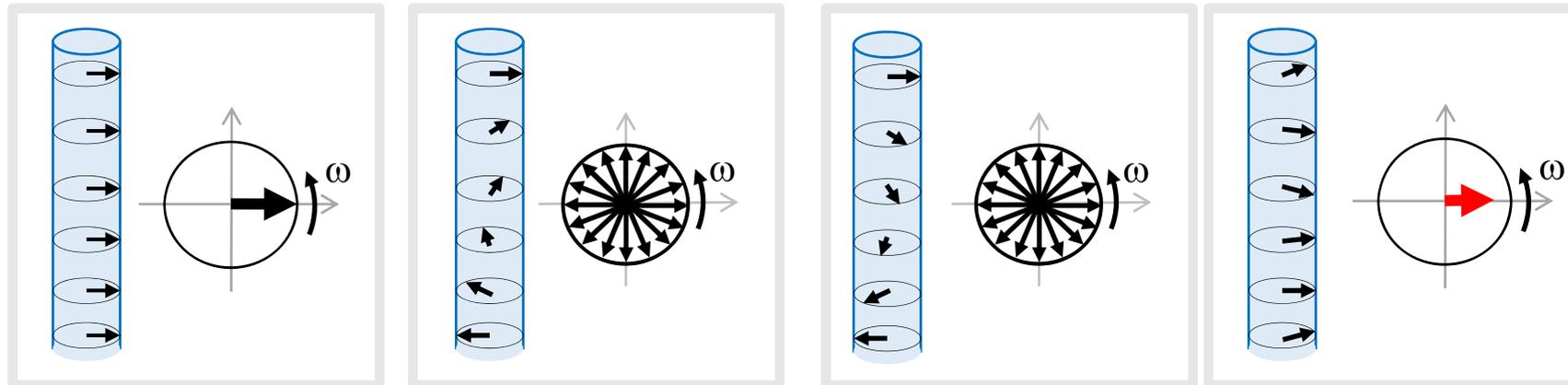
Todos los espines son reenfocados **si no se han desplazado**

Eco de espín con gradientes

Eco de espín con gradientes de campo (PFGSE)



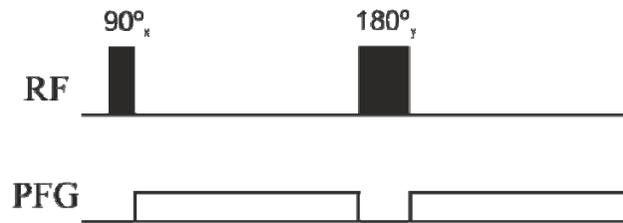
La pérdida de coherencia en M_x/M_y causada por el movimiento Browniano es irreversible



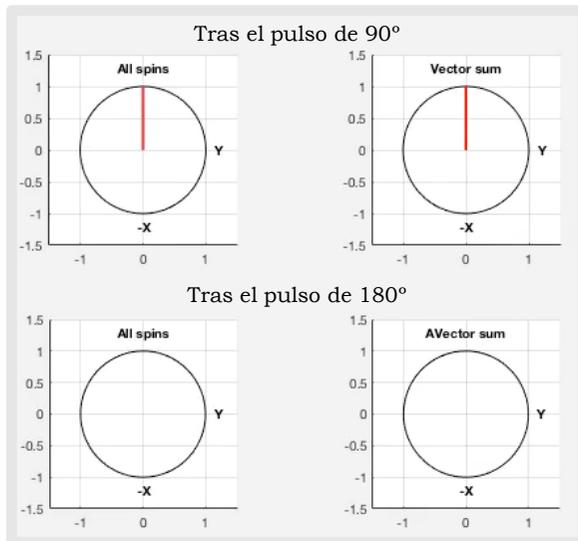
Debido al **movimiento Browniano** de las partículas a lo largo de la muestras durante el curso del experimento no todos los espines son perfectamente reenfocados lo que provoca una **atenuación de la señal**

Eco de espín con gradientes

Efecto de la difusión y los gradientes



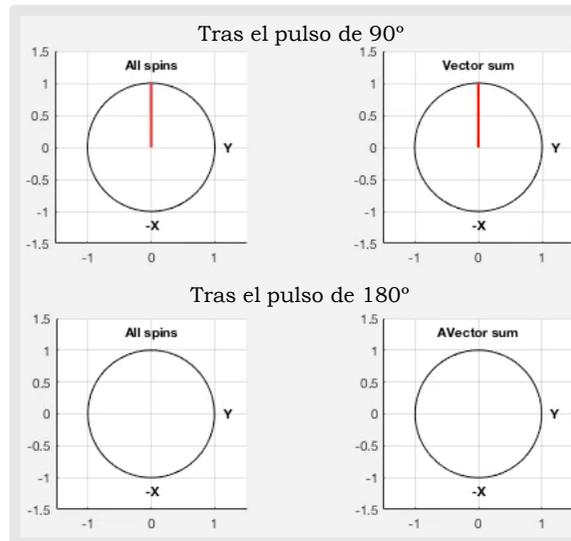
Efecto de los PFG



Pérdida de coherencia reversible

Diferente (pero estática) posición de cada espín durante el gradiente

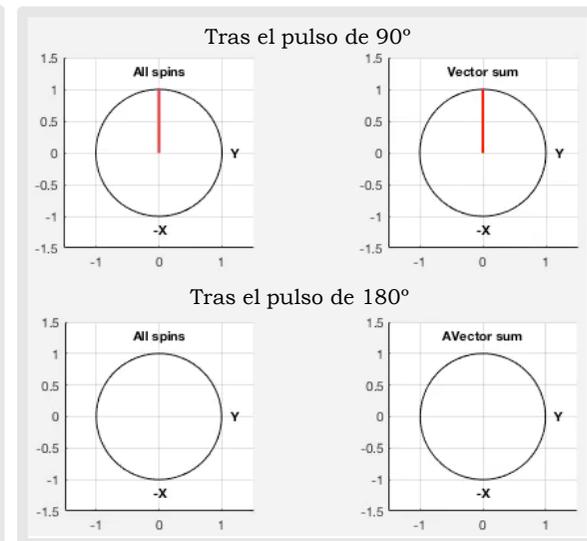
Efecto de la difusión



Pérdida de coherencia irreversible

Cambio aleatorio de la posición de cada espín durante el gradiente

Efecto de ambos



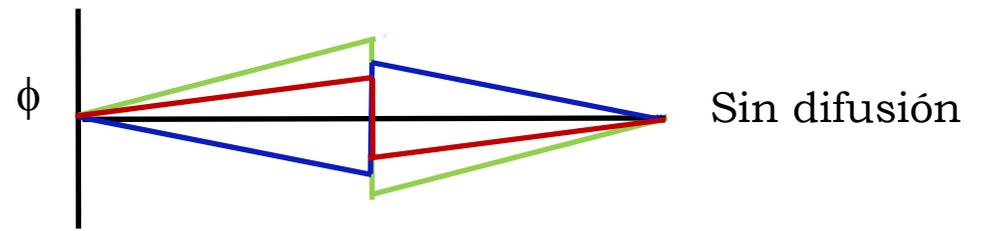
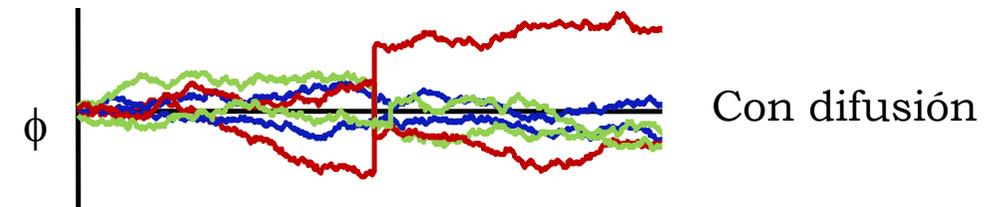
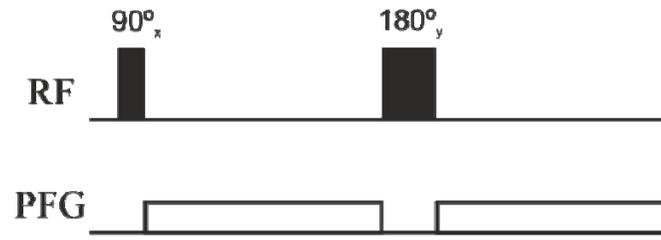
La pérdida de coherencia provoca una

atenuación de la señal

Eco de espín con gradientes

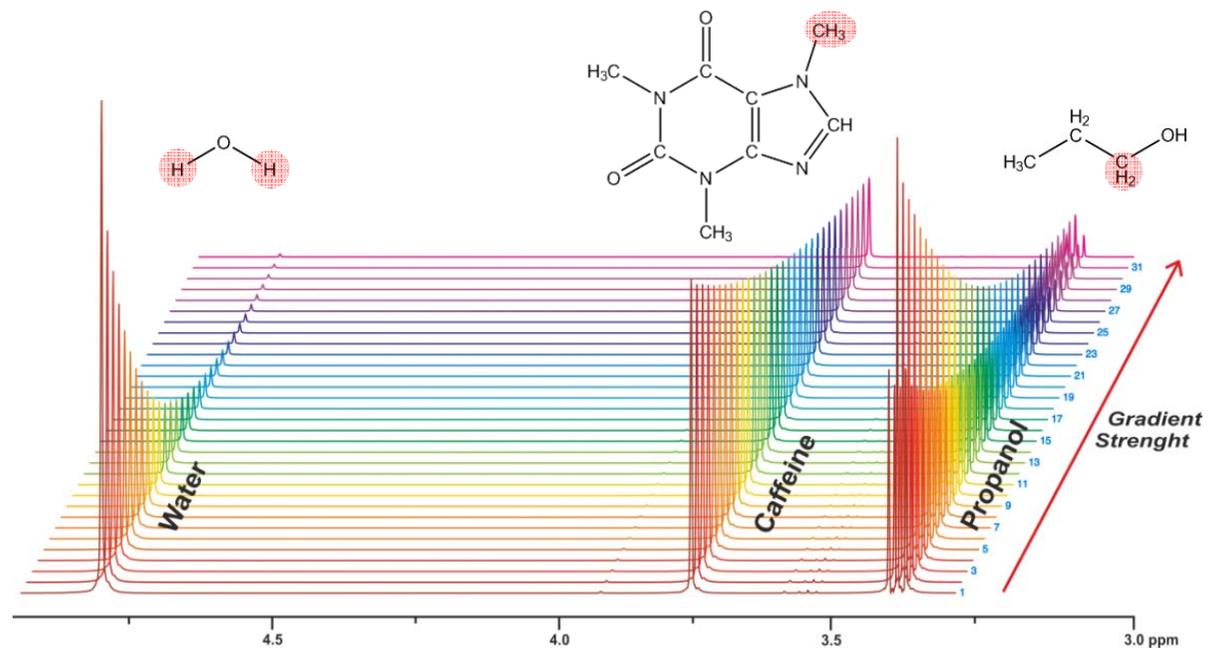
Influencia del tamaño y la forma de las partículas

Menor tamaño
 ↓
 Mayor difusión
 ↓
 Mayor pérdida de coherencia
 ↓
 Mayor atenuación de la señal



$$D \propto \frac{1}{r_h} \quad I \propto e^{-D}$$

Análisis de mezclas mediante experimentos de difusión



$$I = I_0 e^{-\left(\frac{2\tau}{T_2}\right)} e^{-\left(D\gamma^2\delta^2g^2\Delta\right)}$$

Diferenciación de los componentes basada en los diferentes D

Información físico-química de los componentes

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta \sqrt[3]{\frac{3M\bar{v}}{4\pi N}}}$$

I - Introducción:

Análisis de mezclas por RMN

Fundamentos de difusión en RMN

Experimento básico de difusión

II – Aspectos prácticos

Experimentos de difusión

Adquisición de los datos

Análisis de los datos

III – Limitaciones-soluciones

Solapamiento de señales

Convección

Mismo coeficiente de difusión

IV – Software

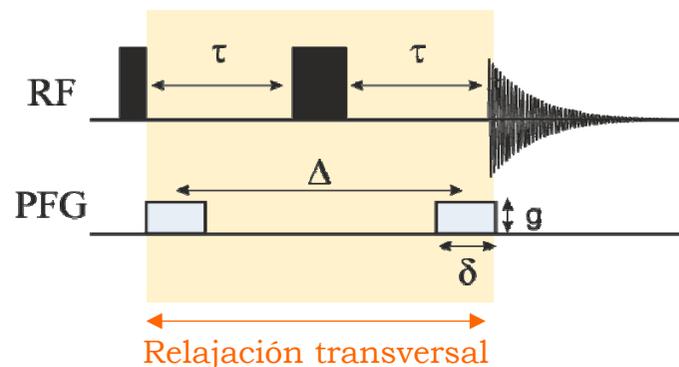
GNAT

MAGNATE

Experimentos de difusión

PFGSE vs PFGSTE

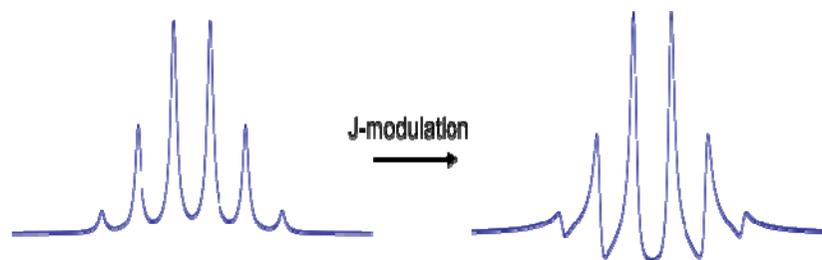
Eco de espín con gradientes de campo (PFGSE)



Durante todo el experimento la magnetización está en el plano xy

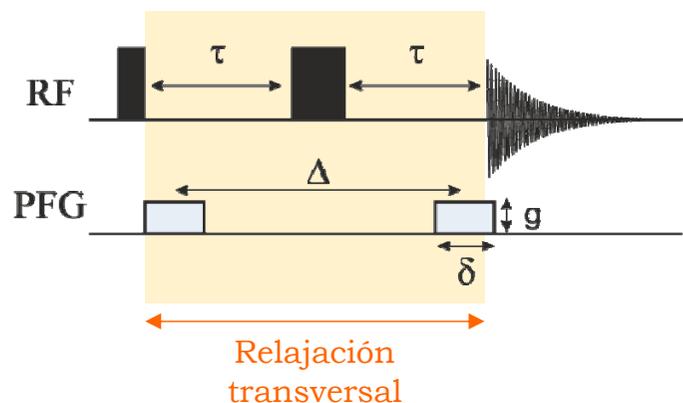
Consecuencias:

- El valor de Δ no puede ser muy largo (pérdida de señal por relajación T_2)
- Distorsión de las señales debido a su modulación con la constante de acoplamiento escalar (J) durante 2τ



PFGSE vs PFGSTE

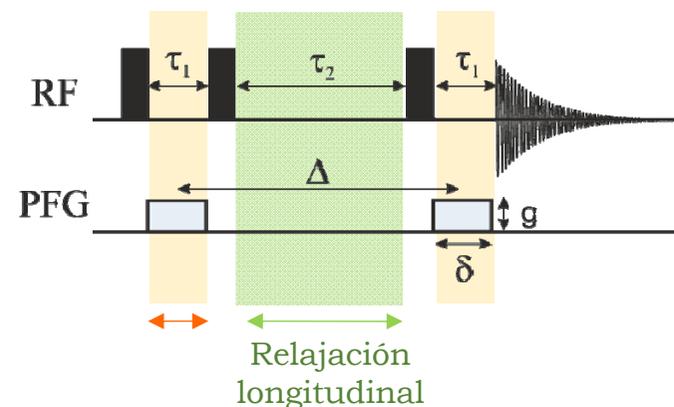
PFGSE



Limitaciones:

- Δ limitado por T_2 de los componentes
- Distorsión de las señales (evolución de J)

Stimulated-echo (PFGSTE)



Beneficios:

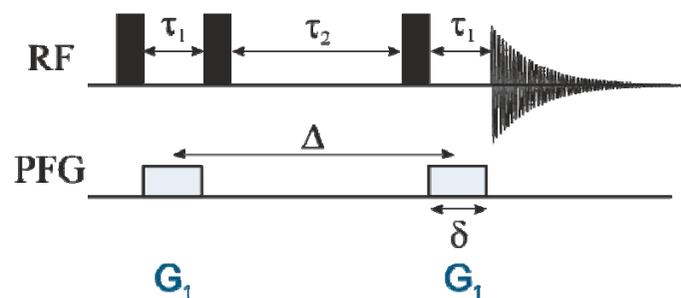
- Durante Δ la magnetización esta la mayor parte del tiempo en z ($\tau_1 \sim 1 - 5$ ms; $\tau_2 \sim 20 - 200$ ms) por lo que se reduce:
 - La pérdida de señal por relajación transversal
 - La modulación de J

Inconvenientes:

- Solo uno de los componentes de la magnetización transversal es detectado (la sensibilidad se reduce a la mitad)

Mejora de los experimentos PFGSTE

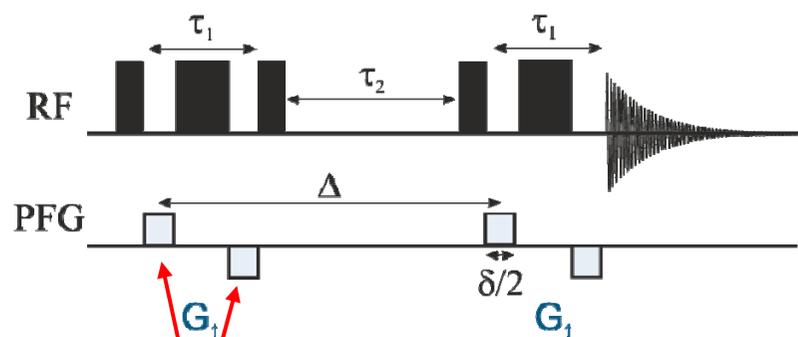
PFGSTE



✗ Distorsión del *lock*

✗ Corrientes de Foucault

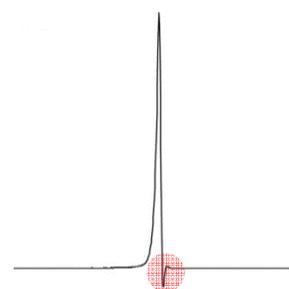
Bipolar Pulse Pair (BPP-STE)



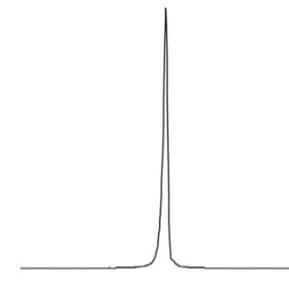
gradientes bipolares

El par de gradientes bipolares (BBP) compensan la distorsión del *lock*

✓ Eliminación de la distorsión de las señales debida al desfase del *lock*



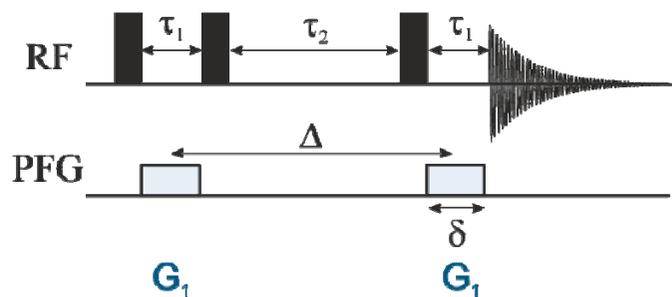
PFGSTE



BBP-STE

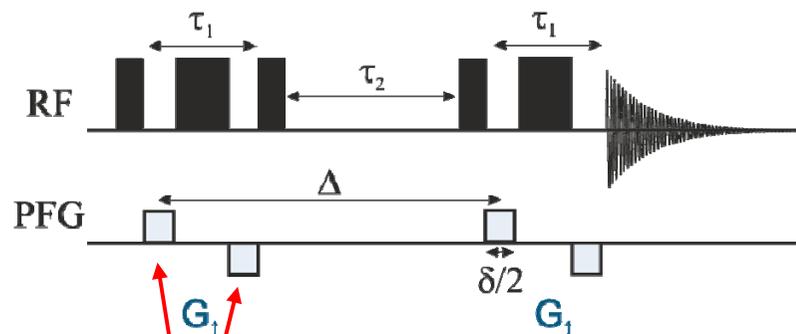
Mejora de los experimentos PFGSTE

PFGSTE



- ✗ Distorsión del *lock*
- ✗ Corrientes de Foucault

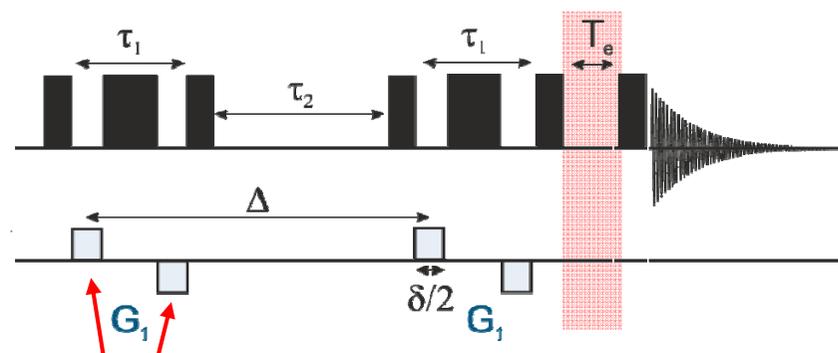
BPP-STE



gradientes bipolares

- ✓ Compensación de la distorsión del *lock*

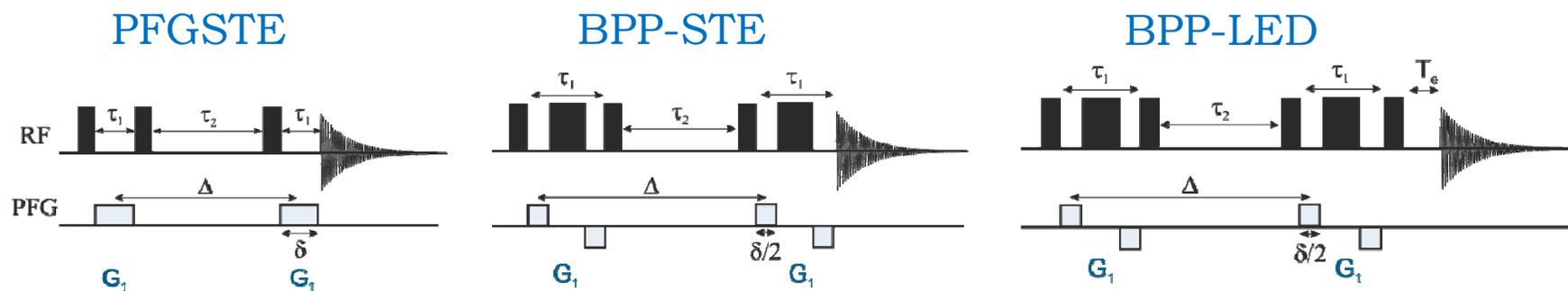
Longitudinal Eddy current Delay BPP-LED



gradientes bipolares

- ✗ Compensación de la distorsión del *lock*
- ✗ Reducción de la corrientes de Foucault (*eddy current*)

Mejora de los experimentos PFGSTE

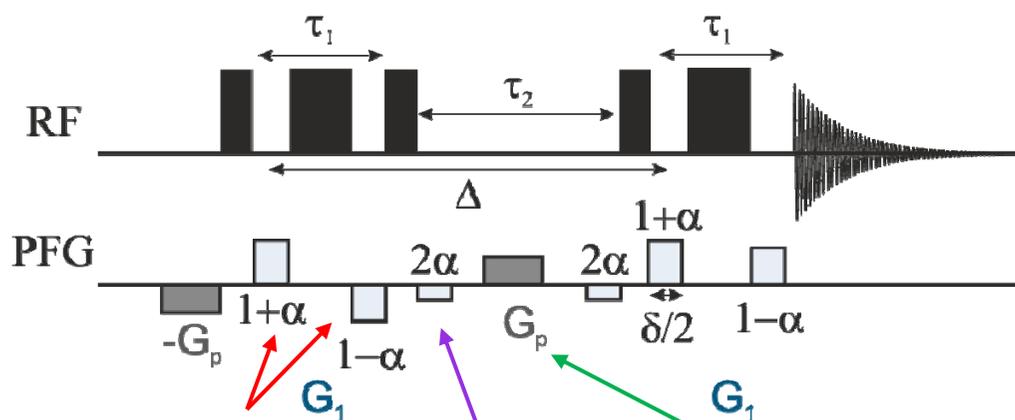


- ✗ Ciclado de fases exhaustivo
- ✗ Distorsión del lock
- ✗ Corrientes de Foucault

- ✗ Ciclado de fases exhaustivo
- ✗ Corrientes de Foucault

- ✗ Ciclado de fases exhaustivo

One-shot



✓ No necesita un ciclado de fases exhaustivo

Lock
Eddy current
Ciclo de fases ←

Gradientes bipolares
asimétricos
 $\alpha \sim 0.1-0.2$

Gradiente de
compensación

Gradiente
de purga

→ Selección
magnetización
longitudinal

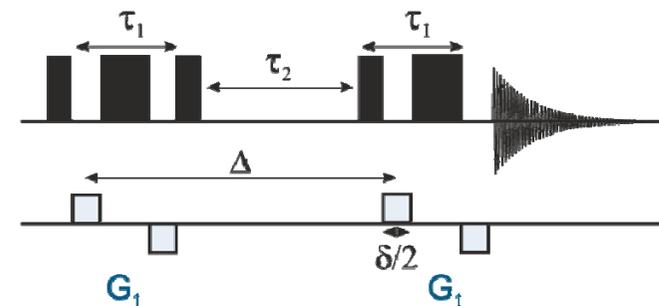
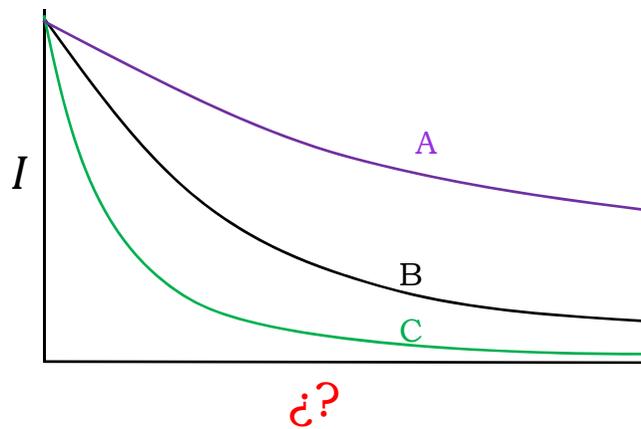
Adquisición de los datos experimentales

¿Cómo codificar la difusión?

Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Stejskal-Tanner

$$I = I_0 e^{-\left(\frac{2\tau_1}{T_2} + \frac{\tau_2}{T_1}\right)} e^{-\left(D\gamma^2 \delta^2 G_1^2 \Delta\right)}$$

Duración del gradiente
Fuerza del gradiente
Tiempo de difusión



¿Cómo codificar la difusión?

Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Stejskal-Tanner

$$I = I_0 e^{-\left(\frac{2\tau_1}{T_2} + \frac{\tau_2}{T_1}\right)} e^{-\left(D\gamma^2 \delta^2 G_1^2 \Delta\right)}$$

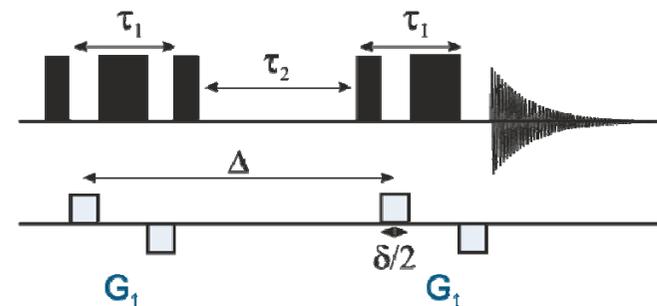
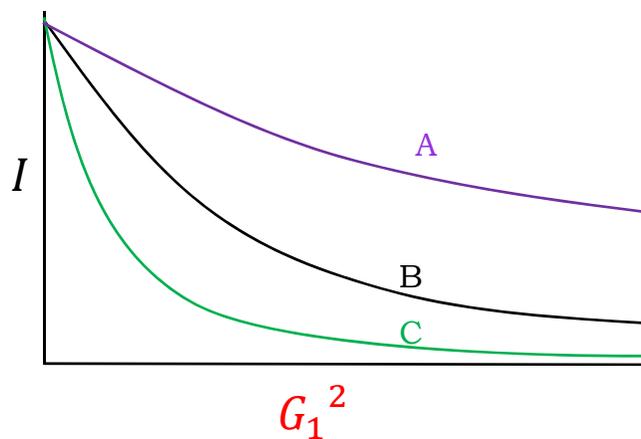
Fuerza del
gradiente

Duración del
gradiente

Tiempo de
difusión

Variación no deseada

Óptimo: relajación constante
en todos los incrementos



¿Cómo codificar la difusión?

Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Stejskal-Tanner

$$I = I_0 e^{-\left(\frac{2\tau_1}{T_2} + \frac{\tau_2}{T_1}\right)} e^{-\left(D\gamma^2 \delta^2 G_1^2 \Delta\right)}$$

I_{G_0}

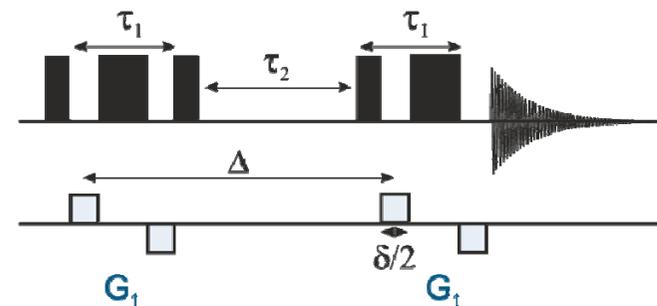
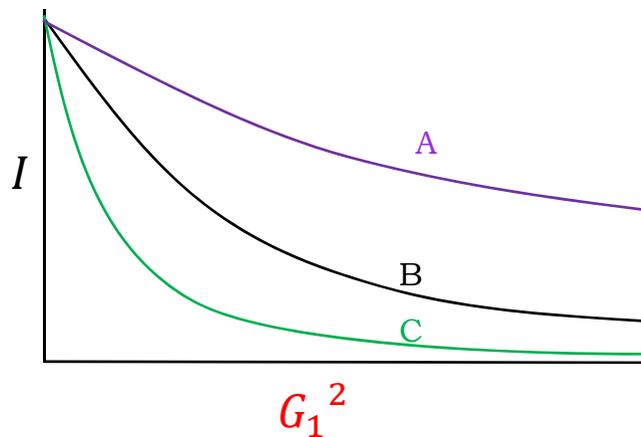
Fuerza del
gradiente

Duración del
gradiente

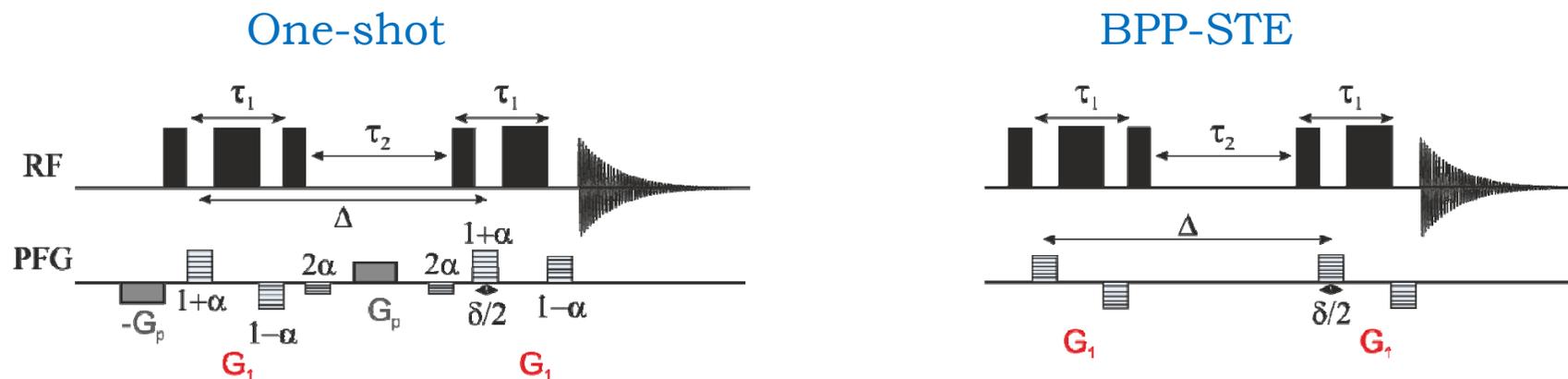
Tiempo de
difusión

Variación no deseada

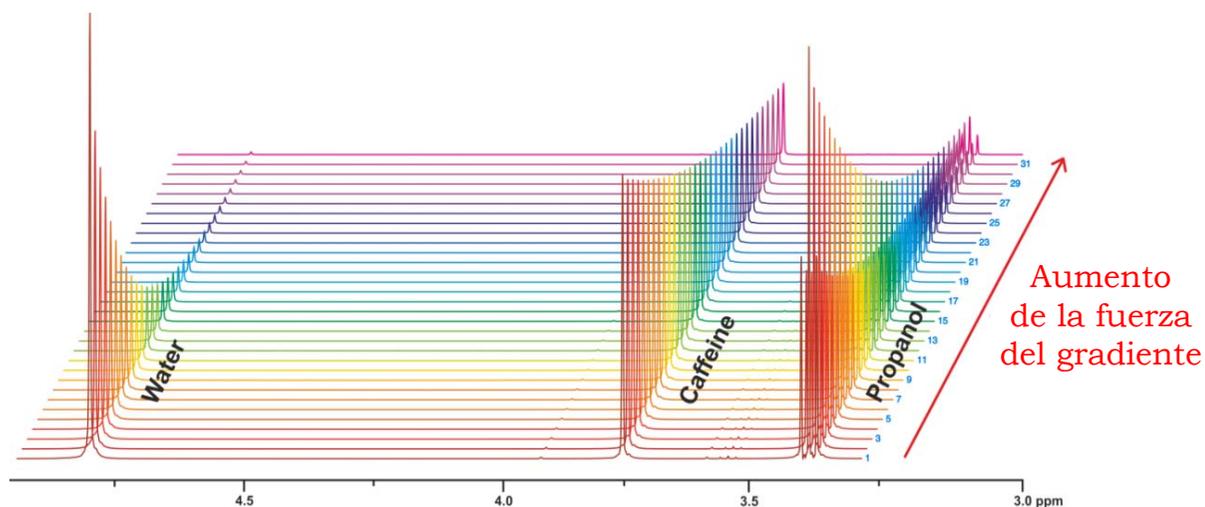
Óptimo: relajación constante
en todos los incrementos



Codificación de la difusión con la fuerza de los gradientes



$$I = I_{G_0} e^{-(D\gamma^2 \delta^2 G_1^2 \Delta)}$$



Optimización de los parámetros experimentales

Factores que afectan al coeficiente de difusión

Los parámetros experimentales tienen que ser optimizados para cada muestra

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_h}$$

Temperatura

Viscosidad del disolvente

Tamaño y forma del soluto

Proceso de optimización

1° - Determinar las condiciones físicas óptimas

- Concentración
- Disolvente
- Temperatura

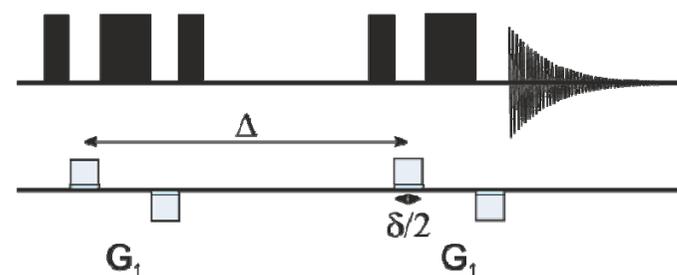
2° - Optimizar los parámetros relacionados con el experimento

- Tiempo de difusión
- Duración de los gradientes
- Rango de la fuerza de gradientes

Optimización de los parámetros de difusión

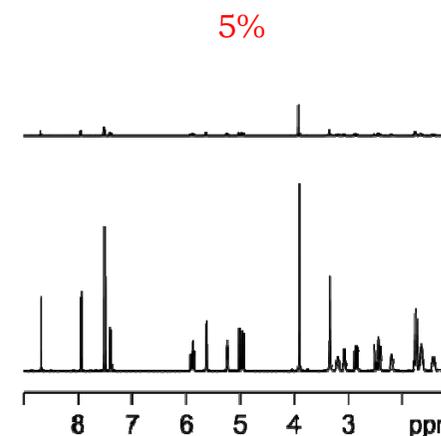
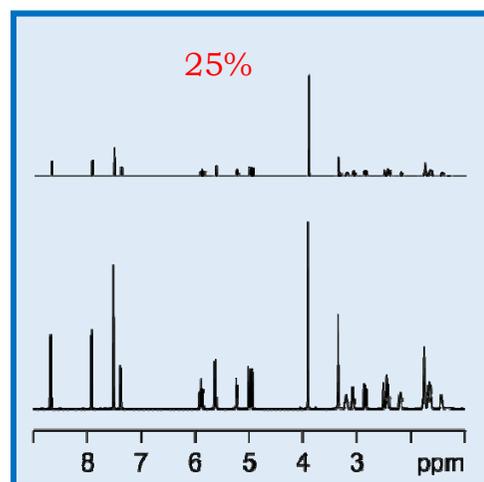
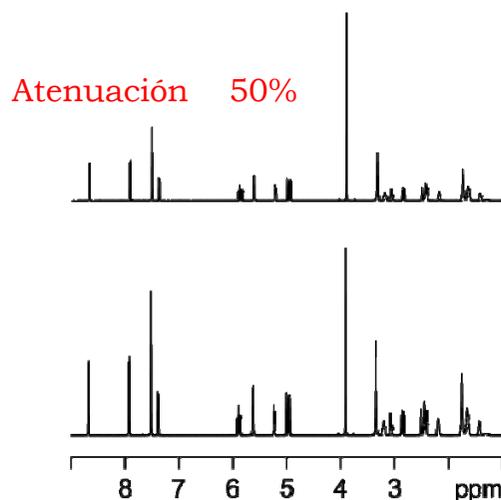
Proceso iterativo

- Definir el tiempo de difusión
 - Moléculas pequeñas: $\Delta \approx 50-200$ ms
 - Moléculas grandes: $\Delta \approx 200-1000$ ms
- Definir la duración de los gradientes
 - $\delta \approx 1-5$ ms ⚠
- Optimizar el rango de los gradientes
 - $G_{\min} \approx 10\%$
 - $G_{\max} \approx 70-80\%$ ⚠



Atenuación óptima

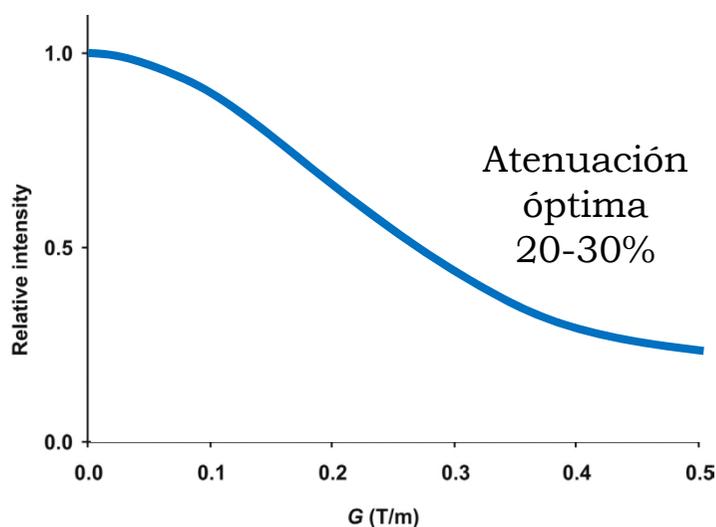
20-30%



Optimización de los parámetros de difusión

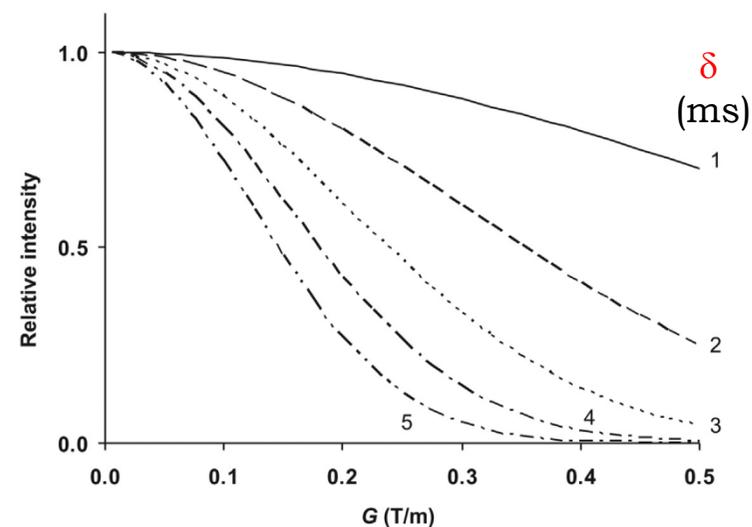
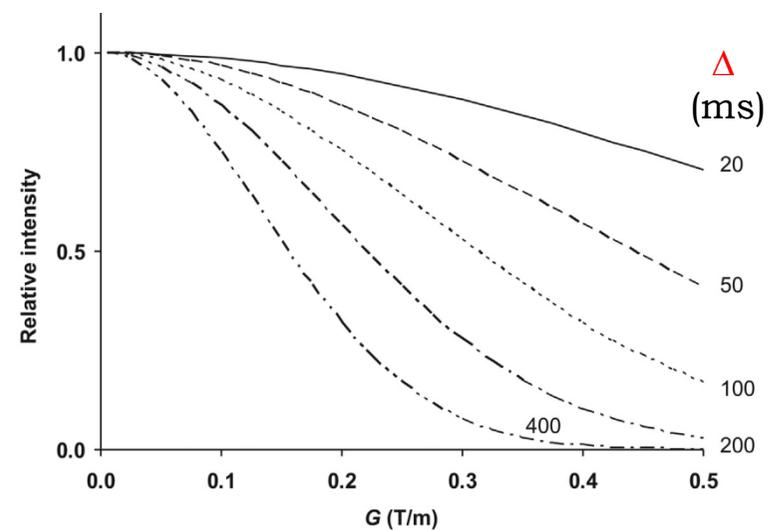
Proceso iterativo

$$I = I_{G_0} e^{-(D\gamma^2\delta^2 G_1^2 \Delta)}$$



$\uparrow \Delta \Rightarrow \uparrow$ Atenuación ($\propto \Delta$)
 $\Rightarrow \uparrow$ Relajación (T_1)

$\uparrow \delta \Rightarrow \uparrow$ Atenuación ($\propto \delta^2$)



Análisis de los datos experimentales

Ajuste de los datos a la ecuación apropiada

Stejskal-Tanner

$$I = I_{G_0} e^{-(D\gamma^2 \delta^2 G_1^2 \Delta')}$$

Experimento
Forma gradiente

Δ' for the Most Common Diffusion Pulse Sequences as a Function of Gradient Shape

Gradient pattern	Monopolar	Bipolar	Unbalanced bipolar (one-shot)
Rectangle	$\left[\Delta - \frac{\delta}{3} \right]$	$\left[\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2} \right]$	$\left[\Delta - \frac{(2-\alpha^2)\delta}{6} - \frac{\tau(1-\alpha^2)}{2} \right]$
Sine bell	$\frac{4}{\pi^2} \left[\Delta - \frac{\delta}{4} \right]$	$\frac{4}{\pi^2} \left[\Delta - \frac{5\delta}{16} - \frac{\tau}{2} \right]$	$\frac{4}{\pi^2} \left[\Delta - \frac{(5-3\alpha^2)\delta}{16} - \frac{\tau(1-\alpha^2)}{2} \right]$
Square sine bell	$\frac{1}{4} \left[\Delta - \left(\frac{1}{3} - \frac{5}{4\pi^2} \right) \delta \right]$	$\frac{1}{4} \left[\Delta - \left(\frac{1}{3} - \frac{5}{16\pi^2} \right) \delta - \frac{\tau}{2} \right]$	$\frac{1}{4} \left[\Delta - \frac{\left(\left(2 - \frac{15}{8\pi^2} \right) - \left(1 + \frac{15}{8\pi^2} \right) \alpha^2 \right) \delta}{6} - \frac{\tau(1-\alpha^2)}{2} \right]$
Trapezoid	$\frac{81}{100} \left[\Delta - \frac{3,667\delta}{12,150} \right]$	$\frac{81}{100} \left[\Delta - \frac{15,817\delta}{48,600} - \frac{\tau}{2} \right]$	$\frac{81}{100} \left[\Delta - \frac{(15,817 - 8,483\alpha^2)\delta}{48,600} - \frac{\tau(1-\alpha^2)}{2} \right]$
Smoothed rectangle	$\frac{81}{100} \left[\Delta - \frac{1,484\pi^2 - 207}{4,860\pi^2} \delta \right]$	$\frac{81}{100} \left[\Delta - \frac{6,344\pi^2 - 207}{19,440\pi^2} \delta - \frac{\tau}{2} \right]$	$\frac{81}{100} \left[\Delta - \frac{[(3,367\pi^2 - 207)\alpha^2 + (6,344\pi^2 - 207)]\delta}{19,440\pi^2} - \frac{\tau(1-\alpha^2)}{2} \right]$

PFGSTE

BPP-STE

One-shot

¿Cómo obtener los valores de difusión?

Stejskal-Tanner

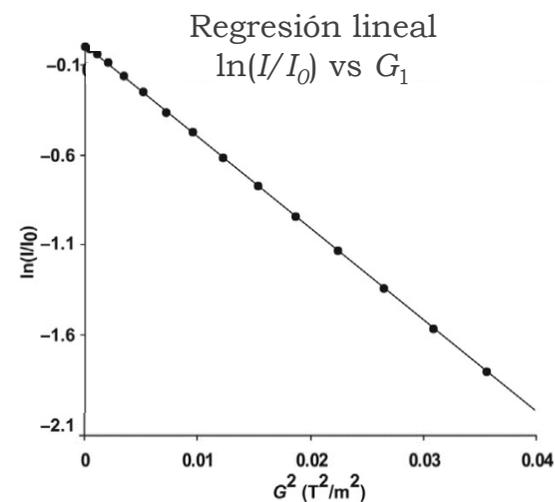
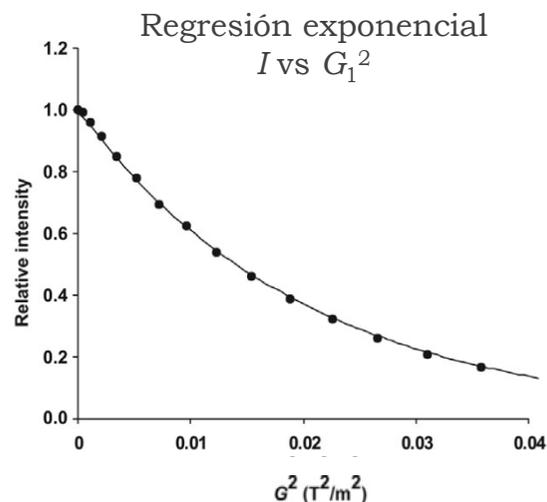
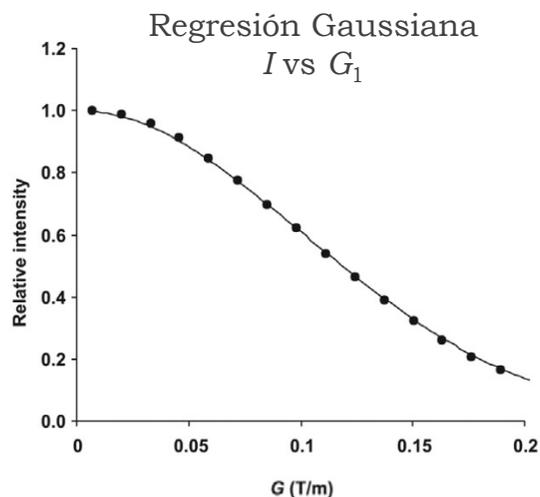
$$I = I_{G_0} e^{-(D\gamma^2 \delta^2 G_1^2 \Delta')}$$

Ajuste del decaimiento de las señales en función del área de los gradientes



Determinación de D + Error estándar

Representación y ajuste de los datos experimentales

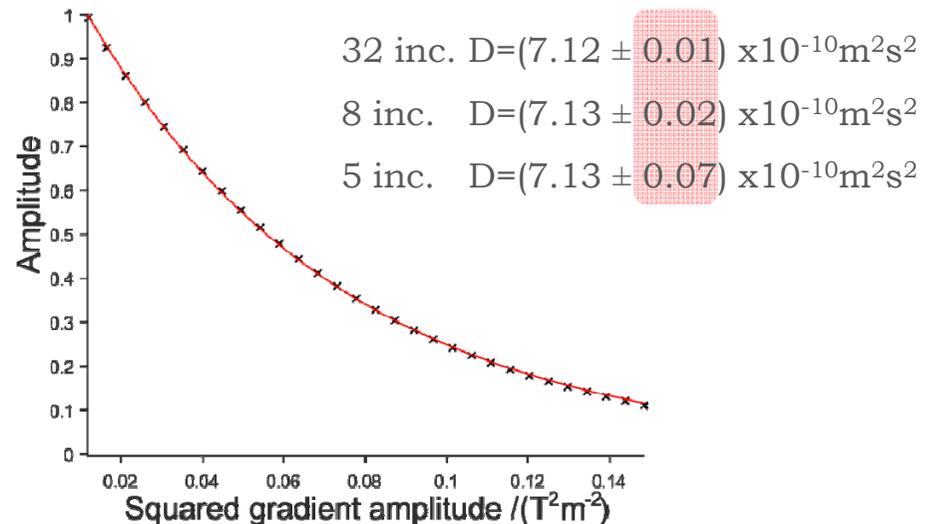


Parámetros que afectan al ajuste

Parámetros de adquisición

La calidad del ajuste depende de:

- Relación señal-ruido **> 100**
- Atenuación de la señal **20-30%**
- Numero de gradientes **8-20**



Otros parámetros a considerar:

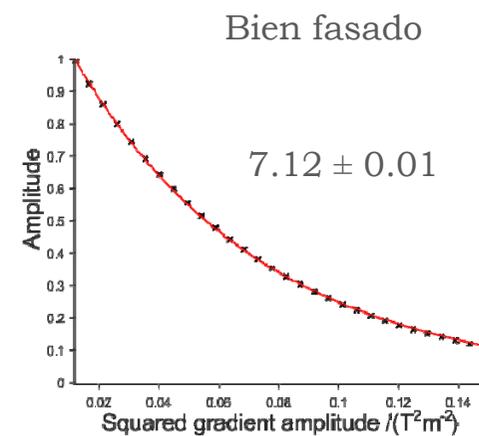
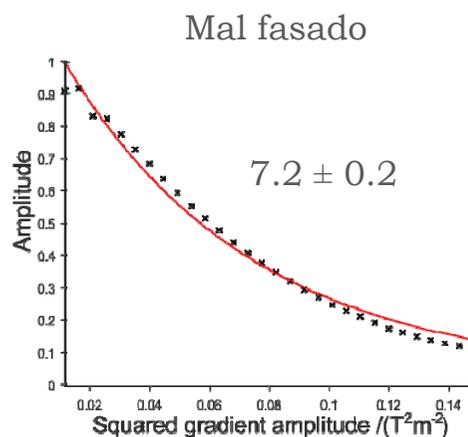
- Ventana de adquisición (afecta a la corrección de la línea base)
- Incrementación cuadrática (no lineal)
- Numero de scans (afecta a la relación señal-ruido y a la selección de coherencia)

Parámetros que afectan al ajuste

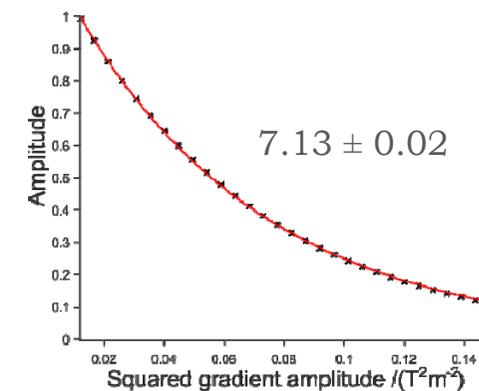
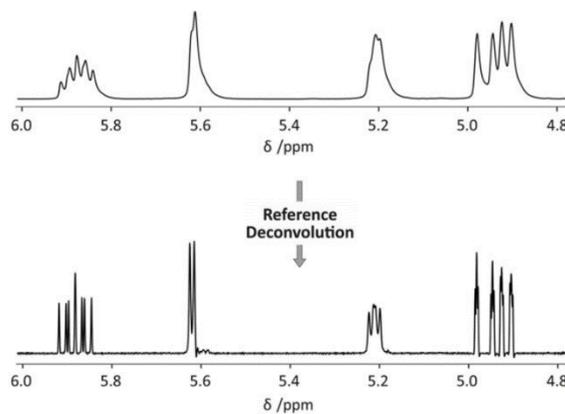
Parámetros de procesamiento

La calidad del ajuste depende de:

- Fasado del espectro



- Reference deconvolution
(TSP o TMS)



Tipos de análisis de los datos

Análisis univariante

Ajuste de la variación de las señales individualmente

En el análisis de mezclas:

- ✓ Diferencias en el coeficiente de difusión (normalmente >5%)
- ✗ Solapamiento (parcial o total) de las señales de los distintos componentes
- ✓ Número de componentes

