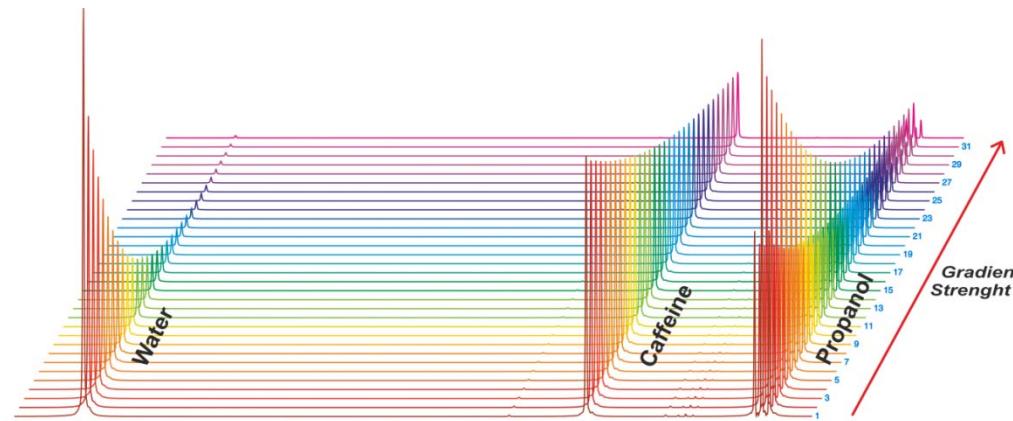




# Difusión en RMN

*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

## Estructura

---

### **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

## Estructura

---

### 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

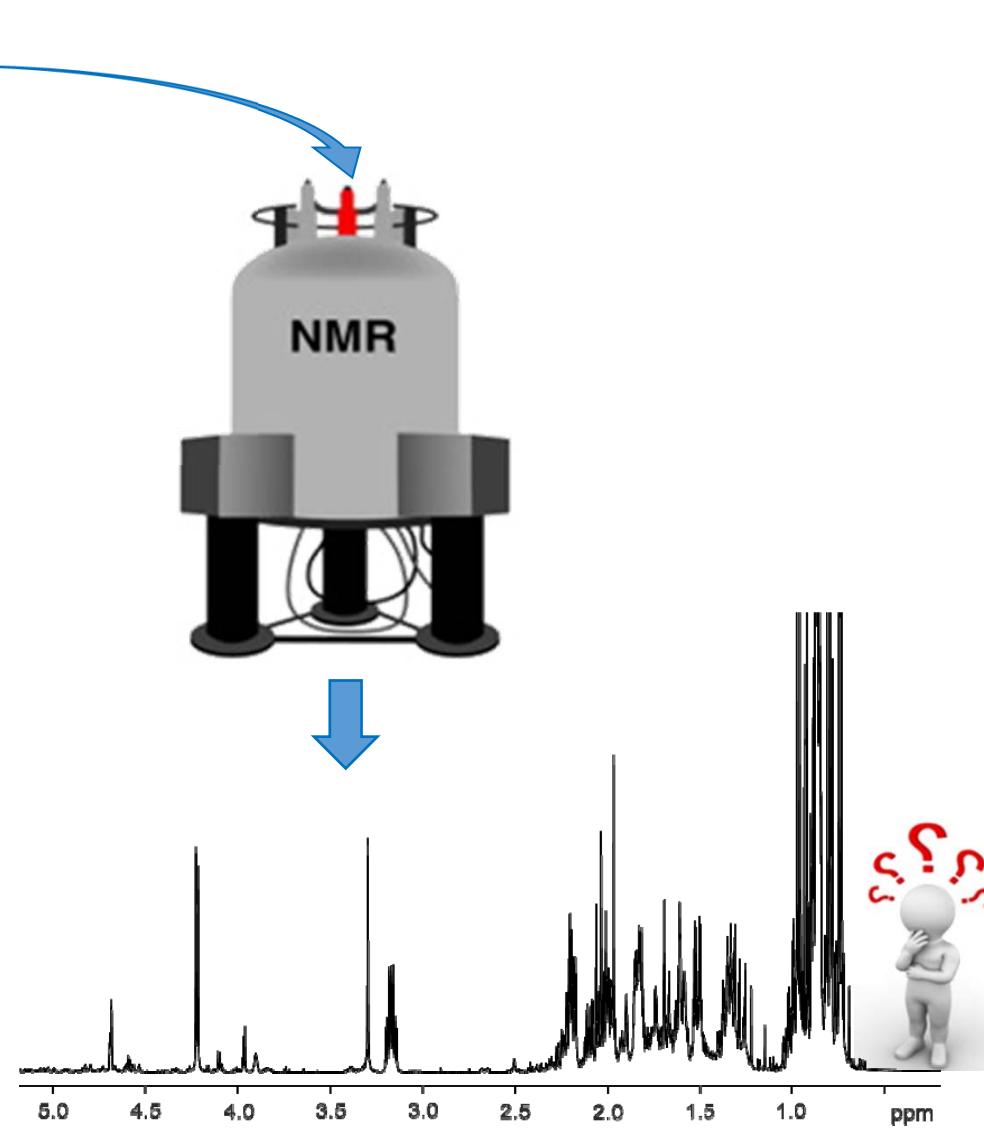
GNAT

MAGNATE

## ¿Por qué usar RMN para el análisis de mezclas?

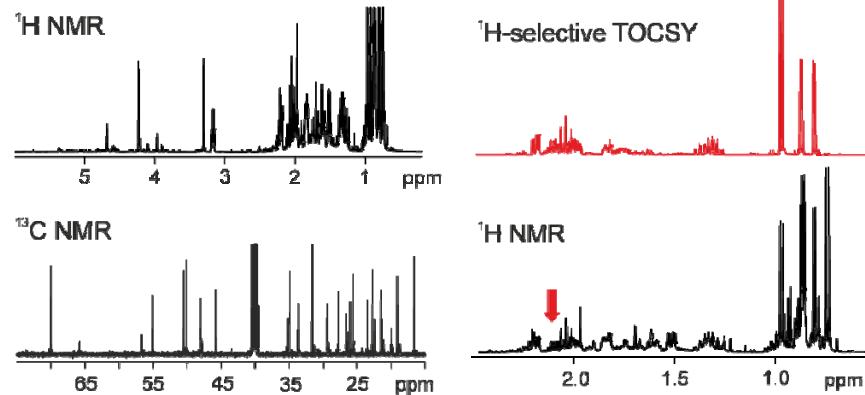


- ✓ No destructiva
- ✓ No requiere separación física
- ✓ Información de los componentes
- ✓ Información estructural

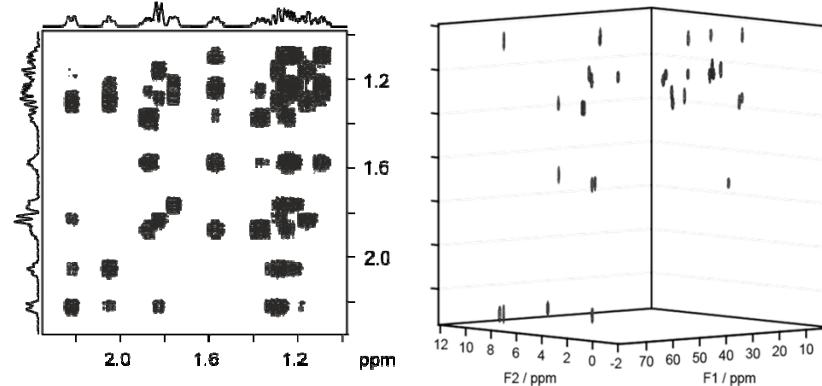


## Métodos de RMN para el análisis de mezclas

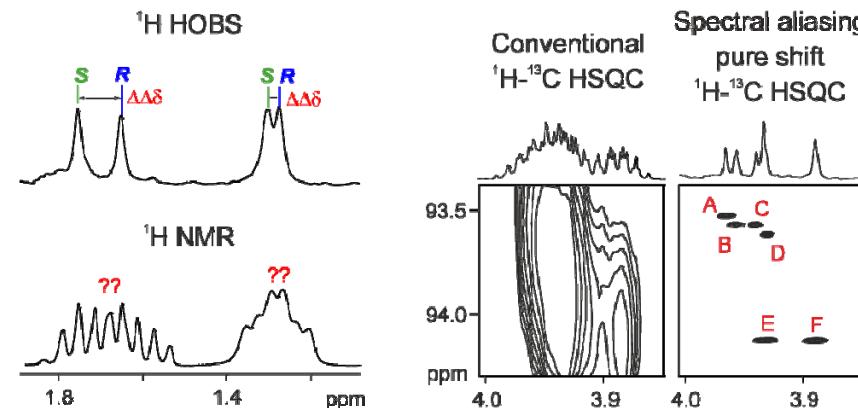
### Experimentos 1D



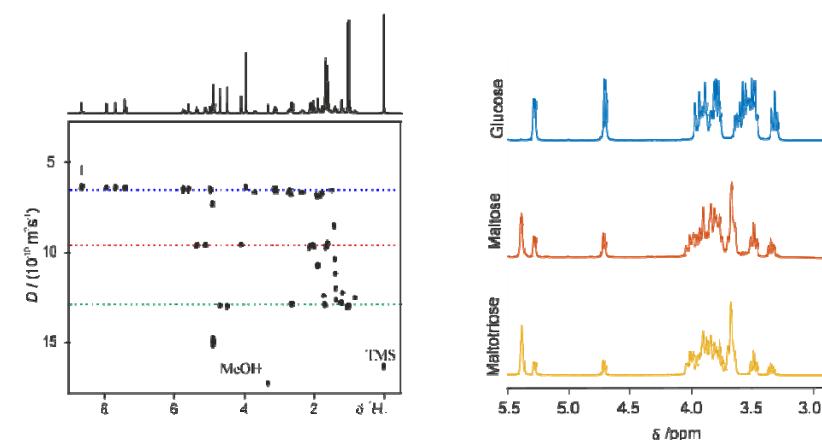
### Experimentos nD



### Experimentos pure shift

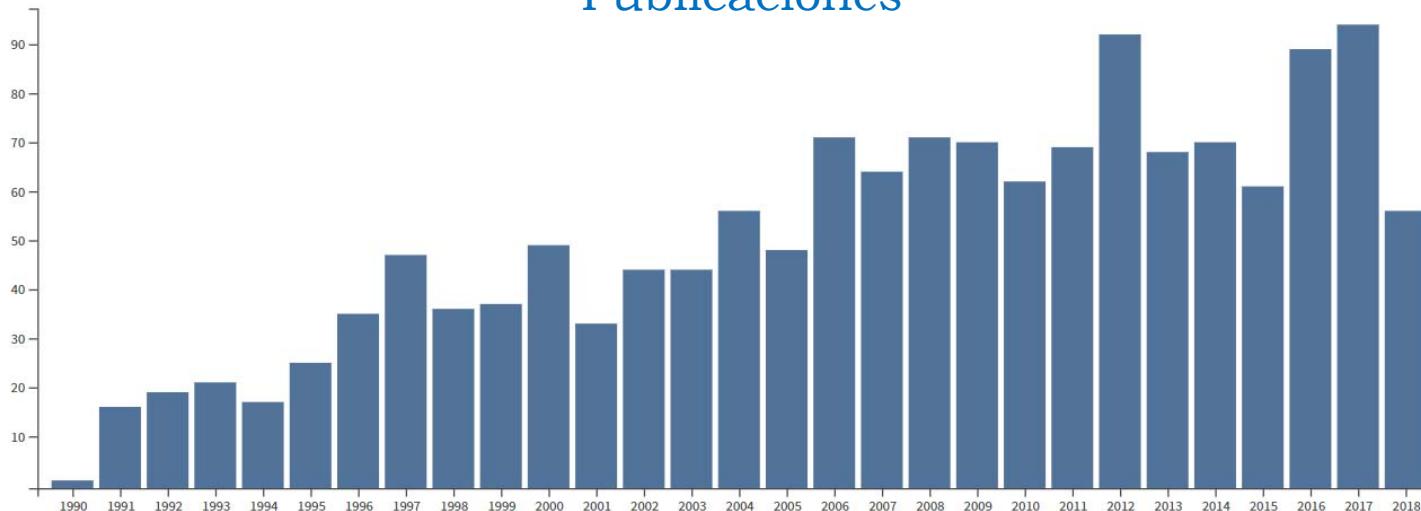


### Experimentos de difusión

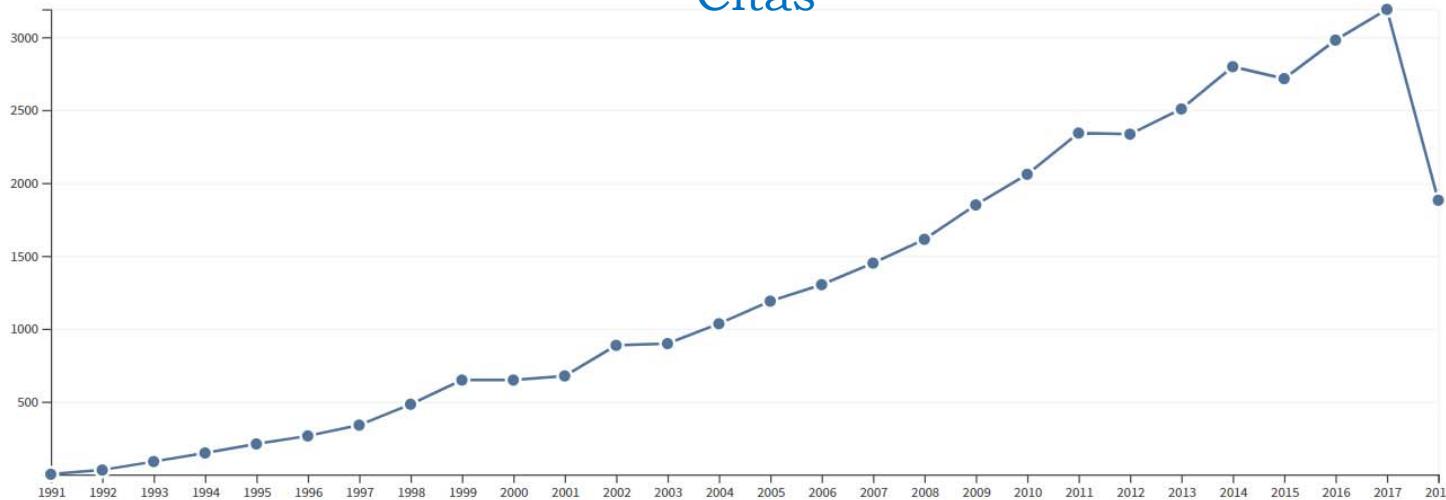


## Difusión en RMN para el estudio de mezclas

Publicaciones



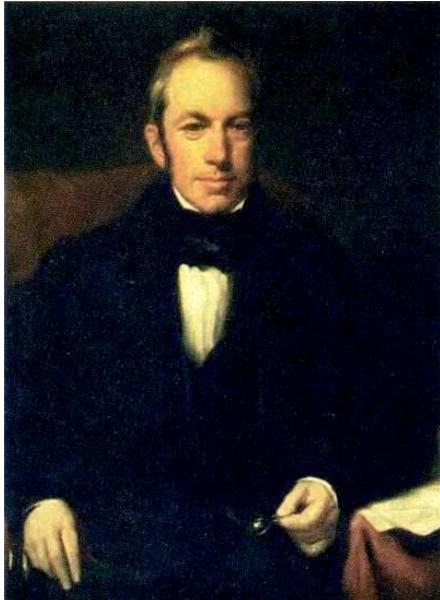
Citas



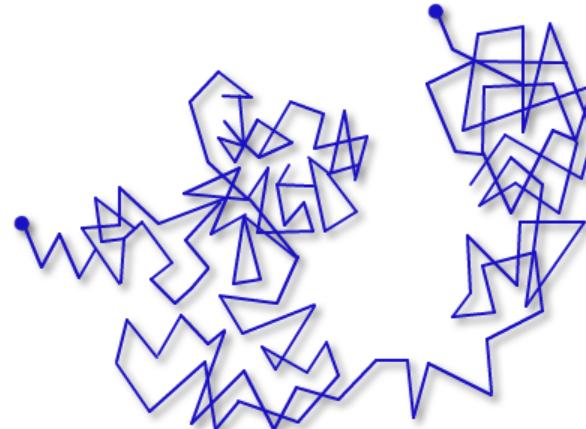
# Fundamentos de la difusión

## Difusión molecular translacional

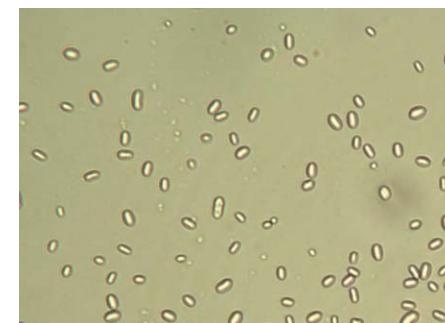
### Movimiento Browniano



Robert Brown  
(1773-1858)



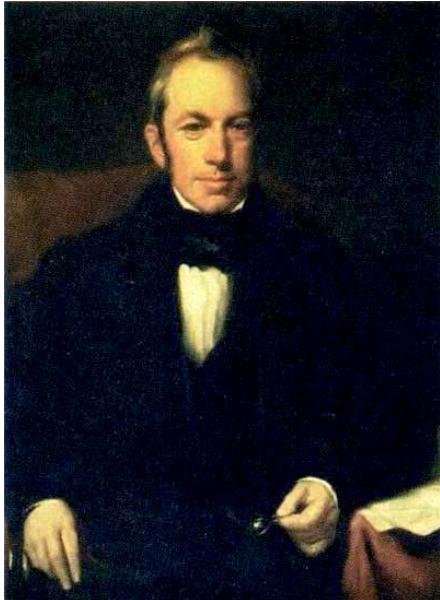
Movimiento aleatorio de las partículas en estado líquido debido a las colisiones entre todas las partículas presentes en el medio



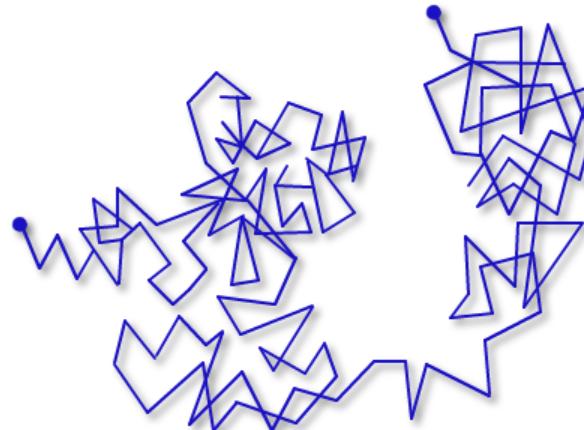
La difusión translacional es debida al movimiento Browniano de la moléculas en disolución en ausencia de fuerzas externas (como gradientes de concentración o campos eléctricos)

## Difusión molecular translacional

### 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

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

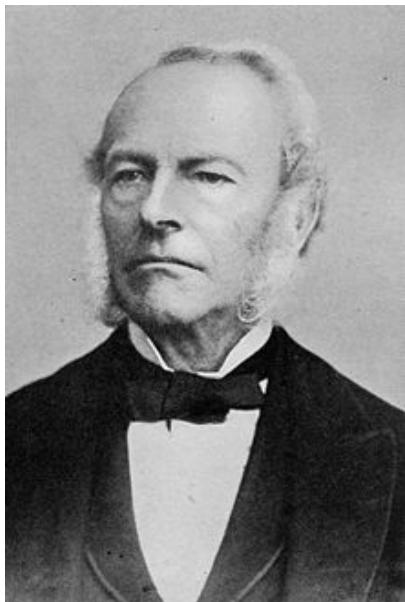
$$Z_{rms} = \sqrt{6Dt}$$

Coeficiente de auto-difusión

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

## Coeficiente de (auto)difusión translacional

Stokes-Einstein



George G. Stokes  
(1819-1903)

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

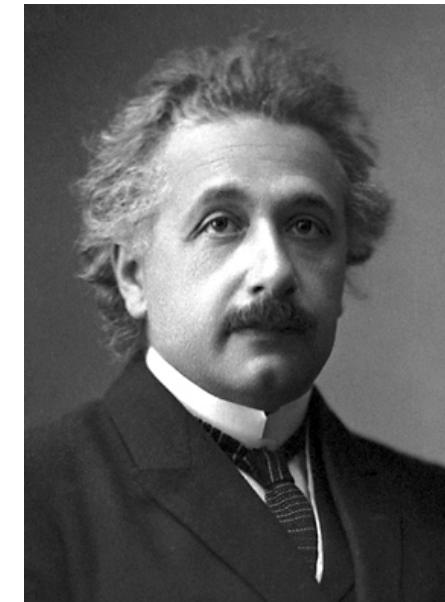
$k$ : Constante de Boltzman

$T$ : Temperatura

$f$ : Coeficiente de fricción

$\eta$ : Viscosidad del medio

$r$ : Radio de la esfera



Albert Einstein  
(1879-1955)

Aproximación:  
Disolución homogénea  
Tamaño disolvente << soluto  
Partícula esférica

## Coeficiente de (auto)difusión translacional

Stokes-Einstein

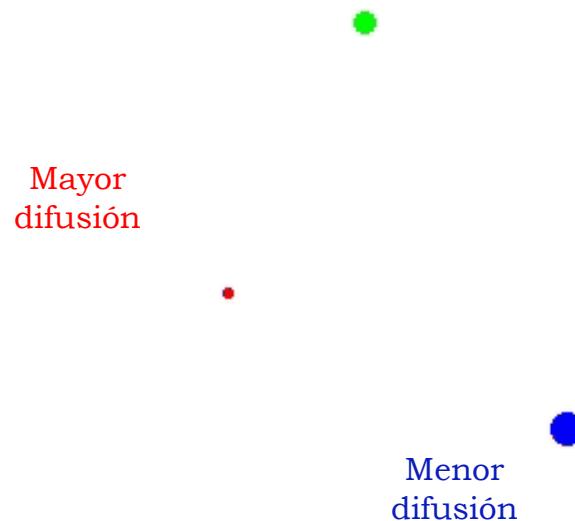
$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

$k$ : Constante de Boltzman

$T$ : Temperatura

$\eta$ : Viscosidad del medio

$r$ : Radio de la esfera



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 esférica

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



Moléculas de geometría plana aleatoria

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

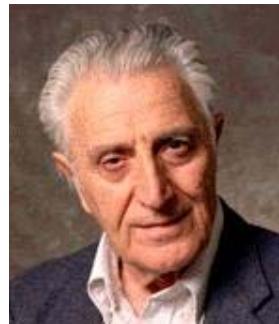


Molécula lineares rígidas

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

# Experimento básico de difusión

## Eco de espín



Erwin L. Hahn  
(1921-2016)

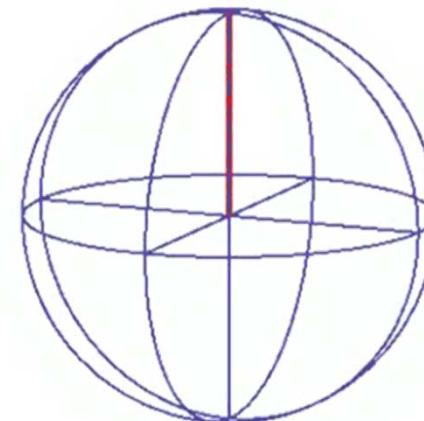
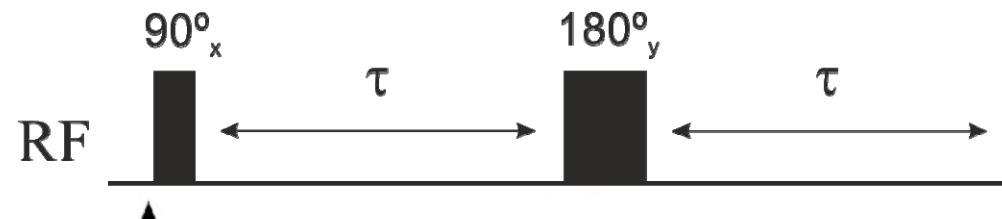


Edward M. Purcell  
(1912-1997)



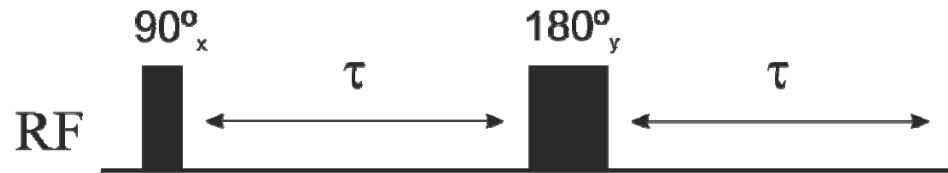
Herman L. Carr  
(1924-2008)

### Los primeros experimentos

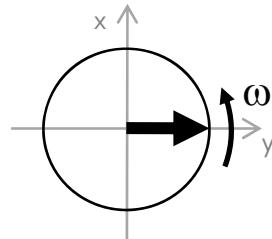


## Eco de espín

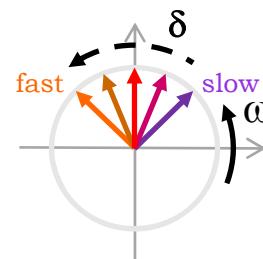
### Reenfoque de la magnetización



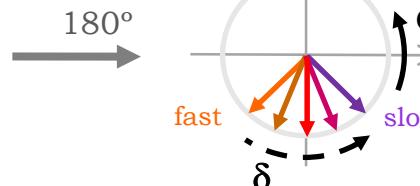
Los espines precesionan en el plano xy durante un tiempo  $\tau$



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

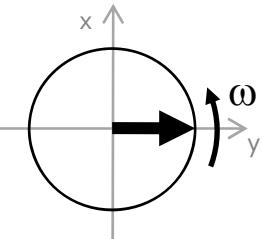


Tras un tiempo  $\tau$  los espines han adquirido una diferencia de fase ( $\phi$ ) proporcional al  $\delta$



El pulso de 180° invierte la posición de los spines en el plano xy

Los espines precesionan en el plano xy durante el mismo tiempo  $\tau$

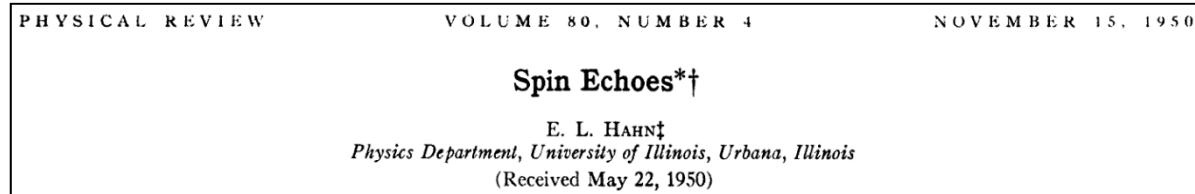


El segundo tiempo de precesión  $\tau$  reenfoca la magnetización de los espines

## Eco de espín



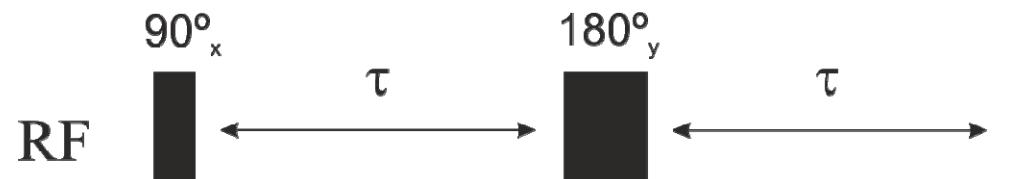
Erwin L. Hahn  
(1921-2016)



### 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,  $D$ ...”*

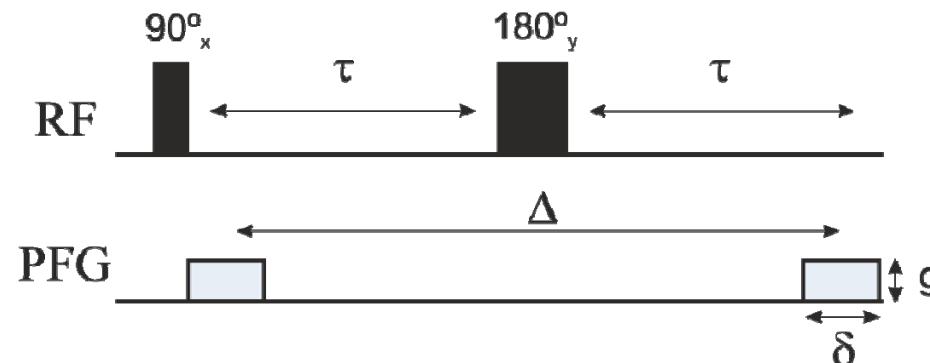


## Eco de espín con gradientes

Stejskal-Tanner



Edward O. Stejskal



John E. Tanner

En presencia de un gradiente de campo magnético, la difusión de las moléculas durante  $\Delta$  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

$2\tau$ : Tiempo total del echo

$T_2$ : Constante de relajación transversal

$D$ : Constante de difusión

$\gamma$ : Constante giromagnética

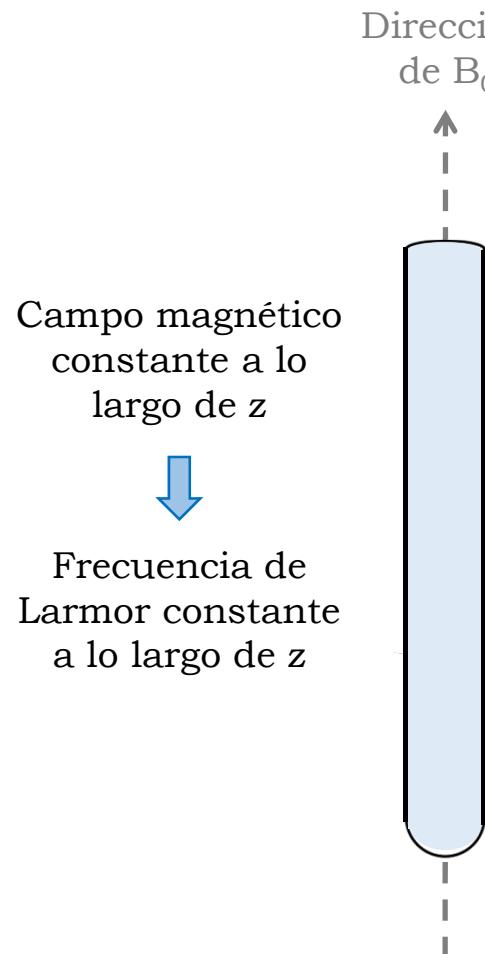
$\delta$ : Duración del gradiente

$g$ : Fuerza del gradiente

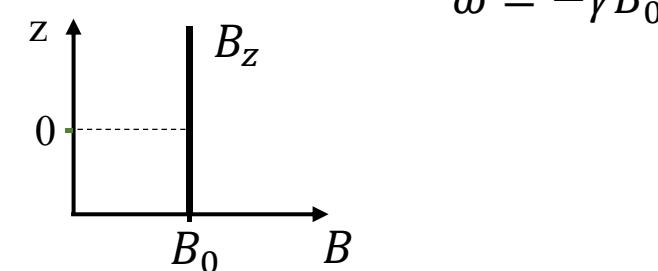
$\Delta$ : Tiempo de difusión

## Eco de espín con gradientes

### Gradientes de campo magnético (PFG)



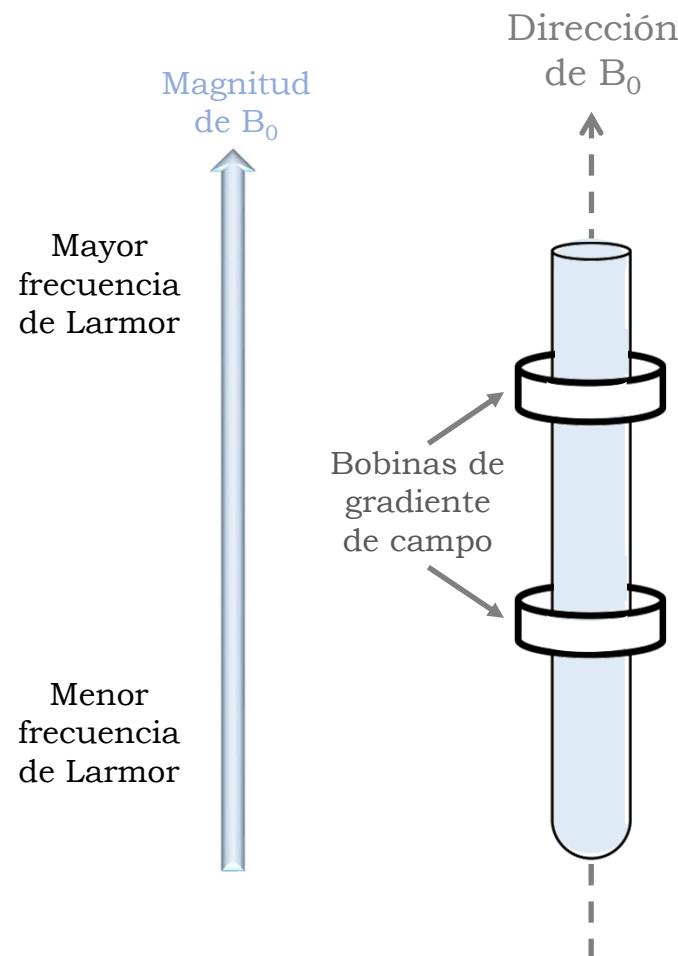
En ausencia de PFG:  $B_z = B_0$



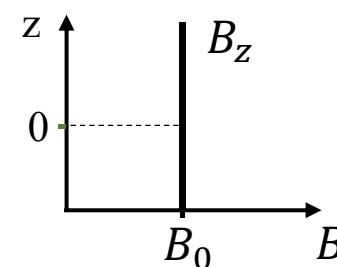
$$\omega = -\gamma B_0$$

## Eco de espín con gradientes

### Gradientes de campo magnético (PFG)



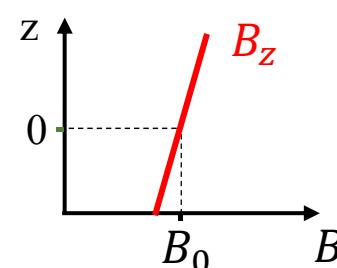
$$\text{En ausencia de PFG: } B_z = B_0$$



$$\omega = -\gamma B_0$$

Frecuencia de Larmor constante a lo largo de  $z$

$$\text{En presencia de PFG: } B_z = B_0 + zG_z$$

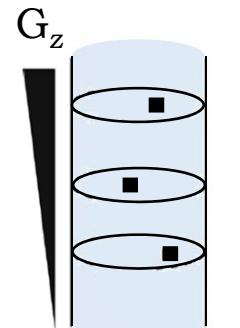


$$\omega = -\gamma(B_0 + zB_z)$$

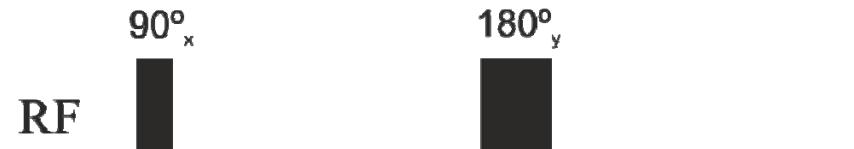
Frecuencia de Larmor varía linealmente a lo largo de  $z$

## Eco de espín con gradientes

### Eco de espín con gradientes de campo (PFGSE)



Sin difusión

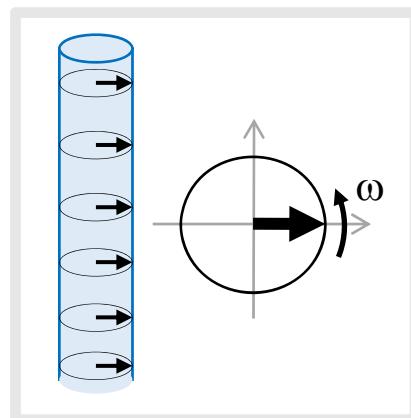


PFG

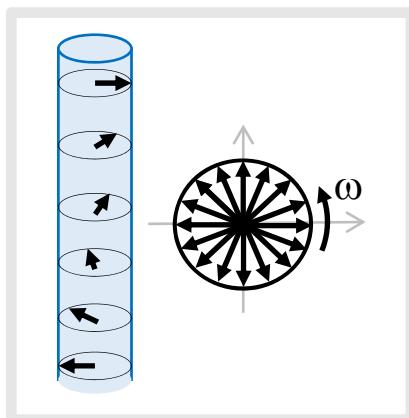
Desfasa

Reenfoca

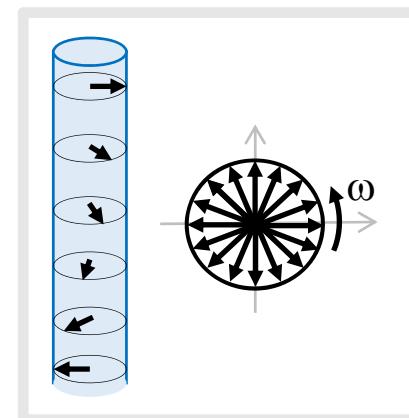
La pérdida de coherencia en  $M_x/M_y$  causada por la inhomogeneidad de  $B_0$  al usar PFG es reversible



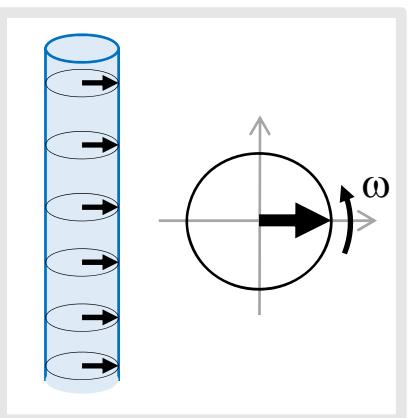
Tras la excitación de todos los espines está a lo largo del eje y



Cada espín precesiona con una frecuencia diferente dependiendo de su posición



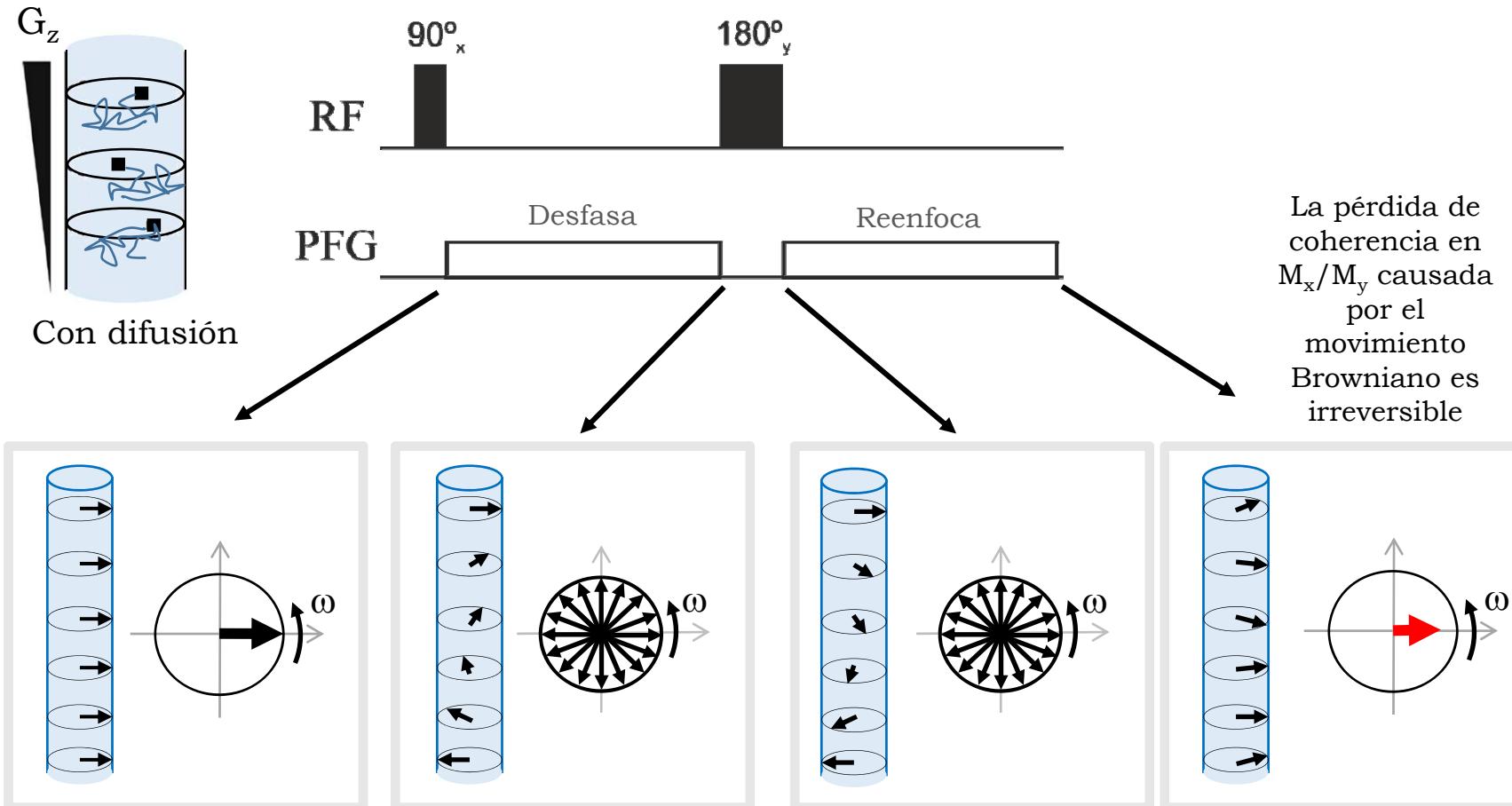
El pulso de  $180^\circ$  invierte todos los spines



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

## Eco de espín con gradientes

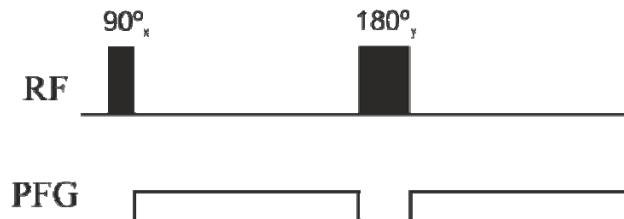
### Eco de espín con gradientes de campo (PFGSE)



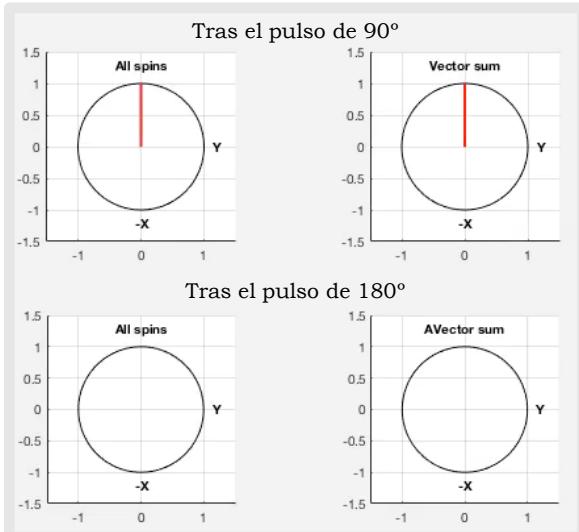
Debido al **movimiento Browniano** de las partículas a lo largo de la muestras durante el curso del experimento no todos los espines son perfectamente reenfocados lo que provoca una **atenuación de la señal**

## Eco de espín con gradientes

### Efecto de la difusión y los gradientes



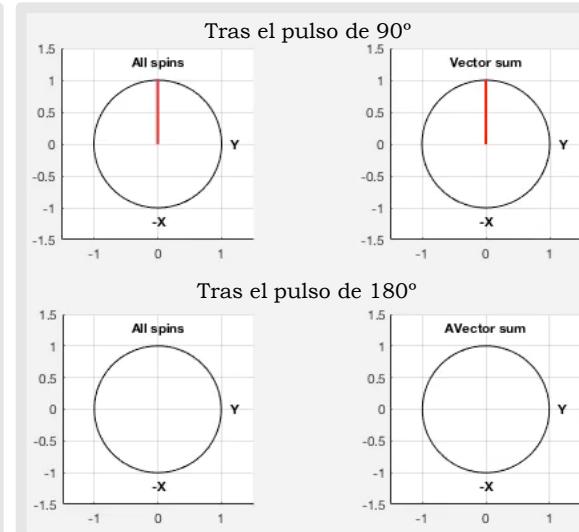
#### Efecto de los PFG



Pérdida de coherencia reversible

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

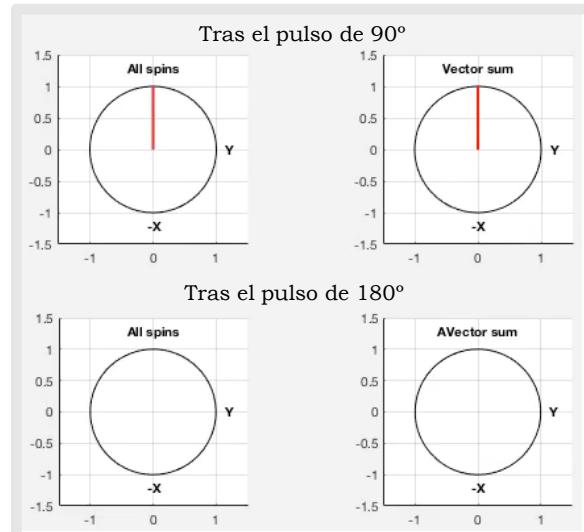
#### Efecto de la difusión



Pérdida de coherencia irreversible

Cambio aleatorio de la posición de cada espín durante el gradiente

#### Efecto de ambos

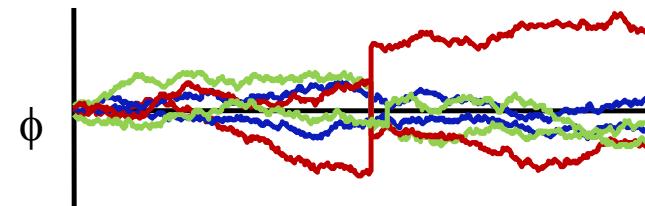
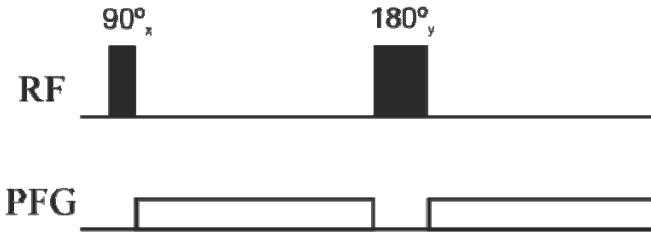


La pérdida de coherencia provoca una **atenuación de la señal**

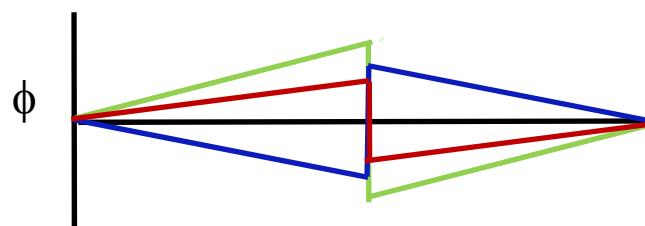
## Eco de espín con gradientes

Influencia del tamaño y la forma de las partículas

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



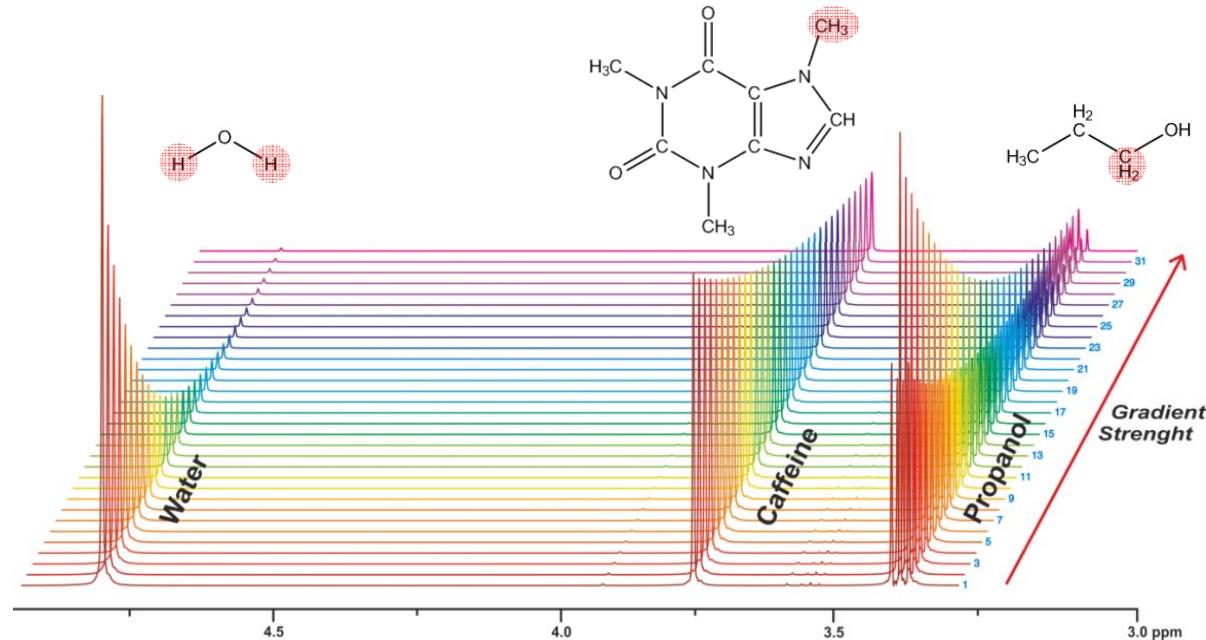
Con difusión



Sin difusión

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

## Análisis de mezclas mediante experimentos de difusión



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

Diferenciación de los componentes basada en los diferentes  $D$

Información fisico-química de los componentes

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

## Estructura

---

### 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

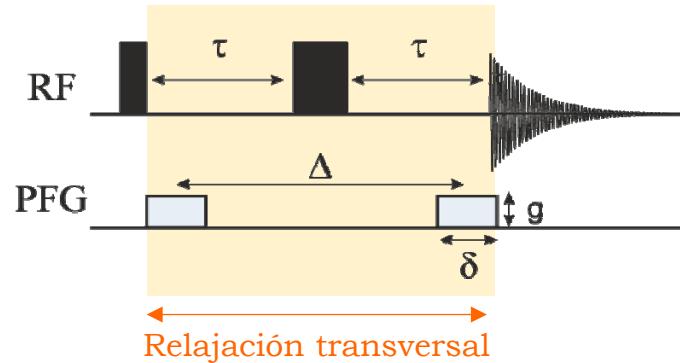
GNAT

MAGNATE

# Experimentos de difusión

## PFGSE vs PFGSTE

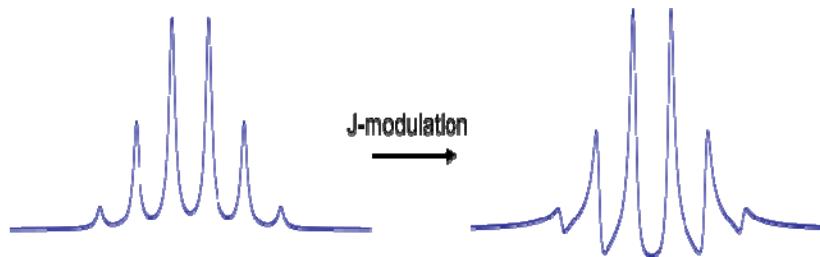
### Eco de espín con gradientes de campo (PFGSE)



Durante todo el experimento la magnetización está en el plano  $xy$

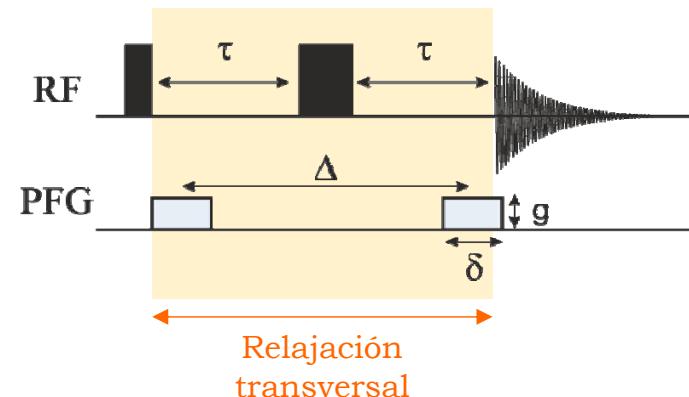
Consecuencias:

- El valor de  $\Delta$  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  $2\tau$



## PFGSE vs PFGSTE

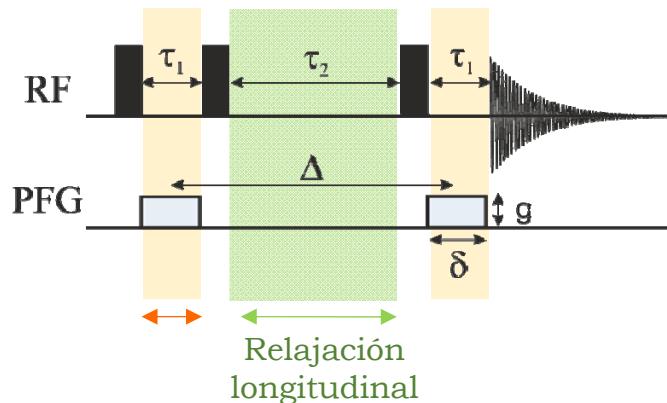
### PFGSE



#### Limitaciones:

- $\Delta$  limitado por  $T_2$  de los componentes
- Distorsión de las señales (evolución de  $J$ )

### Stimulated-echo (PFGSTE)



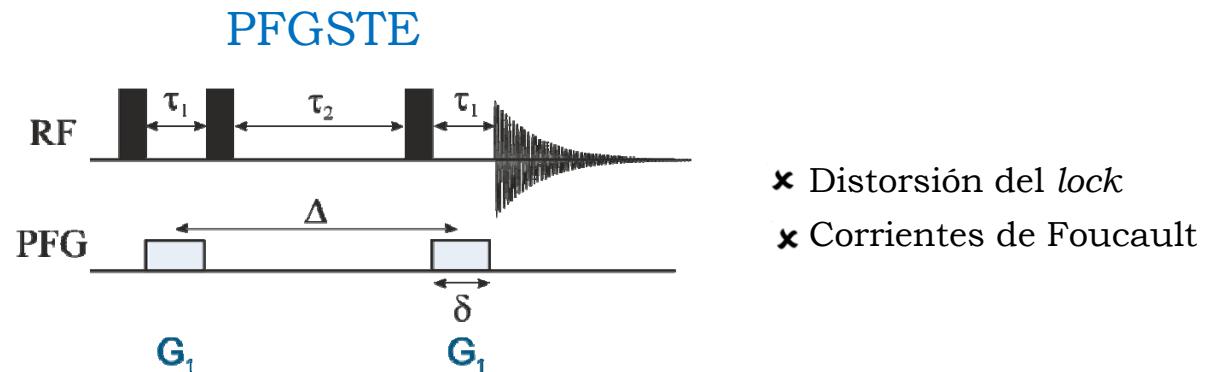
#### Beneficios:

- Durante  $\Delta$  la magnetización está 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 perdida de señal por relajación transversal
  - La modulación de  $J$

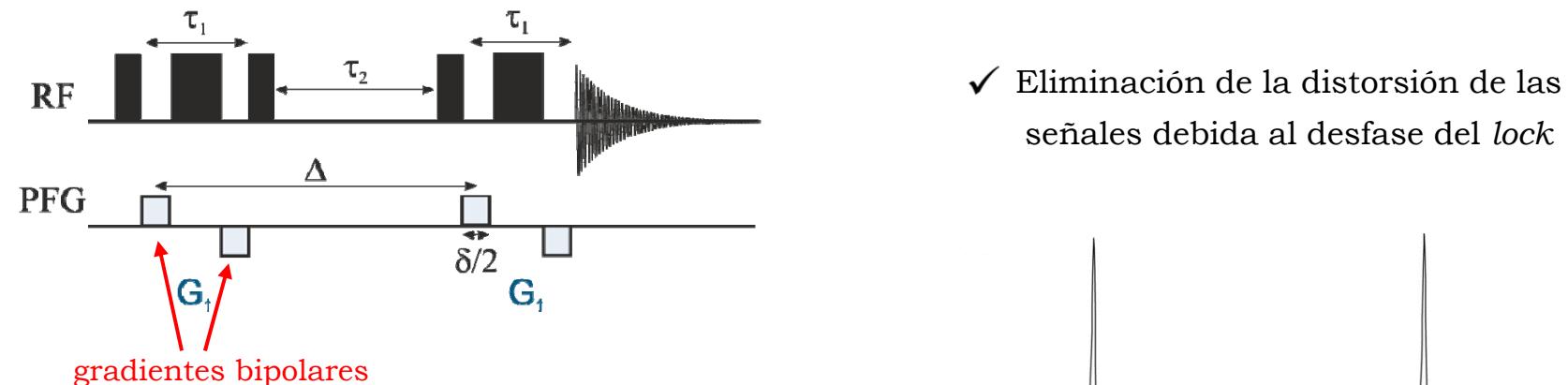
#### Inconvenientes:

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

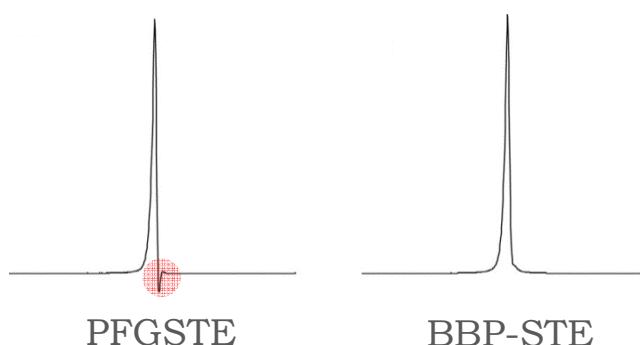
## Mejora de los experimentos PFGSTE



## Bipolar Pulse Pair (BPP-STE)

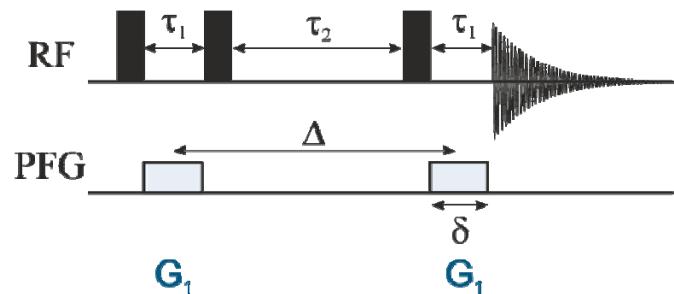


El par de gradientes bipolares (BBP)  
compensan la distorsión del lock



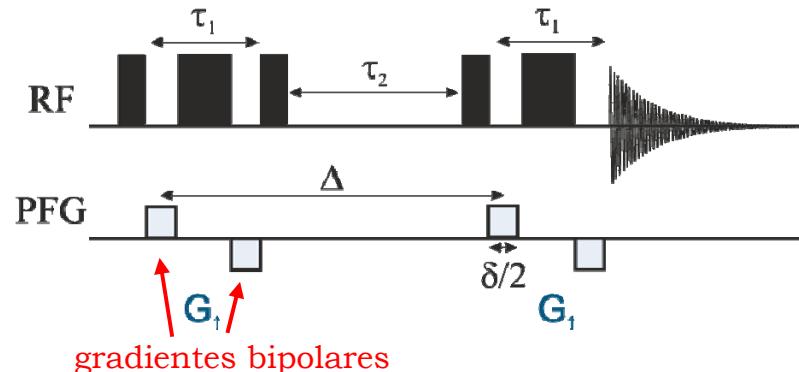
## Mejora de los experimentos PFGSTE

PFGSTE



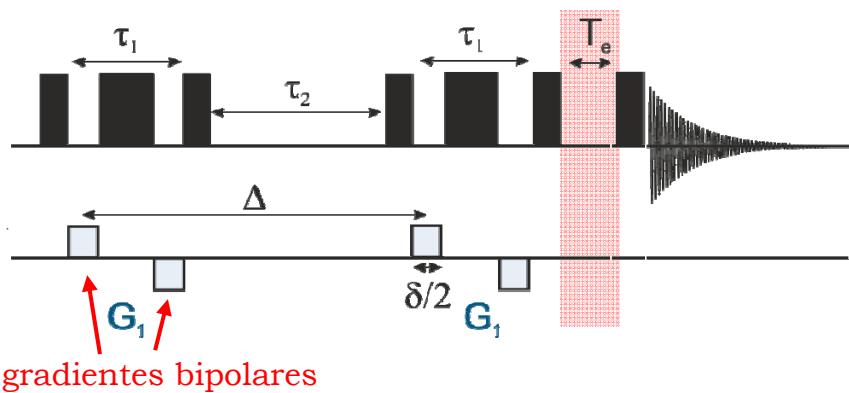
- ✗ Distorsión del *lock*
- ✗ Corrientes de Foucault