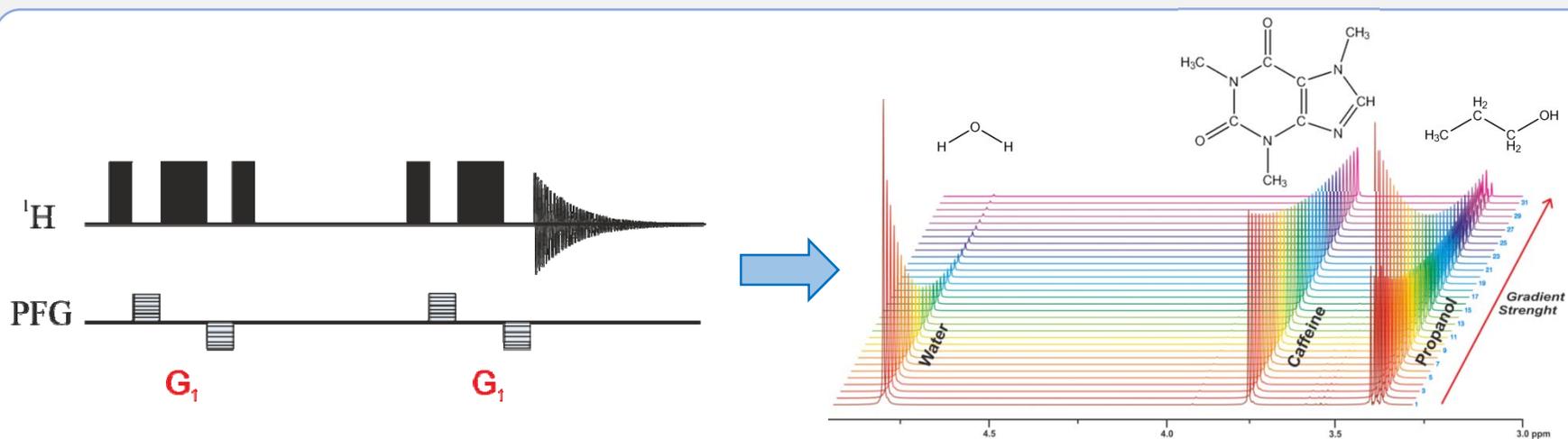
Análisis multivariante

Ajuste del espectro como un todo

En el análisis de mezclas:

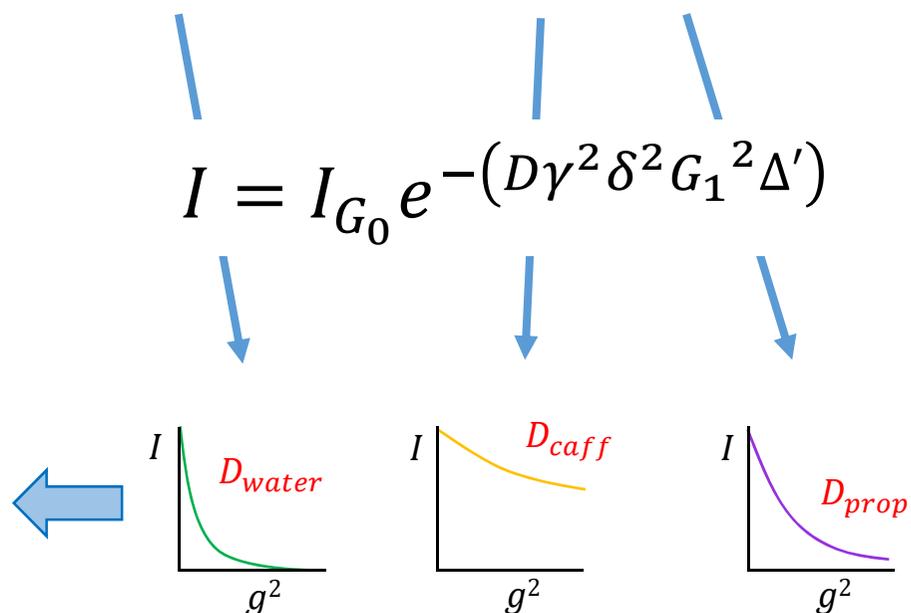
- ✗ Diferencias en el coeficiente de difusión (normalmente >30%)
- ✓ Solapamiento (parcial o total) de las señales de los distintos componentes
- ✗ Número de componentes (2-5)

Análisis univariante



$$I = I_{G_0} e^{-(D\gamma^2 \delta^2 G_1^2 \Delta')}$$

Frequency	Diff coef1	error
3.45598	8.40595	0.12559
3.46927	8.92506	0.12118
3.48271	8.31934	0.13264
3.79066	5.45490	0.12161
3.79170	5.41969	0.02017
4.71136	15.14912	0.00703

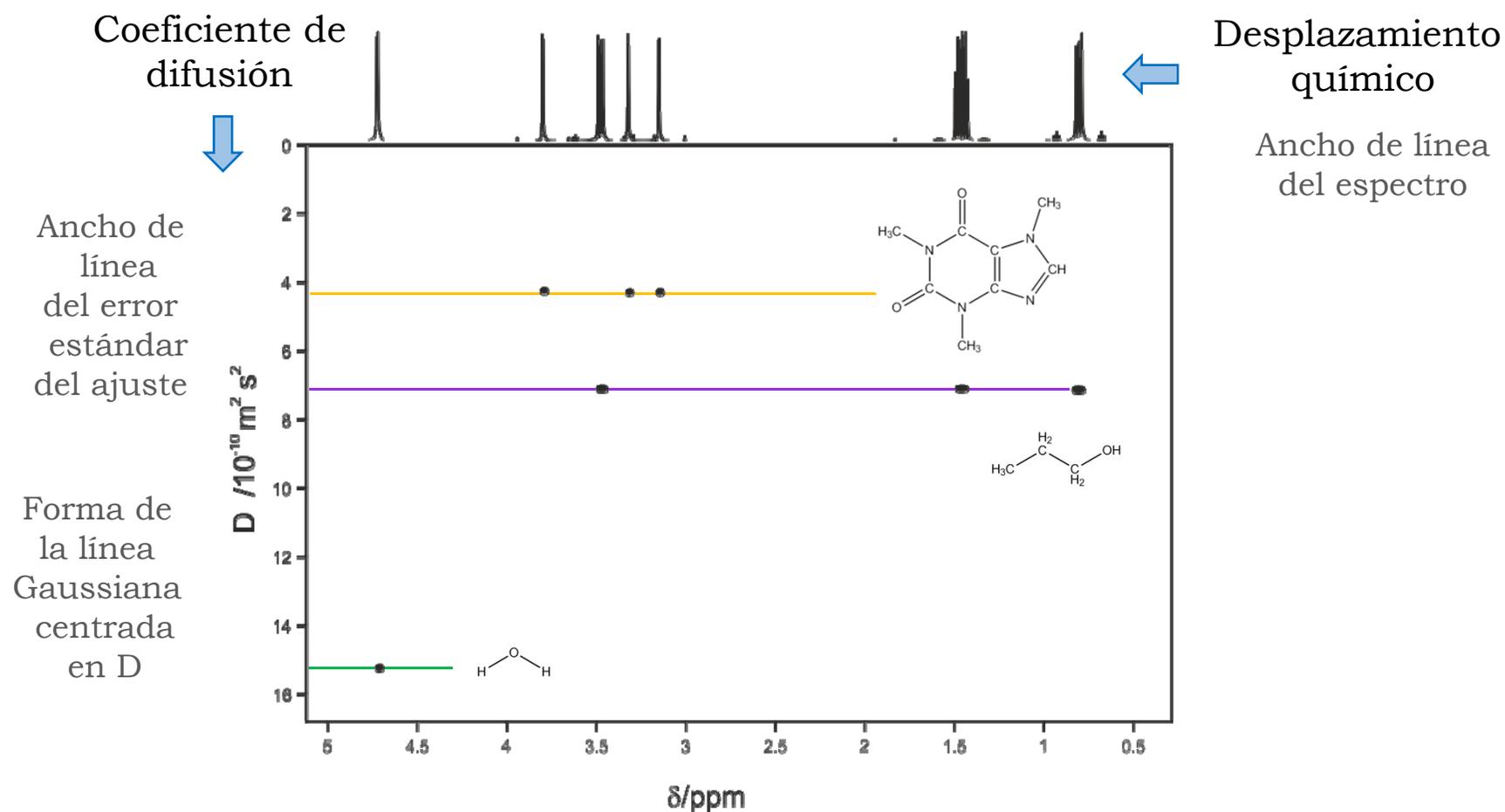


+ error del ajuste

Análisis univariante

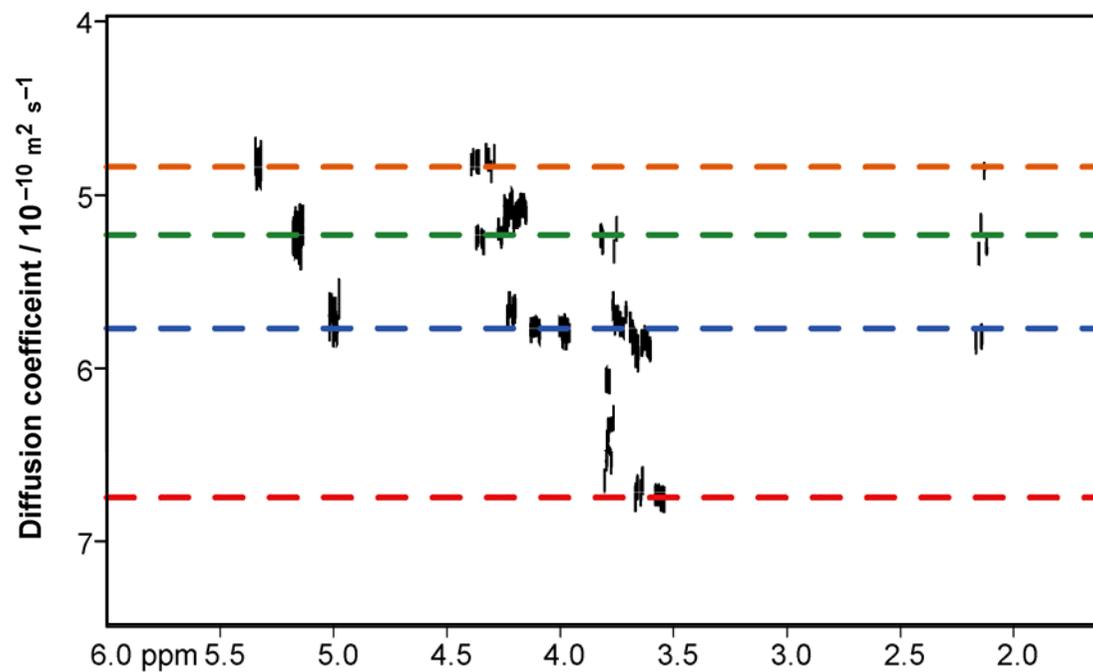
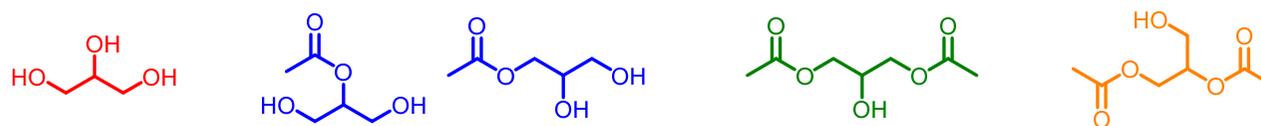
Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)

Espectro 2D sintético (pseudo-2D)



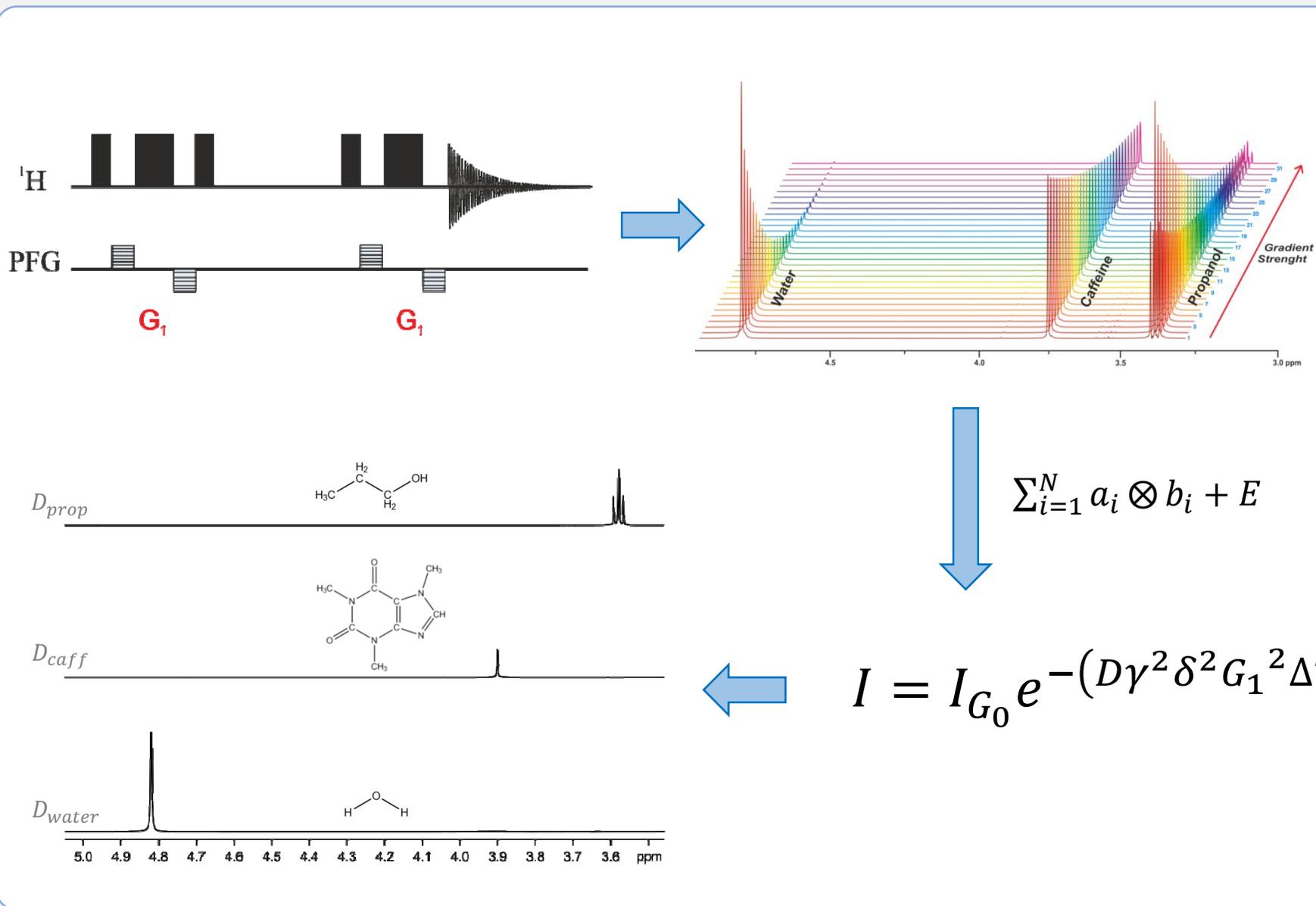
Análisis univariante

Análisis de crudos de reacción



Espectro HR-DOSY de una mezcla de glicerol y mono-m di- y triacetina en D_2O

Análisis multivariante



Análisis multivariante

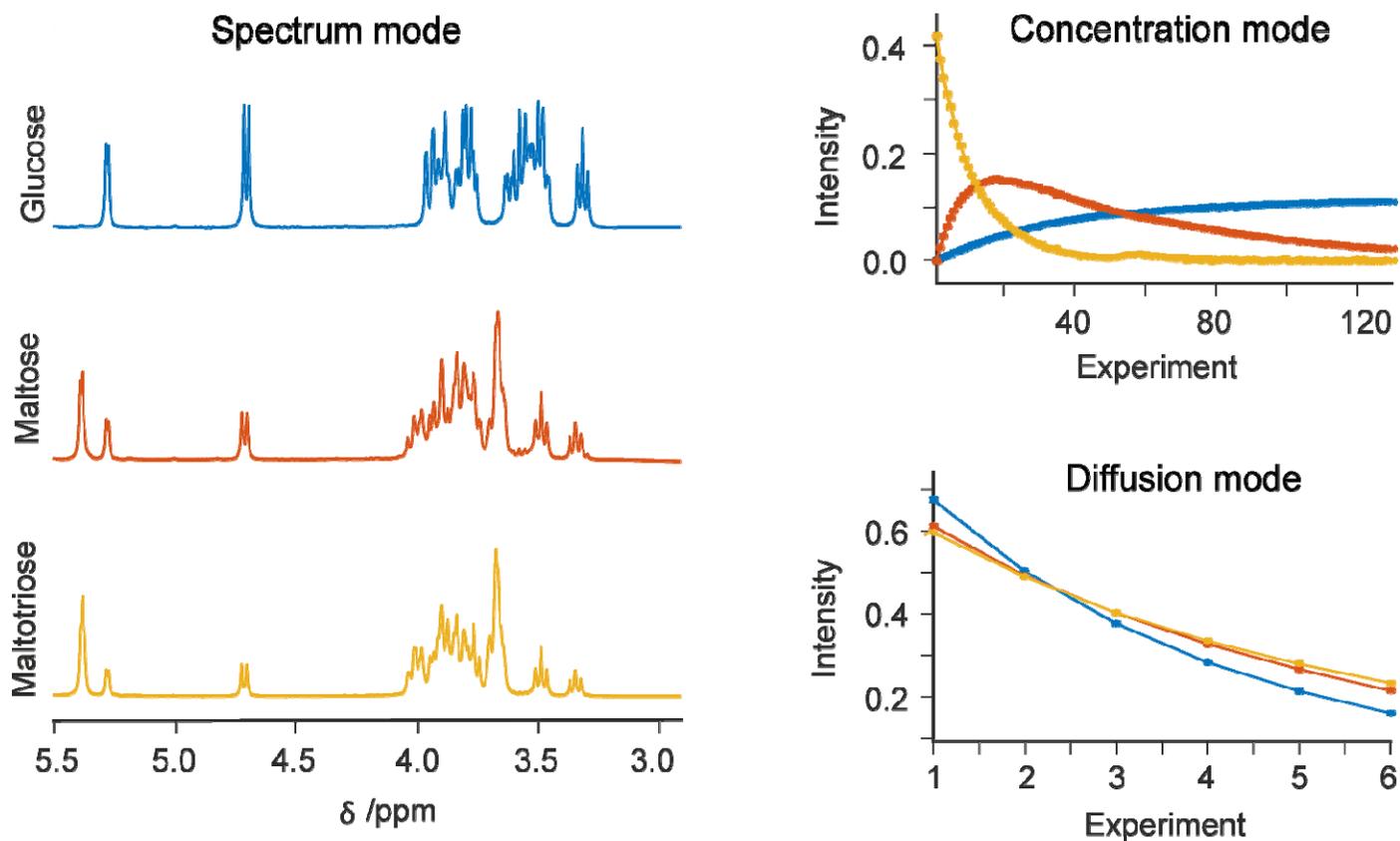
Métodos de análisis

- SCORE/RSCORE (Speedy Component REsolution)
Minimización de los residuales
- OUTSCORE (Optimized Unmixing of True Spectra for COmponent REsolution)
Maximización de las diferencias espectrales
- LOCODOSY (LOcal COvariance Diffusion-Ordered SpectroscopY)
Híbrido entre DOSY y SCORE (análisis espectral fragmentado)
- DECRA (Direct Exponential Curve Resolution Algorith)
Decaimiento exponencial puro
- FDM (Filter Diagonalization Method)/RRT (Regularized Resolvent Transform)
Utilización de la transformada de Laplace inversa
- ICA (Independent Component Analysis)
Independencia estadística de los componentes
- PARAFAC (PARAllel FACtor)
Modos (≥ 3) matemáticamente y físicamente independientes

$$\sum_{i=1}^N a_i \otimes b_i \otimes c_i + E$$

Análisis multivariante

PARAFAC análisis de la hidrólisis de la maltotriosa



Experimentos de difusión adquiridos de forma continua durante el curso de la reacción

I - Introducción:

Análisis de mezclas por RMN

Fundamentos de difusión en RMN

Experimento básico de difusión

II – Aspectos prácticos

Experimentos de difusión

Adquisición de los datos

Análisis de los datos

III – Limitaciones-soluciones

Solapamiento de señales

Convección

Mismo coeficiente de difusión

IV – Software

GNAT

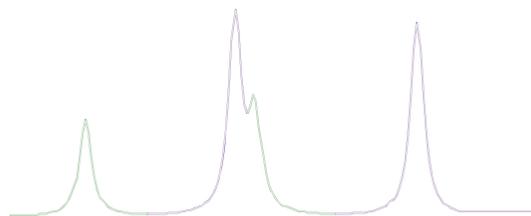
MAGNATE

Solapamiento de señales

Solapamiento de señales

El problema

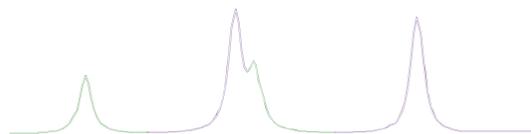
Señales solapadas



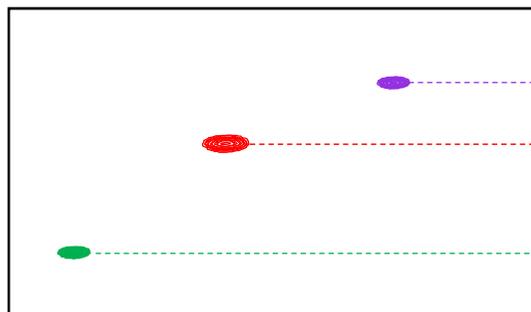
HR-DOSY



Ajuste monoexponencial



Coeficiente de difusión aparente

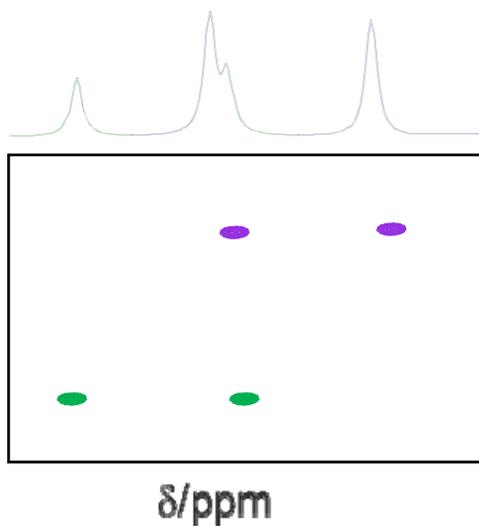


D_1
 $D_a = nD_1 + mD_2$
 D_2

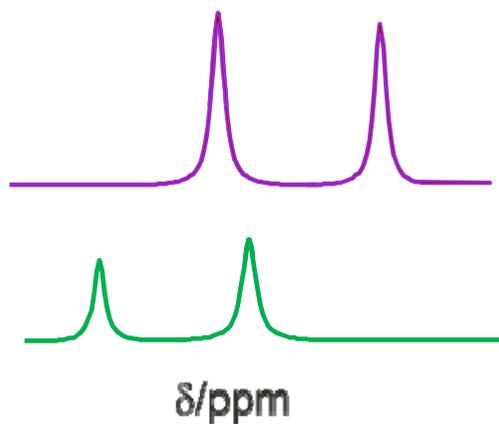
Solapamiento de señales

Posibles soluciones

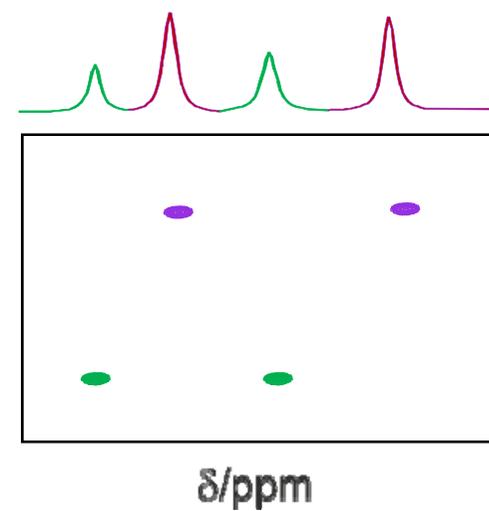
Ajuste
multiexponential



Análisis
multivariate



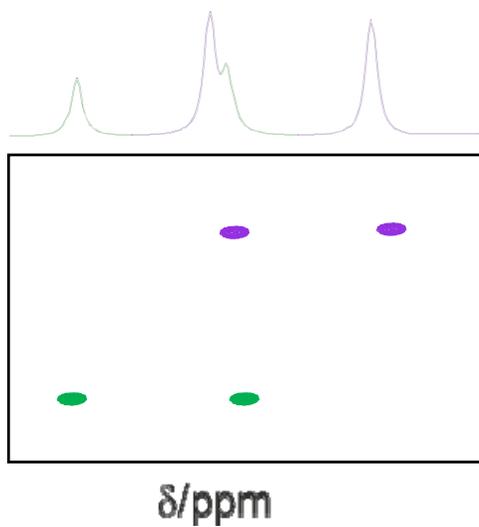
Evitar el
solapamiento



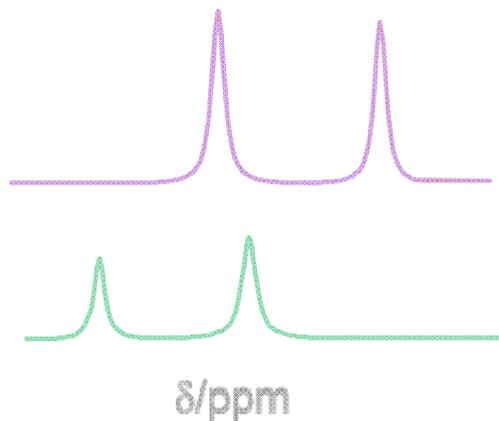
Solapamiento de señales

Posibles soluciones

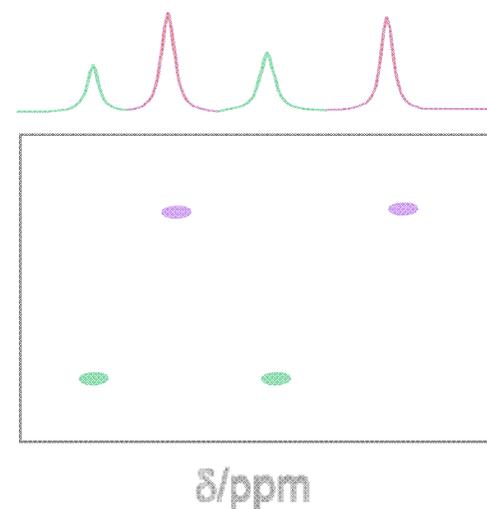
Ajuste
multiexponential



Análisis
multivariate



Evitar el
solapamiento



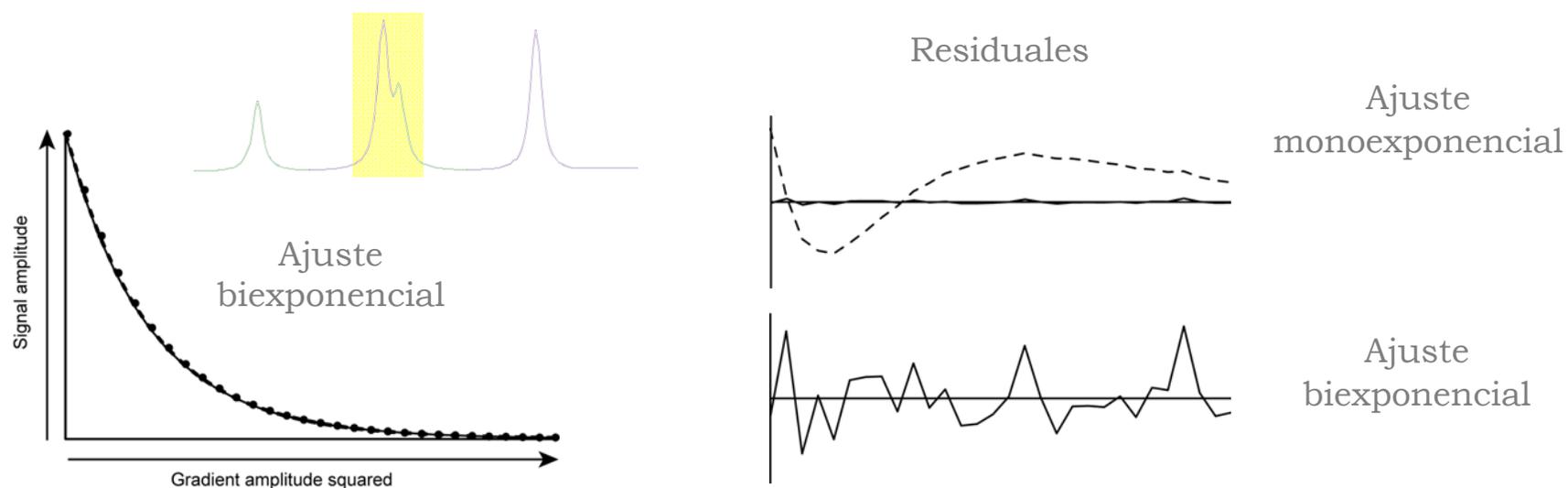
Ajuste multiexponencial

El ajuste multiexponencial supone una alta demanda matemática:

- Alta dependencia del planteamiento inicial
- Numéricamente inestable

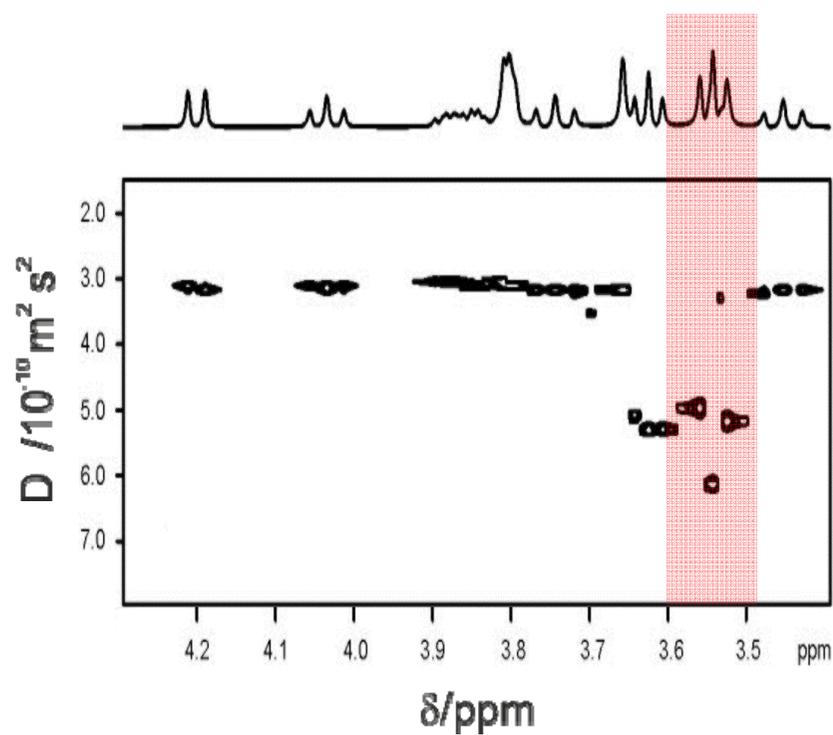
Los resultados dependen altamente de:

- La relación señal-ruido
- Diferencia en los coeficientes de difusión (>30%)
- Número de componentes (2-3)

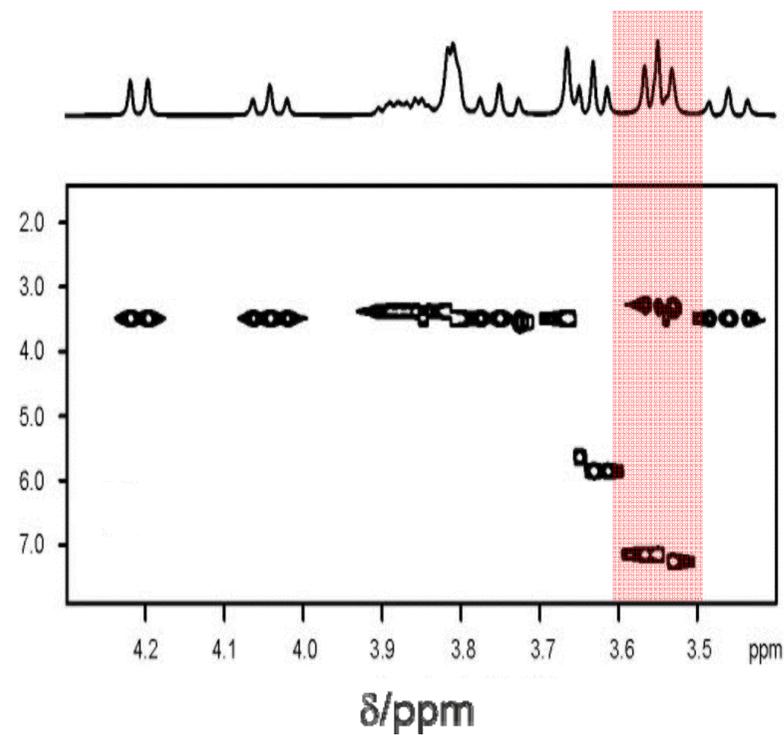


Ajuste multiexponencial

Ajuste monoexponencial



Ajuste biexponencial

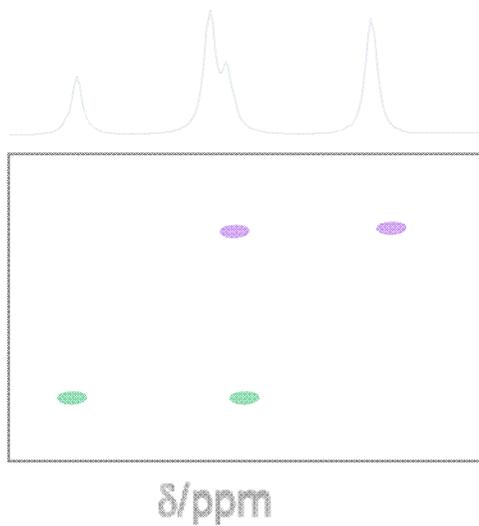


Espectro DOSY de sacarosa, isopentanol y propanol en D_2O

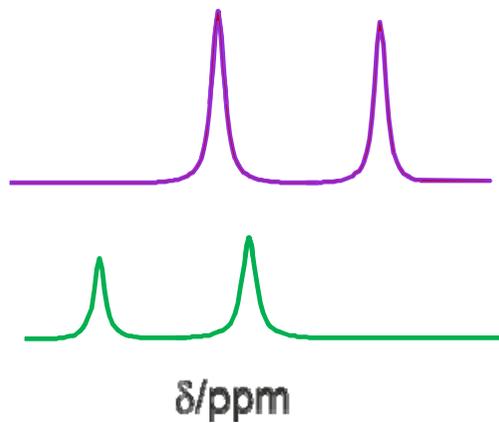
Solapamiento de señales

Soluciones

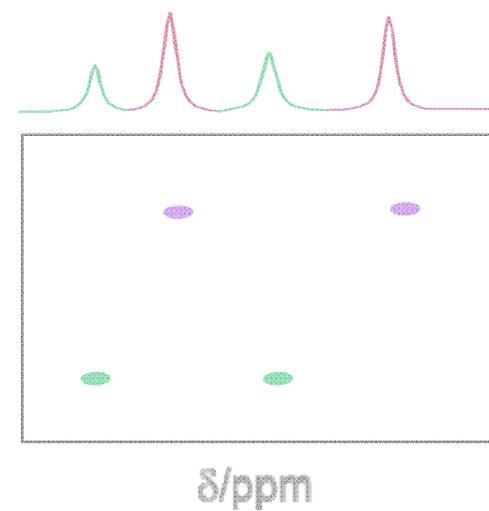
Ajuste
multiexponential



Análisis
multivariate



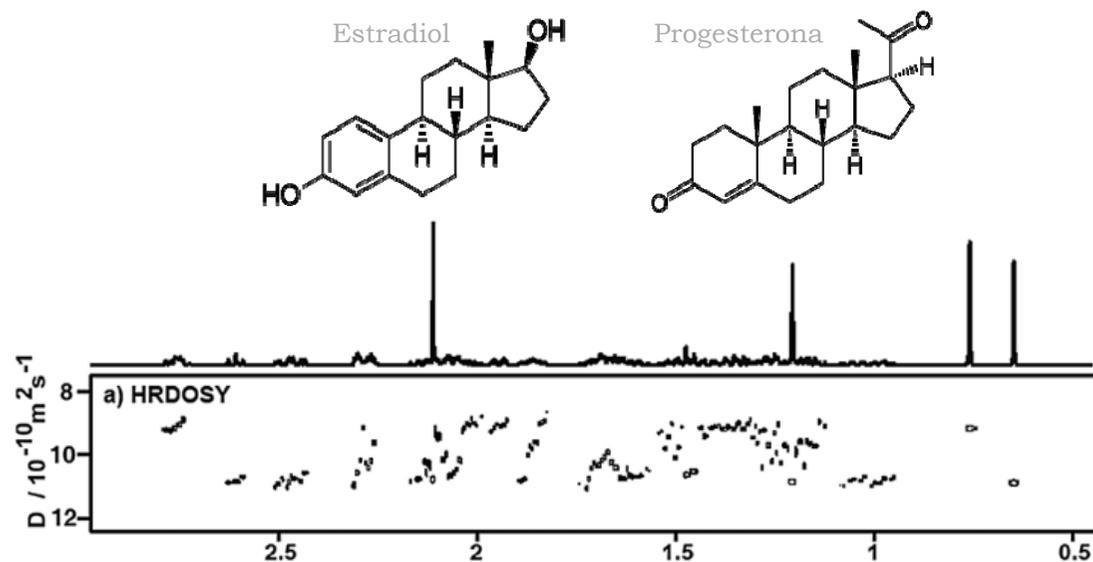
Evitar el
solapamiento



Análisis multivariante

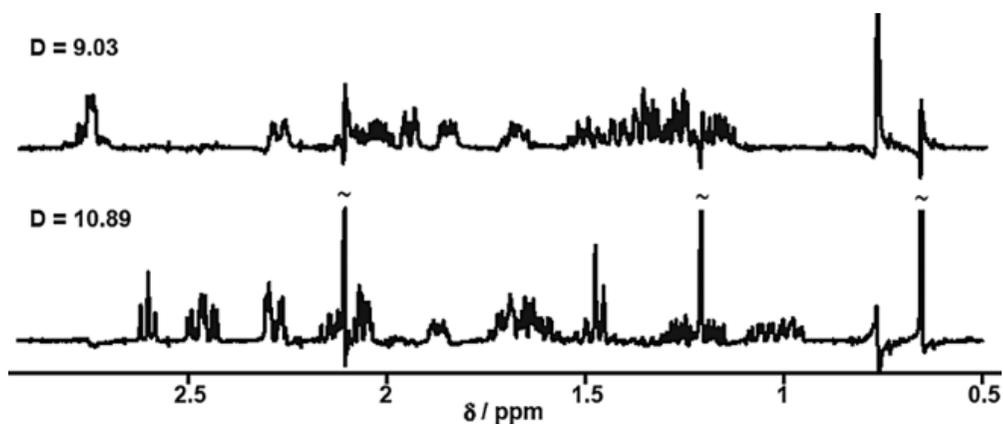
Separación de especies similares en base a su difusión

HR-DOSY
Análisis univariante



Solapamiento de señales

OUTSCORE
Análisis multivariante

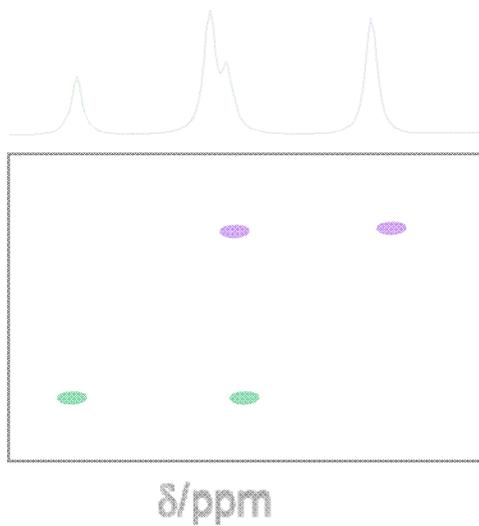


Separación de los componentes

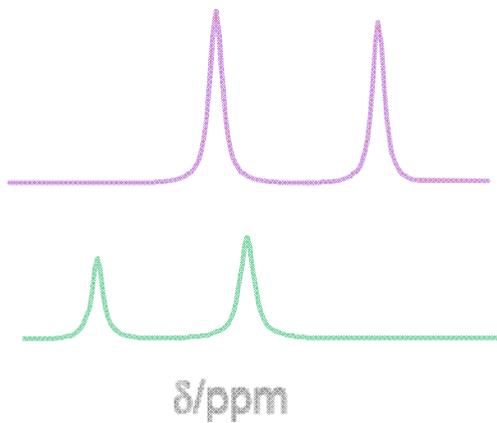
Solapamiento de señales

Soluciones

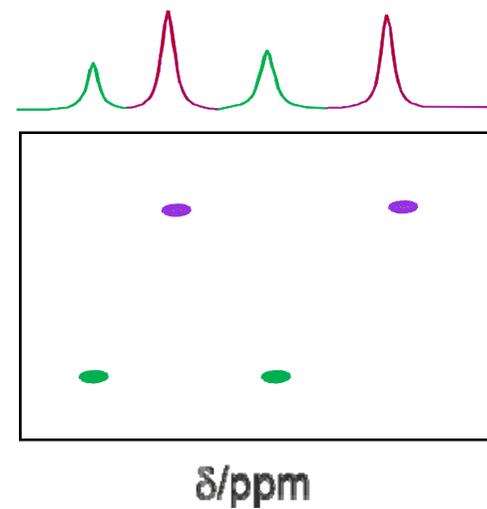
Ajuste
multiexponential



Análisis
multivariate



Evitar el
solapamiento

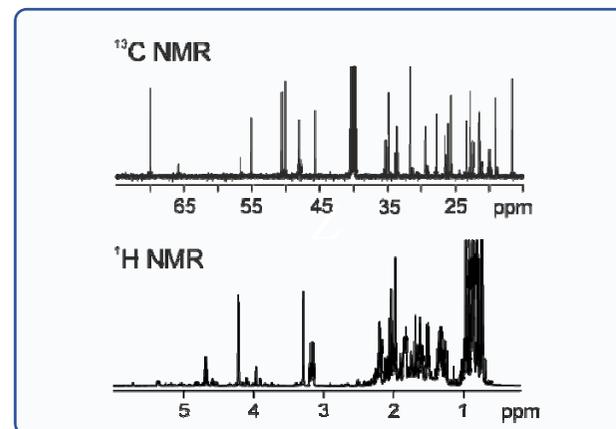


Reducción del solapamiento de señales

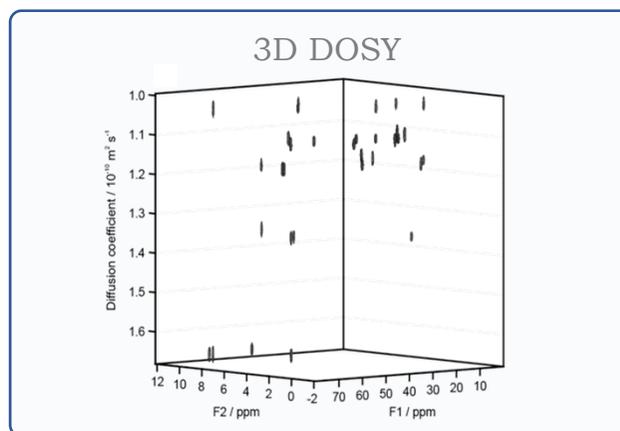
Condiciones experimentales



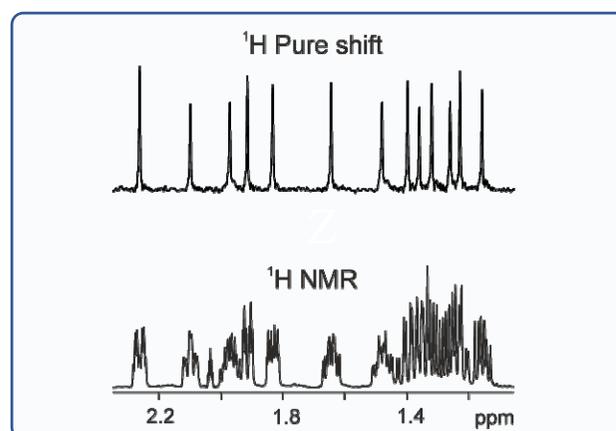
Otros núcleos



RMN multidimensional (nD)



Pure shift

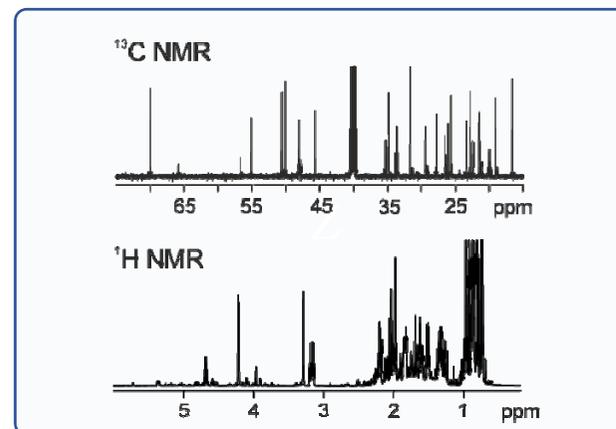


Reducción del solapamiento de señales

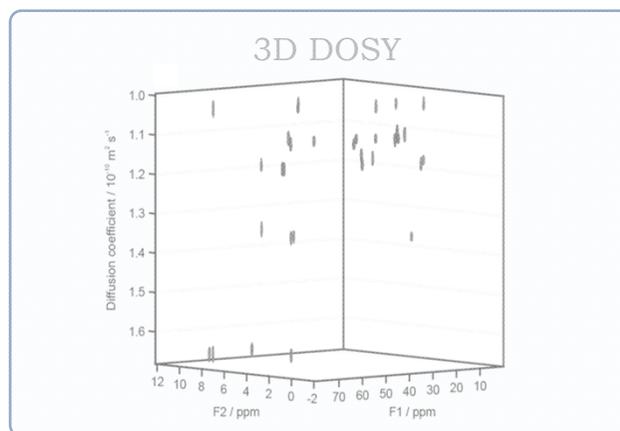
Condiciones experimentales



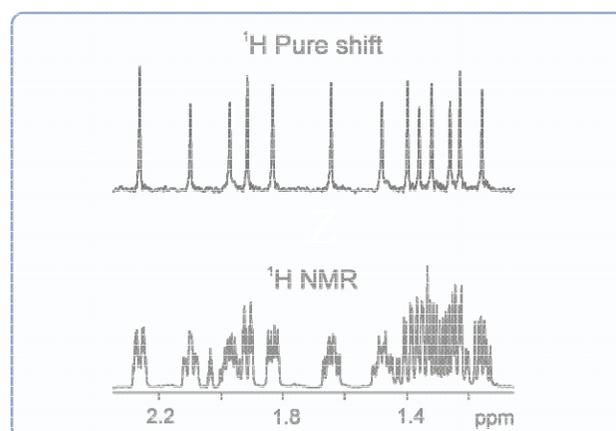
Otros núcleos



RMN multidimensional (nD)



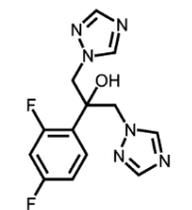
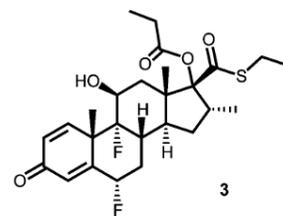
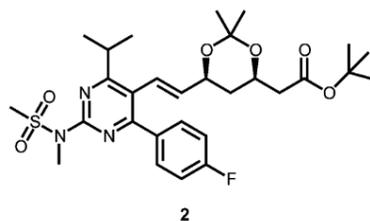
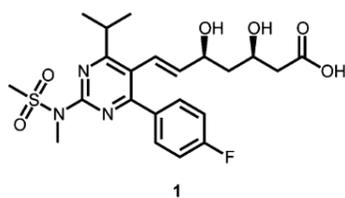
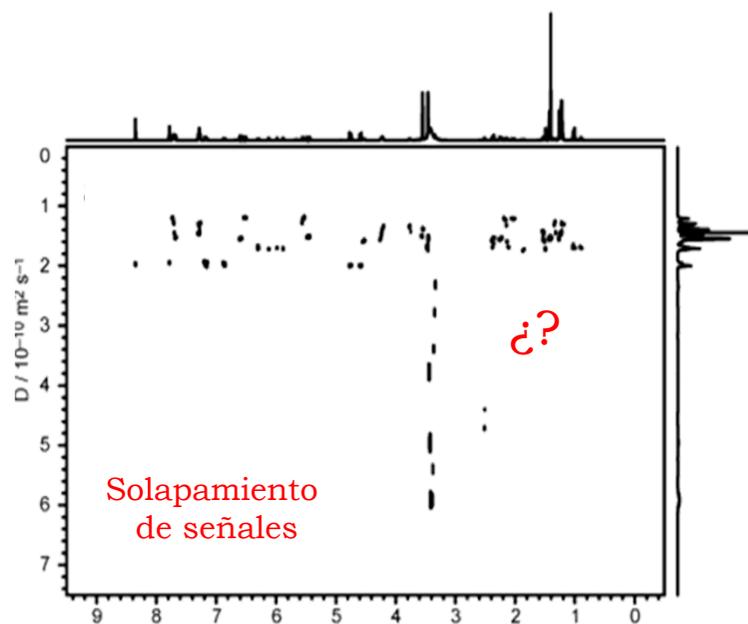
Pure shift



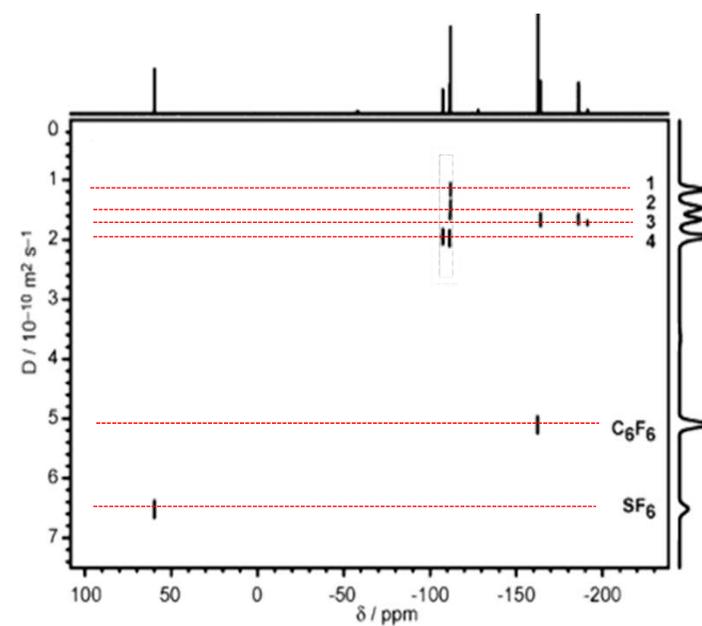
Reducción del solapamiento de señales

Experimentos de difusión en núcleos con mayor dispersión de señales

^1H HR-DOSY one-shot



^{19}F HR-DOSY one-shot

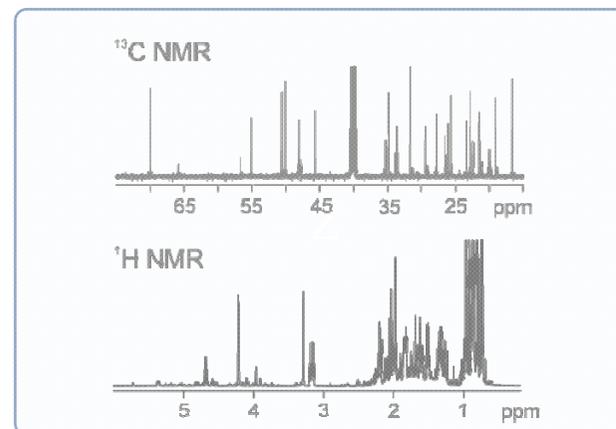


Reducción del solapamiento de señales

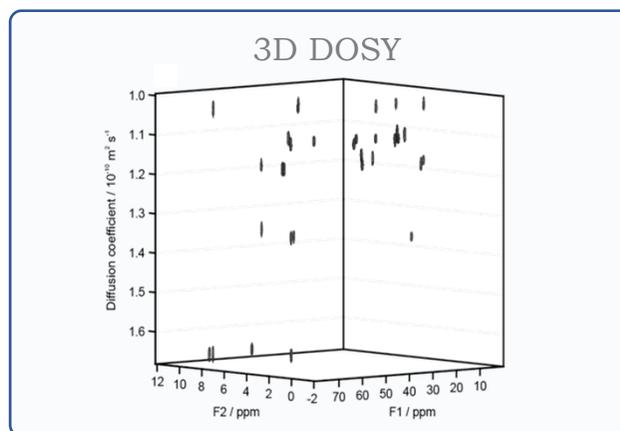
Condiciones experimentales



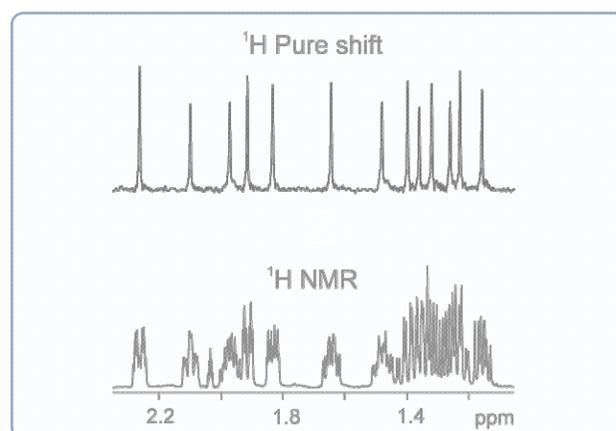
Otros núcleos



RMN multidimensional (nD)

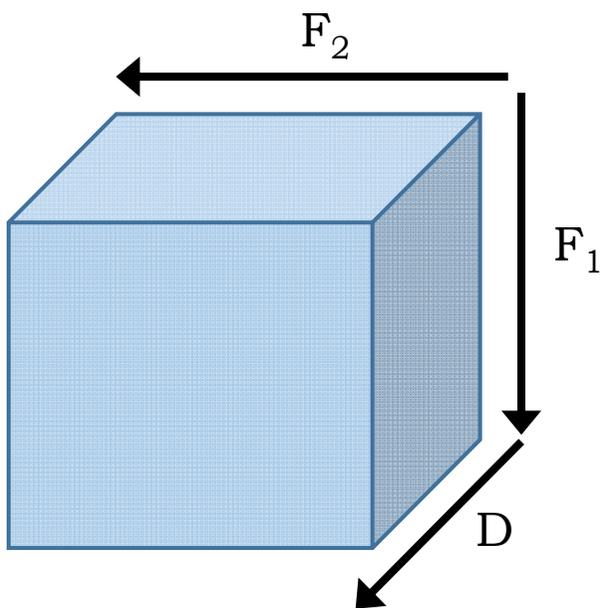
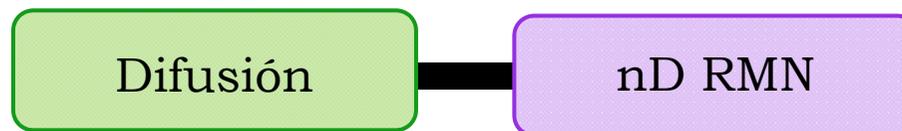


Pure shift



Reducción del solapamiento de señales

Combinación de experimentos de difusión y convencionales

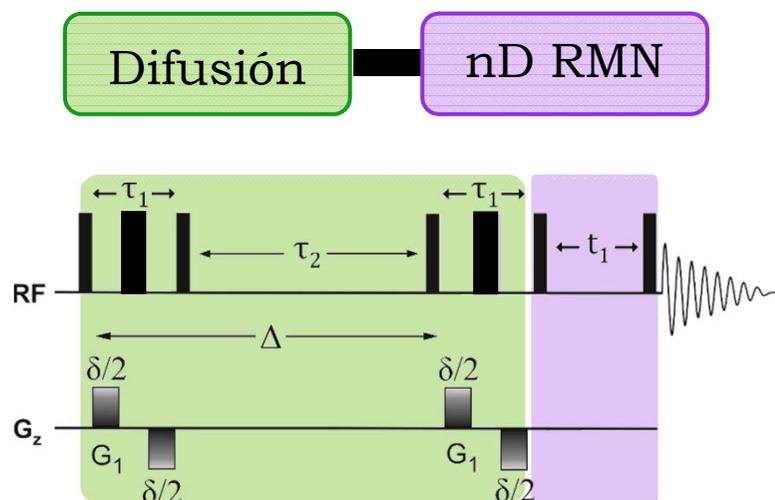


Combinando las secuencias de pulsos de difusión con otros experimentos nD se producen experimentos $(n+1)D$

Reducción del solapamiento de señales

Combinación de experimentos de difusión y convencionales

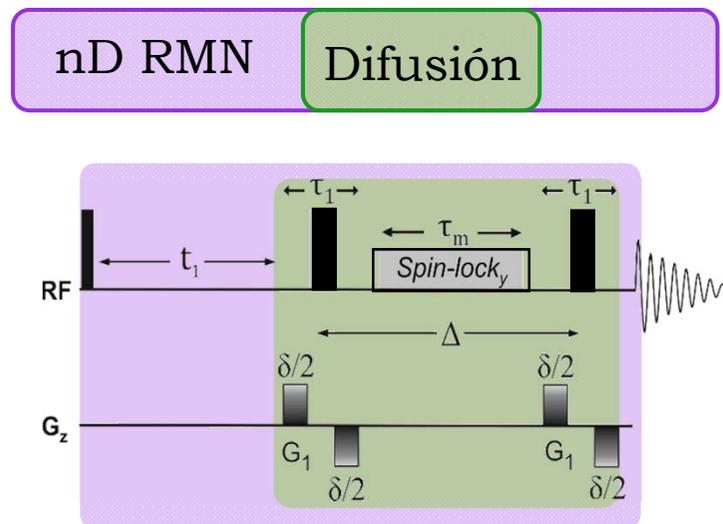
Concatenados



COSY-DOSY
 DOSY-TOCSY
 DOSY-NOESY
 HSQC-DOSY

...