BPP-STE



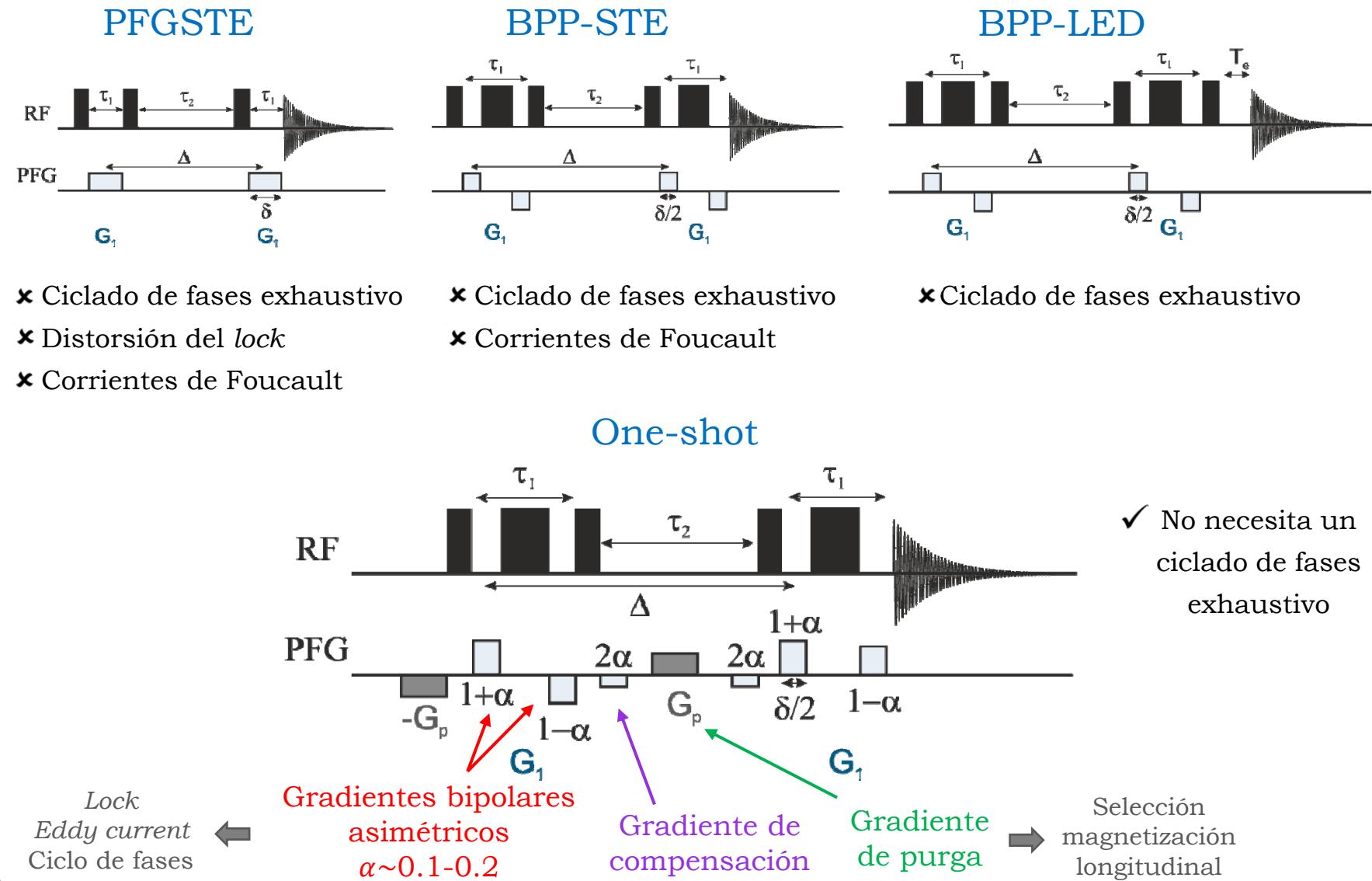
- ✓ Compensación de la distorsión del *lock*

Longitudinal Eddy current Delay  
BPP-LED



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

## Mejora de los experimentos PFGSTE



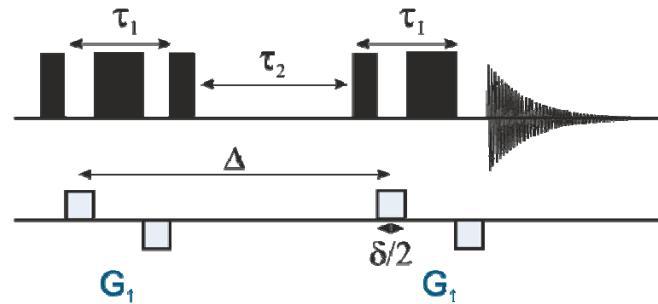
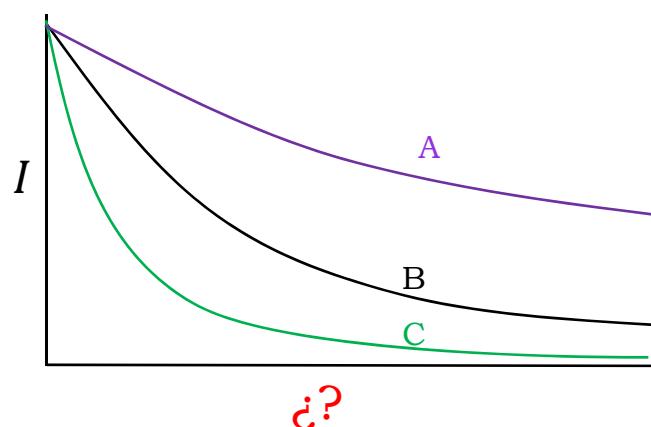
# Adquisición de los datos experimentales

## ¿Cómo codificar la difusión?

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

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

Fuerza del gradiente  
Duración del gradiente  
Tiempo de difusión



## ¿Cómo codificar la difusión?

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

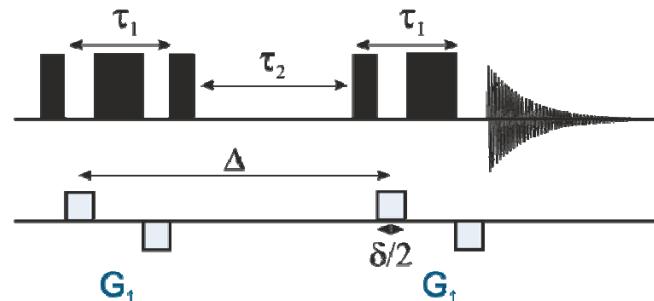
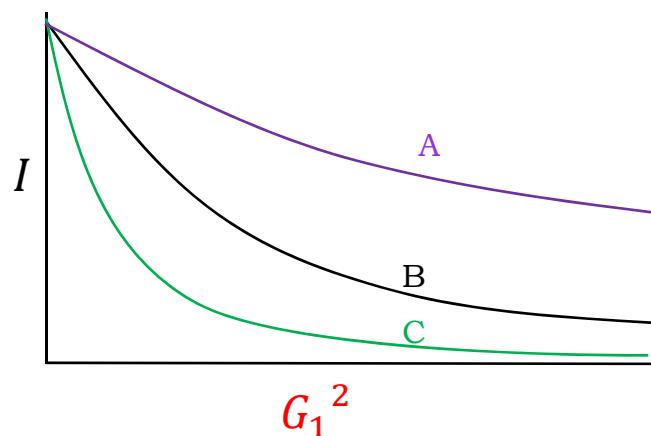
$$I = I_0 e^{-\left(\frac{2\tau_1}{T_2} + \frac{\tau_2}{T_1}\right)} e^{-(D\gamma^2\delta^2 G_1^2 \Delta)}$$

Duración del gradiente      Tiempo de difusión

Fuerza del gradiente

Variación no deseada

Óptimo: relajación constante en todos los incrementos



## ¿Cómo codificar la difusión?

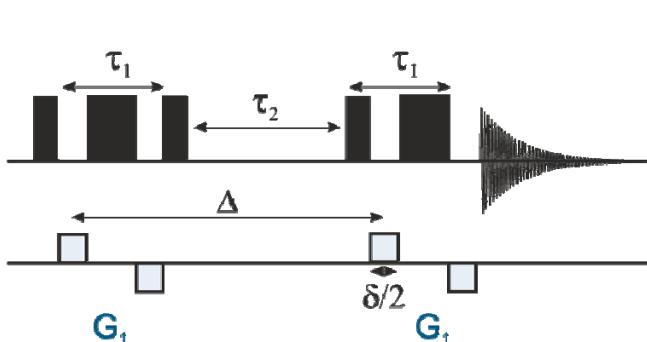
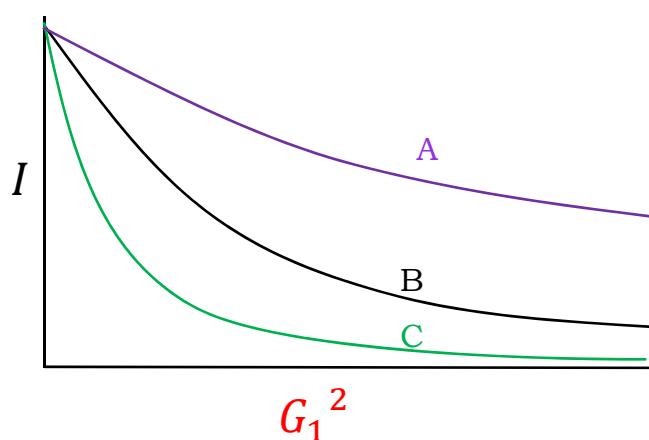
Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Stejskal-Tanner

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

$I_{G_0}$

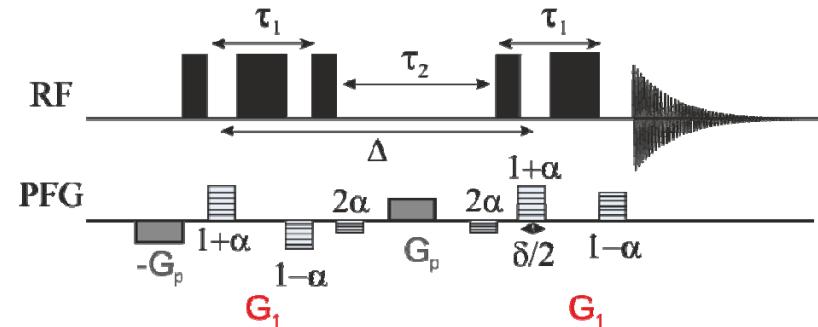
Duración del gradiente
Tiempo de difusión

Variación no deseada

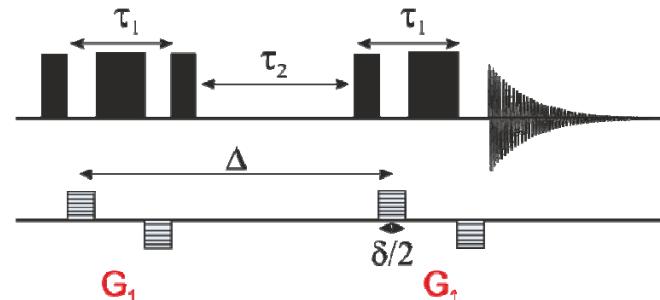


## Codificación de la difusión con la fuerza de los gradientes

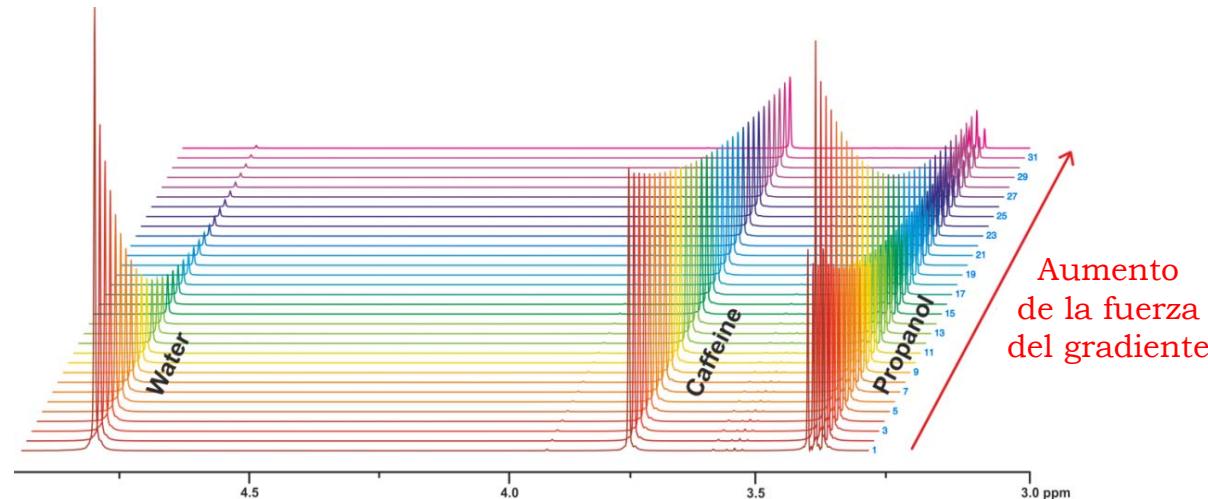
One-shot



BPP-STE



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



## 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

#### 1º - Determinar la condiciones físicas optimas

- Concentración
- Disolvente
- Temperatura

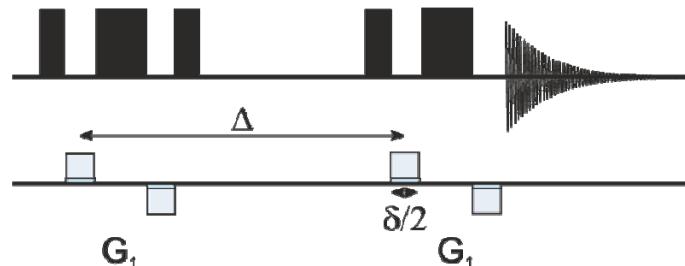
#### 2º - Optimizar los parámetros relacionados con el experimento

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

## Optimización de los parámetros de difusión

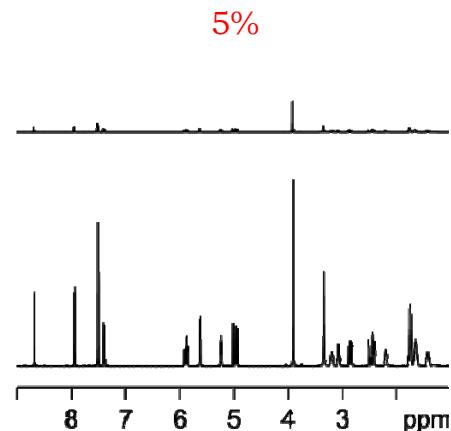
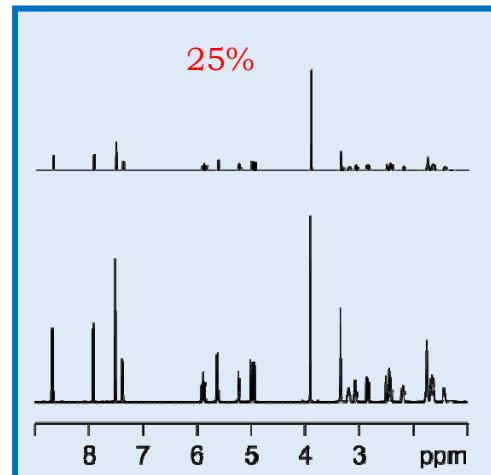
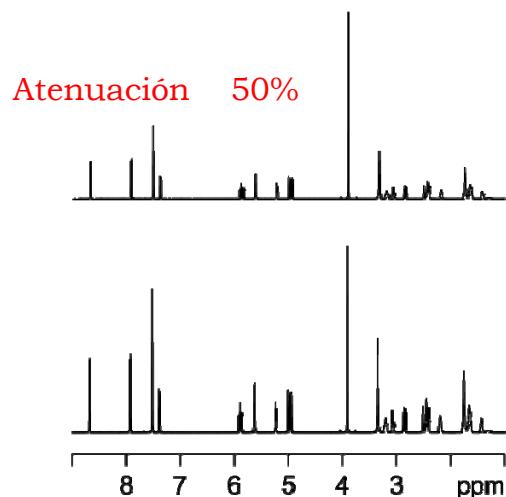
### Proceso iterativo

- 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

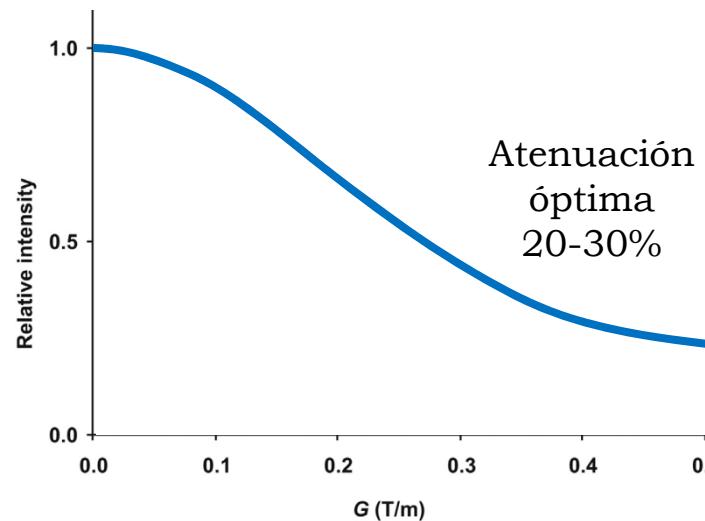
20-30%



## Optimización de los parámetros de difusión

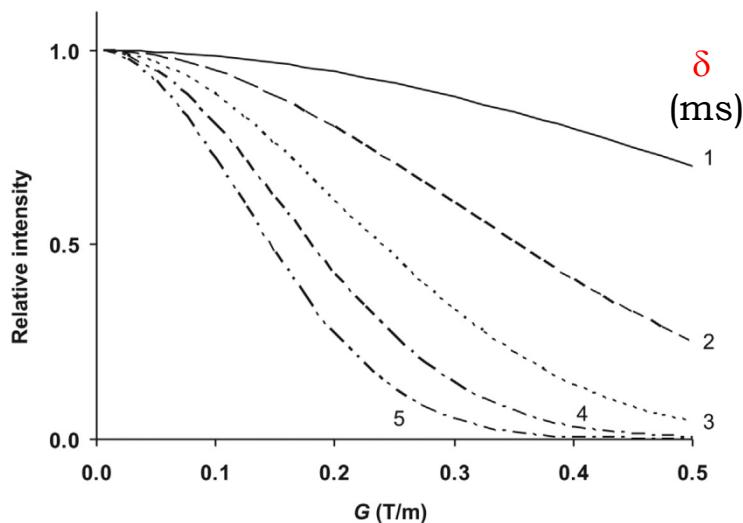
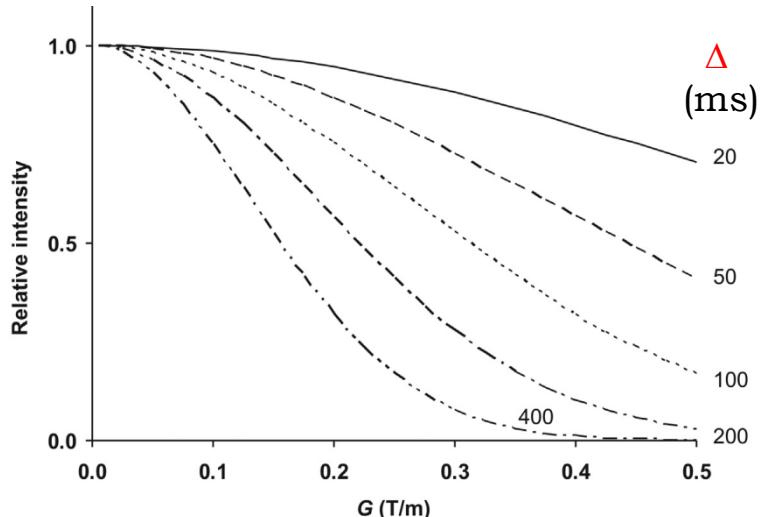
### Proceso iterativo

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



$\uparrow \Delta \Leftrightarrow$  Atenuación ( $\propto \Delta$ )  
 $\Downarrow$  Relajación ( $T_1$ )

$\uparrow \delta \Rightarrow$  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

$\Delta'$  for the Most Common Diffusion Pulse Sequences as a Function of Gradient Shape

Gradient pattern	Monopolar	Bipolar	Unbalanced bipolar (one-shot)
Rectangle	$[\Delta - \frac{\delta}{3}]$	$[\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2}]$	$[\Delta - \frac{(2-\alpha^2)\delta}{6} - \frac{\tau(1-\alpha^2)}{2}]$
Sine bell	$\frac{4}{\pi^2} [\Delta - \frac{\delta}{4}]$	$\frac{4}{\pi^2} [\Delta - \frac{5\delta}{16} - \frac{\tau}{2}]$	$\frac{4}{\pi^2} [\Delta - \frac{(5-3\alpha^2)\delta}{16} - \frac{\tau(1-\alpha^2)}{2}]$
Square sine bell	$\frac{1}{4} [\Delta - (\frac{1}{3} - \frac{5}{4\pi^2})\delta]$	$\frac{1}{4} [\Delta - (\frac{1}{3} - \frac{5}{16\pi^2})\delta - \frac{\tau}{2}]$	$\frac{1}{4} \left[ \Delta - \frac{((2 - \frac{15}{8\pi^2}) - (1 + \frac{15}{8\pi^2})\alpha^2)\delta}{6} - \frac{\tau(1-\alpha)}{2} \right]$
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

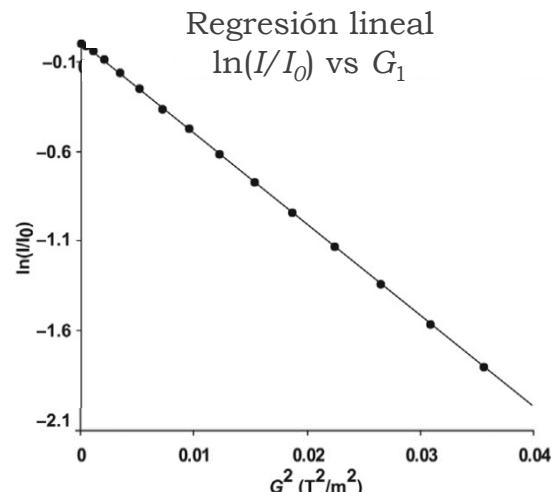
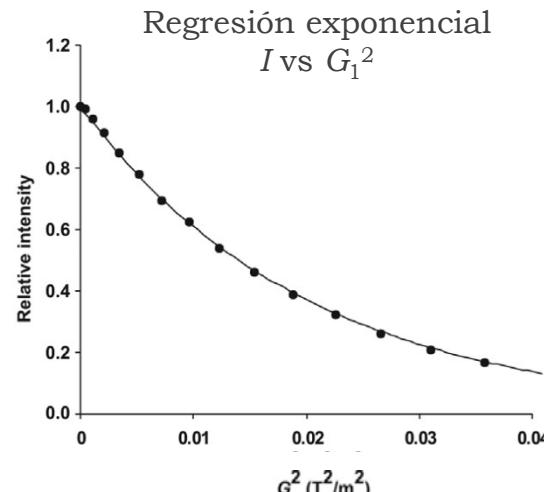
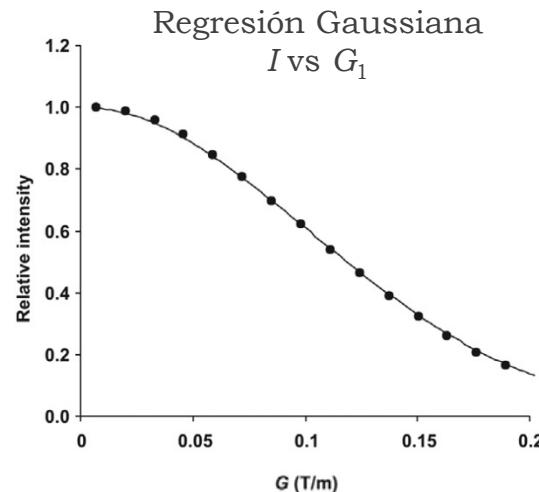
$$I = I_{G_0} e^{-(D\gamma^2 \delta^2 G_1^2 \Delta')}$$

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

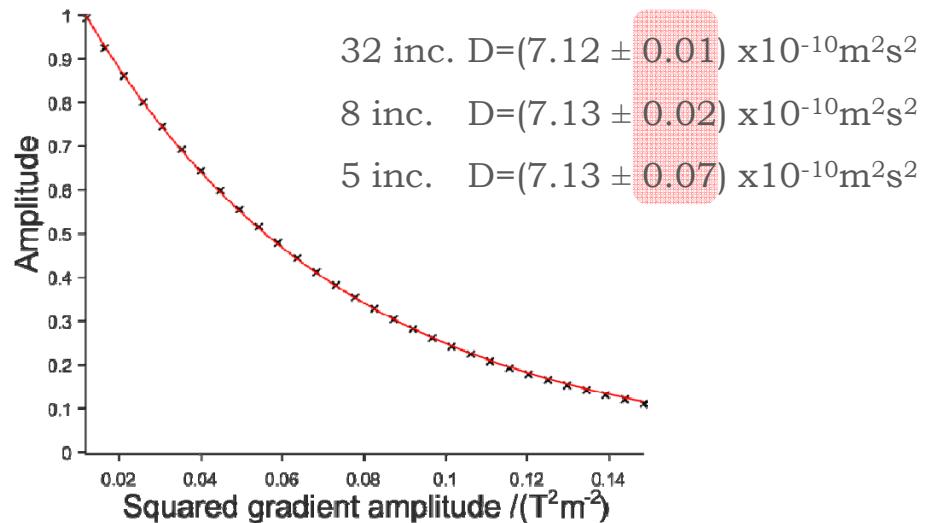


## Parámetros que afectan al ajuste

### Parámetros de adquisición

La calidad del ajuste depende de:

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



Otros parámetros a considerar:

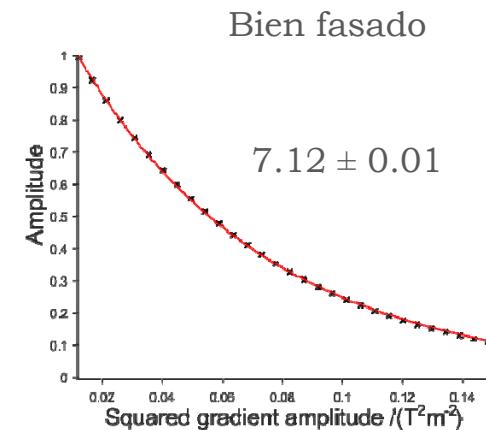
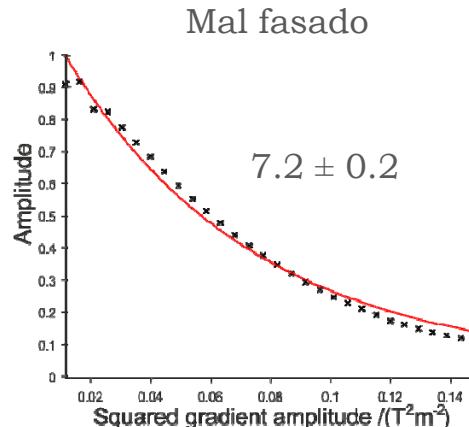
- Ventana de adquisición (afecta a la corrección de la línea base)
- Incrementación cuadrática (no lineal)
- Número de scans (afecta a la relación señal-ruido y a la selección de coherencia)

## Parámetros que afectan al ajuste

### Parámetros de procesado

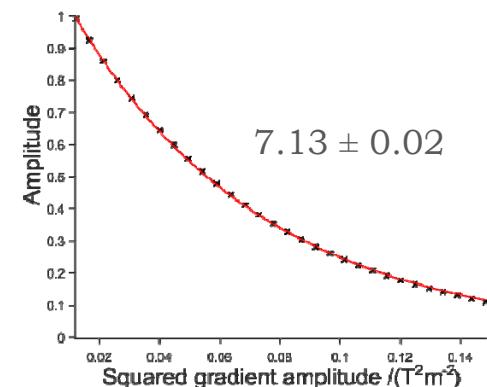
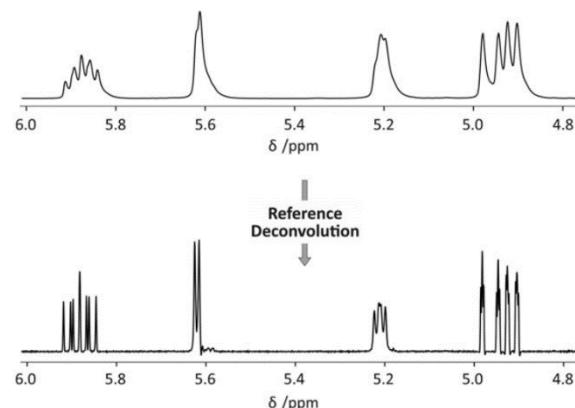
La calidad del ajuste depende de:

- 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

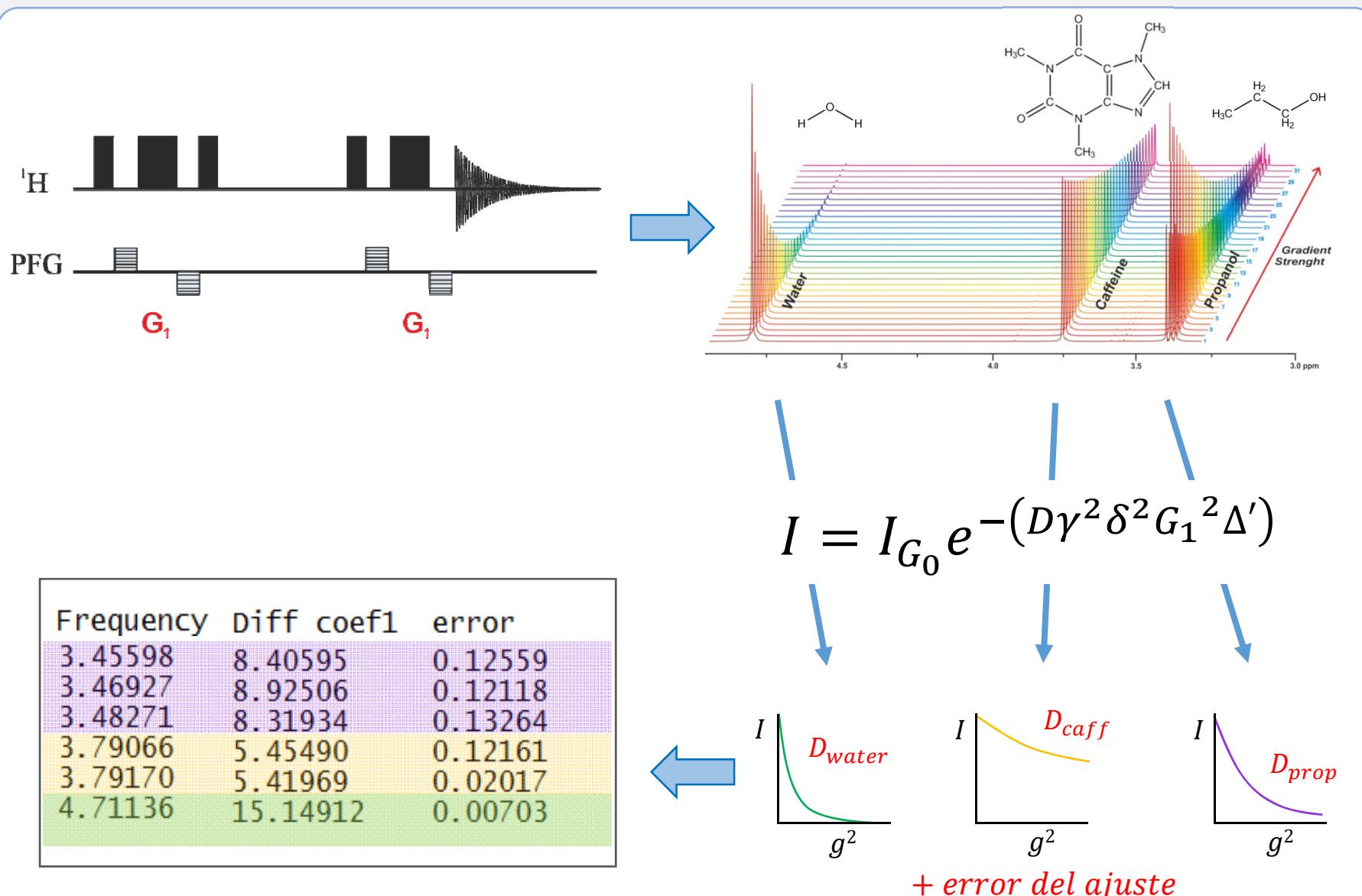
### Análisis multivariante

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)

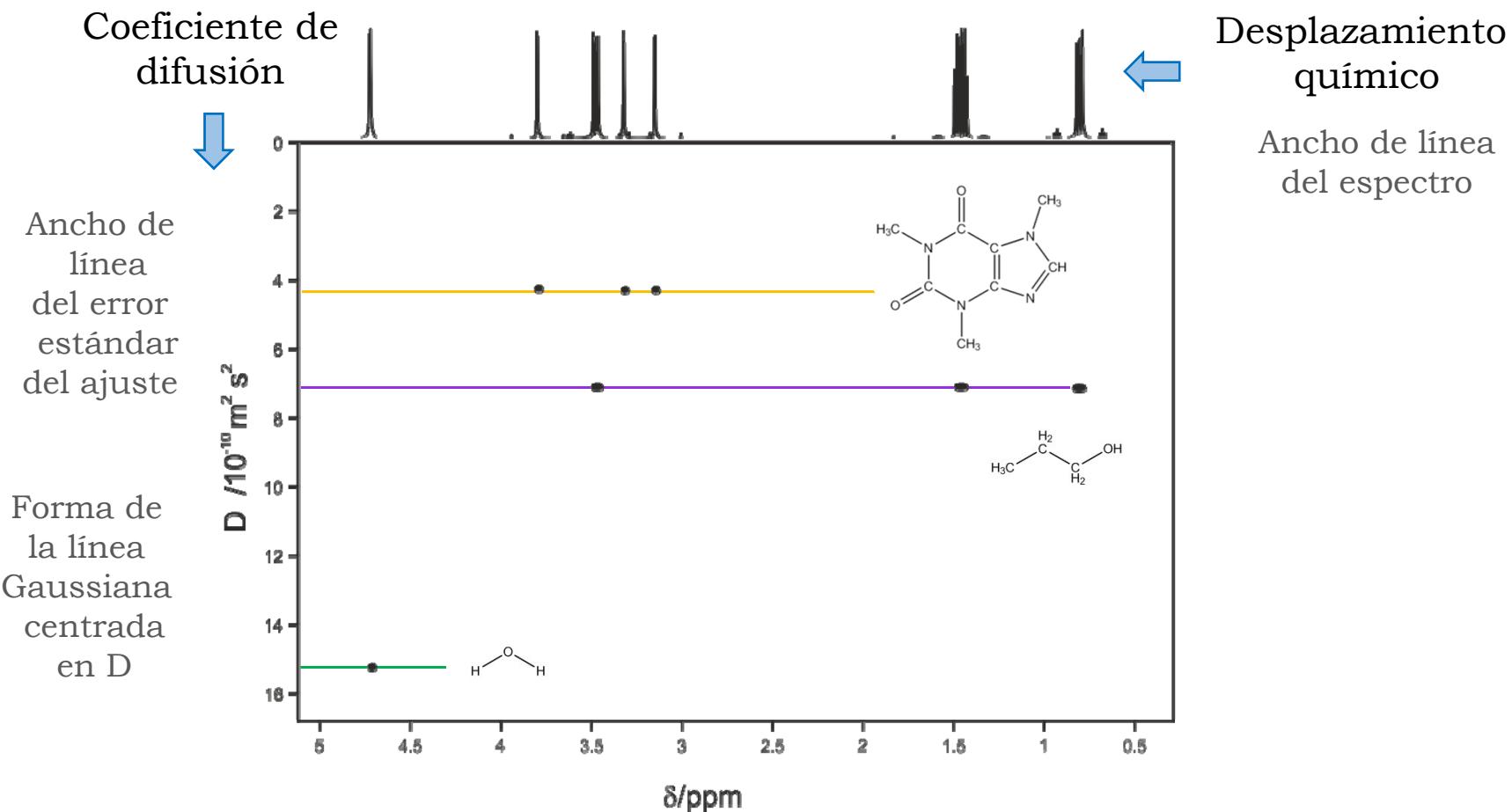
## Análisis univariante



## Análisis univariante

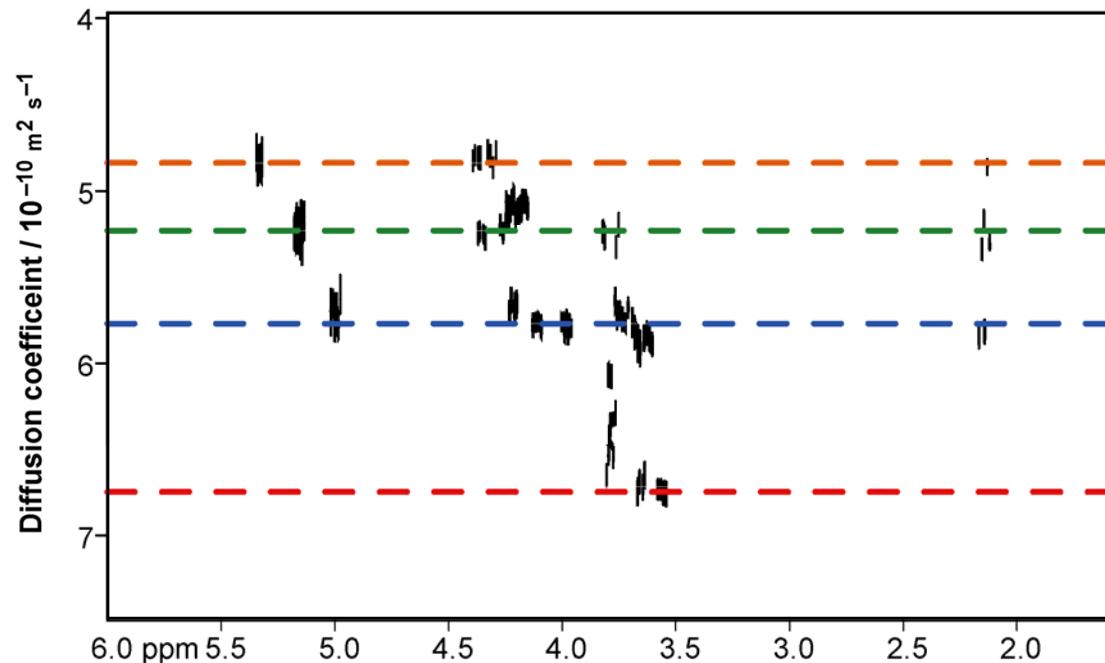
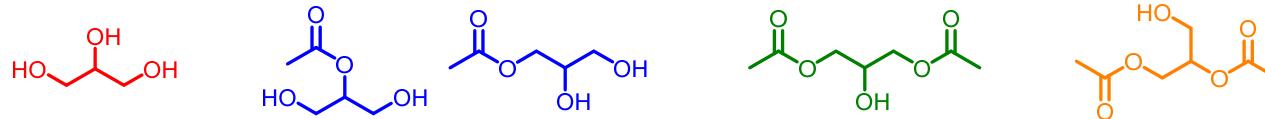
### Diffusion Ordered SpectroscopY (DOSY)

Espectro 2D sintético (pseudo-2D)



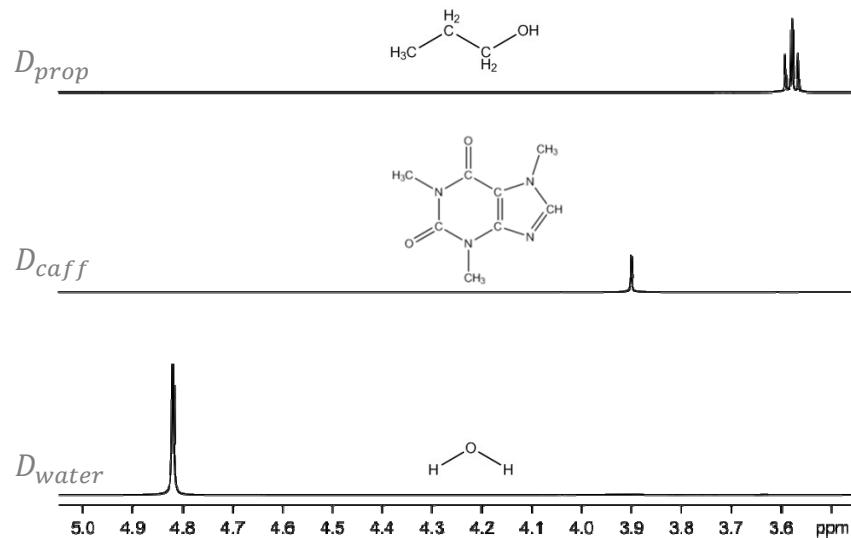
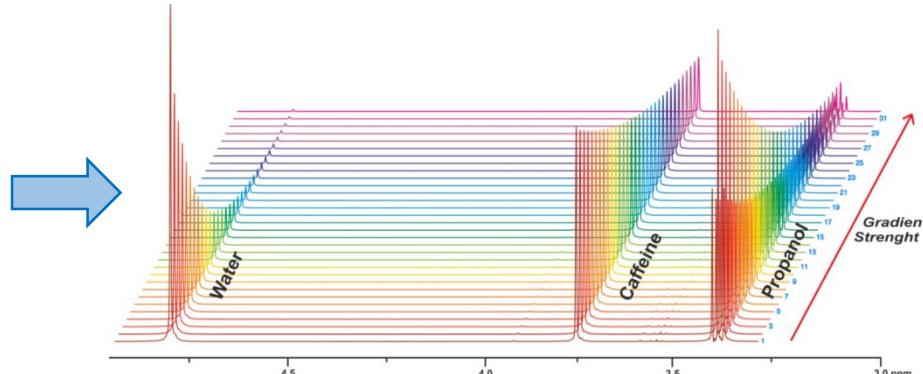
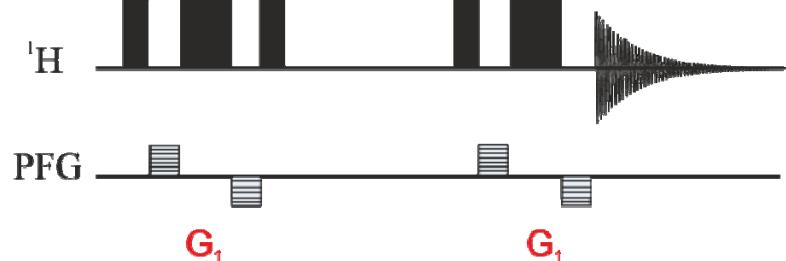
## Análisis univariante

### Análisis de crudos de reacción



Espectro HR-DOSY de una mezcla de glicerol y mono-m di- y triacetina en  $\text{D}_2\text{O}$

## Análisis multivariante



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

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

## Análisis multivariante

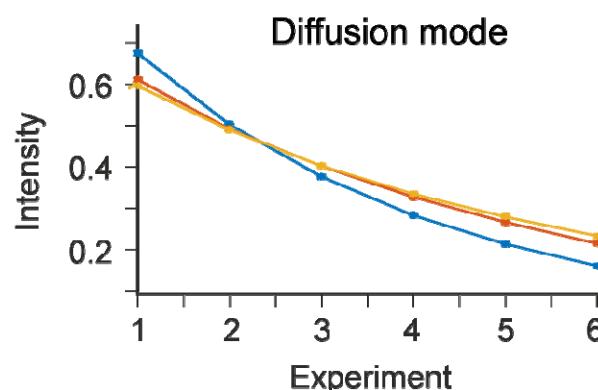
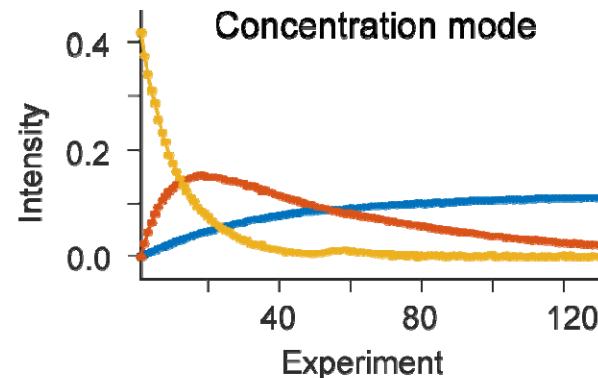
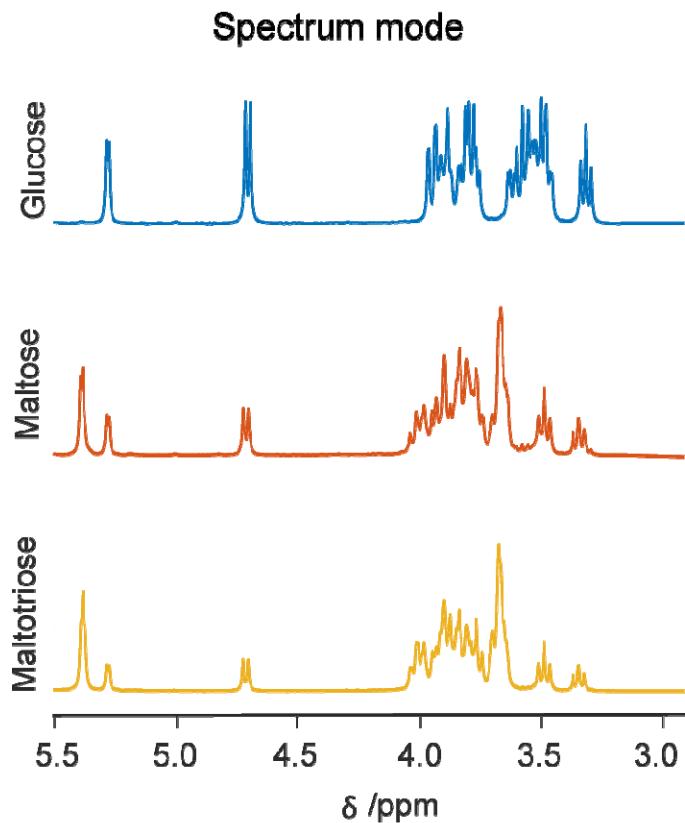
### Métodos de análisis

- SCORE/RSCORE (Speedy Component REsolution)  
Minimización de los residuales
- OUTSCORE (Optimized Unmixing of True Spectra for COnponent 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 ( $\geq 3$ ) 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

## Estructura

---

### **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

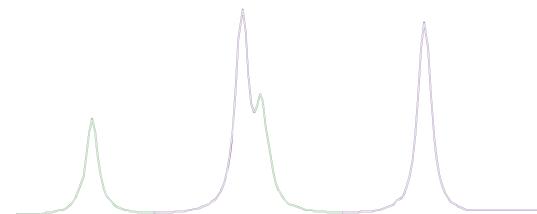
MAGNATE

# Solapamiento de señales

## Solapamiento de señales

### El problema

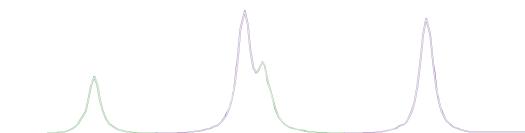
Señales  
solapadas



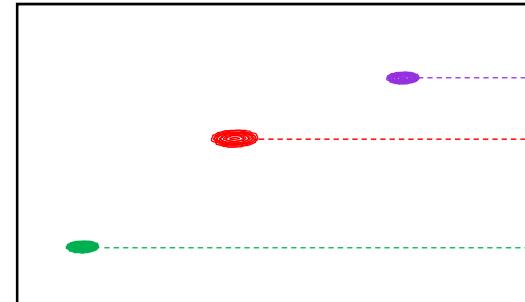
HR-DOSY



Ajuste monoexponencial



Coeficiente  
de difusión aparente

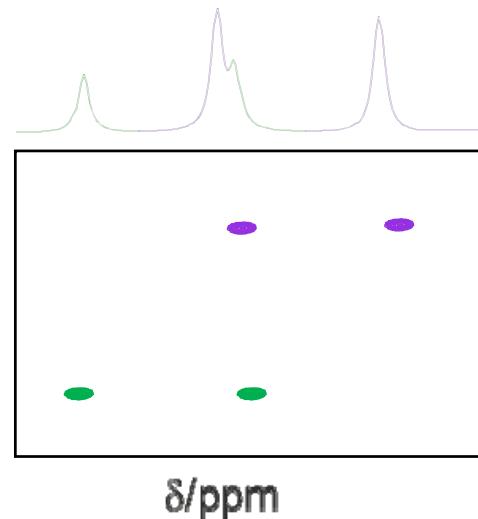


$\delta/\text{ppm}$

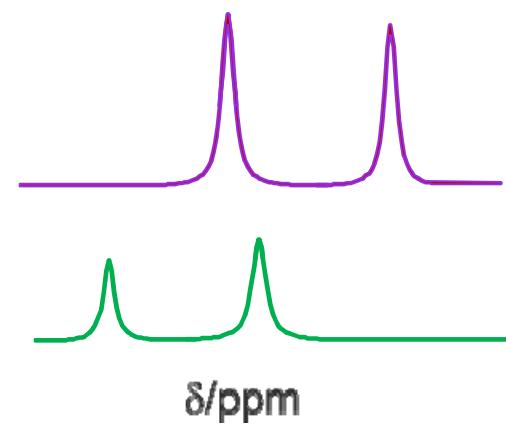
## Solapamiento de señales

### Posibles soluciones

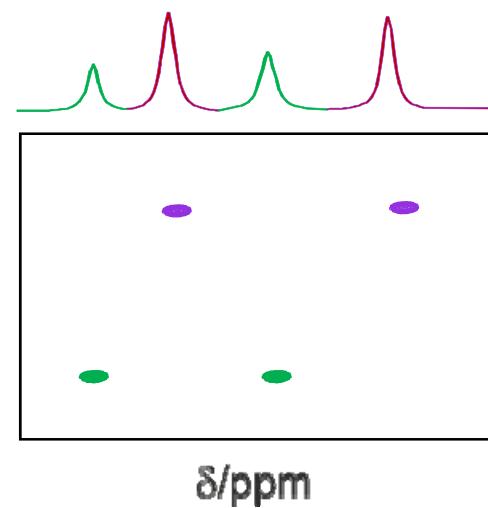
Ajuste  
multiexponential



Análisis  
multivariante



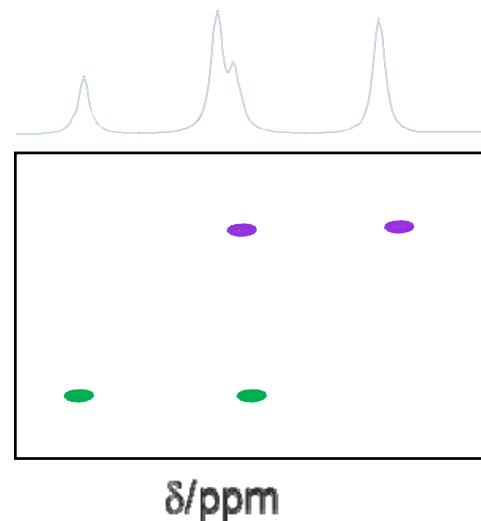
Evitar el  
solapamiento



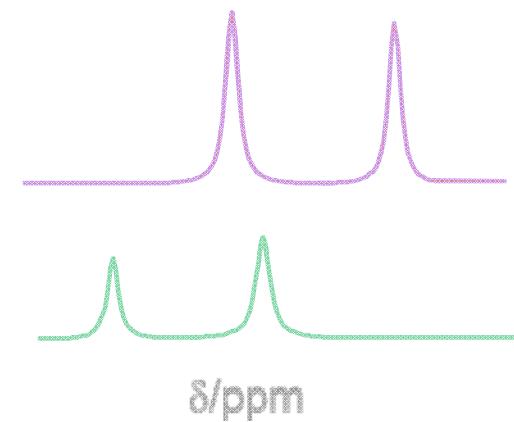
## Solapamiento de señales

### Posibles soluciones

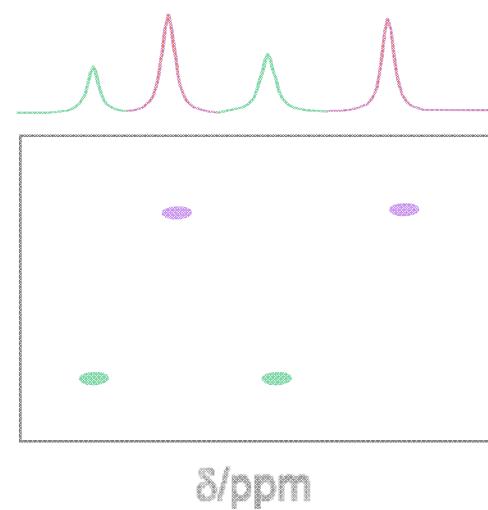
Ajuste  
multiexponential



Análisis  
multivariante



Evitar el  
solapamiento



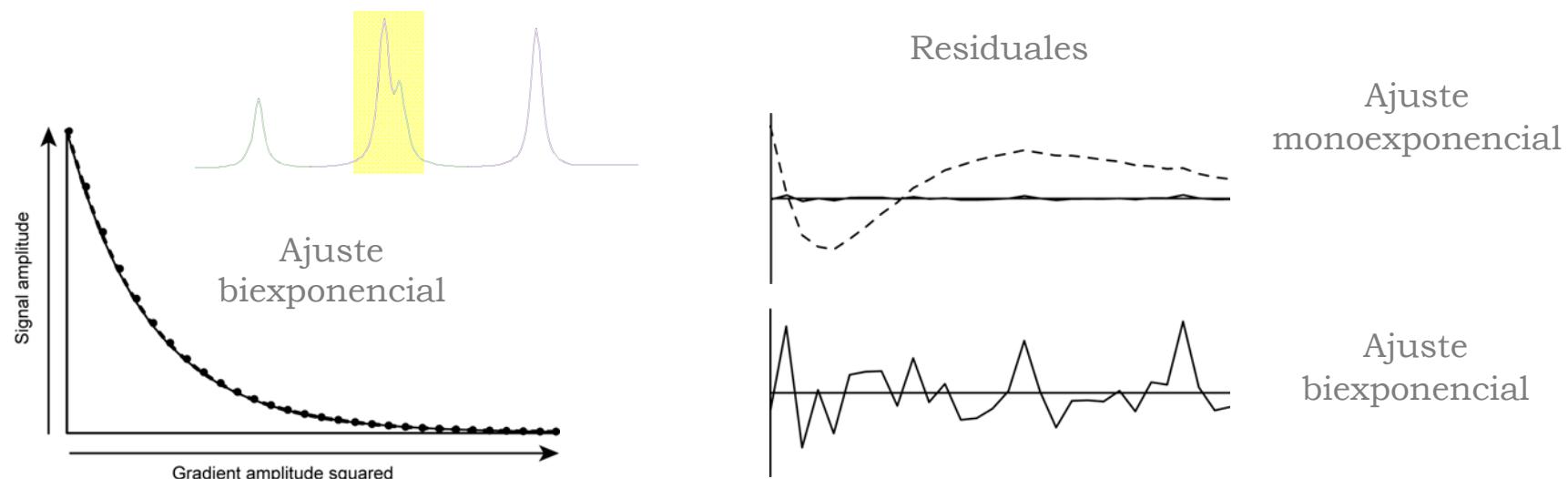
## Ajuste multiexponencial

El ajuste multiexponencial supone una alta demanda matemática:

- Alta dependencia del planteamiento inicial
- Numéricamente inestable

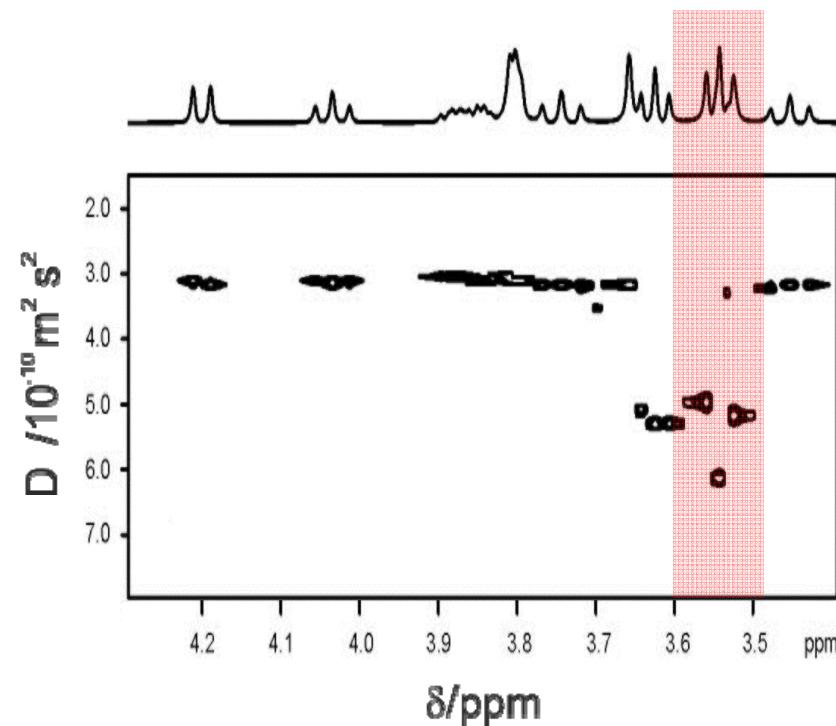
Los resultados dependen altamente de:

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

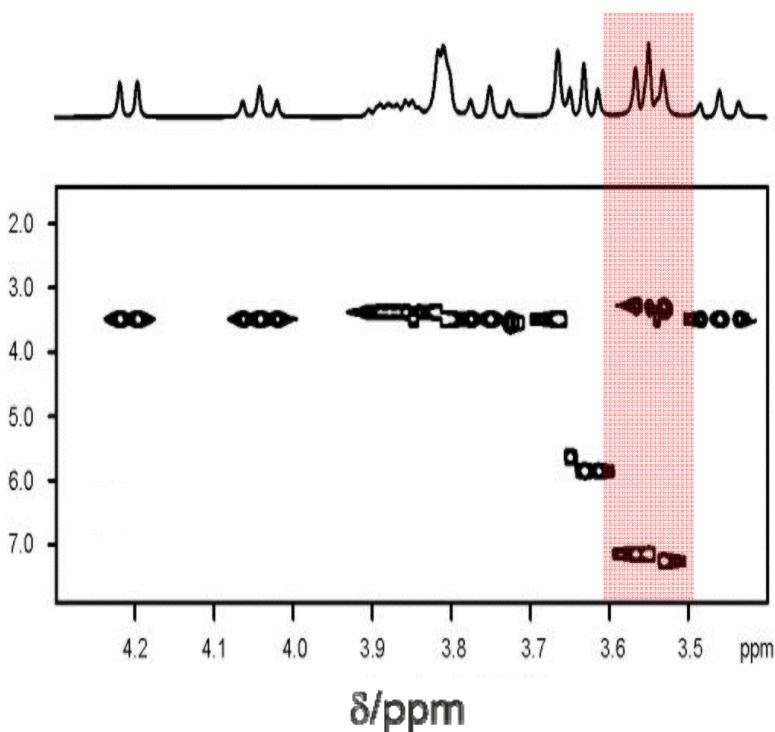


## Ajuste multiexponencial

Ajuste monoexponencial



Ajuste biexponencial

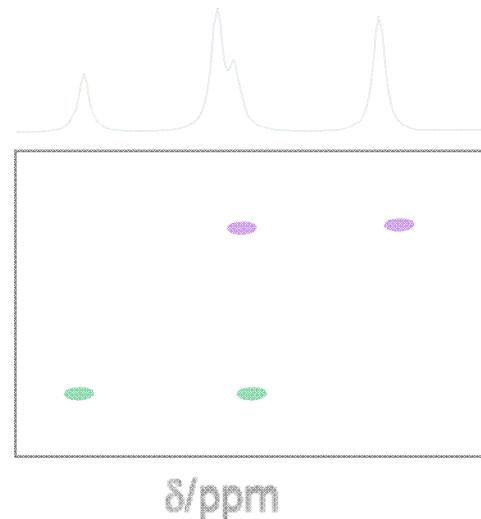


Espectro DOSY de sacarosa, isopentanol y propanol en  $\text{D}_2\text{O}$

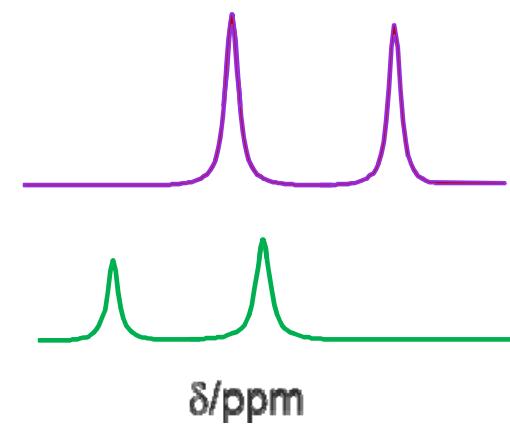
## Solapamiento de señales

### Soluciones

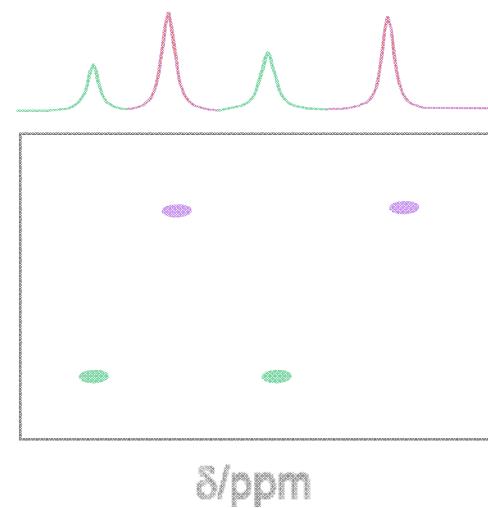
Ajuste  
multiexponential



Análisis  
multivariante



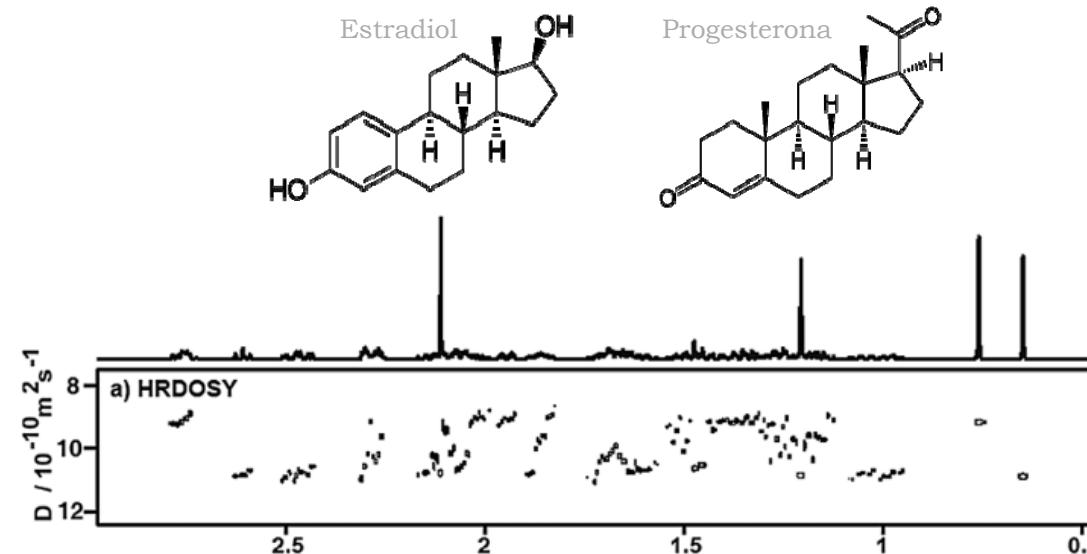
Evitar el  
solapamiento



## Análisis multivariante

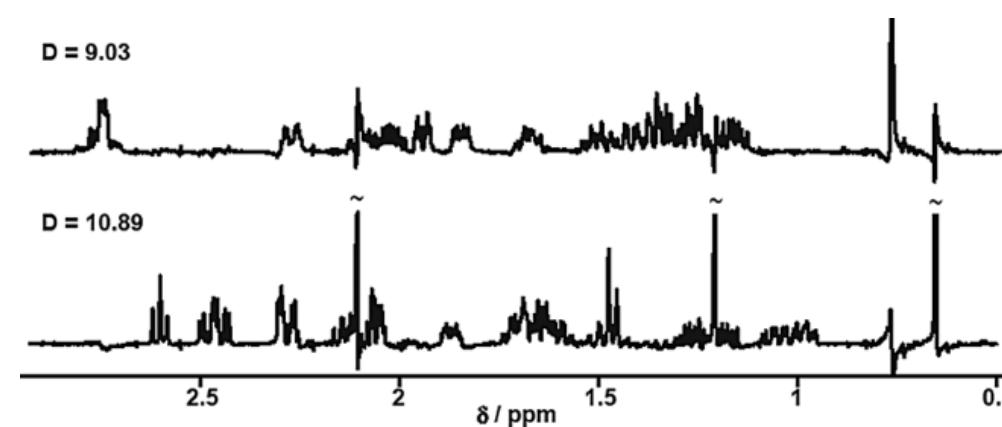
Separación de especies similares en base a su difusión