Codificación interna



2DJ-iDOSY
 COSY-iDOSY
 TOCSY-iDOSY
 HSQC-iDOSY

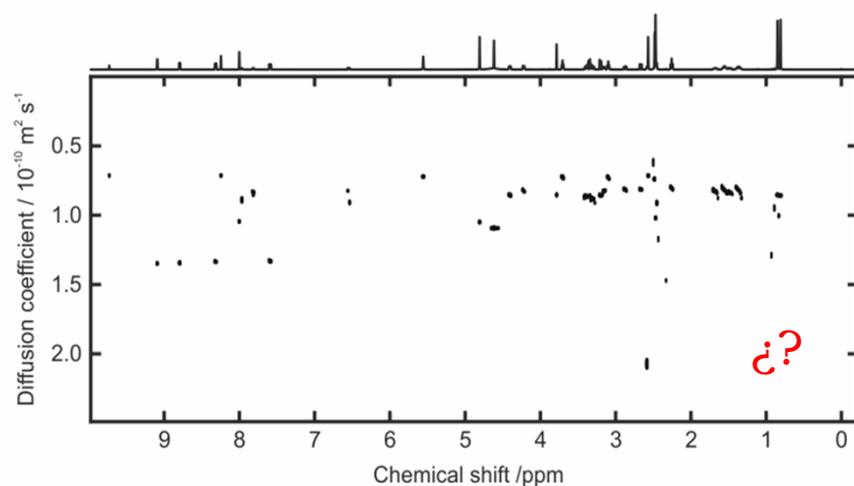
...

Reducción del solapamiento de señales

Combinación de experimentos de difusión y convencionales

One-shot DOSY

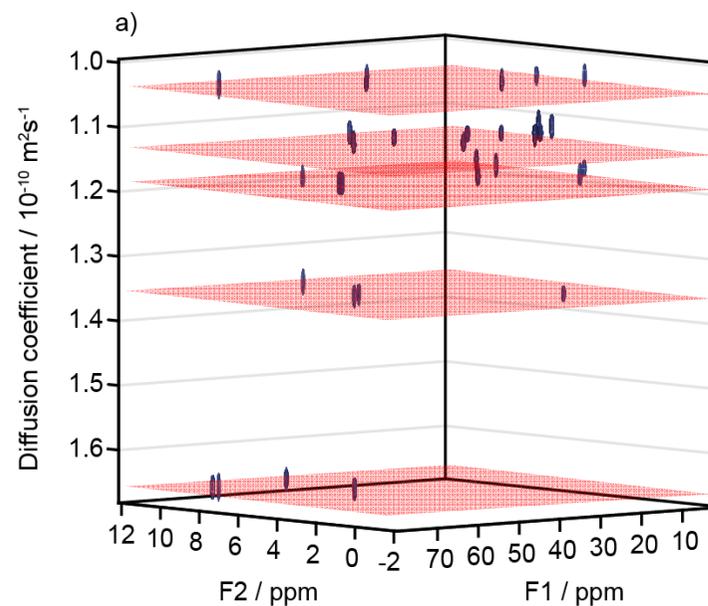
Pseudo-2D espectro



Solapamiento de señales

One-shot HSQC-DOSY

Pseudo-3D espectro



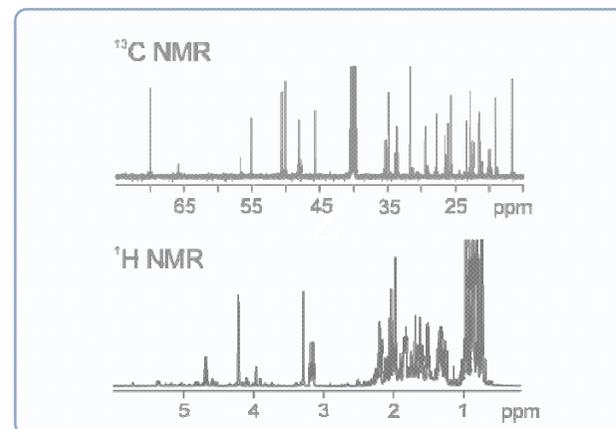
Separación de los componentes

Reducción del solapamiento de señales

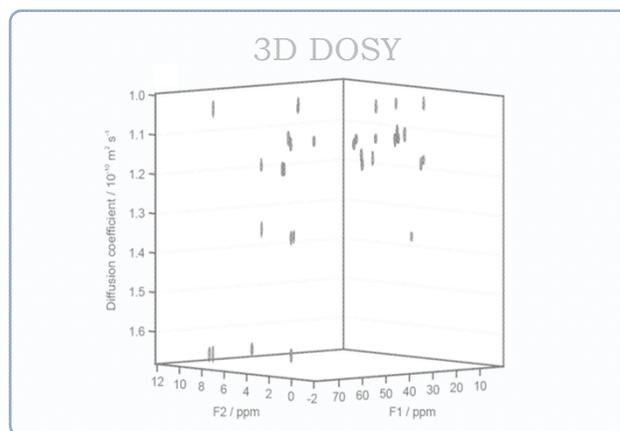
Condiciones experimentales



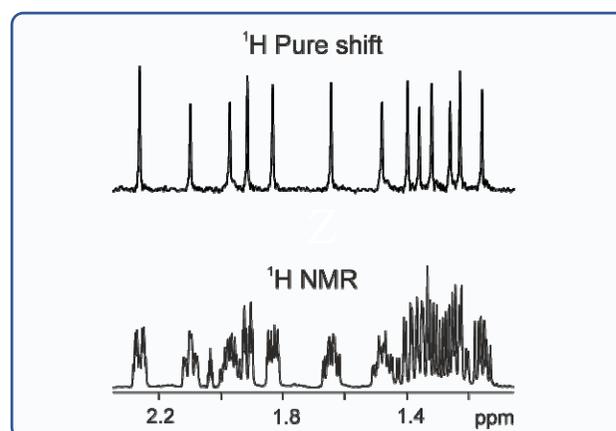
Otros núcleos



RMN multidimensional (nD)

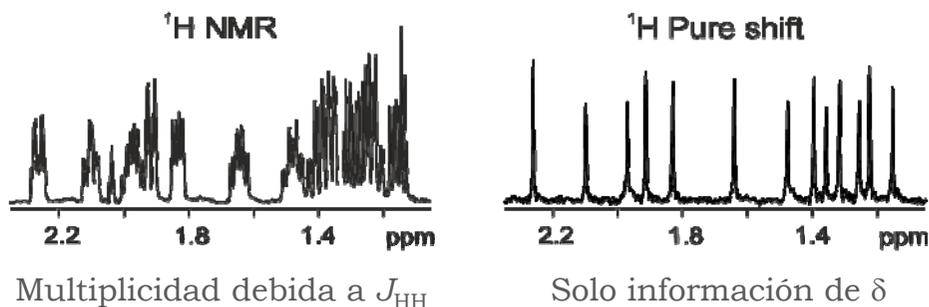


Pure shift



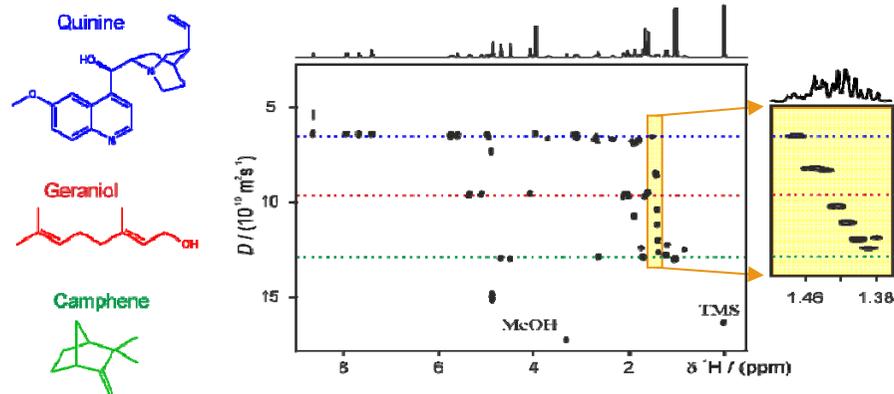
Reducción del solapamiento de señales

Combinación con la metodología *pure shift*



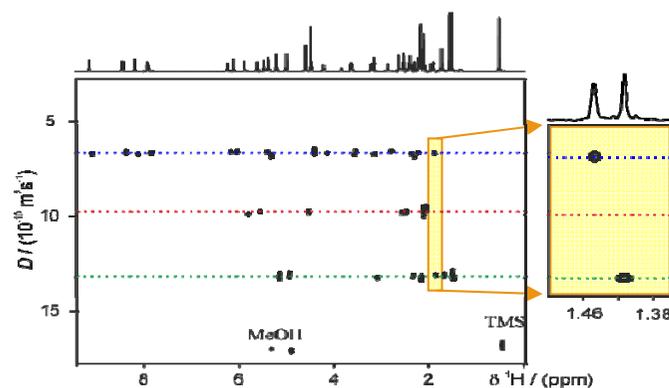
- ✓ Reducción de la complejidad
- ✓ Mejora de la resolución
- ✓ Menor solapamiento de señales

Oneshot DOSY



- ✗ Señales solapadas
- ✗ Señales engañosas

PSYCHE-iDOSY

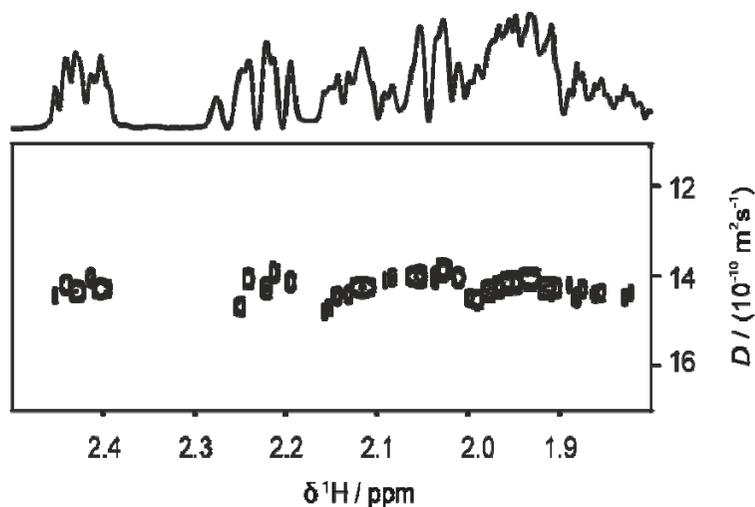


- ✓ Mayor resolución de las señales
- ✓ Reducción del solapamiento

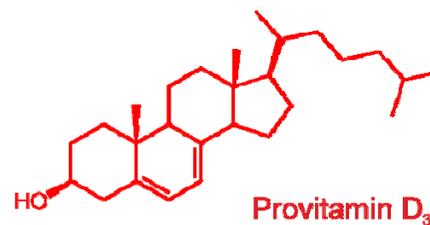
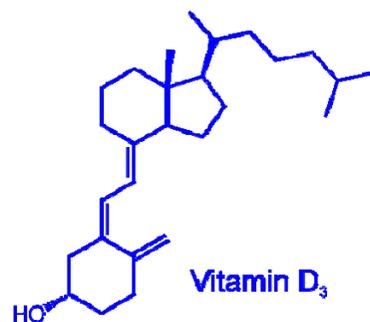
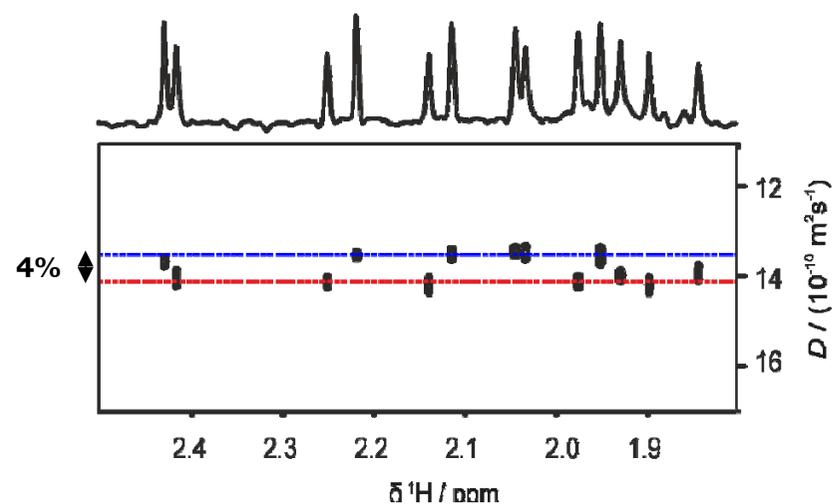
Reducción del solapamiento de señales

PSYCHE-iDOSY: Espectros de ultra-alta resolución

Oneshot DOSY



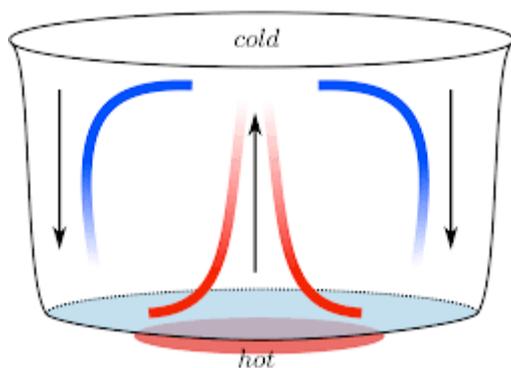
PSYCHE-iDOSY



Convección

Convección

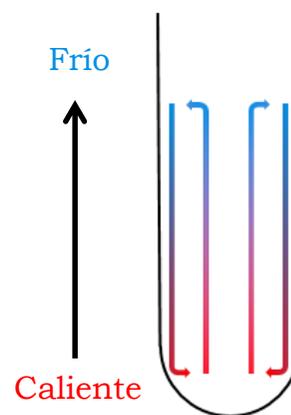
El fenómeno de convección térmica



La convección es un mecanismo de transferencia de calor que se produce cuando un fluido experimenta diferentes temperaturas en diferentes partes del mismo

Corrientes de convección en el tubo de RMN

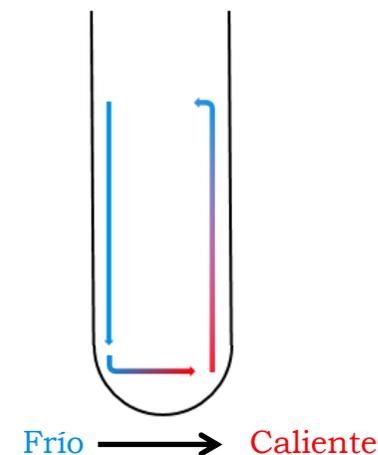
Raleigh-Bérnard



Cuando el gradiente de temperatura supera un determinado límite

Fenómeno crítico

Hadley



Cuando no se trabaja a temperatura ambiente

Siempre presente

Gradiente de temperatura en el tubo de RMN generados por el mecanismo de regulación de temperatura

Convección en los experimentos de difusión

El problema: pérdida de señal por convección

Ecuación de Stejskal-Tanner modificada considerando el movimiento de las partículas debido a la difusión y a la convección en un tubo de RMN

$$I(g) = I_{g_0} e^{-(D\gamma^2 \delta^2 g^2 \Delta')} \cos(D\gamma \delta g \Delta' v)$$

I_{g_0} : Intensidad de la señal en ausencia de gradientes

D : Constante de difusión

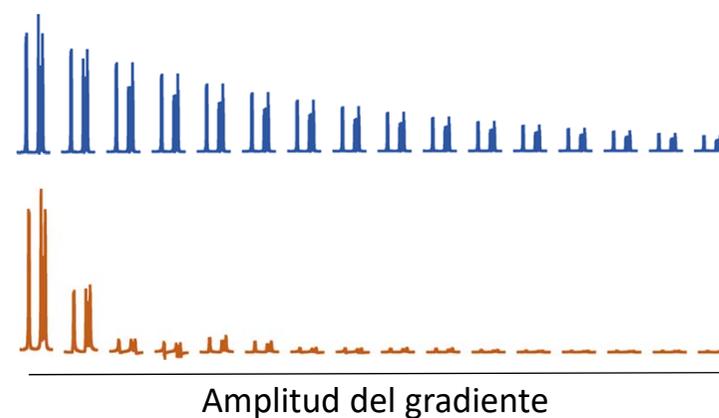
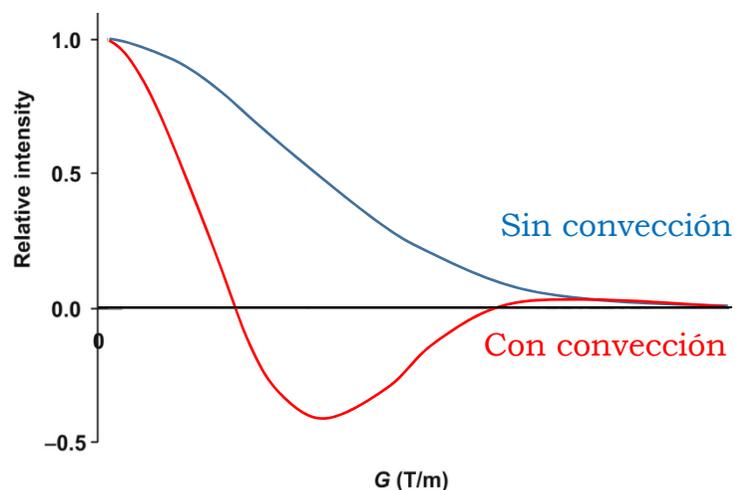
γ : Constante giromagnética

δ : Duración del gradiente

g : Amplitud del gradiente

Δ : Tiempo de difusión y convección

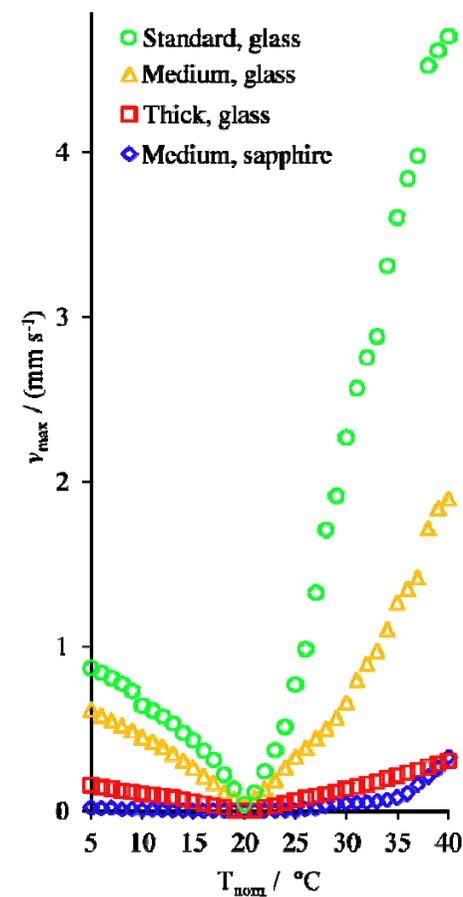
v : Velocidad de convección



¿Cómo minimizar la convección?

Factores que influyen en la convección

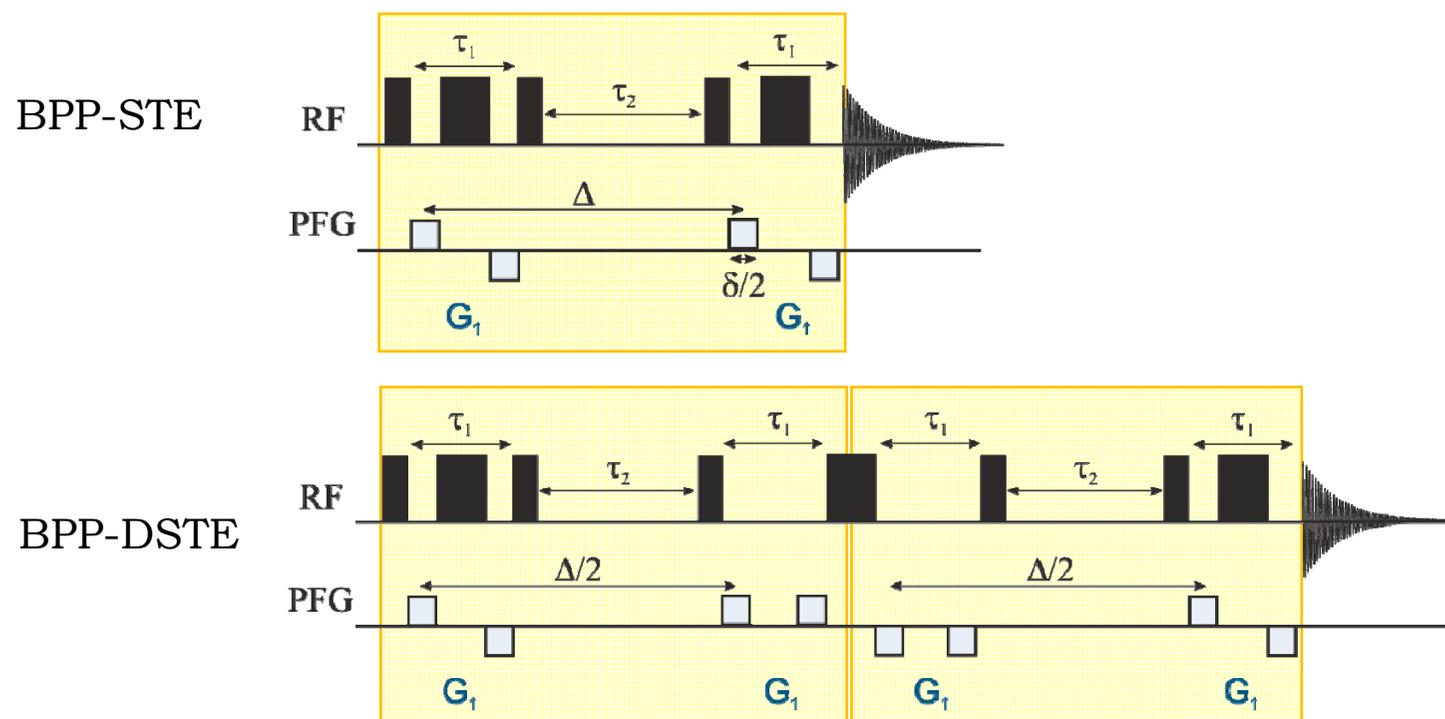
- Temperatura
Cercana a la temperatura ambiente
- Diámetro del tubo de RMN
Pequeño (3 mm)
- Material del tubo de RMN
Zafiro
- Viscosidad de la muestra
Disolventes de alta viscosidad (DMSO, D₂O)
- Sonda
- Flujo de aire
- Girar la muestra
- Experimento de difusión
Secuencias con compensación de convección



Experimentos de difusión para compensar la convección

Experimentos con *Double Stimulated Echo* (DSTE)

Compensación del efecto de convección mediante la cancelación de la influencia de los flujos de convección en la muestras



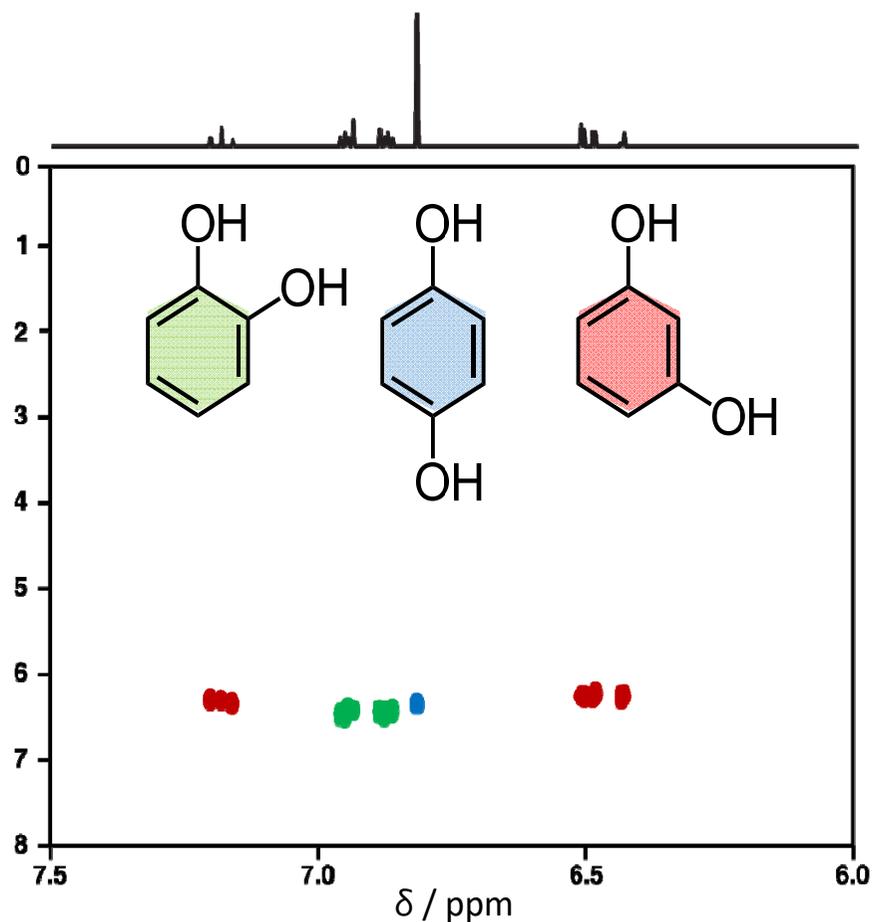
El tiempo total de difusión (Δ) es dividido en dos

El efecto de la convección durante el primer tiempo de difusión ($\Delta/2$) es compensado durante el segundo periodo

Mismo
coeficiente
de difusión

Análisis de mezclas con el mismo coeficiente de difusión

El problema



NO es posible diferenciar entre compuestos que difunden a la misma (o muy similar) velocidad

¿Es posible manipular la forma en la que las diferentes especies difunden?