HR-DOSY  
Análisis univariante



Solapamiento de señales

OUTSCORE  
Análisis multivariante

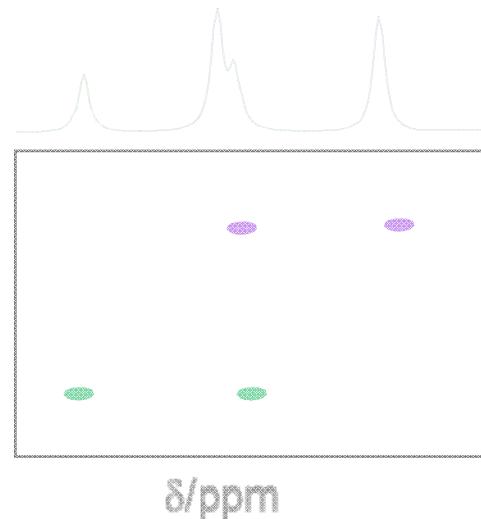


Separación de los componentes

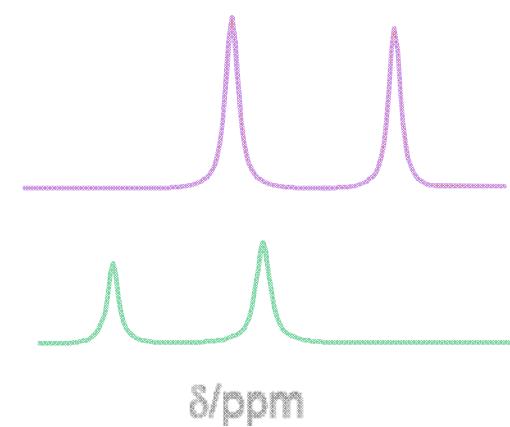
## Solapamiento de señales

### Soluciones

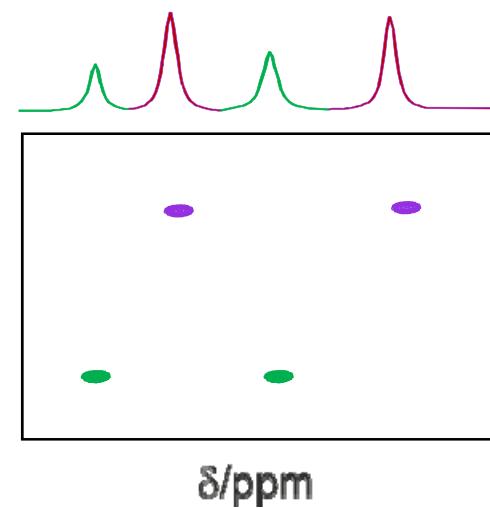
Ajuste  
multiexponential



Análisis  
multivariante



Evitar el  
solapamiento

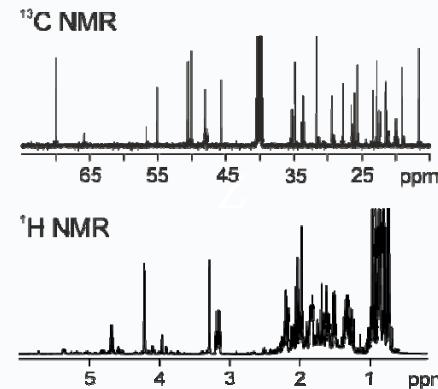


## Reducción del solapamiento de señales

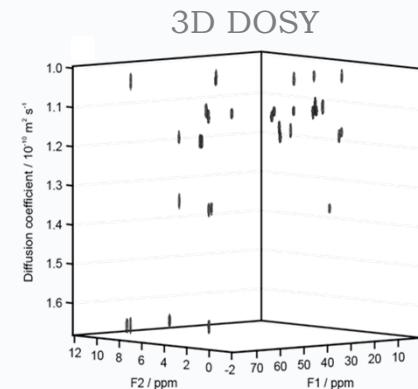
### Condiciones experimentales



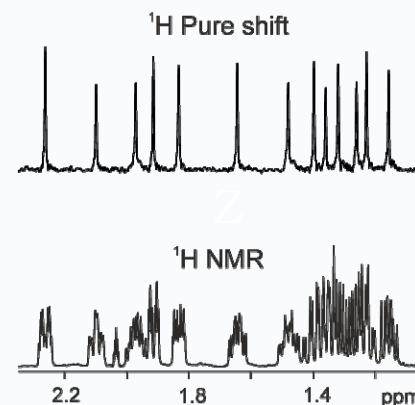
### Otros núcleos



### RMN multidimensional (nD)



### Pure shift

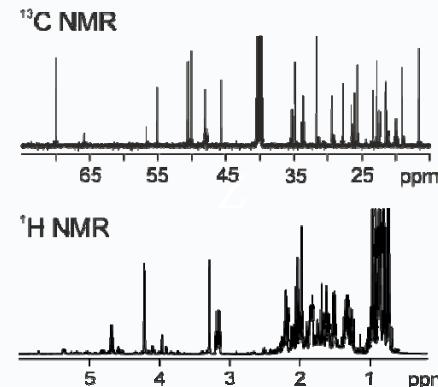


## Reducción del solapamiento de señales

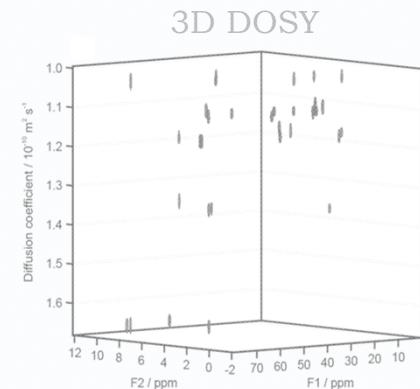
### Condiciones experimentales



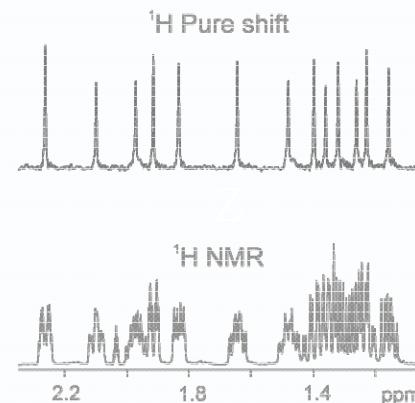
### Otros núcleos



### RMN multidimensional (nD)



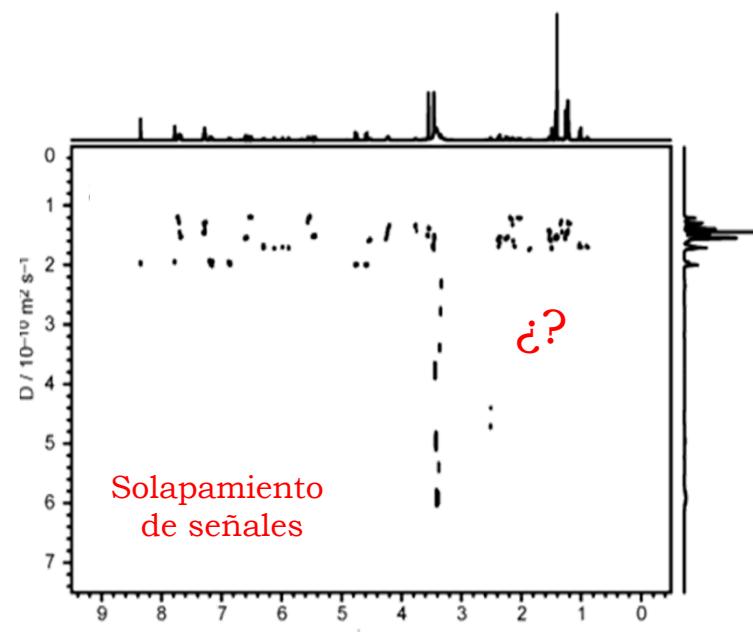
### Pure shift



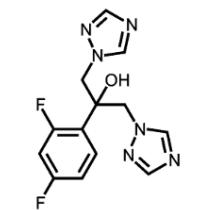
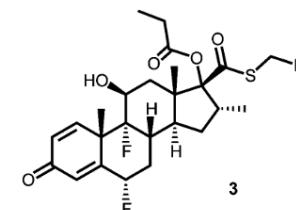
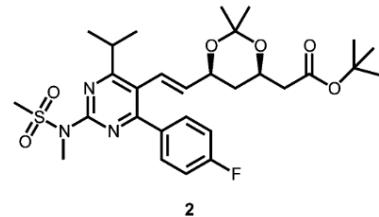
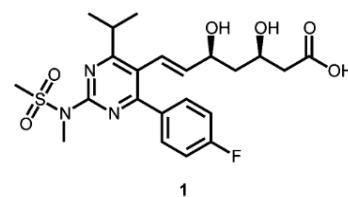
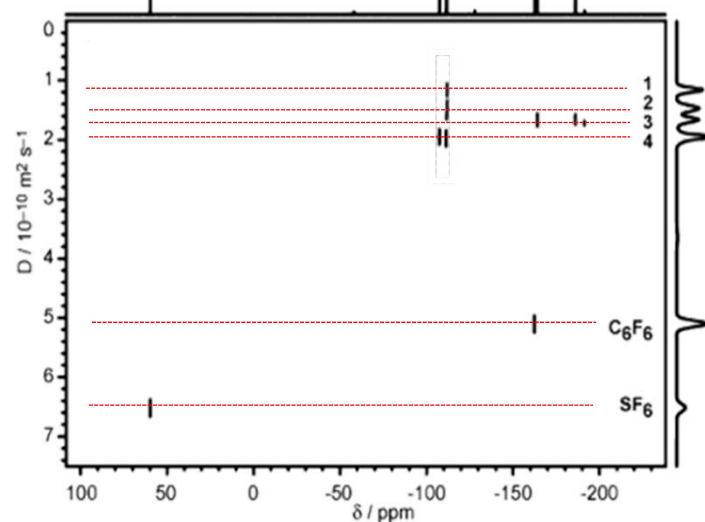
## Reducción del solapamiento de señales

Experimentos de difusión en núcleos con mayor dispersión de señales

$^1\text{H}$  HR-DOSY one-shot



$^{19}\text{F}$  HR-DOSY one-shot

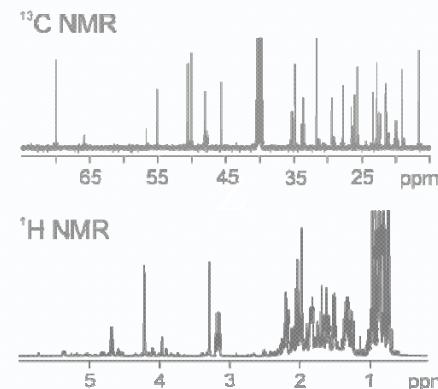


## Reducción del solapamiento de señales

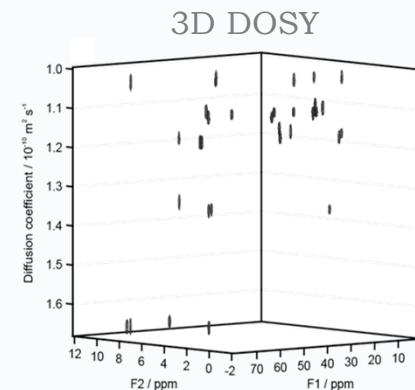
### Condiciones experimentales



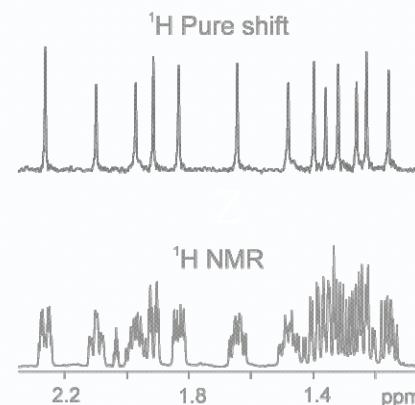
### Otros núcleos



### RMN multidimensional (nD)

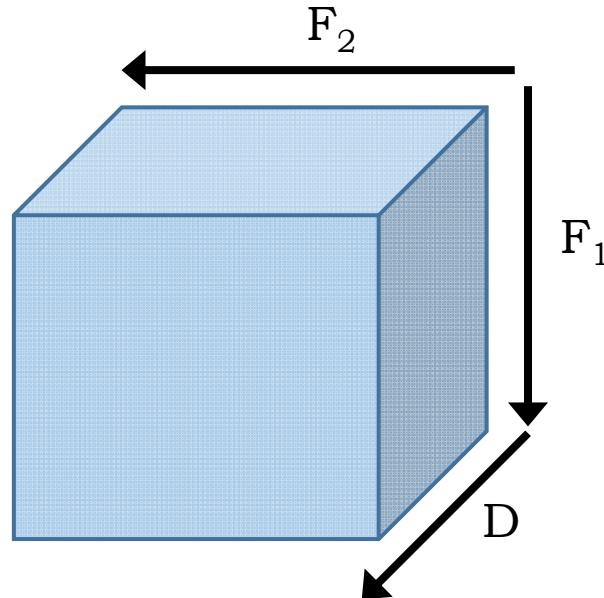
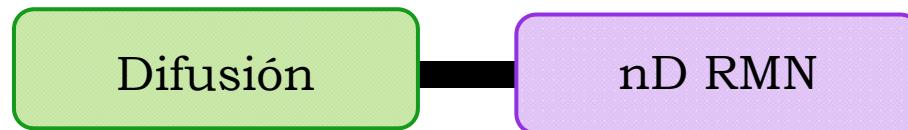


### Pure shift



## Reducción del solapamiento de señales

Combinación de experimentos de difusión y convencionales

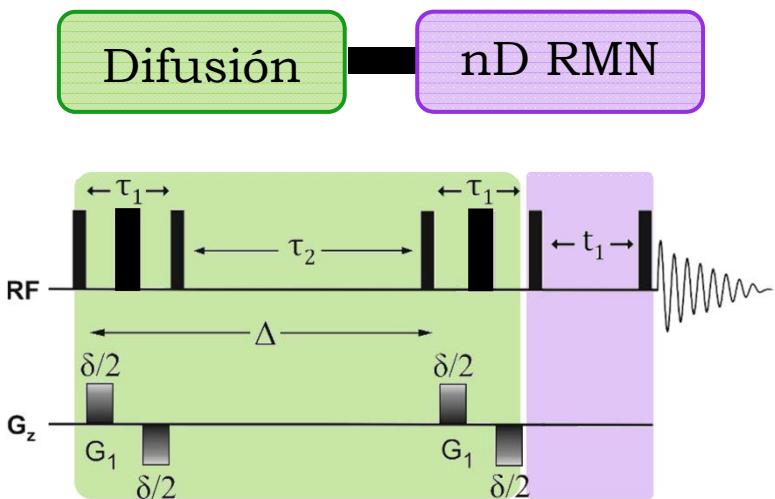


Combinando las secuencias de pulsos de difusión con otros experimentos nD se producen experimentos  $(n+1)D$

## Reducción del solapamiento de señales

Combinación de experimentos de difusión y convencionales

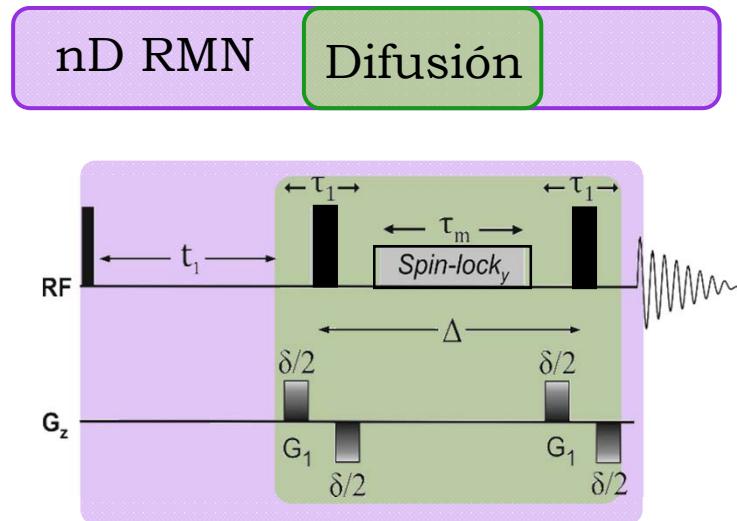
Concatenados



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

...

Codificación interna



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

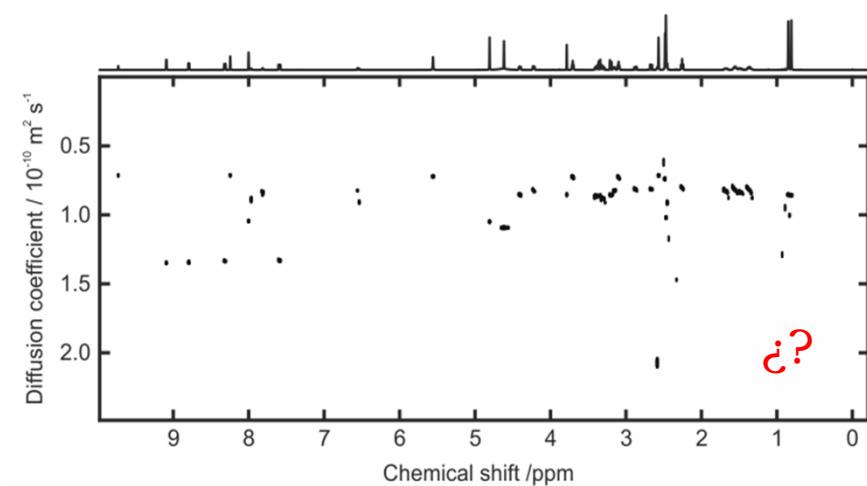
...

## Reducción del solapamiento de señales

Combinación de experimentos de difusión y convencionales

One-shot DOSY

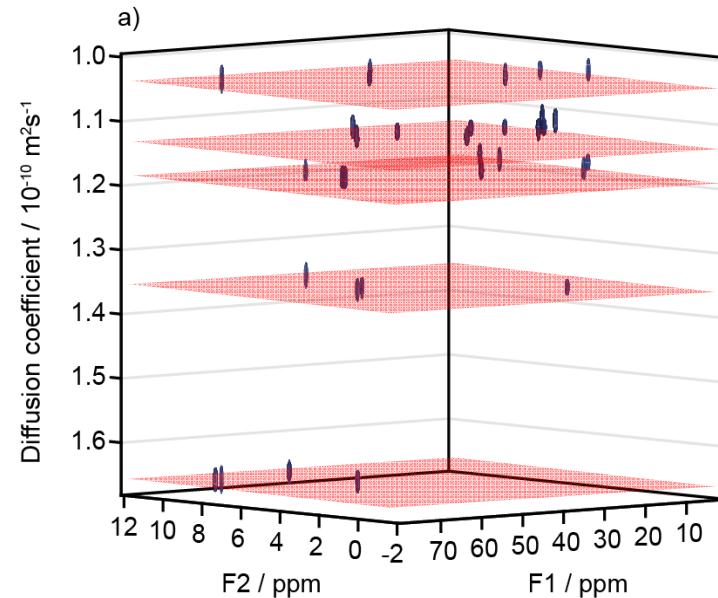
Pseudo-2D espectro



Solapamiento  
de señales

One-shot HSQC-DOSY

Pseudo-3D espectro



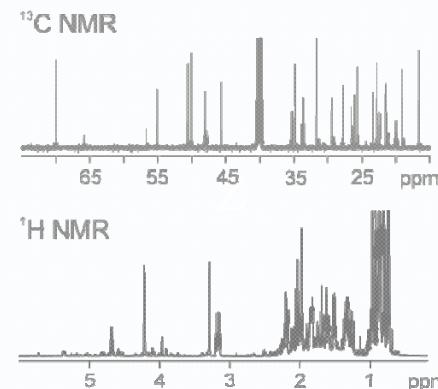
Separación de los  
componentes

## Reducción del solapamiento de señales

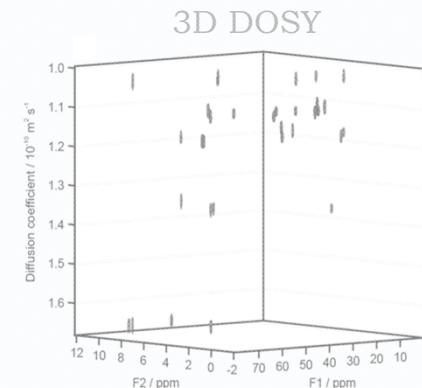
Condiciones experimentales



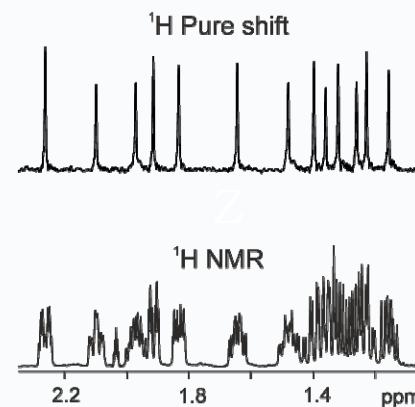
Otros núcleos



RMN multidimensional (nD)

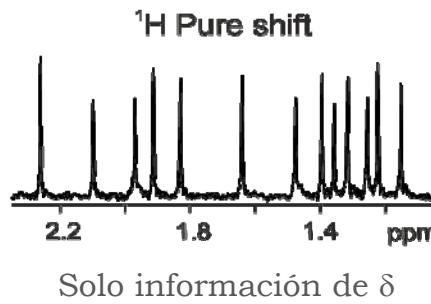
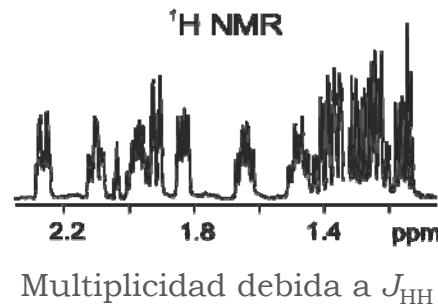


Pure shift



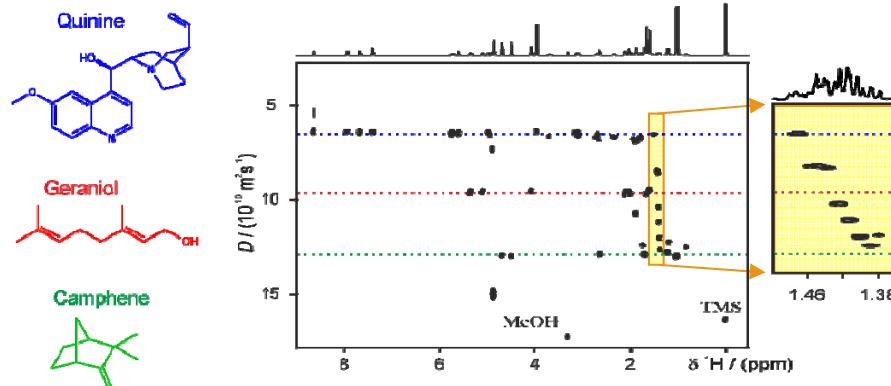
## Reducción del solapamiento de señales

Combinación con la metodología *pure shift*



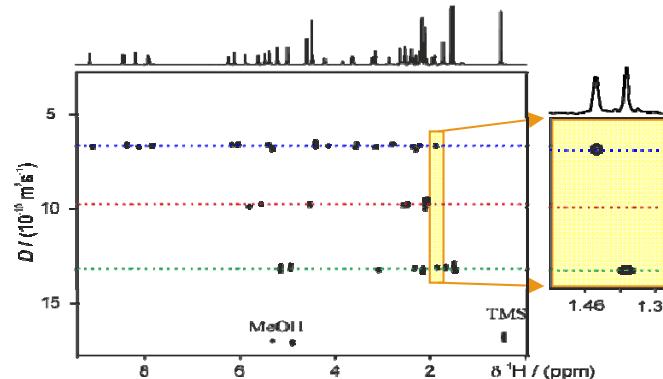
- ✓ Reducción de la complejidad
- ✓ Mejora de la resolución
- ✓ Menor solapamiento de señales

### Oneshot DOSY



- ✗ Señales solapadas
- ✗ Señales engañosas

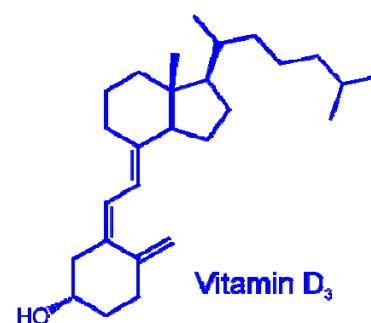
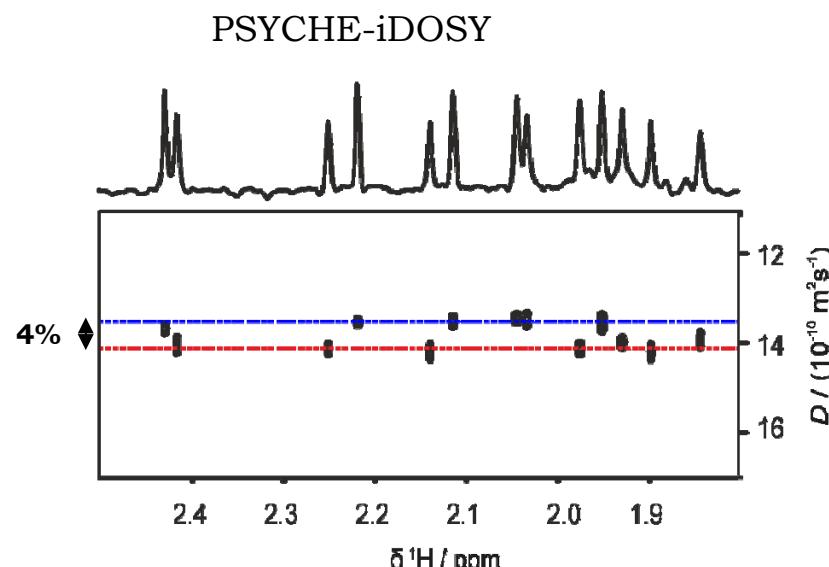
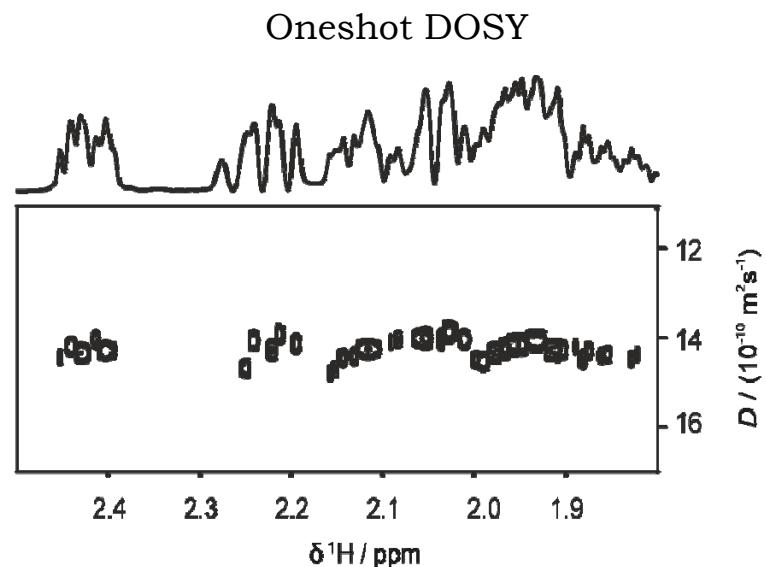
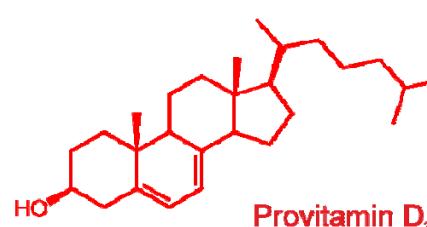
### PSYCHE-iDOSY



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

## Reducción del solapamiento de señales

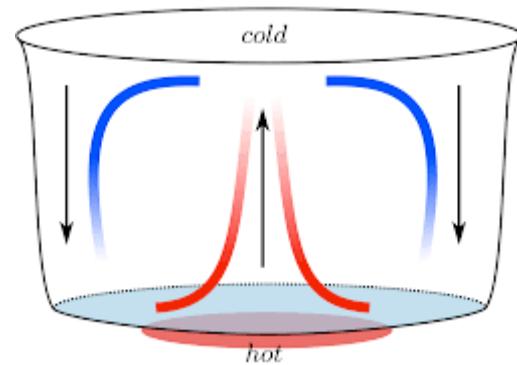
PSYCHE-iDOSY: Espectros de ultra-alta resolución

Vitamin D<sub>3</sub>Provitamin D<sub>3</sub>

# Convección

## Convección

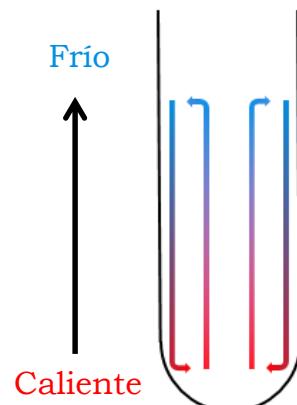
### El fenómeno de convección térmica



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

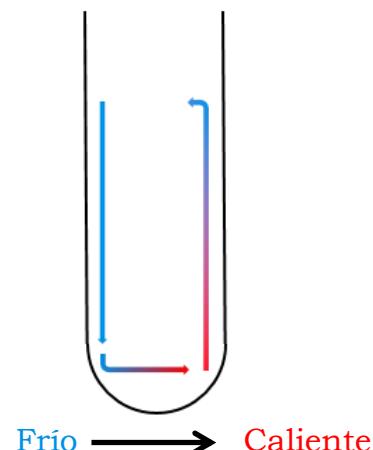
#### Raleigh–Bérnard



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

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

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

$D$ : Constante de difusión

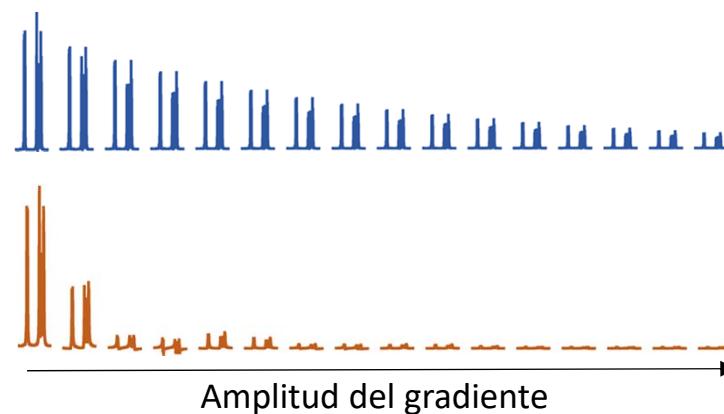
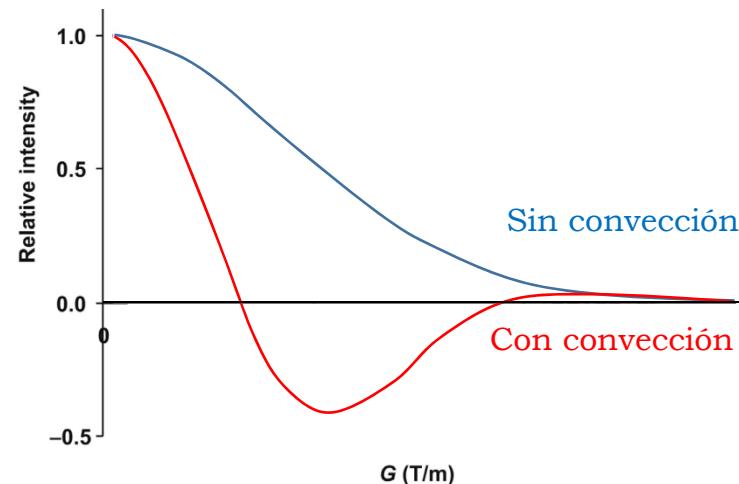
$\gamma$ : Constante giromagnética

$\delta$ : Duración del gradiente

$g$ : Amplitud del gradiente

$\Delta$ : Tiempo de difusión y convección

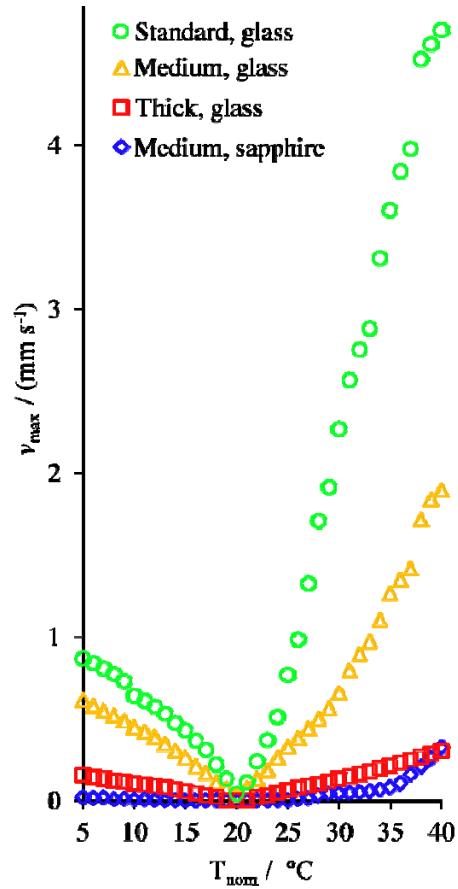
$v$ : Velocidad de convección



## ¿Cómo minimizar la convección?

### Factores que influyen en la convección

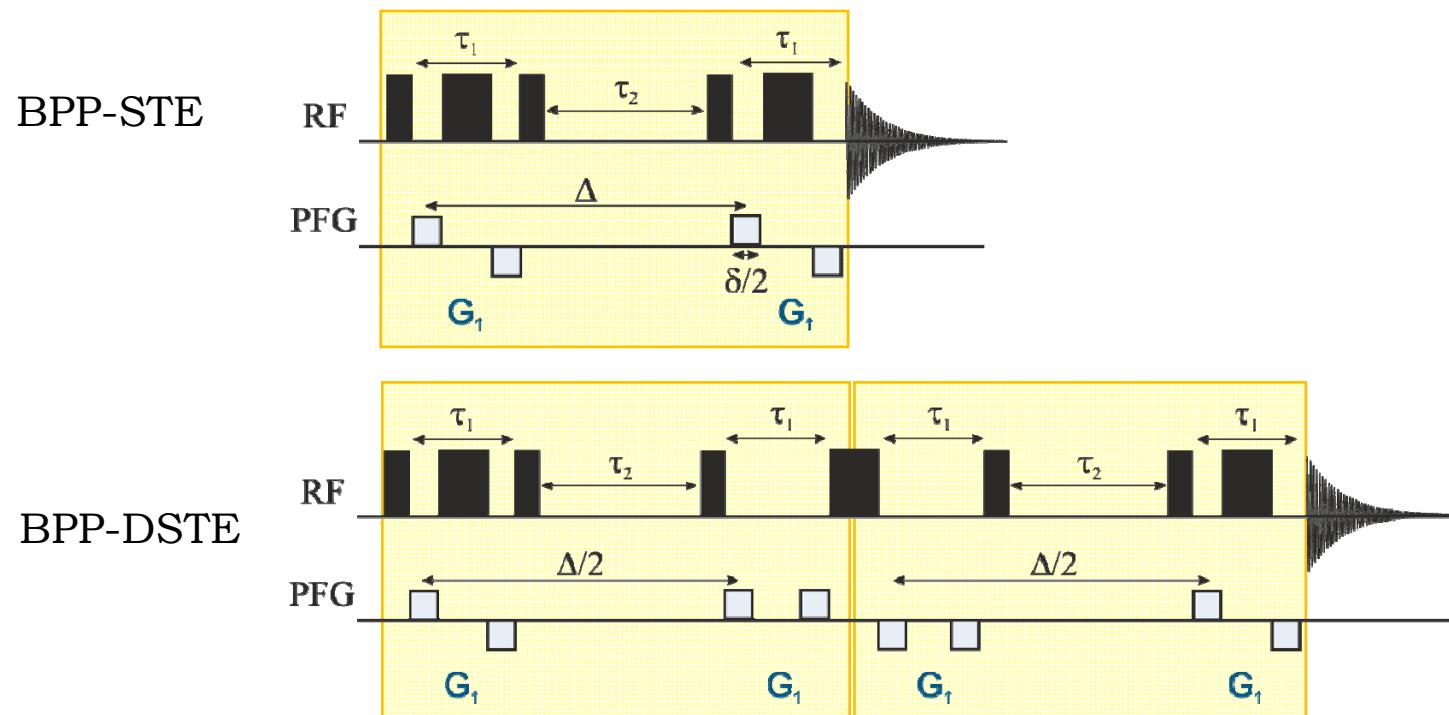
- Temperatura  
Cercana a la temperatura ambiente
- Diámetro del tubo de RMN  
Pequeño (3 mm)
- Material del tubo de RMN  
Zafiro
- Viscosidad de la muestra  
Disolventes de alta viscosidad (DMSO, D<sub>2</sub>O)
- Sonda
- Flujo de aire
- Girar la muestra
- Experimento de difusión  
Secuencias con compensación 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



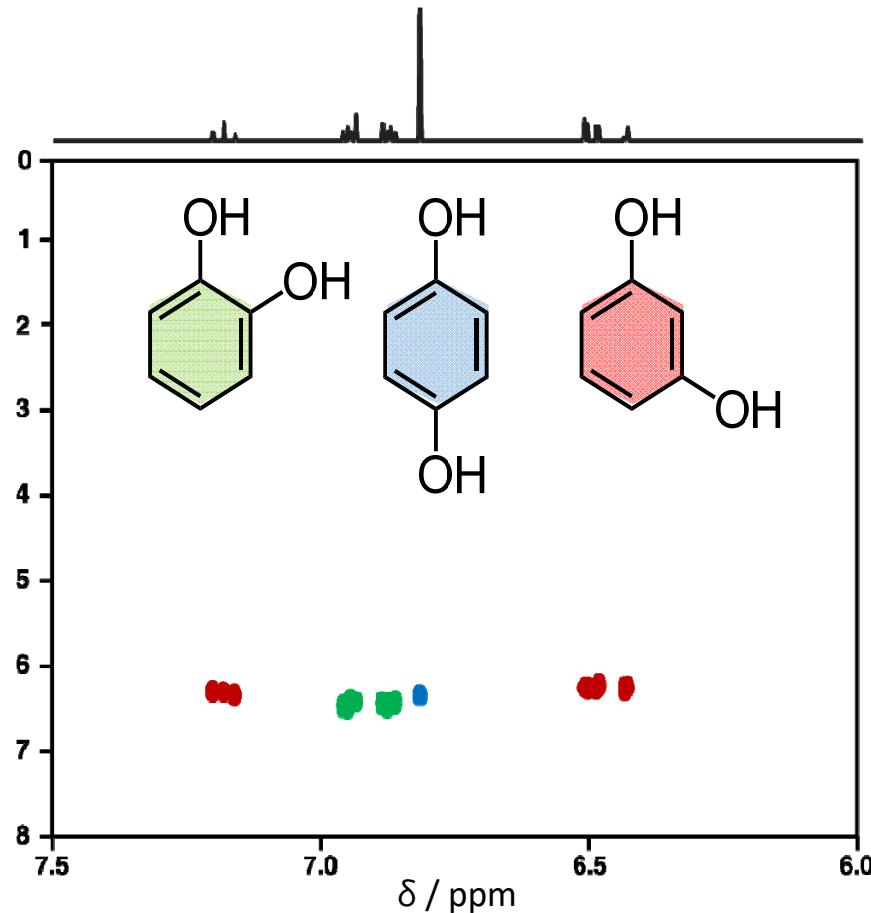
El tiempo total de difusión ( $\Delta$ ) es dividido en dos

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



¿Cómo?

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)

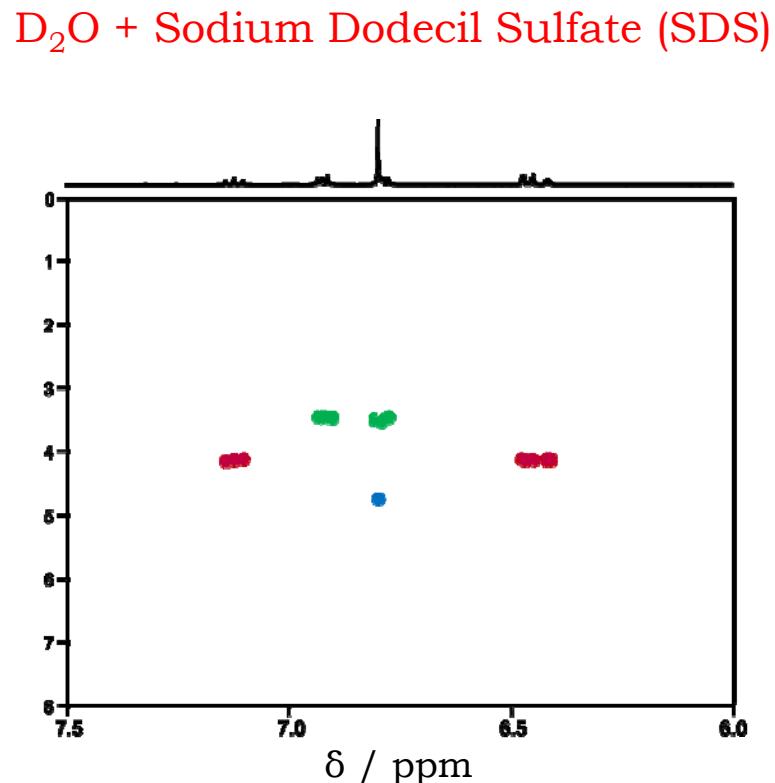
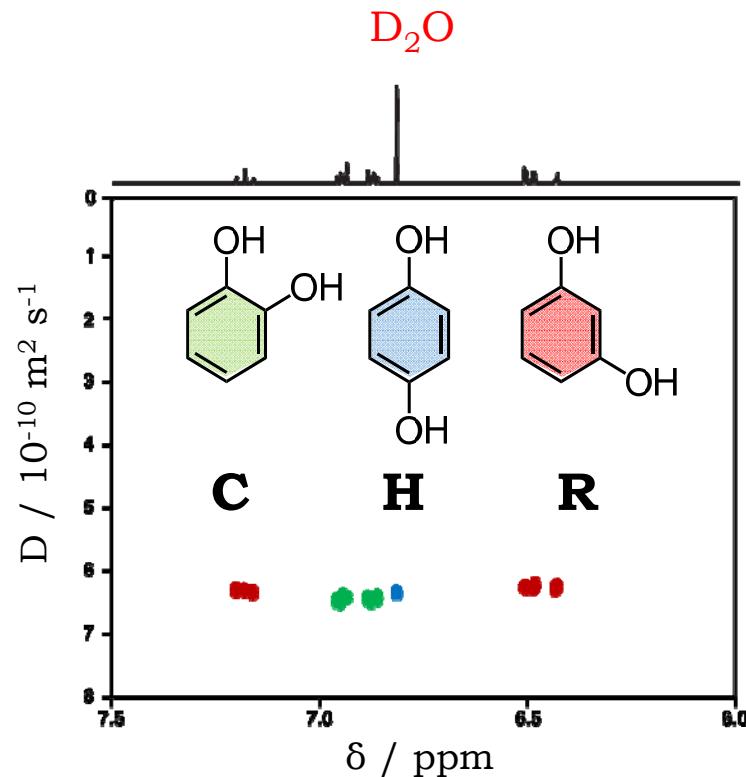
$$D_{\text{aparente}} = f_{\text{interacción}} D_{\text{matrix}} + (1 - f_{\text{interacción}}) D_{\text{libre}}$$



Matrix-Assisted DOSY (MAD)

## Matrix-Assisted DOSY (MAD)

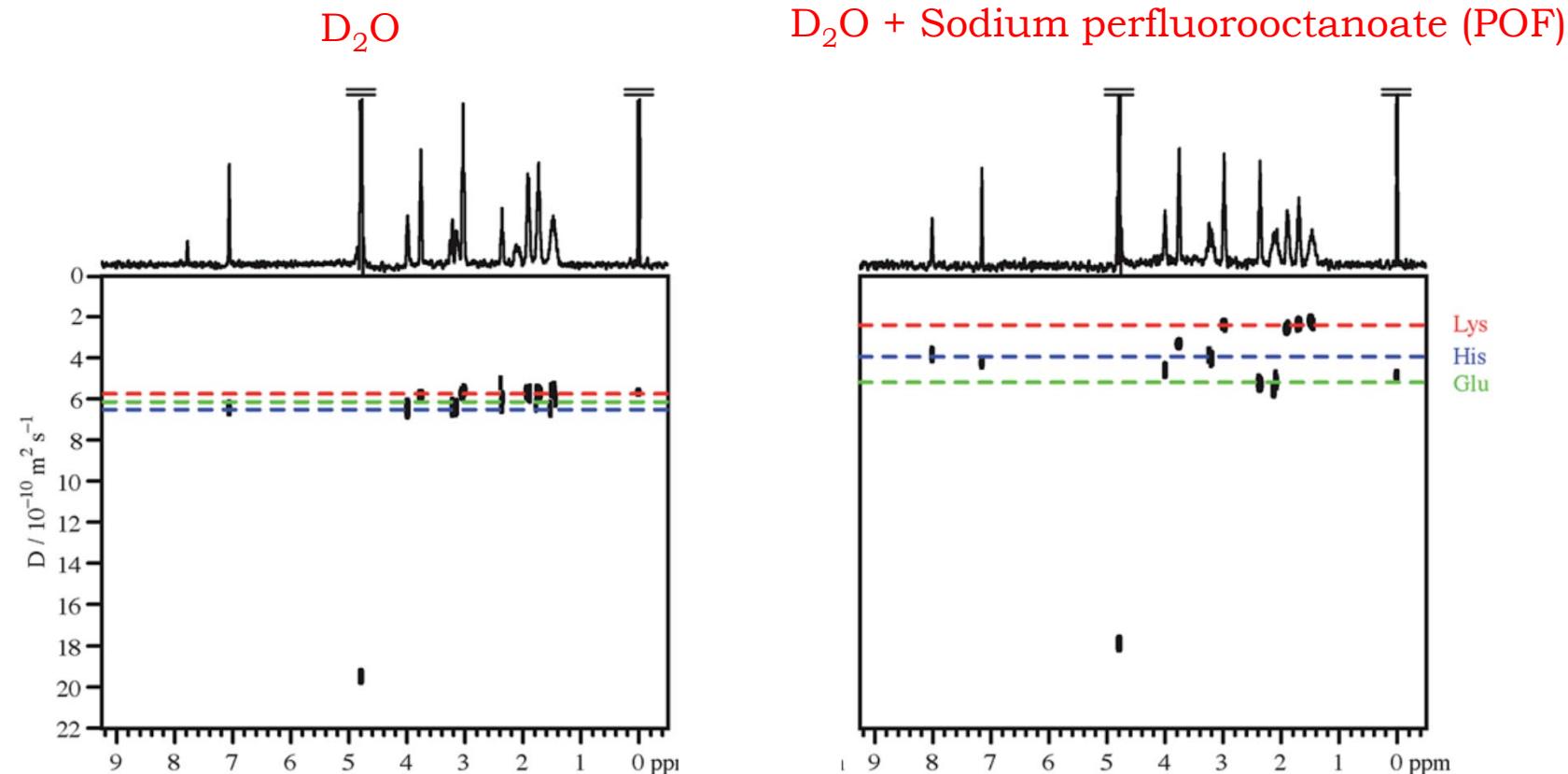
Separación de isómeros mediante la utilización de micelas



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)

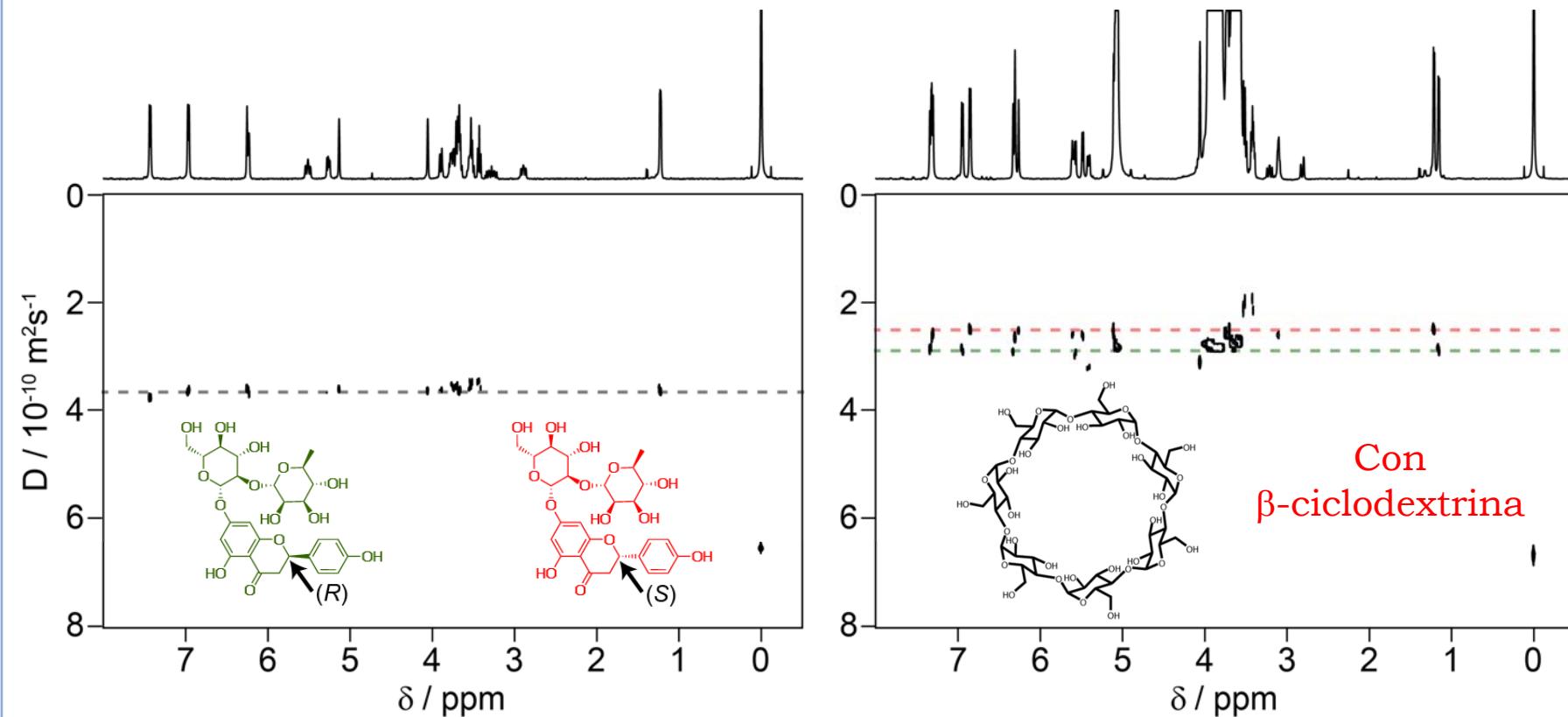
Utilización de micelas invisibles



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  $\beta$ -ciclodextrina permite la separación de los mismos