Análisis de mezclas con el mismo coeficiente de difusión

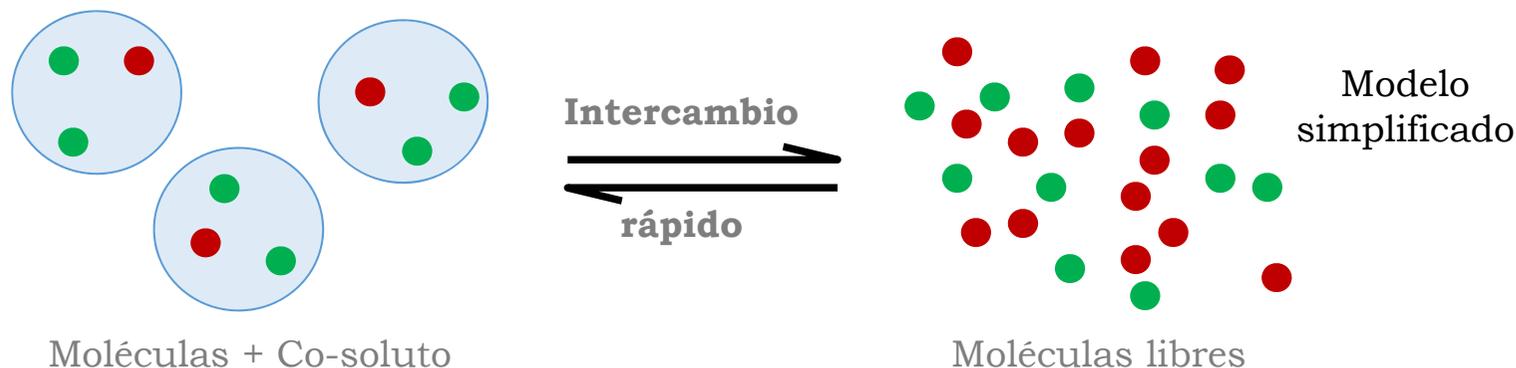
La solución

Cambiar la matriz en la que difunden los solutos



Añadir un co-soluto (difusión más lenta) que interaccione de forma diferente con las moléculas (diferente difusión aparente en función de la fuerza de interacción)

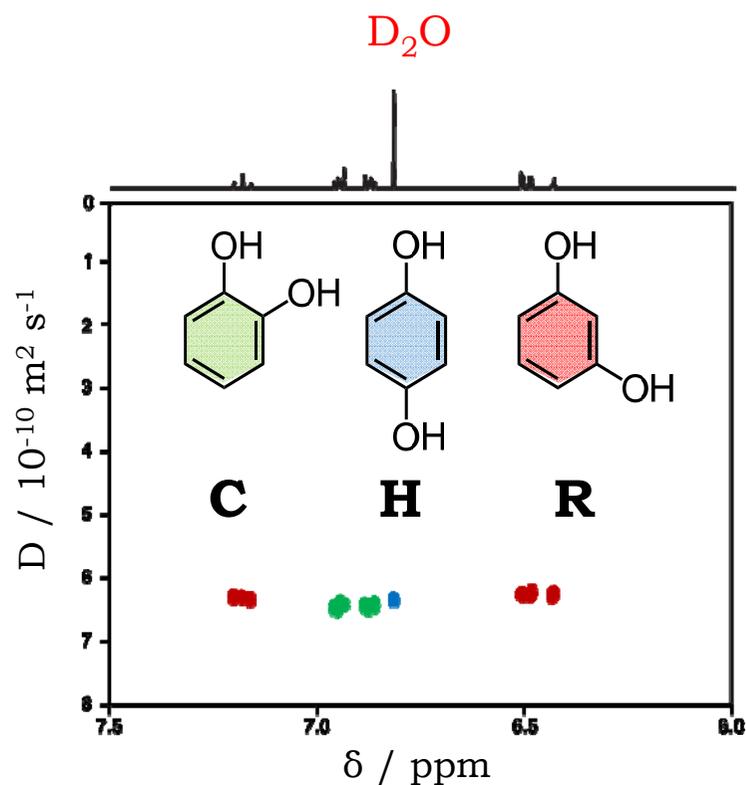
$$D_{\text{aparente}} = f_{\text{interacción}} D_{\text{matrix}} + (1 - f_{\text{interacción}}) D_{\text{libre}}$$



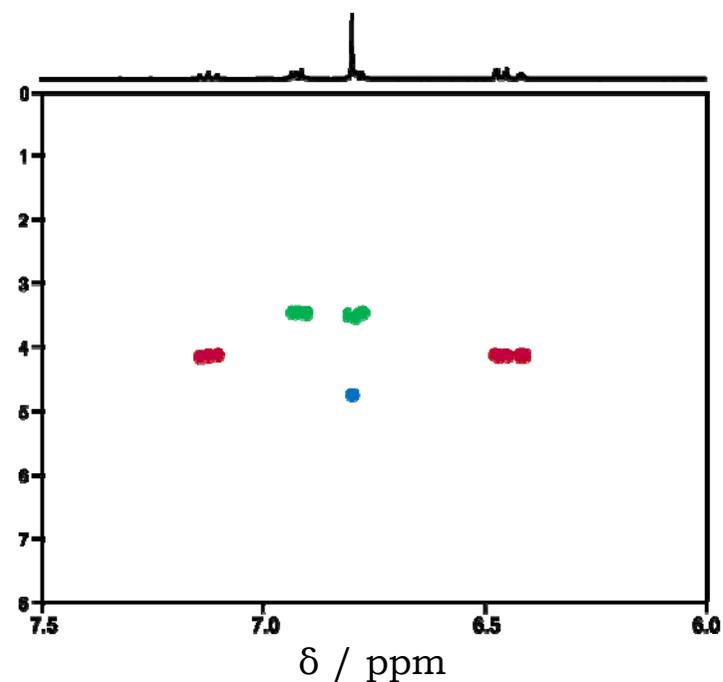
Matrix-Assisted DOSY (MAD)

Matrix-Assisted DOSY (MAD)

Separación de isómeros mediante la utilización de micelas



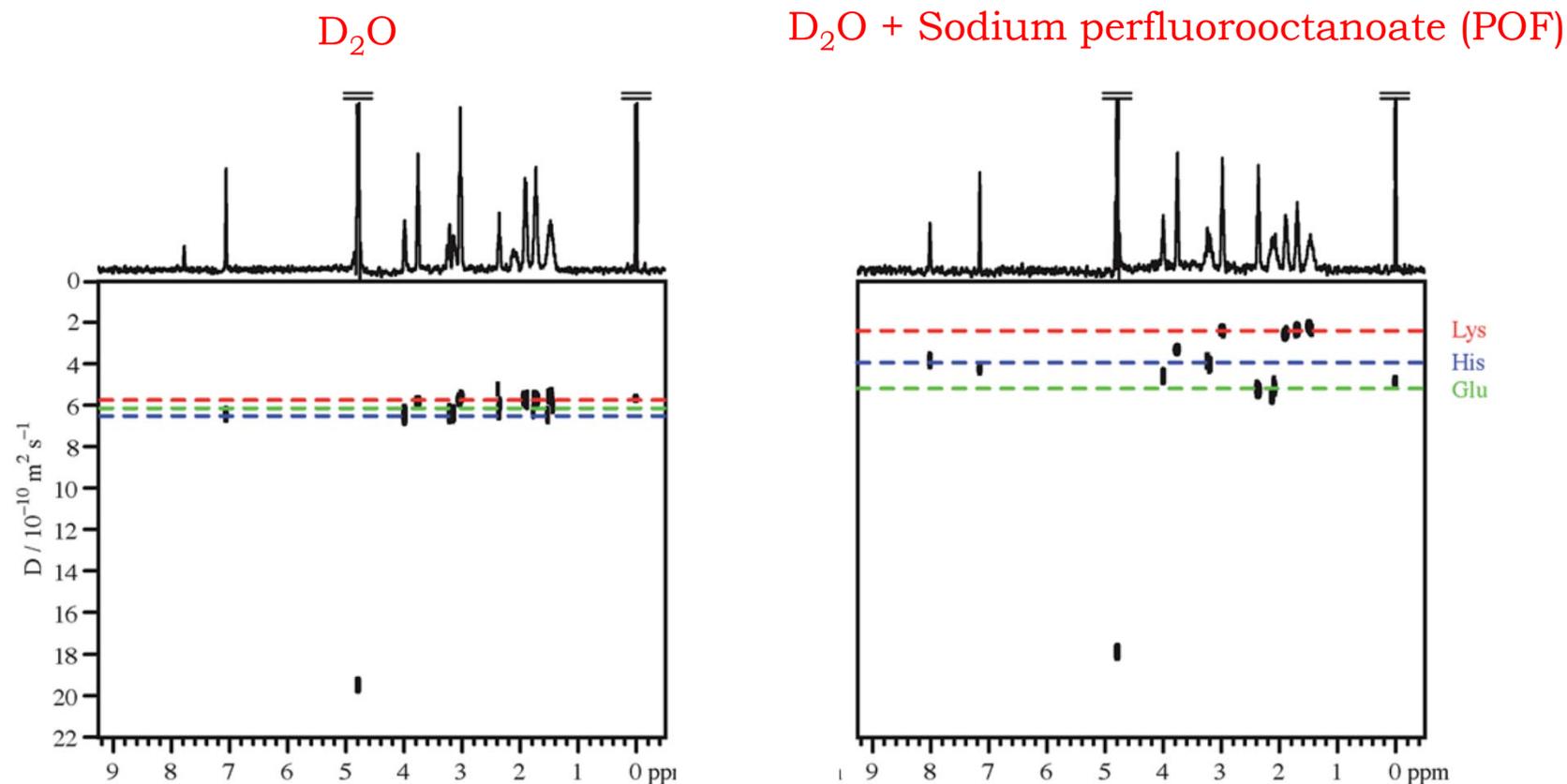
$D_2O + \text{Sodium Dodecil Sulfate (SDS)}$



Es posible utilizar una matriz micelar para diferenciar entre compuestos que en ausencia de ella difunden a la misma (o muy similar) velocidad

Matrix-Assisted DOSY (MAD)

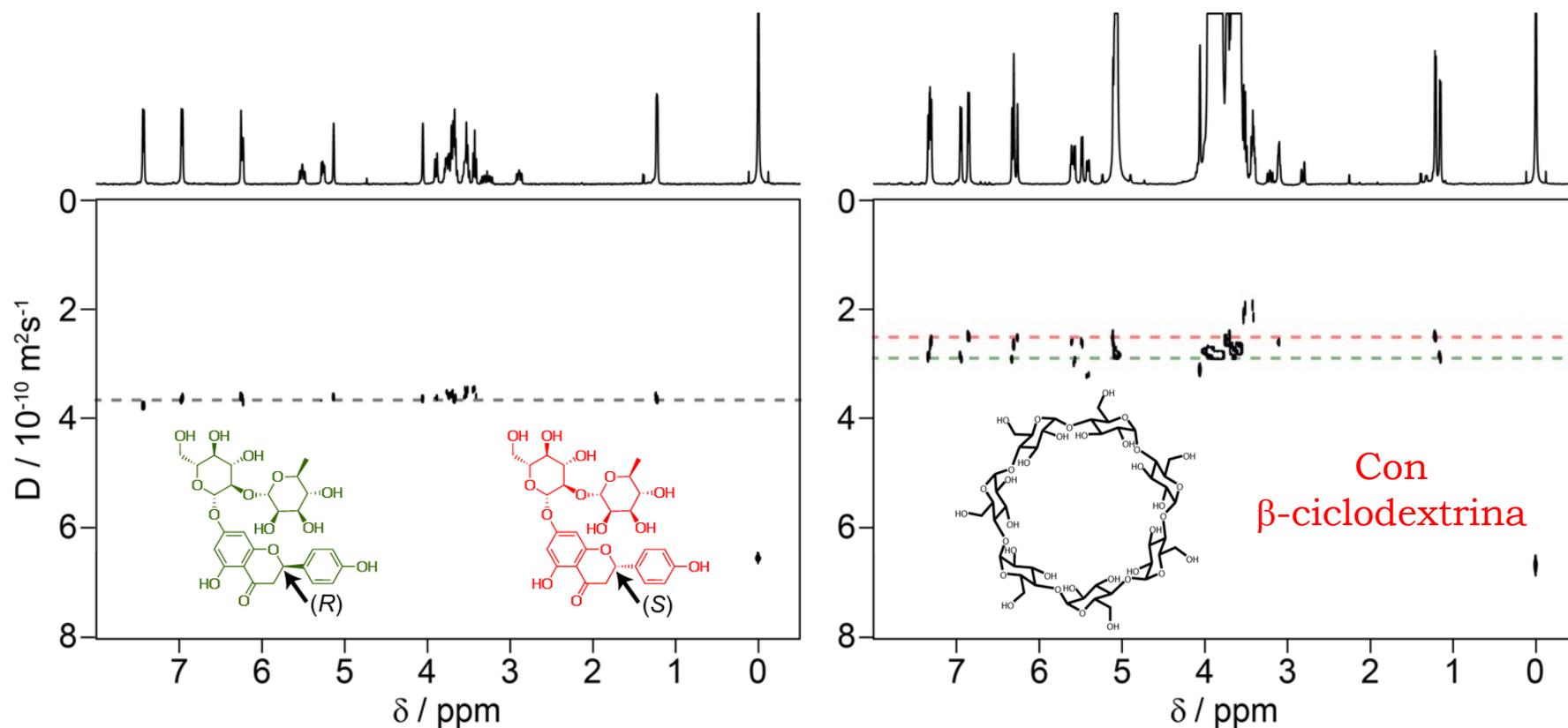
Utilización de micelas invisibles



Las utilización de matrices “invisibles” evita el solapamiento de señales y facilita el análisis de la mezcla

Matrix-Assisted DOSY (MAD) quiral

Separación de productos naturales mediante la utilización de ciclodextrinas quirales



La diferencia de inclusión de los epímeros en la β -ciclodextrina permite la separación de los mismos

I - Introducción:

Análisis de mezclas por RMN

Fundamentos de difusión en RMN

Experimento básico de difusión

II – Aspectos prácticos

Experimentos de difusión

Adquisición de los datos

Análisis de los datos

III – Limitaciones-soluciones

Solapamiento de señales

Convección

Mismo coeficiente de difusión

IV – Software

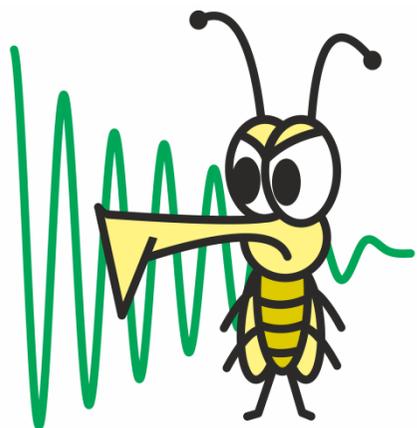
GNAT

MAGNATE

Softwares para el procesamiento de los experimentos de difusión

GNAT

General NMR Analysis Toolbox



General NMR Analysis Toolbox

Procesamiento, visualizado y analisis de experimentos de difusión (pseudo-2D)

Basado en DOSY Toolbox

MAGNATE

Multidimensional Analysis for the GNAT Enviroment



maGNATE

Procesamiento, visualizado y analisis de experimentos de difusión (pseudo-3D)

Software libres y gratuitos

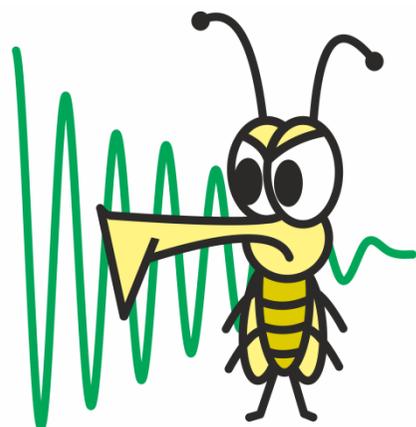
Interfaz de fácil uso para el usuario

MATLAB®

Softwares para el procesamiento de los experimentos de difusión

GNAT

General NMR Analysis Toolbox



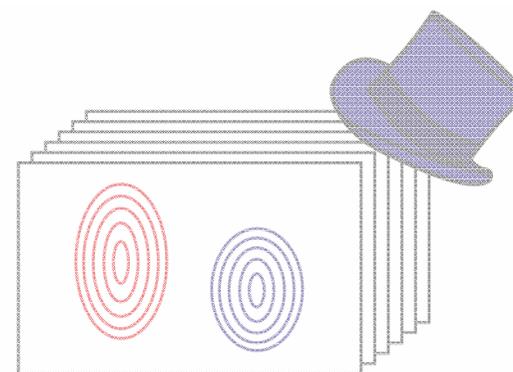
General NMR Analysis Toolbox

Procesamiento, visualizado y analisis de experimentos de difusión (pseudo-2D)

Basado en DOSY Toolbox

MAGNATE

Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



maGNATE

Procesamiento, visualizado y analisis de experimentos de difusión (pseudo-3D)

Software libres y gratuitos

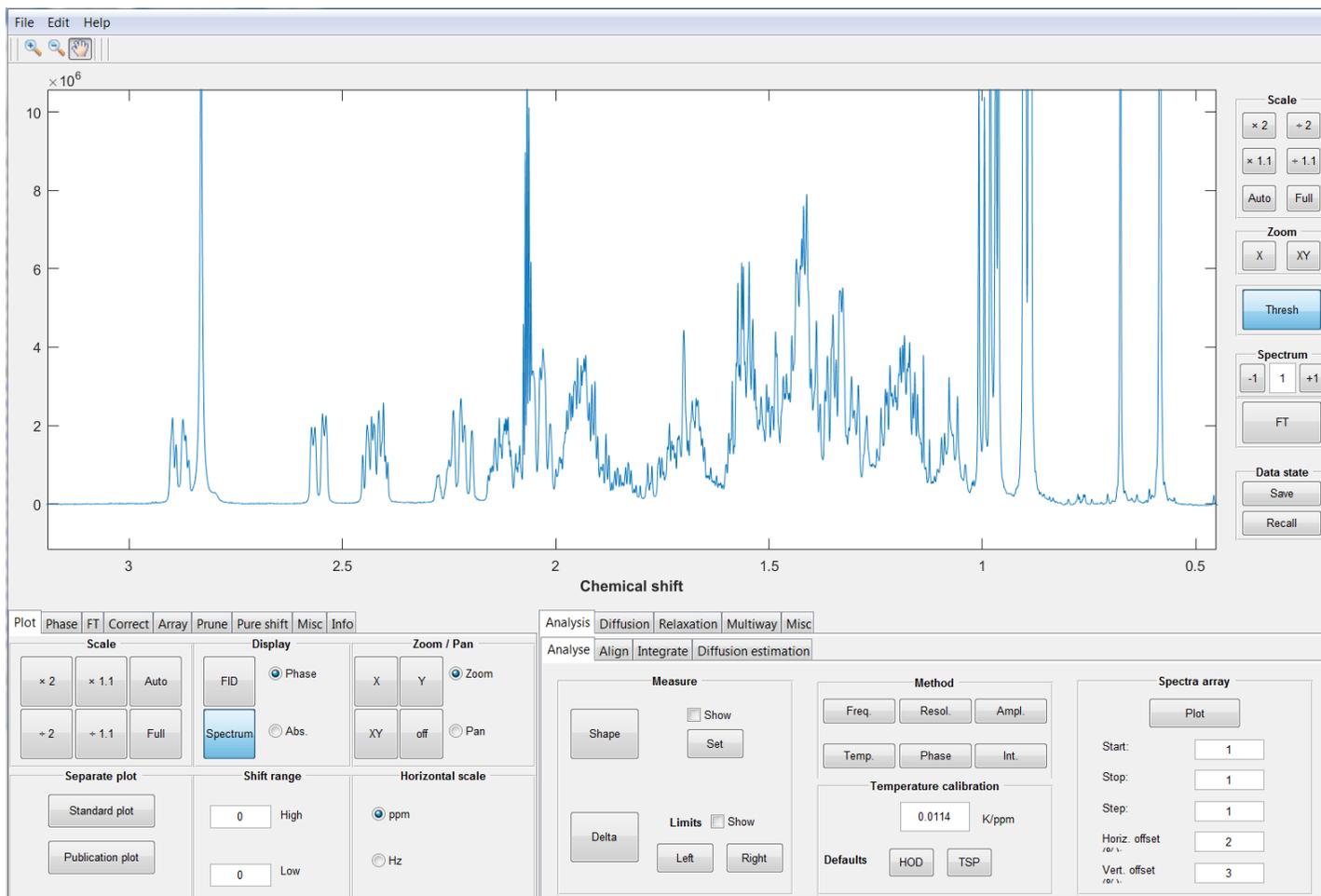
Interfaz de fácil uso para el usuario

MATLAB®



General NMR Analysis Toolbox

Ventana principal de GNAT

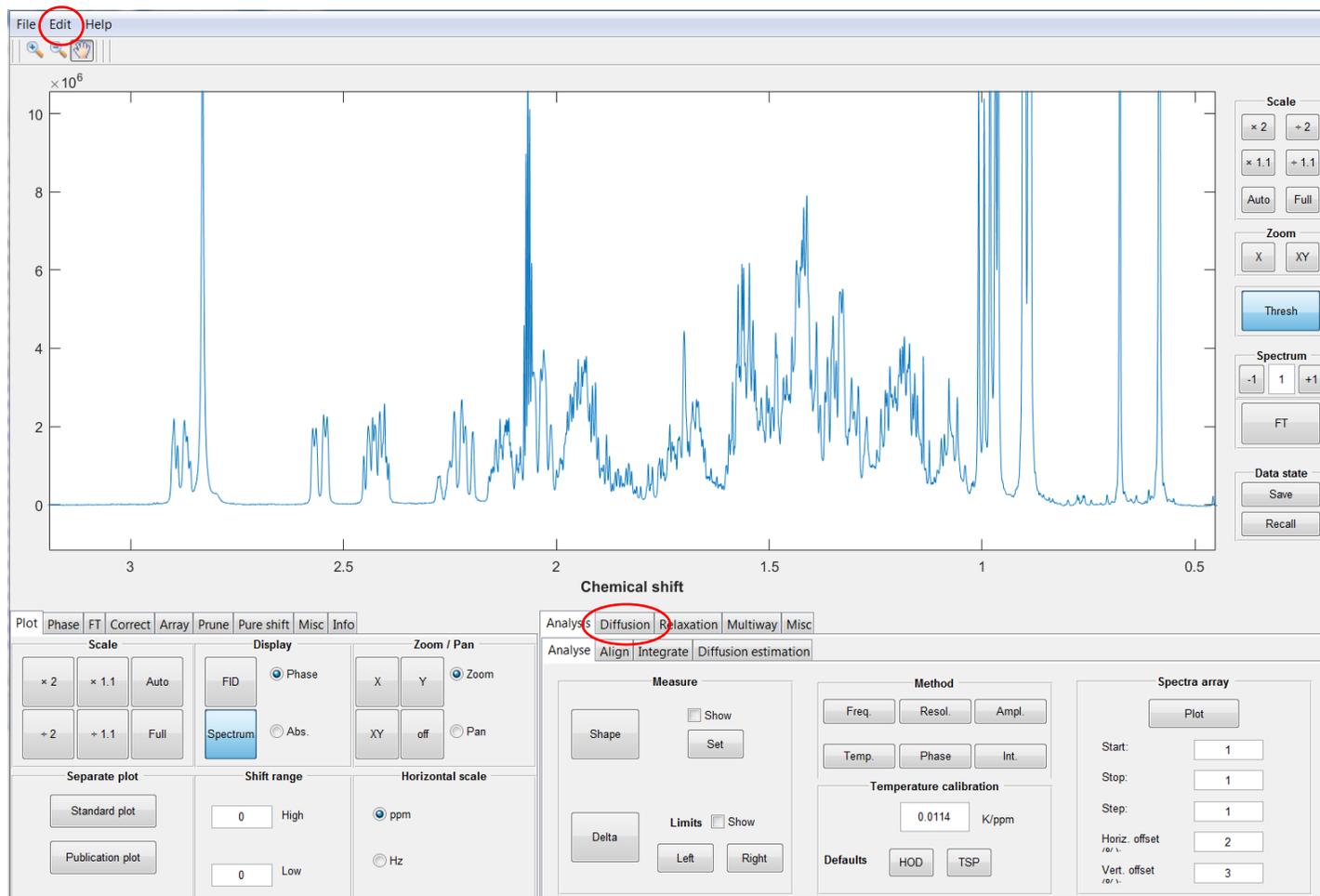


Acceso a todas las funciones de procesado y análisis



General NMR Analysis Toolbox

Ventana principal de GNAT



Acceso a todas las funciones de procesamiento y análisis



General NMR Analysis Toolbox

Análisis univariante y multivariante

The screenshot shows the 'Analysis' menu with sub-options: DOSY, SCORE, LOCODOSY, T1, DECRA, FDM/RRT, ICA, and MCR. The 'Process' section includes 'Run' and 'Replot' buttons. The 'Peak pick' section has radio buttons for 'Peak pick', 'All frequencies', and 'Integrals'. The 'Fit type' section has radio buttons for 'Monoexponential' and 'Multiexponential'. The 'DOSY plot' section includes input fields for 'D Min.' (0), 'D Max.' (20), and 'Digitization' (512), with an 'Auto' checkbox. The 'Fit equation' section has radio buttons for 'Exponential' and 'NUG'. The 'Multiexponential' section includes input fields for 'Exponentials' (1) and 'Random repeats' (100).

Parámetros de difusión experimentales

The screenshot shows the 'Settings' dialog box with the 'Diffusion' tab selected. The 'Diffusion related parameters' section includes a 'Calculate diffusion parameters by pulse sequence type' section with 'Monopolar' and 'Bipolar' buttons, and a 'Restore Original' button. Below this are input fields for Δ (0.071), Δ' (0.0703), and δ (0.0021). There are also input fields for γ (267524618.573) and τ (1223.5), and a 'dosyconstant' field (22188166774.9105). On the right, a table lists 'T/m' values for 13 different entries.

	T/m
1	0.0482
2	0.0839
3	0.1084
4	0.1283
5	0.1455
6	0.1509
7	0.1749
8	0.1879
9	0.2000
10	0.2115
11	0.2223
12	0.2327
13	0.2431



General NMR Analysis Toolbox

Análisis univariante y multivariante

The screenshot shows the 'Analysis' tab of the software. The 'Process' section has a 'Run' button circled in red. Other sections include 'Peak pick' (radio buttons for Peak pick, All frequencies, Integrals), 'DOSY plot' (input fields for D Min: 0, D Max: 20, Digitization: 512, and a checked 'Auto' checkbox), 'Multiexponential' (input fields for Exponentials: 1, Random repeats: 100), 'Fit type' (radio buttons for Monoexponential, Multiexponential), and 'Fit equation' (radio buttons for Exponential, NUG).

Parámetros de difusión experimentales

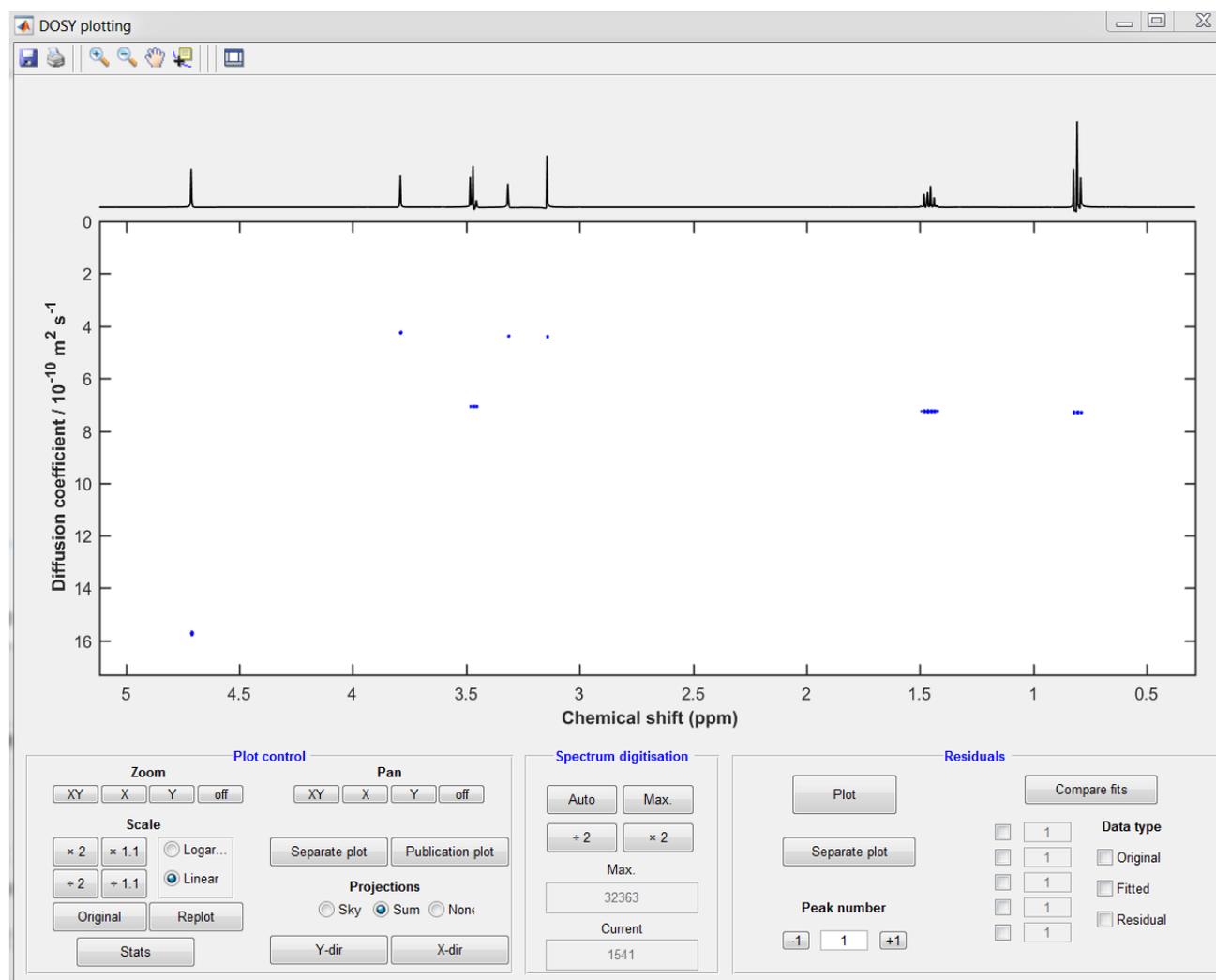
The 'Settings' dialog box shows the 'Diffusion' tab. Under 'Diffusion related parameters', there are options for 'Calculate diffusion parameters by pulse sequence type' (Monopolar, Bipolar) and a 'Restore Original' button. Below are input fields for Δ (0.071), Δ' (0.0703), δ (0.0021), γ (267524618.573), and τ (1223.5). A 'dosyconstant' field contains 22188166774.9105. On the right, a table lists T/m values for 13 different points.

	T/m
1	0.0482
2	0.0839
3	0.1084
4	0.1283
5	0.1455
6	0.1609
7	0.1749
8	0.1879
9	0.2000
10	0.2115
11	0.2223
12	0.2327
13	0.2426



General NMR Analysis Toolbox

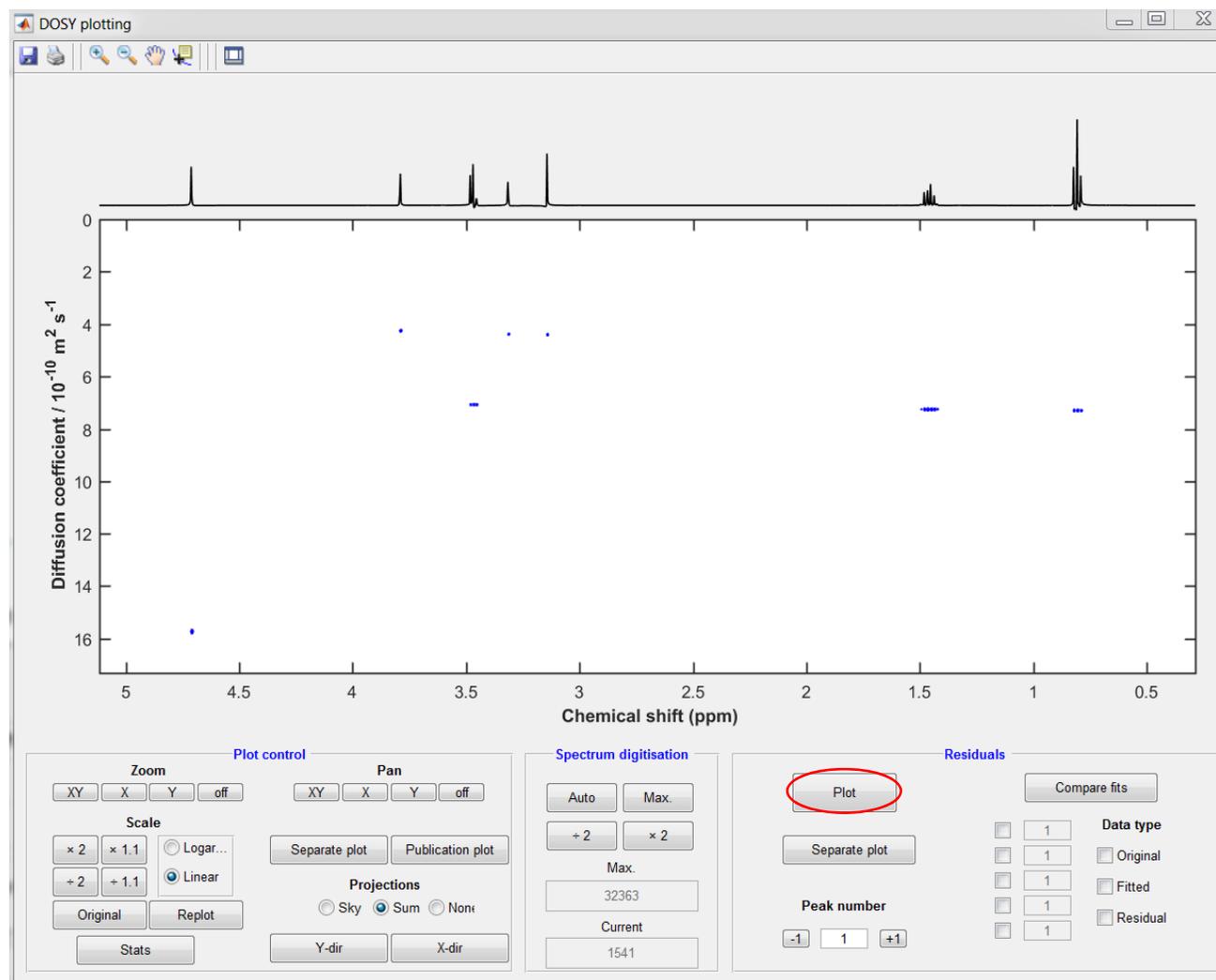
2D DOSY - Análisis univariante





General NMR Analysis Toolbox

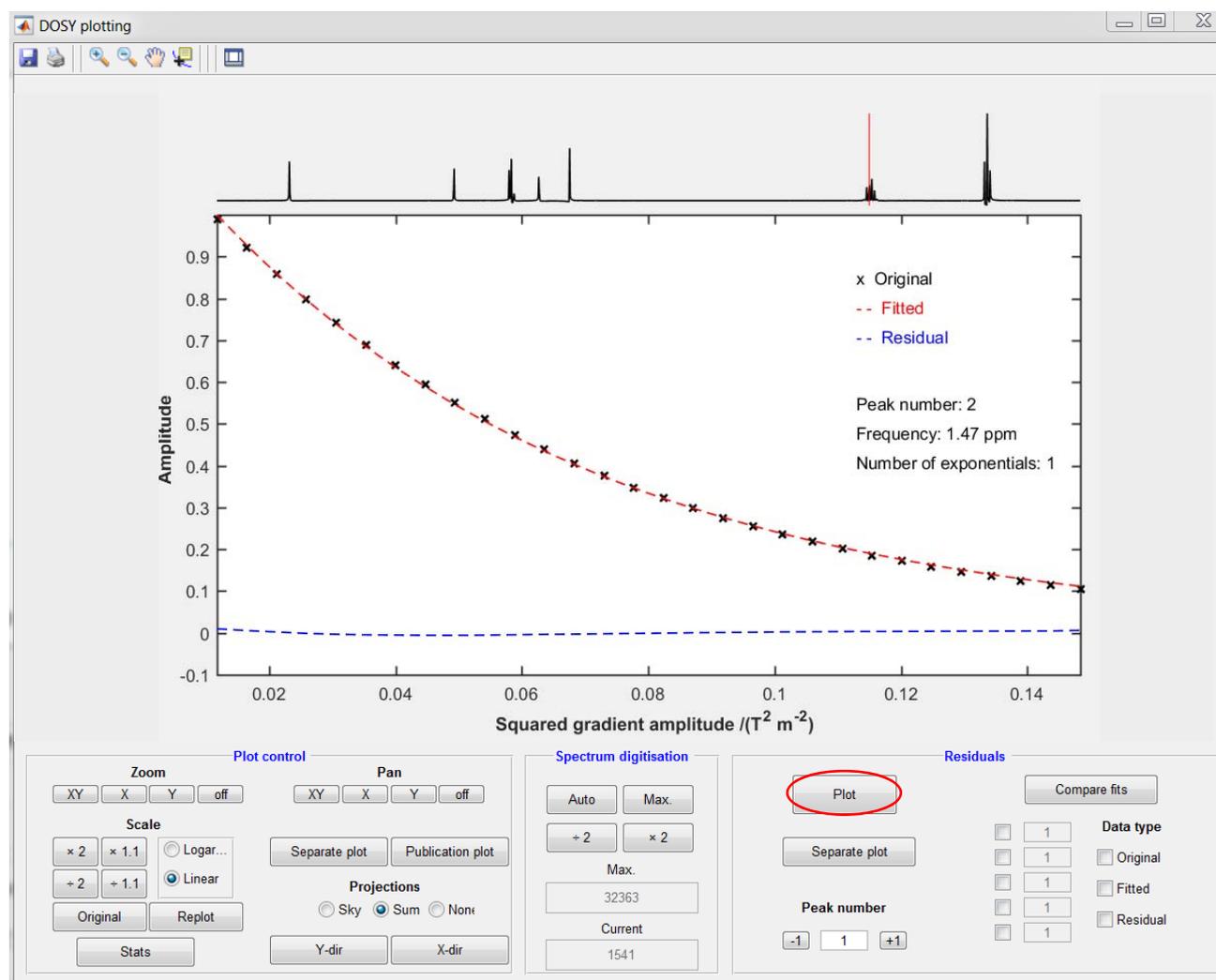
2D DOSY - Análisis univariante





General NMR Analysis Toolbox

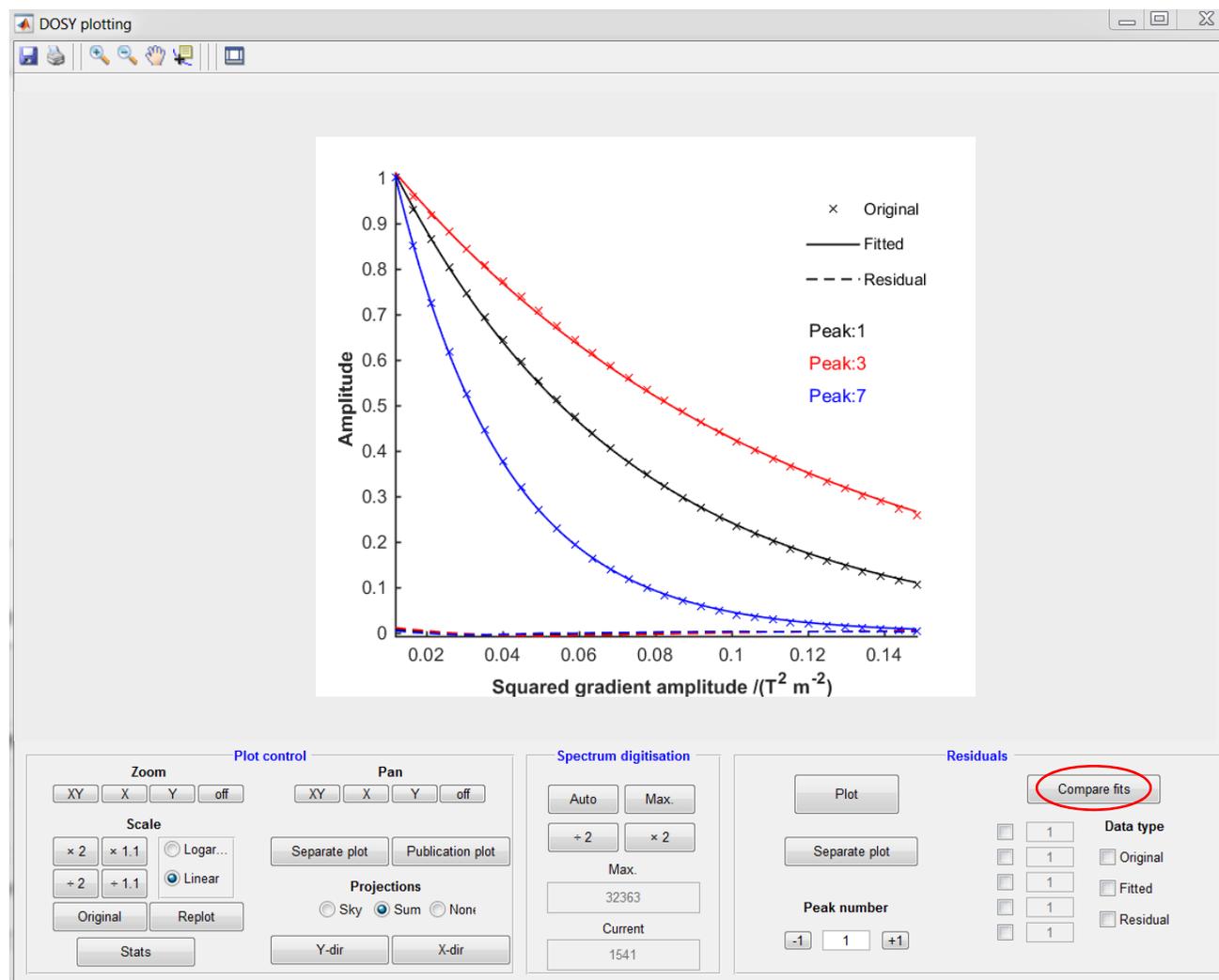
2D DOSY - Análisis univariante





General NMR Analysis Toolbox

2D DOSY - Análisis univariante





General NMR Analysis Toolbox

2D DOSY - Análisis univariante

DOSY plotting

Fitting statistics for a 2D DOSY experiment
Pure exponential fitting (Stejskal-Tanner equation)
Monoexponential fitting

```
*****Fit Summary*****
Frequency  Exp. Amp1  Fit. Amp11  error      Diff coef1  error
0.79258    0.41313    0.53800     0.00581    8.60266     0.11405
0.80752    0.81888    1.07713     0.01179    8.98509     0.11921
1.45253    0.20010    0.25992     0.00303    8.36409     0.12091
1.46747    0.20516    0.26340     0.00282    8.03095     0.10803
3.14445    0.49937    0.63075     0.01151    5.95994     0.15412
3.31515    0.50985    0.64831     0.01109    5.40882     0.15036
3.45598    0.26601    0.34631     0.00418    8.40595     0.12559
3.46927    0.52601    0.69149     0.00773    8.92506     0.12118
3.48271    0.26197    0.34098     0.00438    8.31934     0.13264
3.79066    0.31337    0.38389     0.00579    5.45490     0.12161
3.79170    0.31359    0.35672     0.00098    5.41969     0.02017
4.71136    0.36350    0.53970     0.00024    15.14912    0.00703
```

Plot control

Zoom: XY X Y off

Pan: XY X Y off

Scale: × 2 × 1.1 Logar...
+ 2 + 1.1 Linear

Projections: Sky Sum Noni

Original Replot

Stats

Spectrum digitisation

Auto Max

+ 2 × 2

Max. 32363

Current 1541

Residuals

Plot

Compare fits

Separate plot

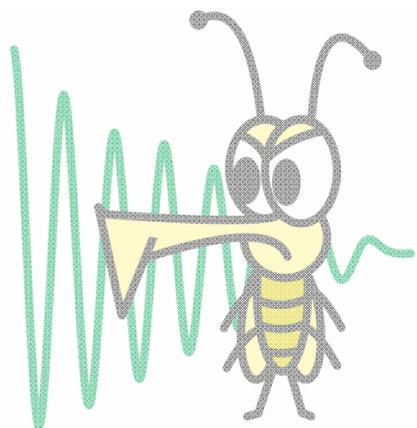
Peak number: -1 1 +1

Data type: Original Fitted Residual

Softwares para el procesamiento de los experimentos de difusión

GNAT

General NMR Analysis Toolbox



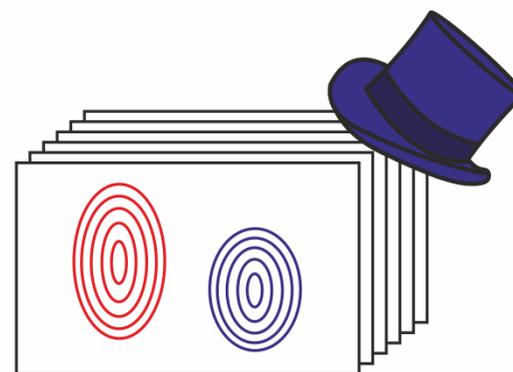
General NMR Analysis Toolbox

Procesamiento, visualizado y analisis de experimentos de difusión (pseudo-2D)

Basado en DOSY Toolbox

MAGNATE

Multidimensional Analysis for the GNAT Enviroment



maGNATE

Procesamiento, visualizado y analisis de experimentos de difusión (pseudo-3D)

Software libres y gratuitos

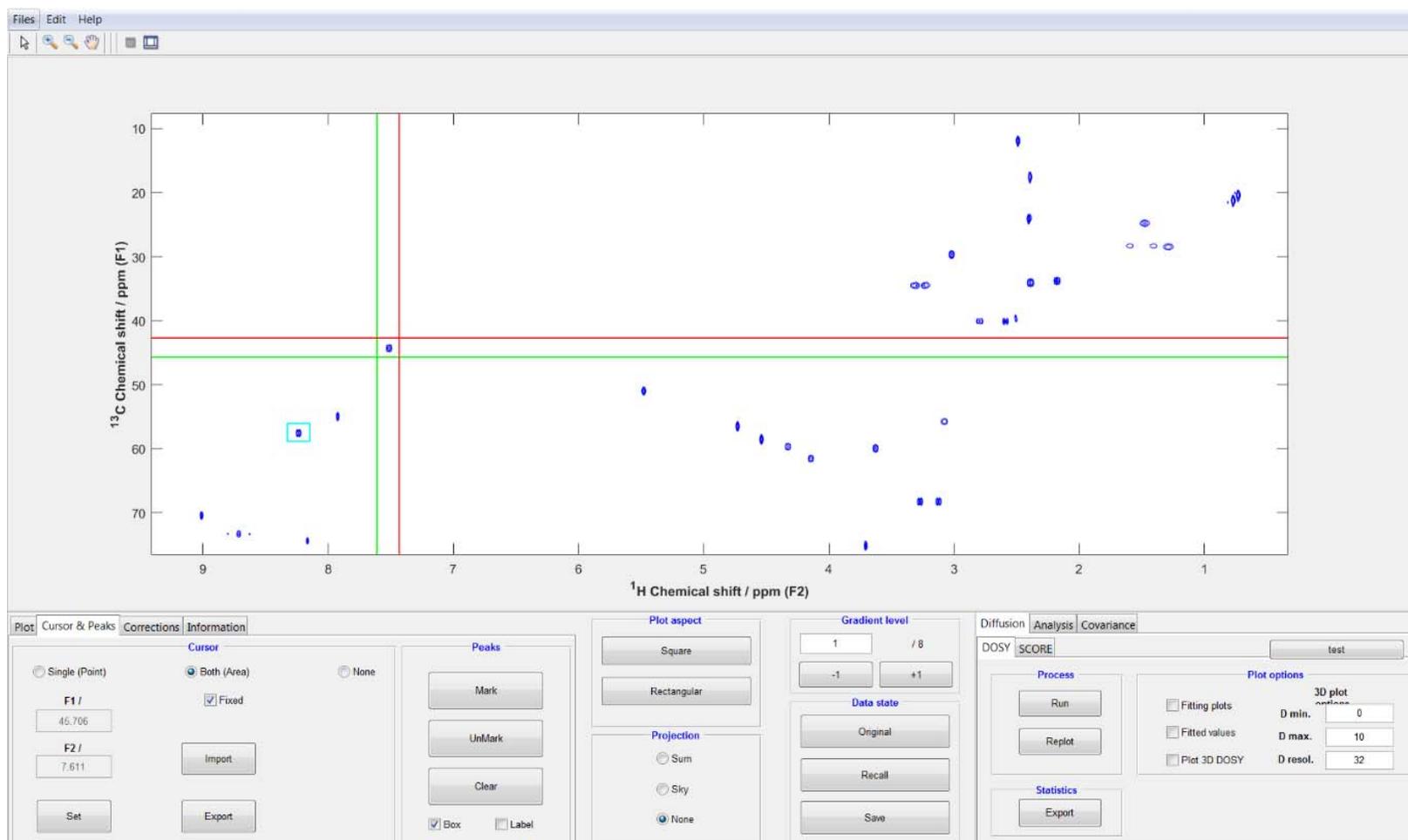
Interfaz de fácil uso para el usuario

MATLAB®

Multidimensional Analysis for the GNAT Enviroment



Ventana principal de MAGNATE



Acceso a todas las funciones de procesamiento y análisis uni- y multivariante

Multidimensional Analysis for the GNAT Enviroment



Ventana principal de MAGNATE

The screenshot displays the MAGNATE software interface. The main window has a menu bar with 'Files', 'Edit', and 'Help'. The 'Edit' menu is circled in red. A 'Settings' dialog box is open, showing the 'Diffusion' tab. The 'Diffusion related parameters' section includes a table of T/m values and input fields for Δ , Δ' , δ , γ , and τ . The 'dosyconstant' is also displayed.