# Estructura

---

## 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

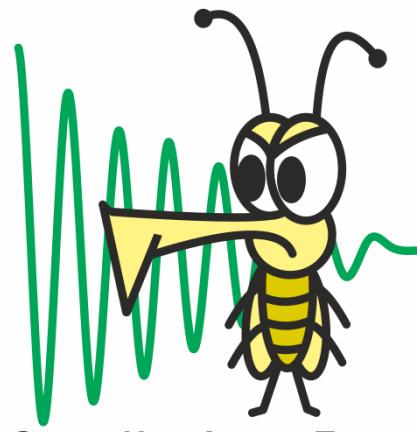
GNAT

MAGNATE

## Softwares para el procesado de los experimentos de difusión

### GNAT

General NMR Analysis Toolbox



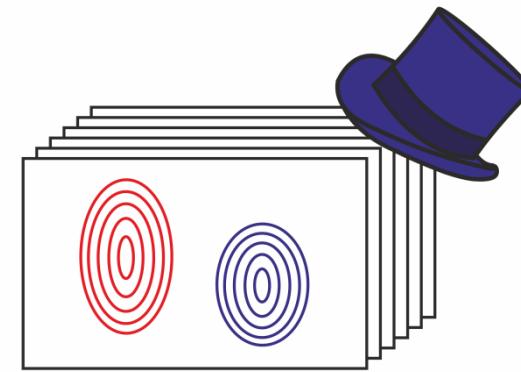
**General NMR Analysis Toolbox**

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

Basado en DOSY Toolbox

### MAGNATE

Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



**magnate**

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

Software libres y gratuitos

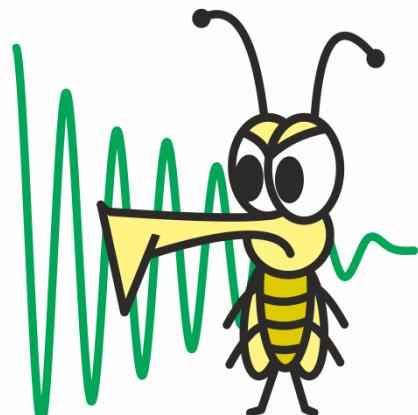
Interfaz de fácil uso para el usuario

MATLAB®

## Softwares para el procesado de los experimentos de difusión

### GNAT

General NMR Analysis Toolbox



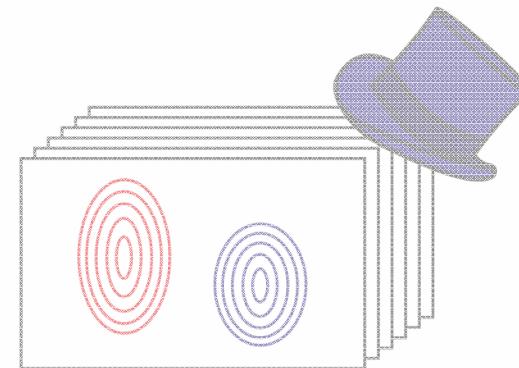
**General NMR Analysis Toolbox**

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

Basado en DOSY Toolbox

### MAGNATE

Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



**maGNATE**

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

Software libres y gratuitos

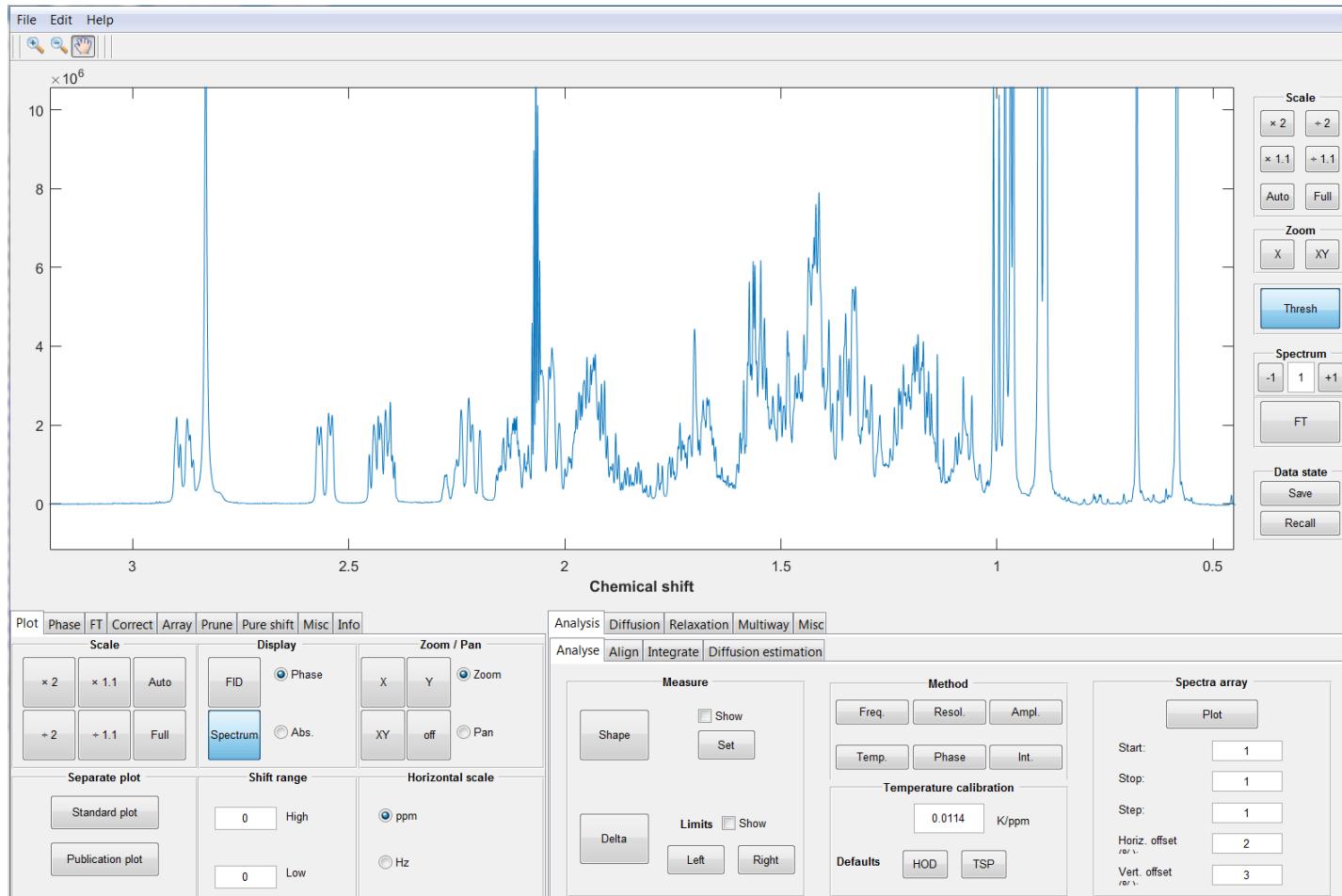
Interfaz de fácil uso para el usuario

MATLAB®



# General NMR Analysis Toolbox

## Ventana principal de GNAT

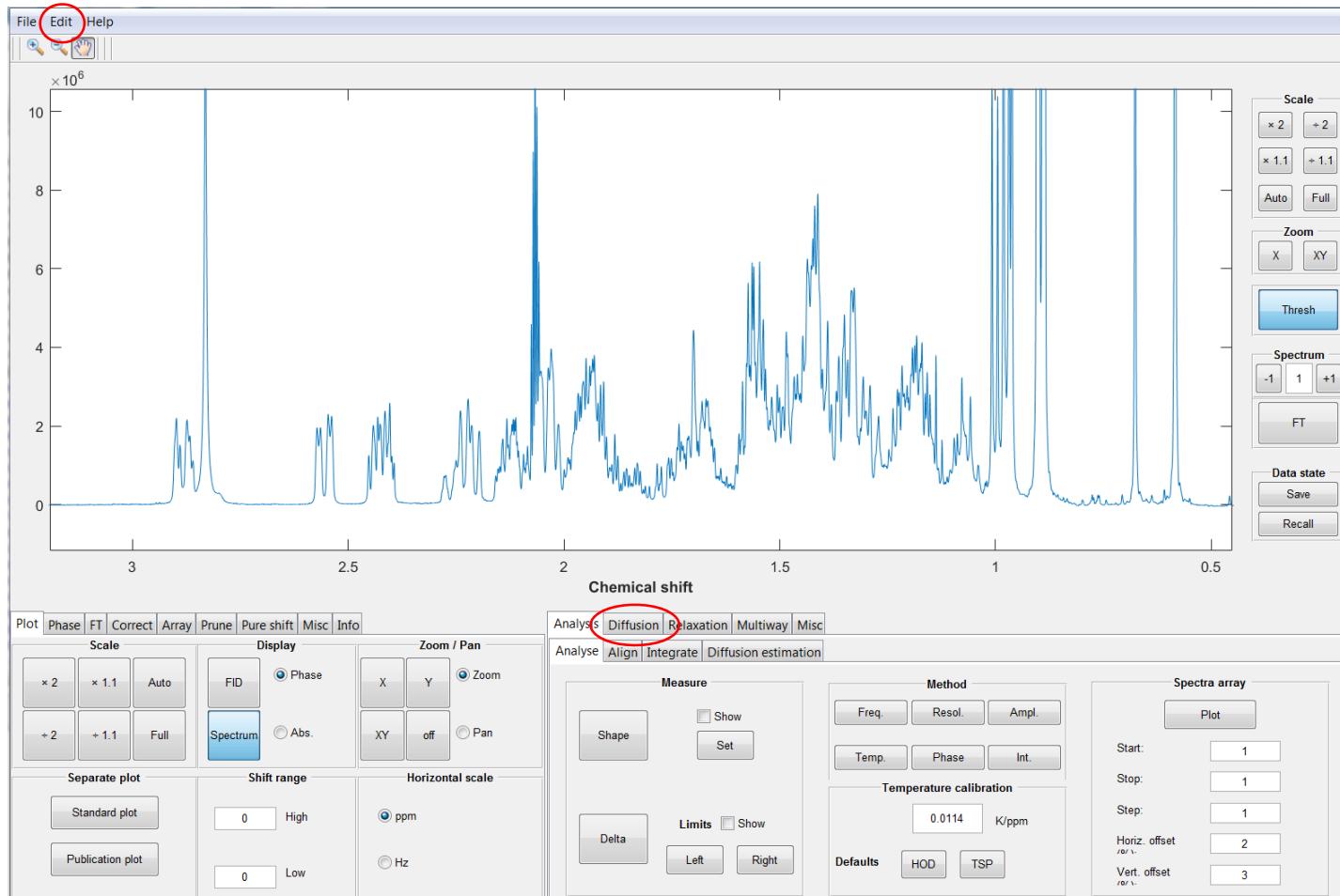


Acceso a todas las funciones de procesado y análisis

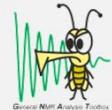


# General NMR Analysis Toolbox

Ventana principal de GNAT

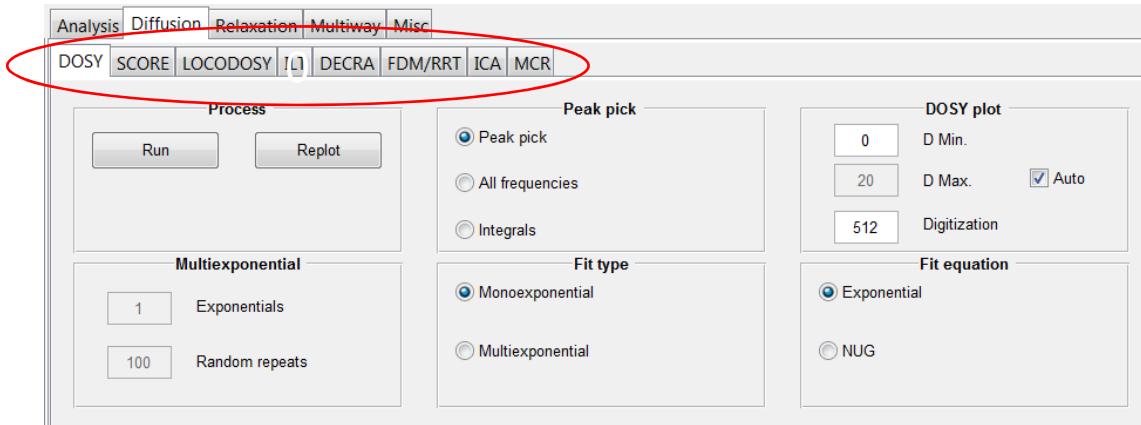


Acceso a todas las funciones de procesado y análisis

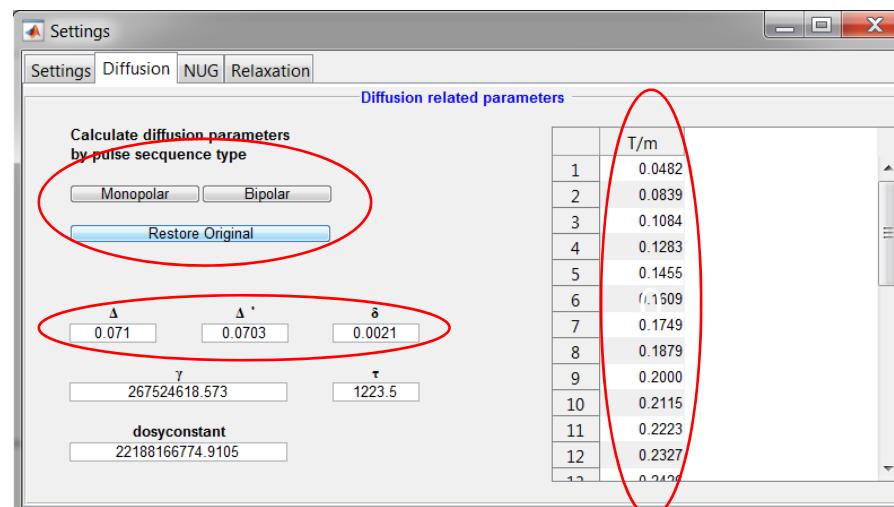


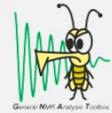
## General NMR Analysis Toolbox

### Análisis univariante y multivariante



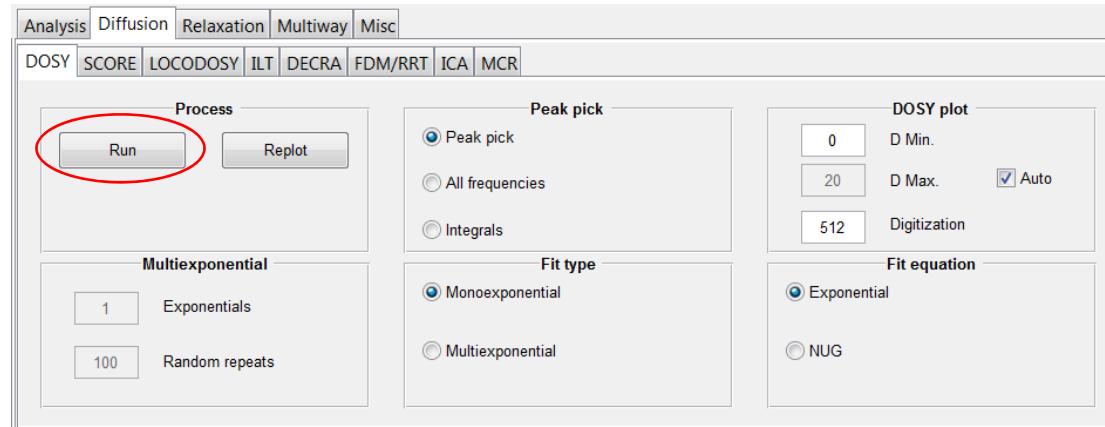
### Parámetros de difusión experimentales



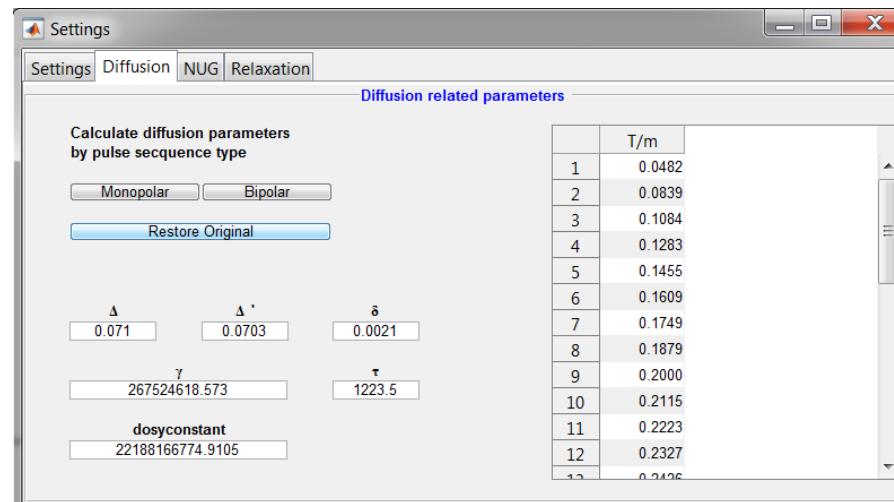


# General NMR Analysis Toolbox

## Análisis univariante y multivariante



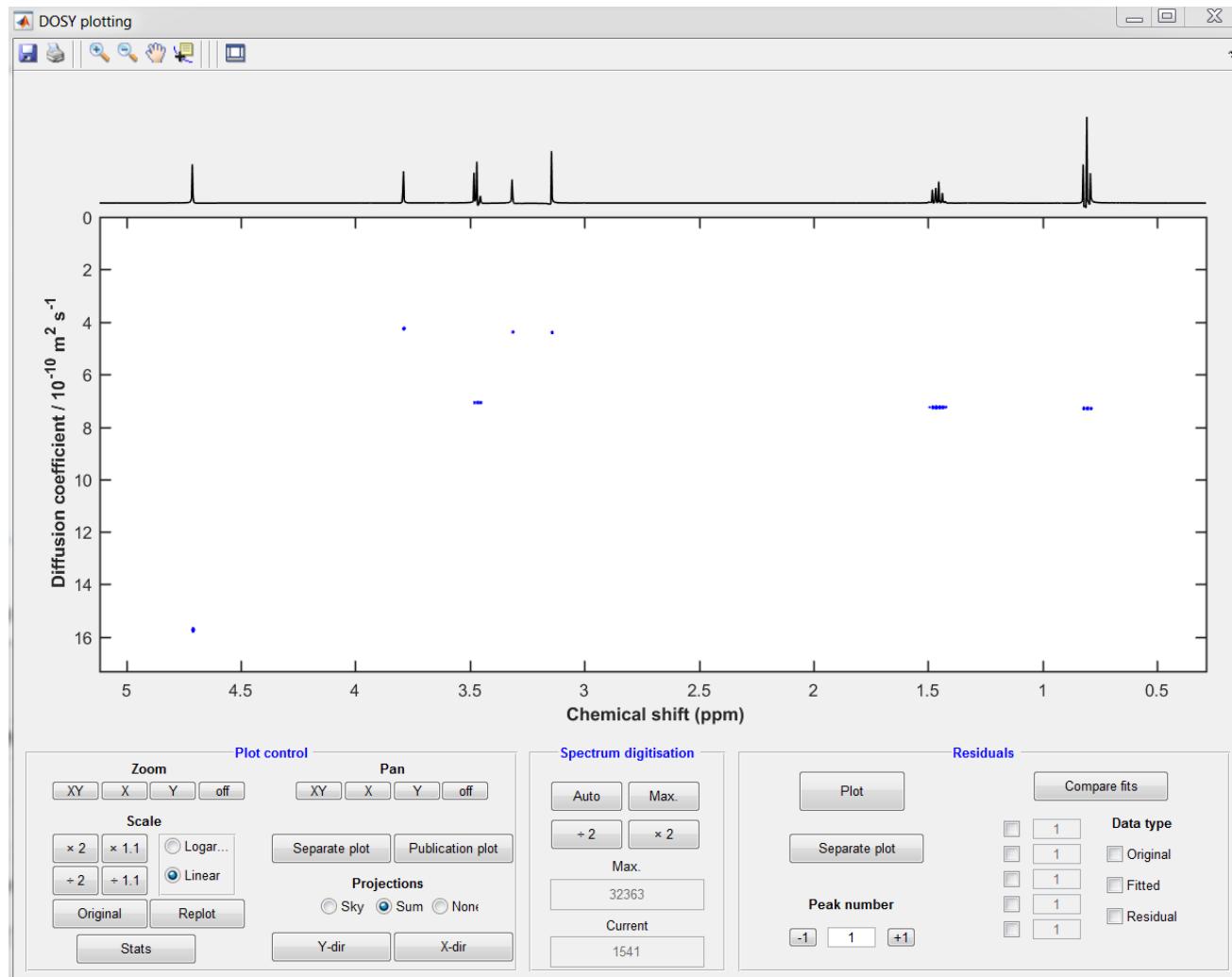
## Parámetros de difusión experimentales