	T/m
1	0.0482
2	0.0839
3	0.1084
4	0.1283
5	0.1455
6	0.1609
7	0.1749
8	0.1879
9	0.2000
10	0.2115
11	0.2223
12	0.2327
13	0.2436

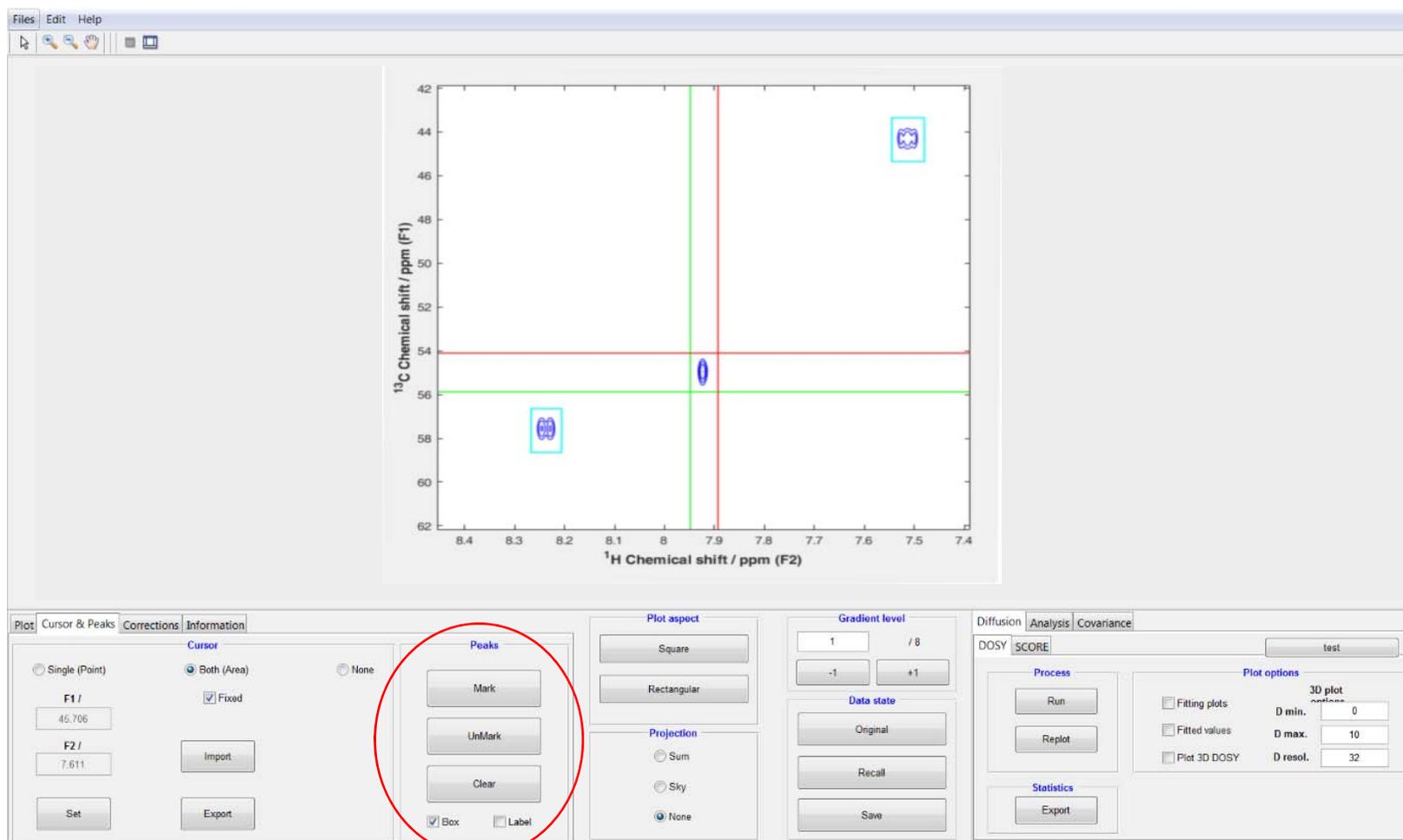
Below the dialog box, the main application window shows various control panels: 'Cursor' (Single/Both/None), 'Peaks' (Mark/UnMark/Clear), 'Plot aspect' (Square/Rectangular), 'Projection' (Sum/Sky/None), 'Gradient level' (1/8), 'Data state' (Original/Recall/Save), 'Process' (Run/Replot), and 'Plot options' (Fitting plots, Fitted values, Plot 3D DOSY, 3D plot options).

Acceso a todas las funciones de procesamiento y análisis uni- y multivariante

Multidimensional Analysis for the GNAT Enviroment



Ventana principal de MAGNATE

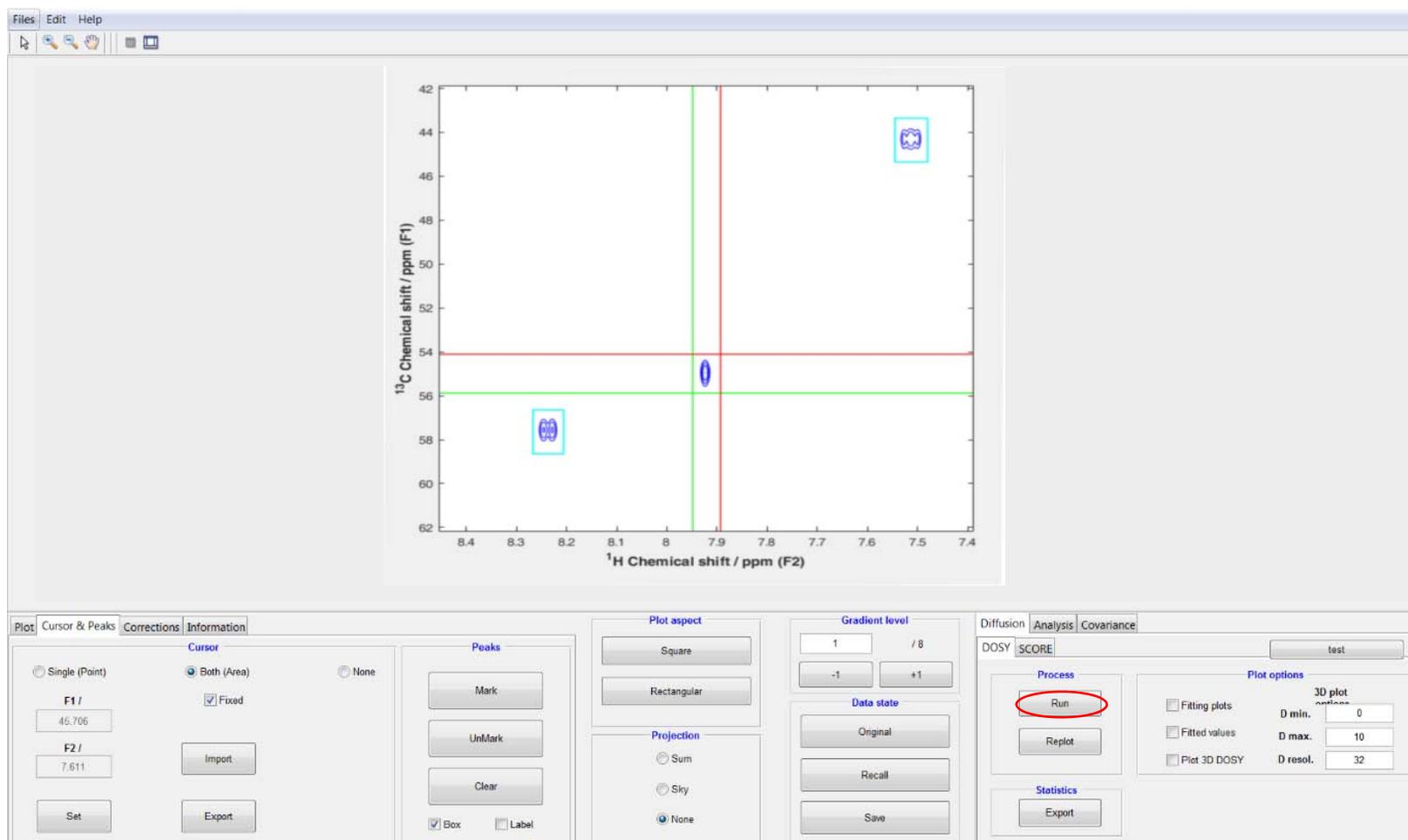


Acceso a todas las funciones de procesado y análisis uni- y multivariante

Multidimensional Analysis for the GNAT Enviroment



Ventana principal de MAGNATE

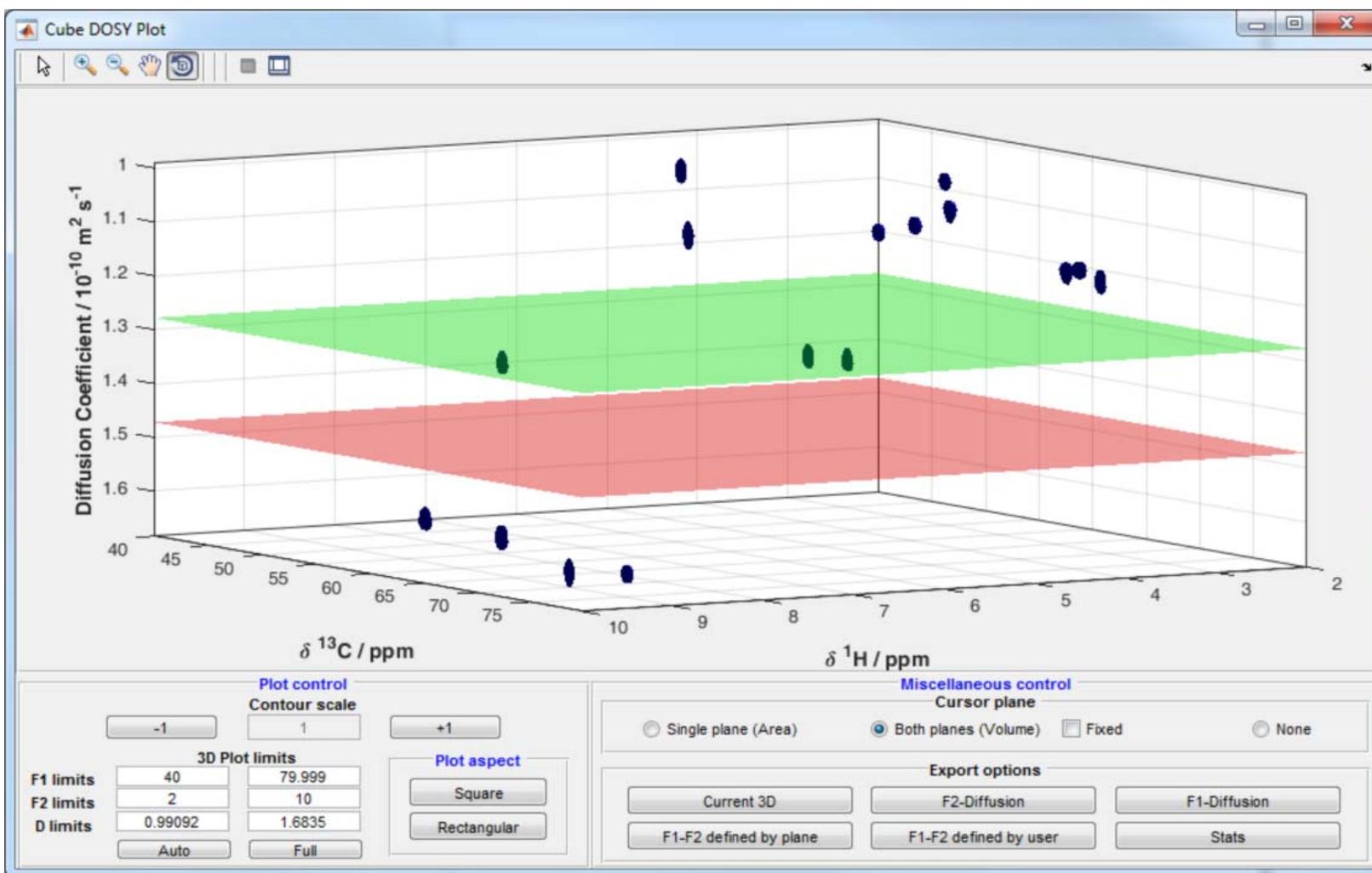


Acceso a todas las funciones de procesamiento y análisis uni- y multivariante

Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



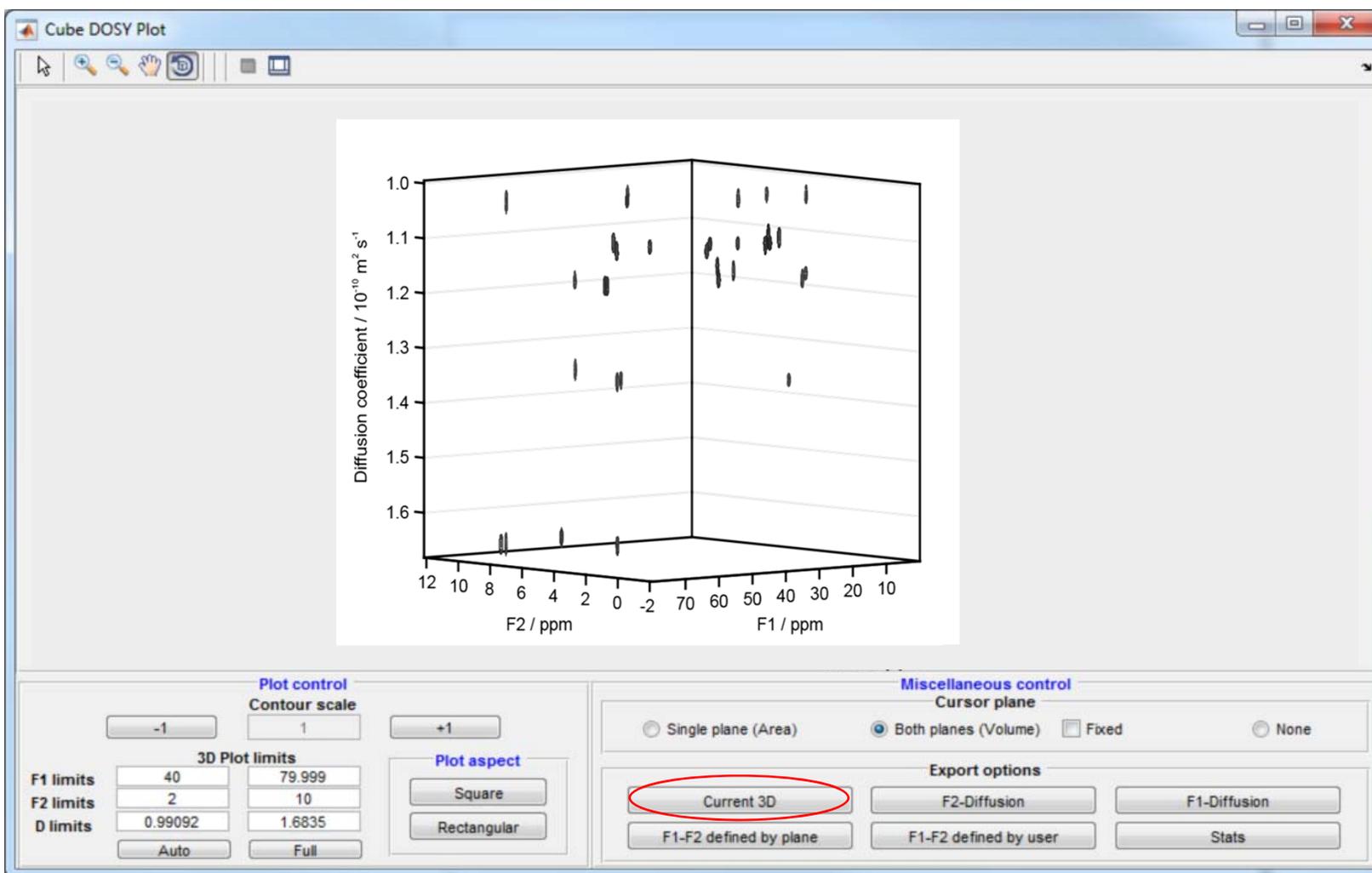
3D DOSY - Análisis univariante



Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



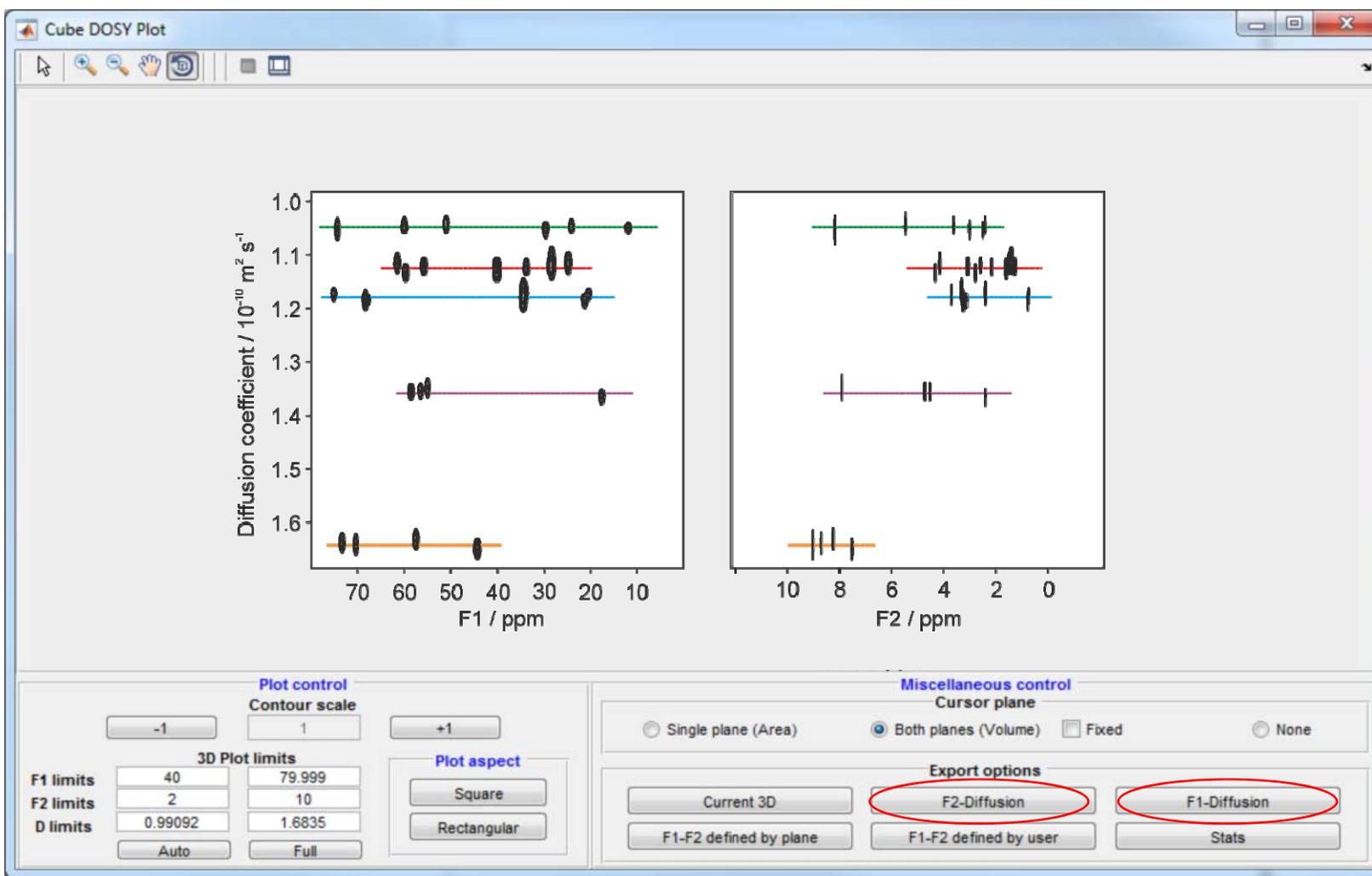
3D DOSY - Análisis univariante



Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



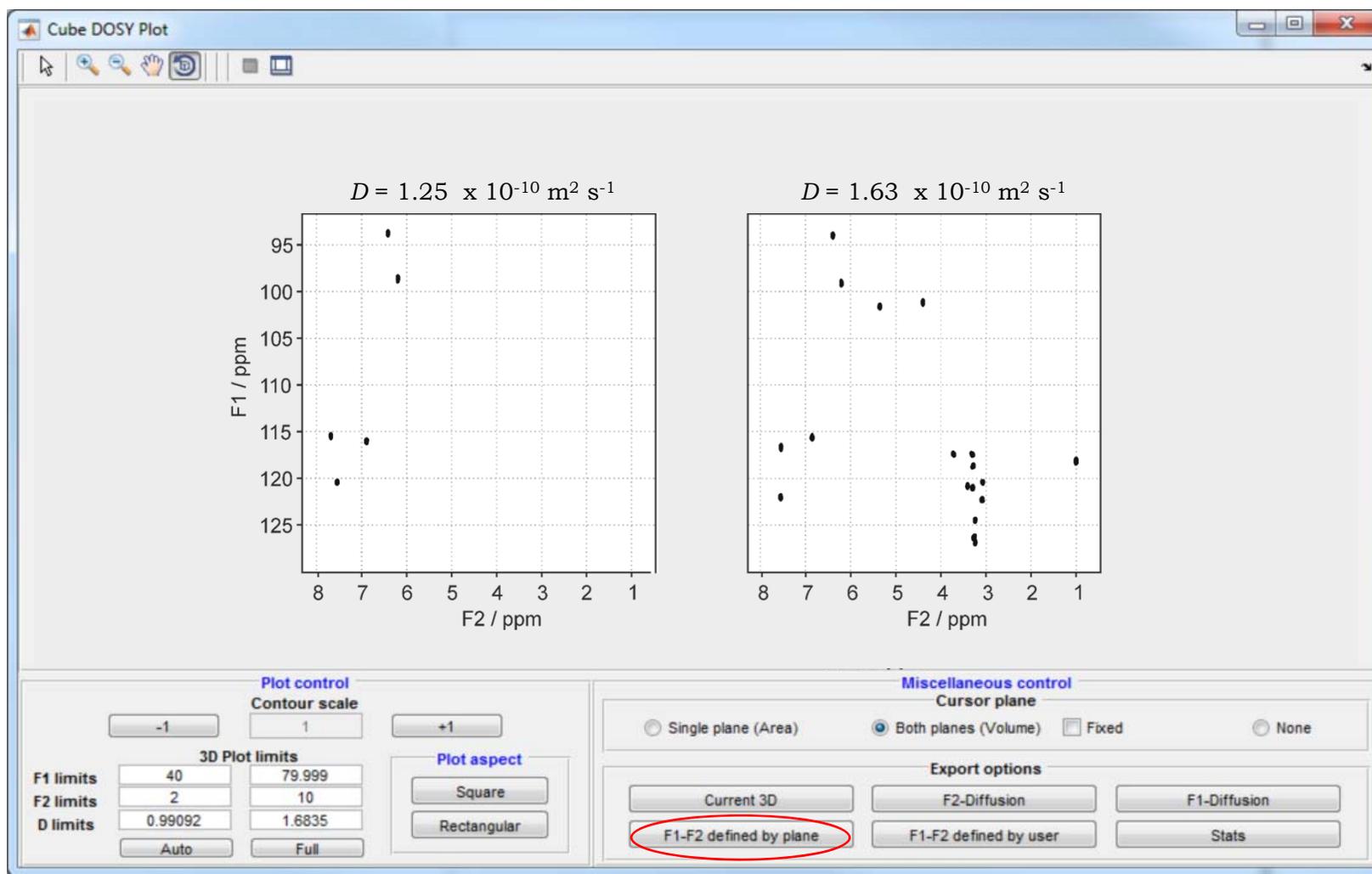
3D DOSY - Análisis univariante



Multidimensional Analysis for the GNAT Environment

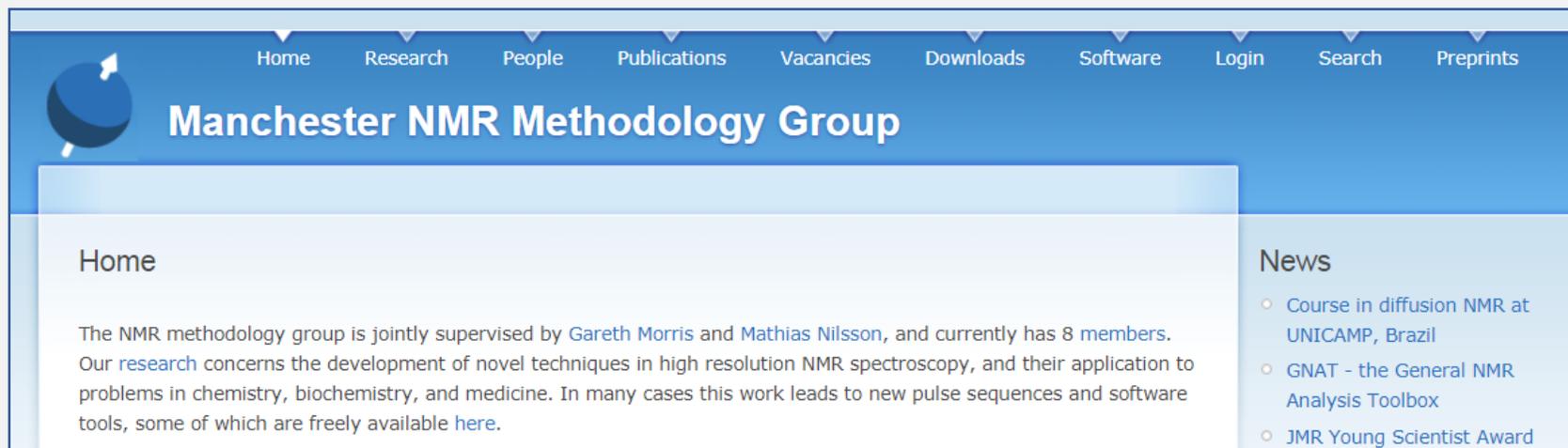


3D DOSY - Análisis univariante



Manchester NMR Methodology Group

<https://nmr.chemistry.manchester.ac.uk/>

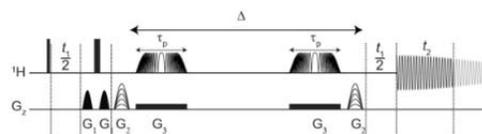


The screenshot shows the website's navigation menu with links for Home, Research, People, Publications, Vacancies, Downloads, Software, Login, Search, and Preprints. The main content area features a 'Home' section with a brief description of the group and a 'News' section with three items: 'Course in diffusion NMR at UNICAMP, Brazil', 'GNAT - the General NMR Analysis Toolbox', and 'JMR Young Scientist Award'.

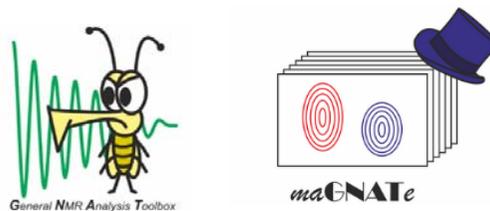
Pulse Sequences

We are currently preparing many of our pulse sequences, parameter sets, example datasets and processing macros for the website. Some are available here but if you would like to use any of the other the sequences, as described in the [publications](#) section, please email us. The majority of sequences are available for Varian systems and we are gradually writing the Bruker variants.

The pulse sequences and any macros required for data conversion can be accessed from [this part of the website](#).



Software



Workshops and presentations

The slides from some of the workshops and presentations given by group members are available from [this part of the website](#). There is a pure shift NMR package available for download as part of our [2017 workshop on pure shift NMR](#).



Manchester NMR Methodology Group

Prof. Gareth A. Morris

Dr. Mohammadali Foroozandeh

Guilherme Dal Poggetto

Prof. Mathias Nilsson

Dr. Peter Kiraly

Pinelopi Moutzouri

Dr. Ralph Adams



Lecturas recomendadas sobre los experimentos de difusión

Prog. Nuc. Magn. Reson. Sp. **34**, 203 (1999)

Concepts Magn. Reson. **14**, 25 (2002)

eMagRes (2007) DOI: 10.1002/9780470034590.emrstm1388

J. Magn. Reson. **200**, 296 (2009)

eMagRes (2009) DOI: 10.1002/9780470034590.emrstm0119.pub2

Nat. Prod. Reports **28**, 78 (2011)

Concepts Magn. Reson. A **40A**, 39 (2012)

eMagRes (2016) DOI: 10.1002/9780470034590.emrstm1388

High-resolution NMR techniques in organic chemistry, 3rd Ed, Elsevier, Chapter 10 (2016)

Analyst **142**, 3771 (2017)

Magn. Reson. Chem. **56**, 546 (2018)

Muchas gracias por su atención



Laura Castañar Acedo

laura.castanaracedo@manchester.ac.uk

[@laura_castanar](https://twitter.com/laura_castanar)

NMR Methodology group

The University of Manchester, UK