## General NMR Analysis Toolbox

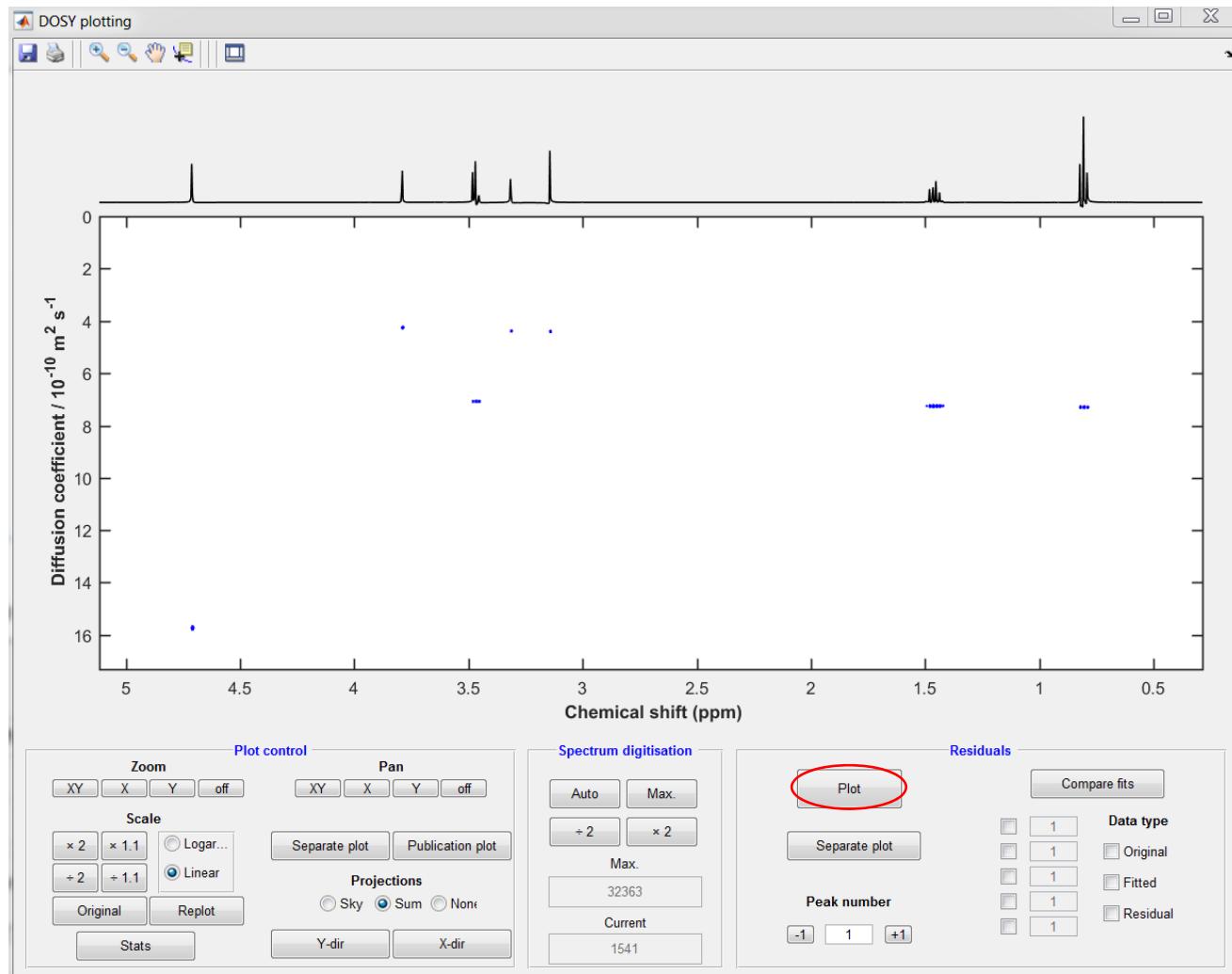
### 2D DOSY - Análisis univariante





## General NMR Analysis Toolbox

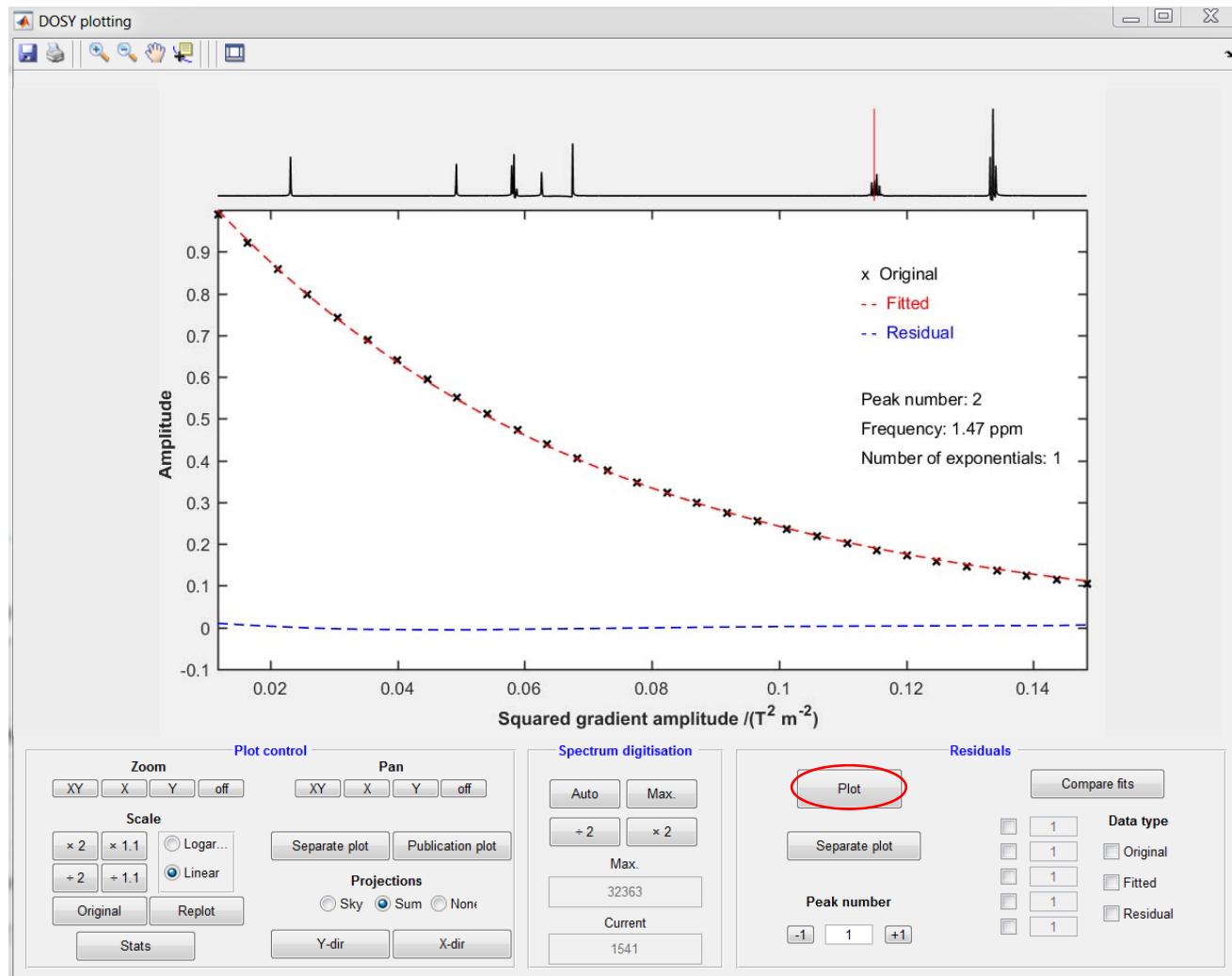
### 2D DOSY - Análisis univariante





## General NMR Analysis Toolbox

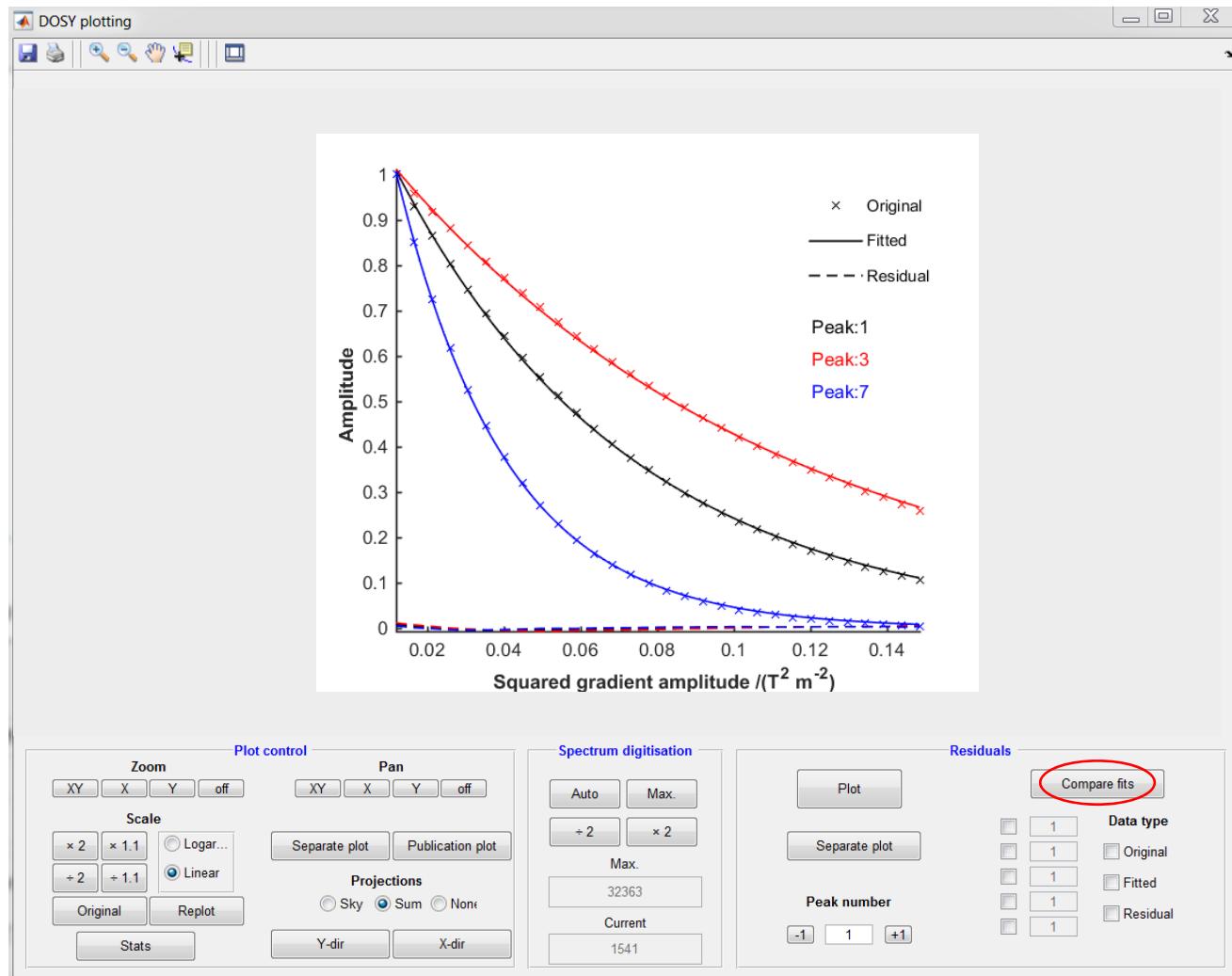
### 2D DOSY - Análisis univariante





## General NMR Analysis Toolbox

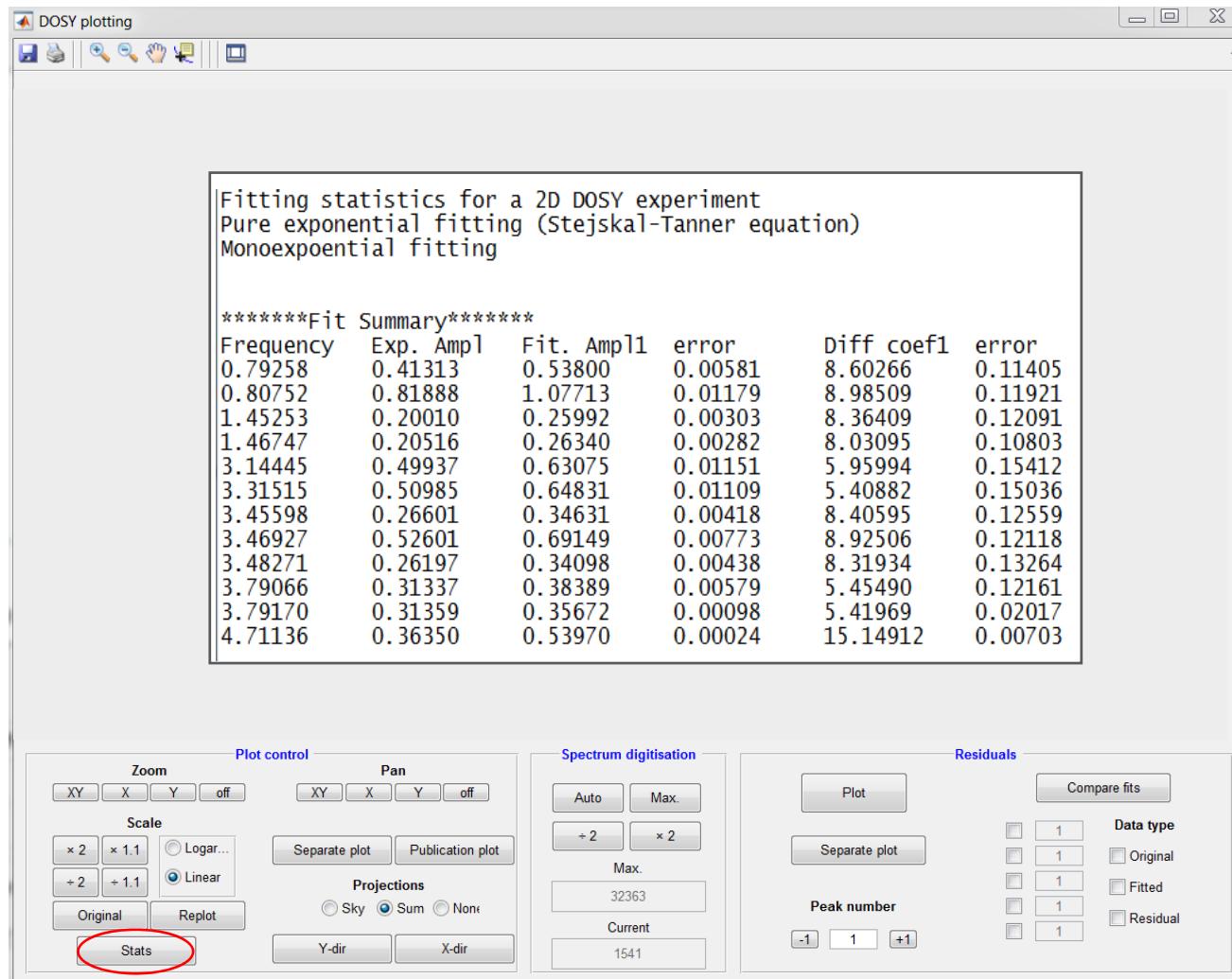
### 2D DOSY - Análisis univariante





## General NMR Analysis Toolbox

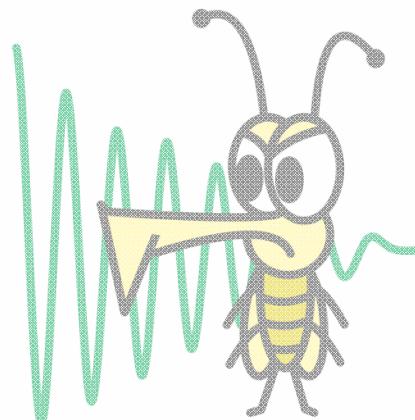
### 2D DOSY - Análisis univariante



## Softwares para el procesado de los experimentos de difusión

### GNAT

General NMR Analysis Toolbox



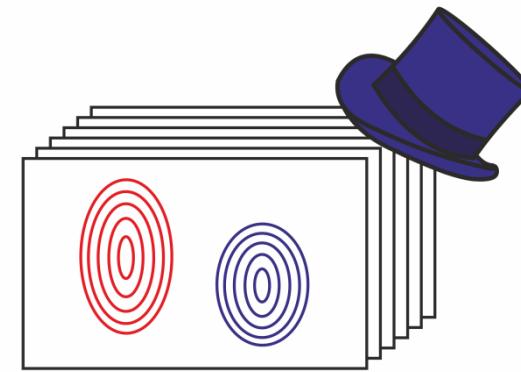
General NMR Analysis Toolbox

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

Basado en DOSY Toolbox

### MAGNATE

Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



maGNATe

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

Software libres y gratuitos

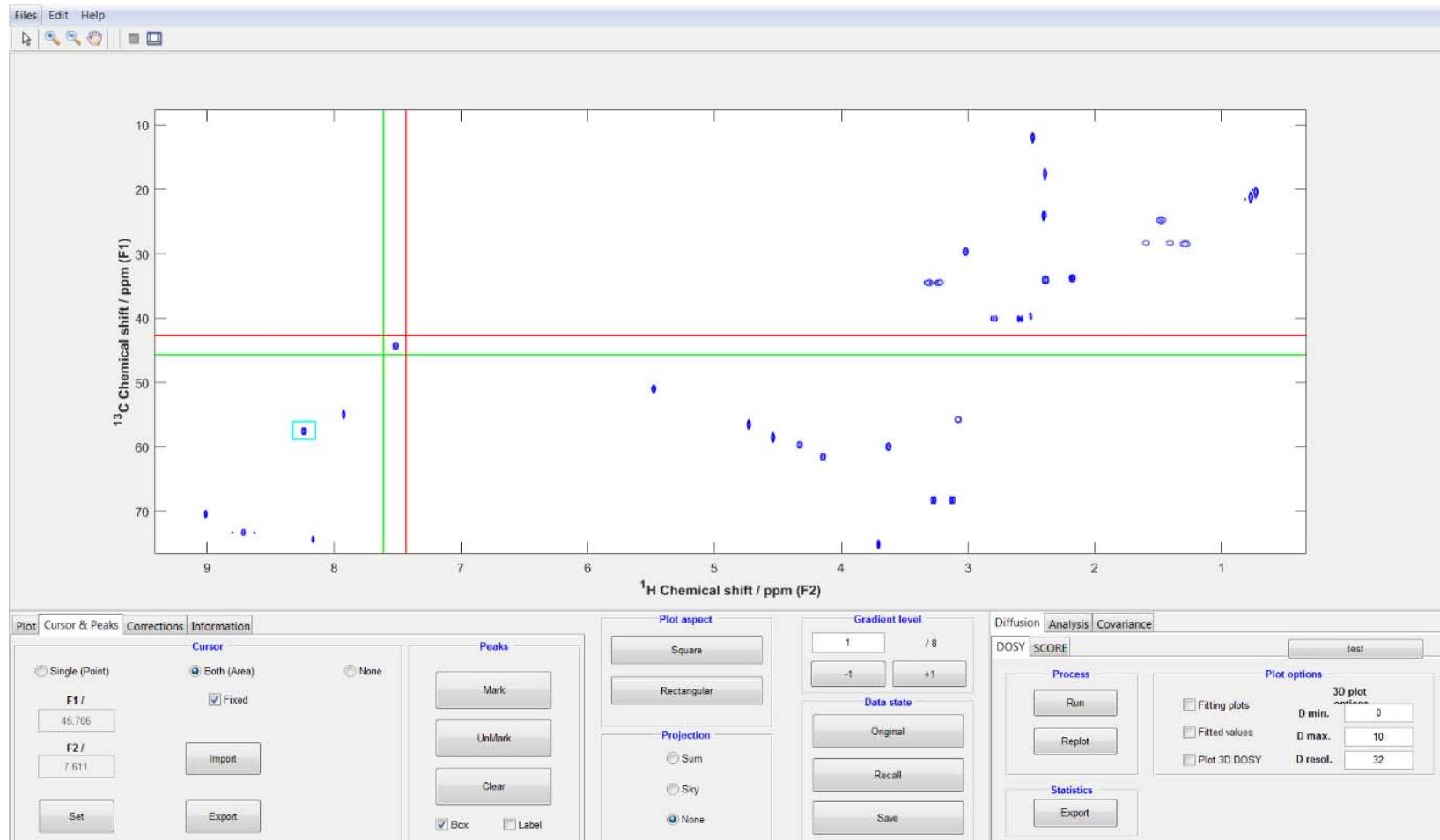
Interfaz de fácil uso para el usuario

MATLAB®

## Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



### Ventana principal de MAGNATE

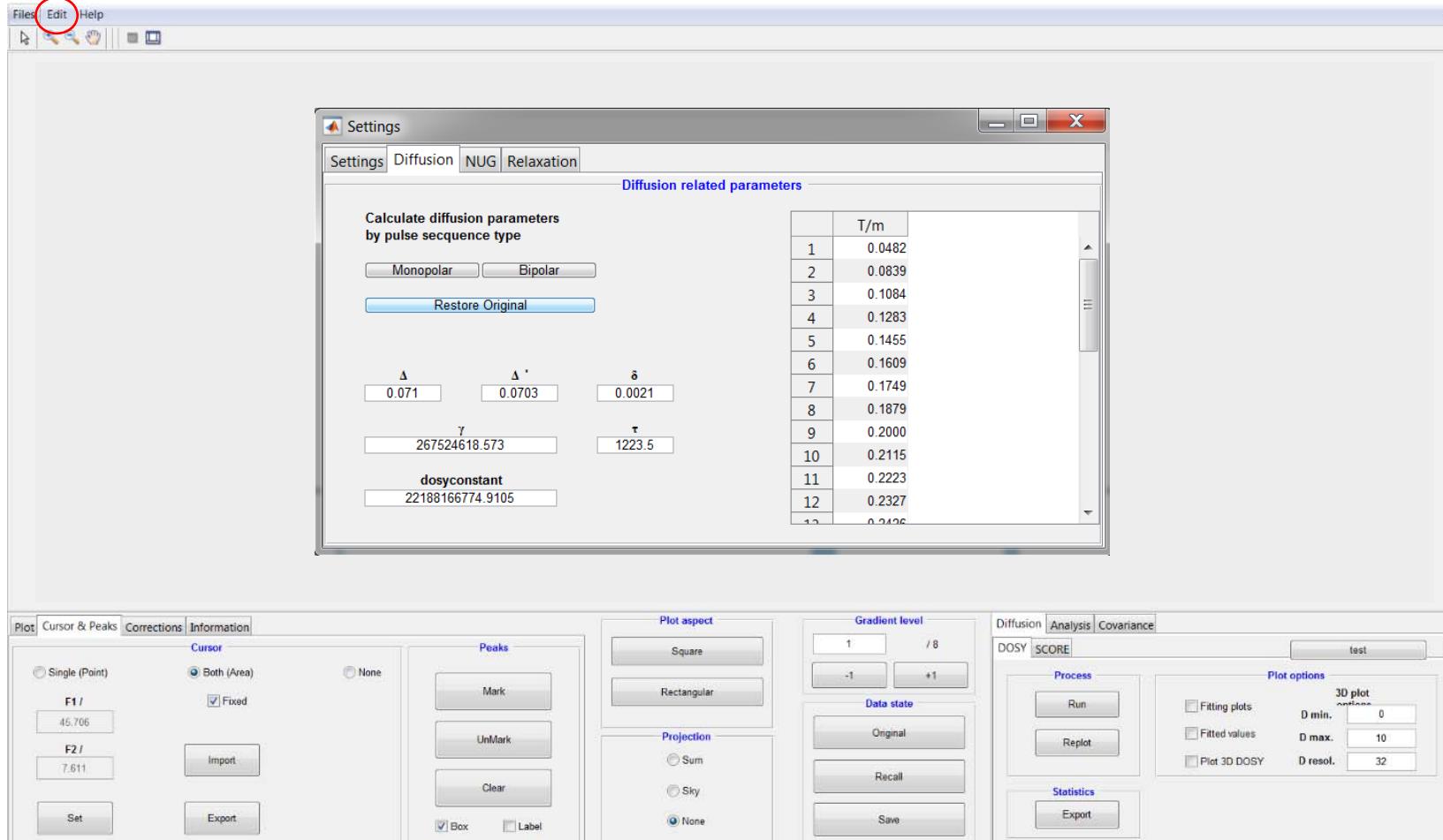


Acceso a todas las funciones de procesado y análisis uni- y multivariante

# Multidimensional Analysis for the GNAT Enviroment



## Ventana principal de MAGNATE

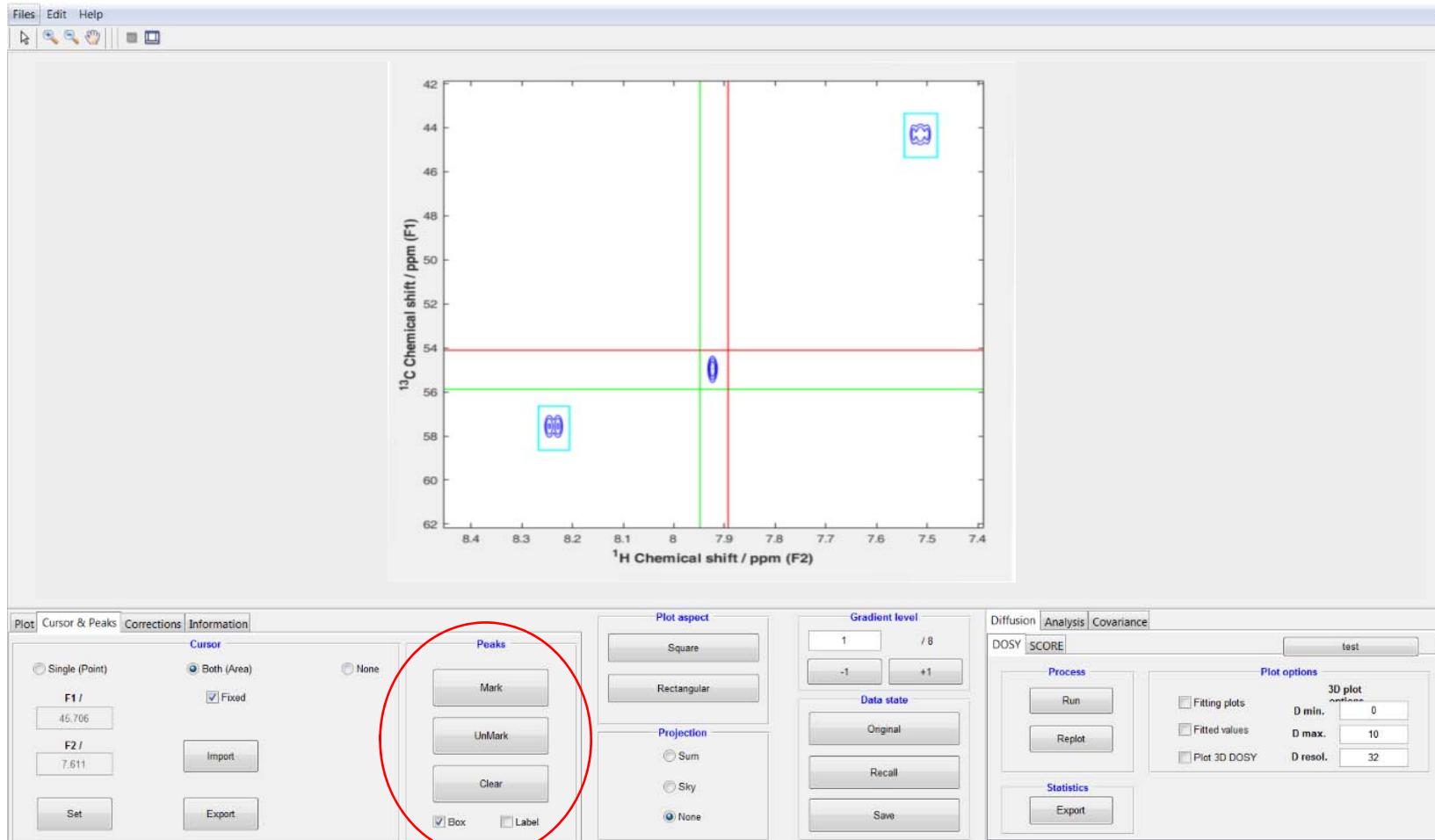


Acceso a todas las funciones de procesado y análisis uni- y multivariante

## Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



### Ventana principal de MAGNATE

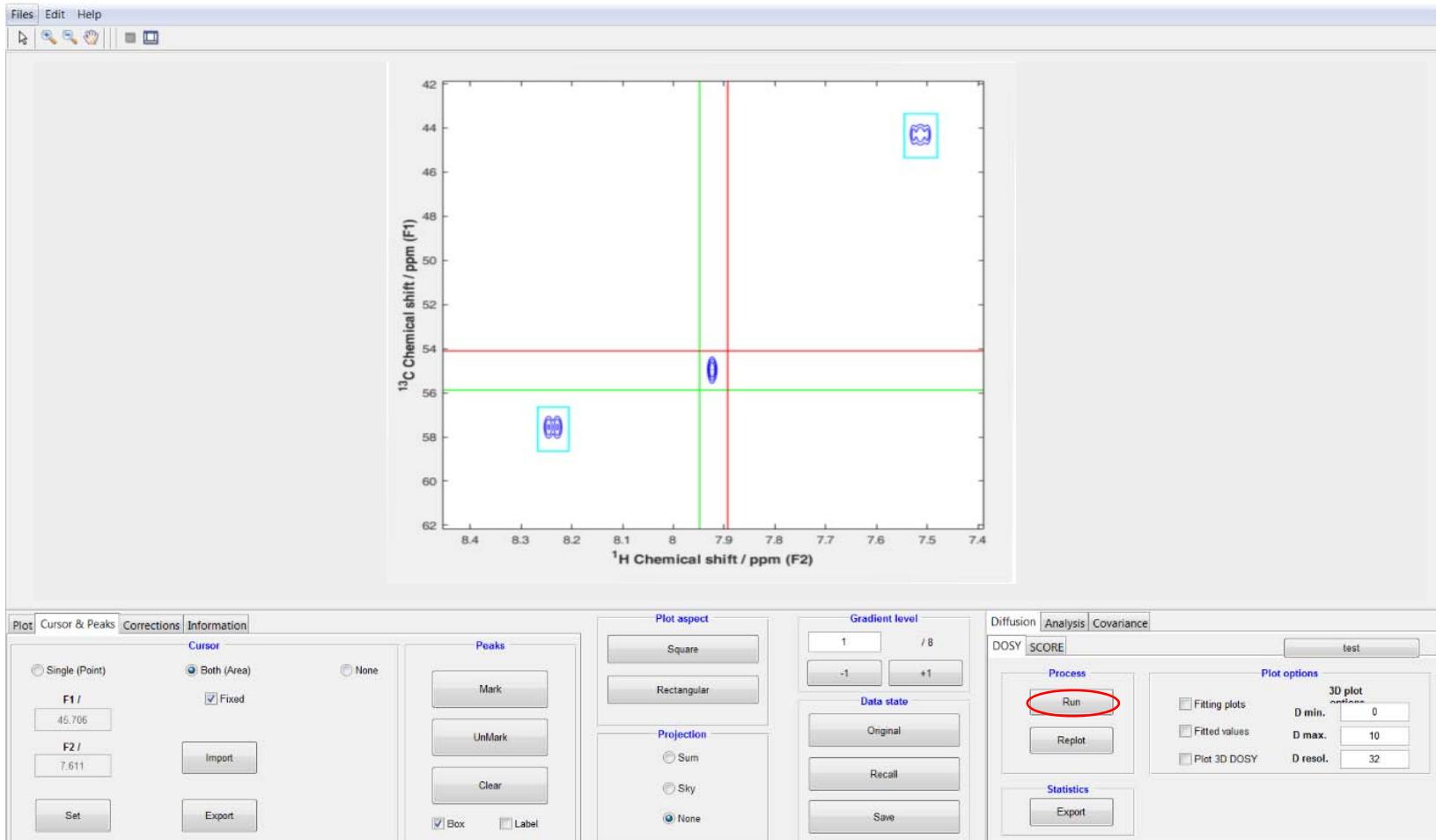


Acceso a todas las funciones de procesado y análisis uni- y multivariante

## Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



Ventana principal de MAGNATE

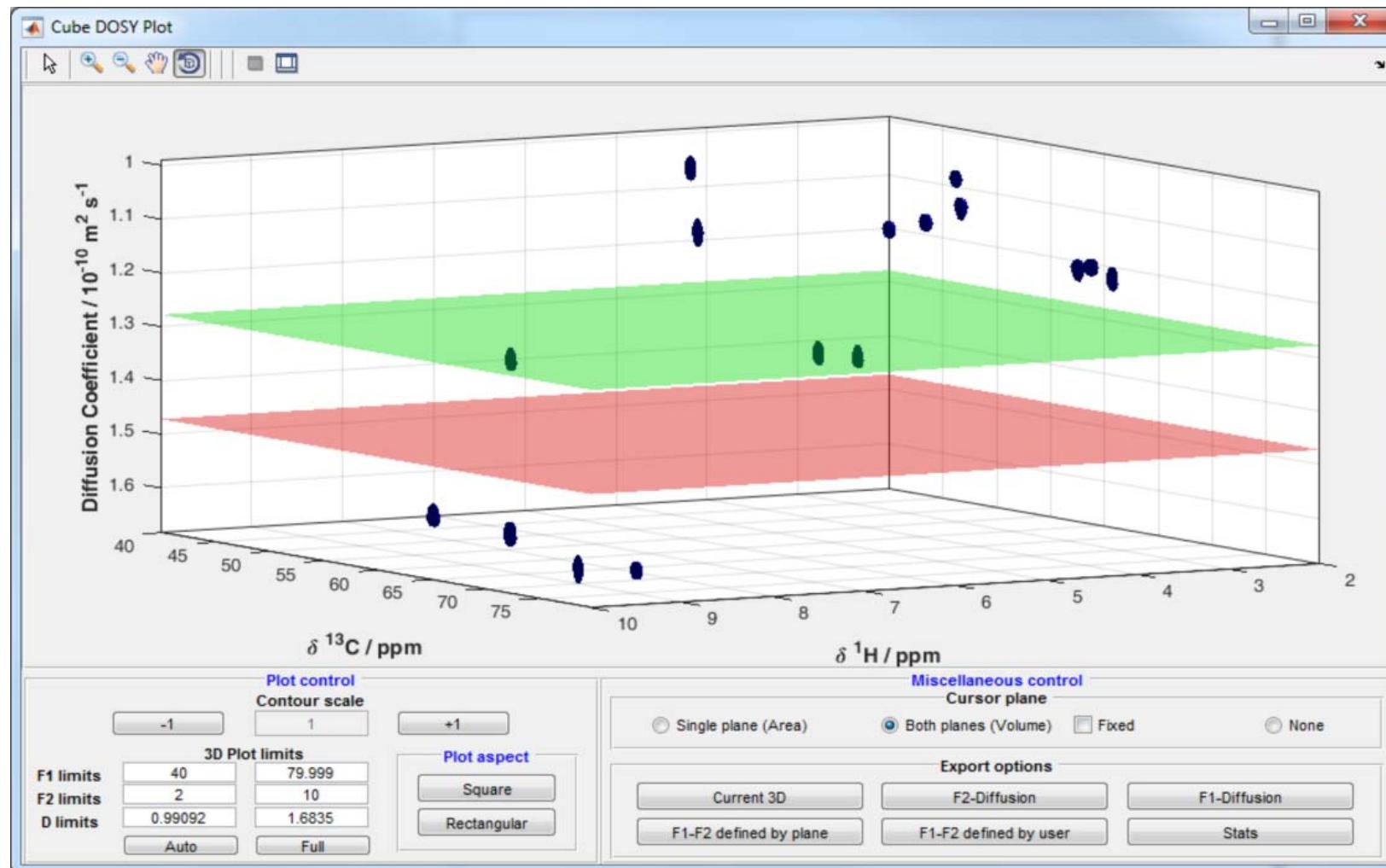


Acceso a todas las funciones de procesado y análisis uni- y multivariante

## Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



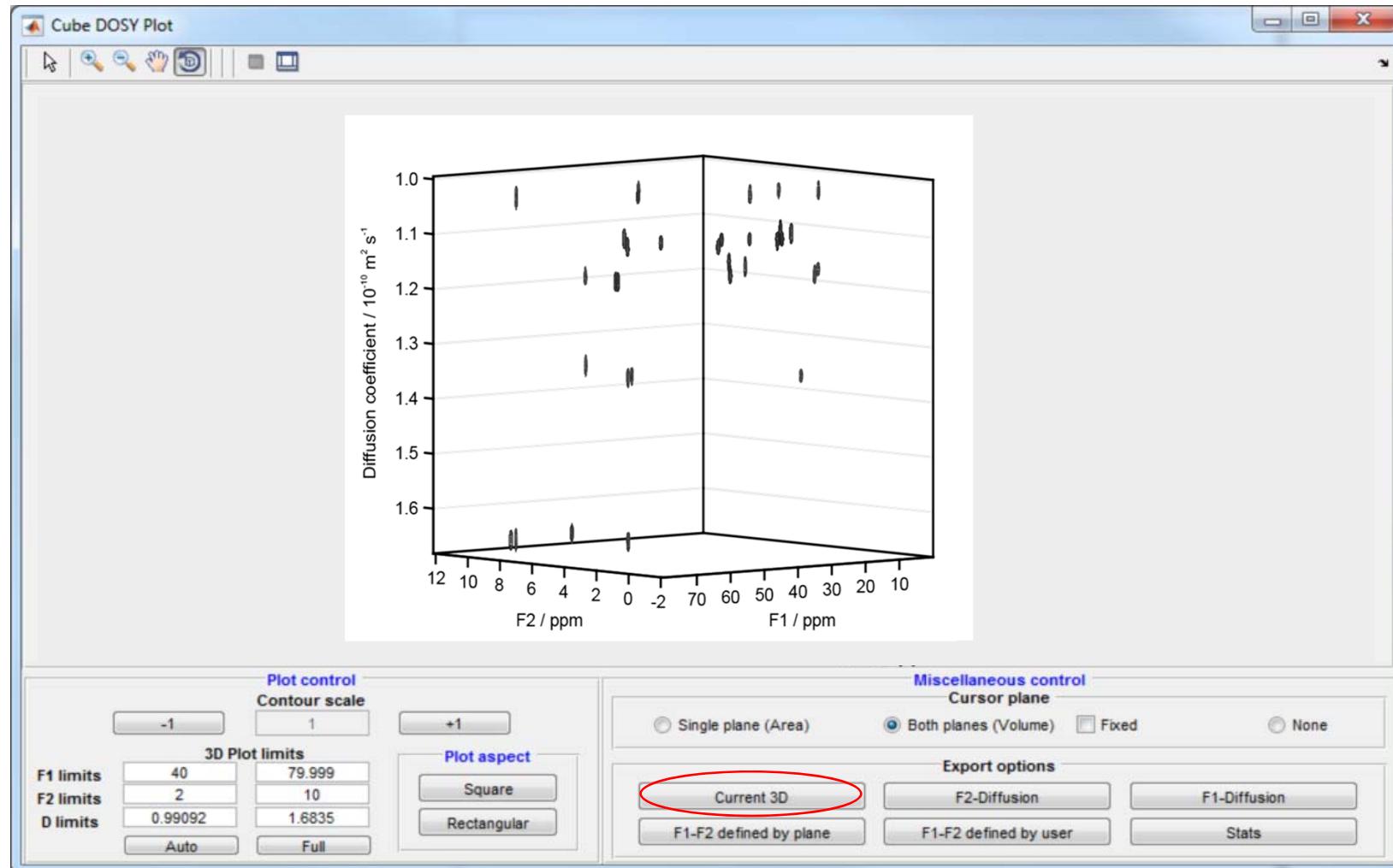
### 3D DOSY - Análisis univariante



## Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



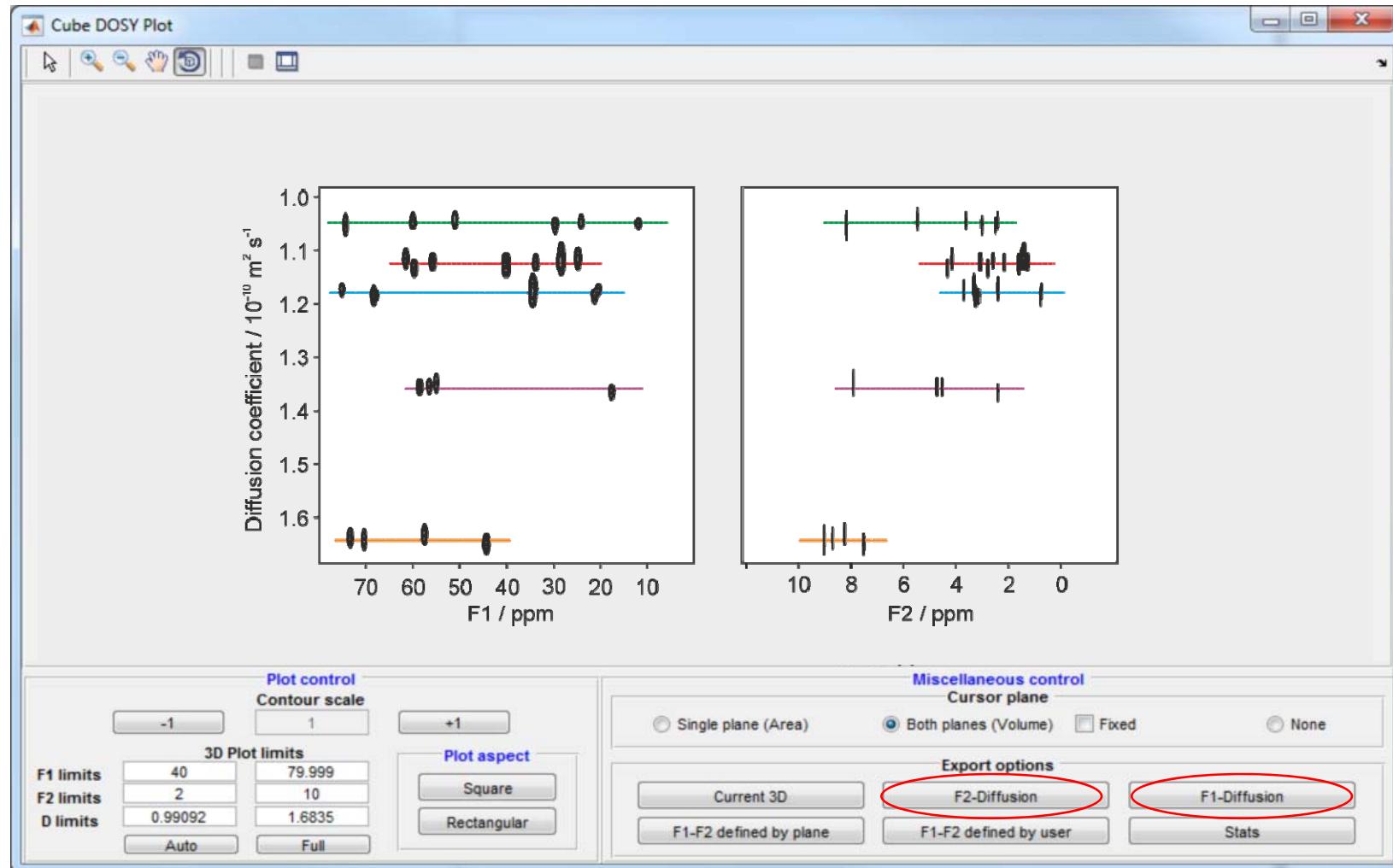
### 3D DOSY - Análisis univariante



## Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



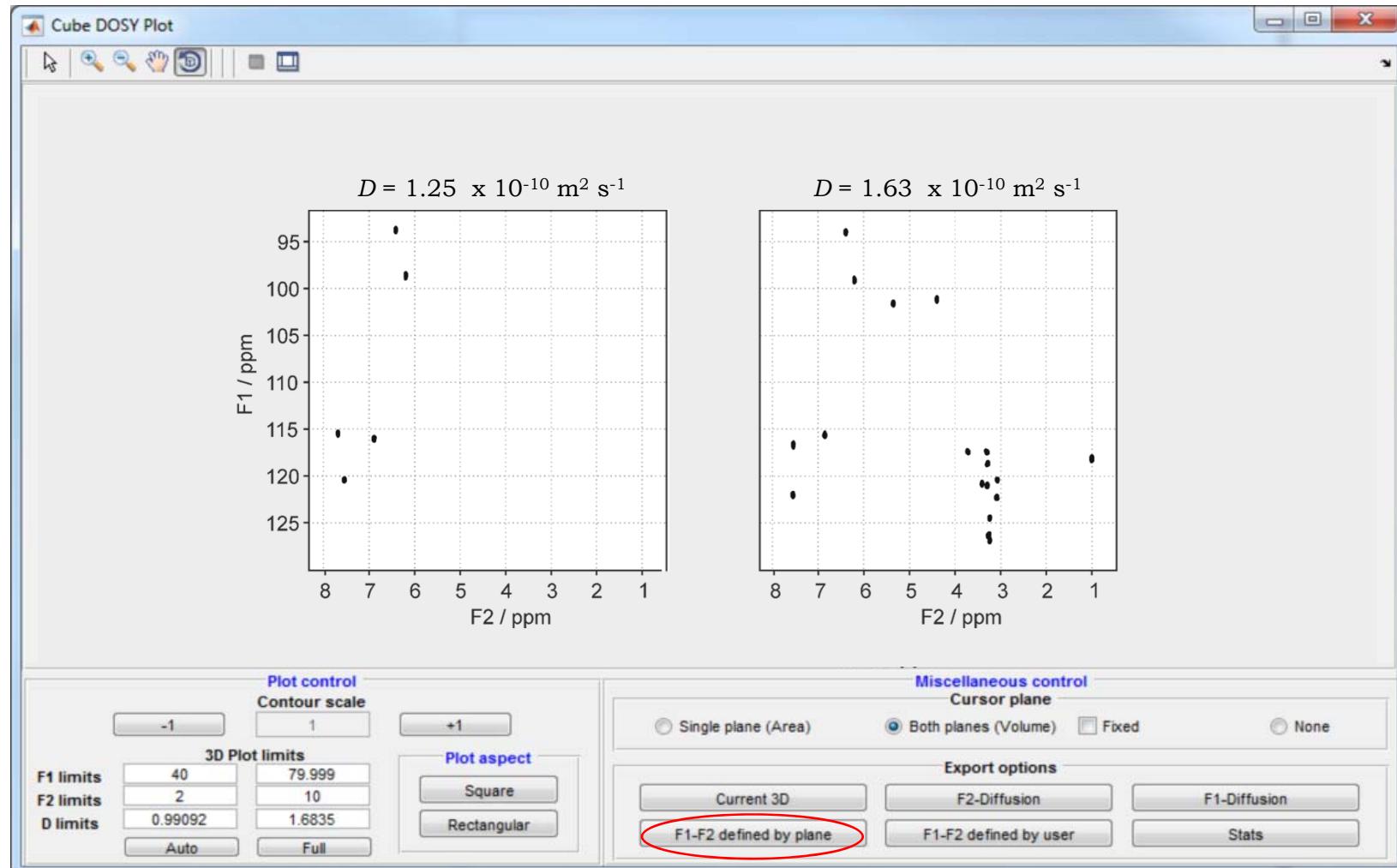
### 3D DOSY - Análisis univariante



## Multidimensional Analysis for the GNAT Environment



### 3D DOSY - Análisis univariante



## Manchester NMR Methodology Group

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

The screenshot shows the homepage of the Manchester NMR Methodology Group. The top navigation bar includes links for Home, Research, People, Publications, Vacancies, Downloads, Software, Login, Search, and Preprints. A blue sidebar on the right contains news items about a diffusion NMR course at UNICAMP, Brazil; the GNAT - General NMR Analysis Toolbox; and the JMR Young Scientist Award.

**Home**

The NMR methodology group is jointly supervised by Gareth Morris and Mathias Nilsson, and currently has 8 members. Our research concerns the development of novel techniques in high resolution NMR spectroscopy, and their application to problems in chemistry, biochemistry, and medicine. In many cases this work leads to new pulse sequences and software tools, some of which are freely available [here](#).

### 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 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

**General NMR Analysis Toolbox**

**maGNATE**

### 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)

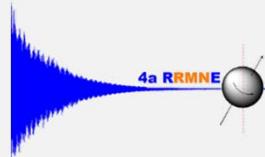
*Concepts Magn. Reson. A* **40A**, 39 (2012)

*eMagRes* (2016) DOI: 10.1002/9780470034590.emrstm1388

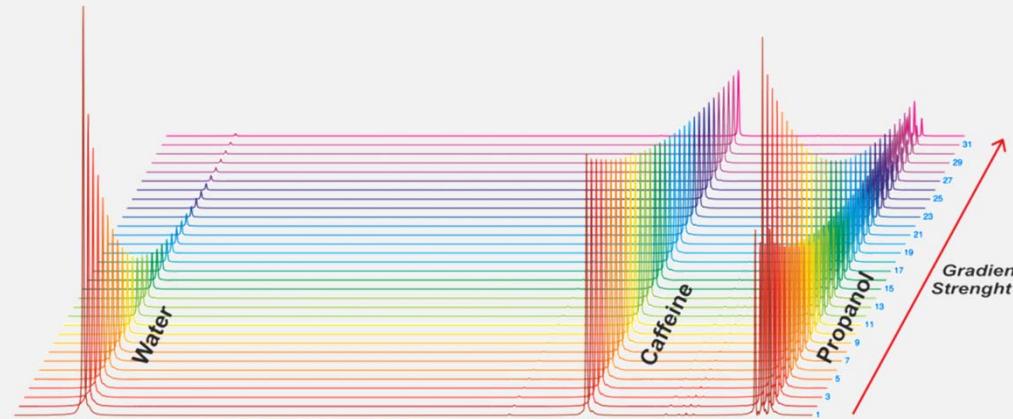
*High-resolution NMR techniques in organic chemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed, Elsevier, Chapter 10 (2016)

*Analyst* **142**, 3771 (2017)

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



# Muchas gracias por su atención



**Laura Castañar Acedo**

[laura.castanaracedo@manchester.ac.uk](mailto:laura.castanaracedo@manchester.ac.uk)

 @laura\_castanar

NMR Methodology group

The University of Manchester, UK